



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

PREPARO E AVALIAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS  
NANOESTRUTURADOS DE EXTRATO LIPOFÍLICO DE BABAÇU  
(*ORBGNYA SP.*)

LILIAN HENRIQUES DO AMARAL

Orientador: Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral

Rio de Janeiro  
2013

LILIAN HENRIQUES DO AMARAL

PREPARO E AVALIAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS  
NANOESTRUTURADOS DE EXTRATO LIPOFÍLICO DE BABAÇU  
(*ORBGNYA SP.*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral

Rio de Janeiro  
2013

A485p Amaral, Lilian Henriques do.  
Preparo e avaliação de carreadores lipídicos nanoestruturados de extrato lipofílico de babaçu (*Orbgnya sp.*) / Lilian Henriques do Amaral; orientador Lúcio Mendes Cabral. — Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2013. 94f. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Carreador lipídicos nanoestruturados. 2. Babaçu. 3. *Orbgnya sp.*  
4. Citotoxicidade. I. Cabral, Lúcio Mendes. II. Título.

CDD 615.32

LILIAN HENRIQUES DO AMARAL

PREPARO E AVALIAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS  
NANOESTRUTURADOS DE EXTRATO LIPOFÍLICO DE BABAÇU  
(*ORBGNYA SP.*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

Orientador:

---

Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Ana Luisa Miranda Palhares  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

---

Prof. Dr. Eduardo Ricci Junior  
Faculdade de Farmácia - UFRJ

---

Profa. Dra Bartira Rossi Bergmann  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

*Aos meus pais, Antônio e Cristina.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço **DEUS**, por me proteger e me guiar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, **Antônio e Cristina**, por todo apoio emocional e financeiro em mais uma etapa cumprida. Por acreditar nos meus sonhos e compreender todos os meus momentos de ausência. E especial a minha **mãe**, pelas incansáveis correções do texto.

A minha família, em especial meu irmão, **Vivian e Wilian**, pelos momentos de descontração e apoiar as minhas decisões e para a minha **tia Penha**, por sempre contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional, pelos ensinamentos, confiança e admiração.

Ao meu orientador, **prof. Dr. Lucio Mendes Cabral**, por todos os ensinamentos, sugestões e ajudas para a realização deste trabalho. Obrigada por todas as oportunidades, por contribuir para o meu amadurecimento profissional e pela confiança depositada em mim.

Ao **prof. Dr. Helvécio Rocha**, por aceitar o desafio de me orientar no estágio em indústria, pela confiança e ensinamentos e por colaborar na realização deste sonho.

A banca de acompanhamento, **profa. Dra. Gisela Dellamora e Ana Luisa Palhares de Miranda**, pelas sugestões e correções dadas durante a realização deste trabalho.

Ao **Sr. Edmond Baruque**, da empresa Tobasa, por gentilmente ceder às amêndoas de babaçu utilizadas no presente trabalho.

Aos amigos de longa data e de sempre **André Abreu, Carla Machado, Cintia Monteiro, Gabriel Norbert, Gabriela Pereira, Gustavo Racca, Natália D'Avila e Nathália Calmon**, por tornar cada encontro, histórias e risadas inesquecíveis, pela amizade e dedicação e por entender todos os momentos de ausência.

Aos meus amigos de Juiz de Fora, que me acompanharam durante o meu crescimento profissional da época de graduação, pelo carinho e dedicação, por sempre ter uma recepção calorosa a cada encontro. E mesmo com a distância, não medir esforços para sempre manterem-se presentes. Em especial **Camila Dornelas, Danilo Costa, Frederico Simões, João Rettore, Moises Alvim, Savio Vieira, Ticiano Muniz**.

As amigadas que conquistei durante o período de mestrado **Alice Simon, Ana Carolina Correa, Narjara Silveira, Roberta Stopilha, Thiago Honório, Túlio Elisiário**. Obrigada por compartilhar os momentos de angústia e desespero e apoio e carinho sempre nos momentos mais difíceis.

A equipe de **alunos e professores do LabTif**, que não mediram esforços para tornar o laboratório cada vez melhor e pelos momentos de descontração. Em especial para as alunas que diretamente colaboraram na realização deste trabalho **Adair Freitas, Carolina Escudini e Samantha Barbosa**.

A **Banca Examinadora** por terem aceitado o convite de participar da defesa desta dissertação.

Aos **funcionários da Faculdade de Farmácia e da Pós Graduação**, que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

A **Capes, CNPq e Faperj** pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

**“Não há nenhuma linha, em que eu não a tenha vivido.”**

(Johann Wolfgang von Goethe)



## RESUMO

Amaral, Lilian Henriques. **Preparo e avaliação de carreadores lipídicos nanoestruturados de extrato lipofílico de babaçu (*Orbignya sp.*)**. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) \_ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

Um nanossistema de matriz lipídica apresenta como vantagem o uso de carrear substâncias lipofílicas. Um exemplo é o carreador lipídico nanoestruturado (CLN) que é produzido a partir de uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos à temperatura ambiente. O babaçu (*Orbignya sp.*) é uma palmeira facilmente encontrada na região norte do Brasil e produz amêndoas ricas em ácidos graxos. Estudos indicam que há relação entre a ingestão de alimentos ricos em ácidos graxos e a prevenção de doenças relacionadas ao processo inflamatório, como, por exemplo, a esclerose múltipla (EM). A EM é uma doença inflamatória crônica em que se observa a destruição da bainha de mielina pela ação, principalmente, de linfócitos e macrófagos. A fim de avaliar a influência do extrato das amêndoas de babaçu sobre macrófagos foram preparados carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e investigou-se a citotoxicidade do sistema produzido frente a células Caco-2 e J774. Para o desenvolvimento dos CLN, inicialmente foram preparadas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) para avaliar condições de preparo. Os CLN foram desenvolvidos a partir da NLS considerada ideal, variando-se a proporção de Compritol ATO 888 e babaçu. Para o CLN selecionado avaliou-se a citotoxicidade frente às células Caco-2 e J774. Visando produzir um sistema estável, avaliou-se o efeito dos crioprotetores glicose (5%), manitol (2,5%) e trealose (2%). A análise qualitativa do extrato de babaçu obtido mostrou-se de acordo com os relatos de literatura. Para o preparo da NLS, determinou-se como condição ideal o tempo de 20 minutos de aplicação de energia ultrassônica de amplitude 80, 5% de porção lipídica e 5% de tensoativo. Baseado no critério de eficiência de encapsulamento (EE) ( $70,8 \pm 8,6\%$ ), tamanho de partícula ( $228,43 \pm 24,82$  m) e índice de polidispersão (Pdl) ( $0,25 \pm 0,031$ ) e potencial zeta (PZ) ( $1,35 \pm 0,69$ ), foi eleito como ideal o 5 CLN. Dentre os crioprotetores testados, o manitol e a trealose mostraram-se promissores segundo valores de tamanho de partícula e Pdl. Os ensaios de

citotoxicidade mostraram que o 5 CLN não desempenhou efeito tóxico frente às células Caco-2, indicando uma segurança para a administração via oral, e provocou a morte celular em macrófagos J774. Este trabalho, portanto, indica que o uso do 5 CLN pode contribuir para o tratamento da EM por promover a morte celular de macrófagos.

## ABSTRACT

Amaral, Lilian Henriques. **Preparo e avaliação de carreadores lipídicos nanoestruturados de extrato lipofílico de babaçu (*Orbgnya sp.*)**. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) \_ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

Nanosystems of lipid matrix have the advantage to career lipophilic drugs. An example is the lipid carrier nanostructured (CLN) which is produced from a mixture of solid and liquid lipid at room temperature. Babassu (*Orbgnya sp*) is a palm found in northern Brazil that produces rich kernel fatty acids. Studies indicate the existence of a relationship between the ingestion of food with fatty acids and the prevention of inflammation related disease as, for example, multiple sclerosis (MS). MS is a chronic inflammatory disease characterized by destruction of the myelin sheath mainly by lymphocytes and macrophages. In order to evaluate the influence of lipophilic extract of kernels babassu in the macrophages CLN were prepared the cytotoxicity of this system against Caco-2 cells and J774 was investigated. The lipophilic extract obtained was characterized according to FTIR and GC-MS. Techniques. The CLN were developed from SLN considered optimal, varying the proportion of Compritol ATO 888 and babassu. For the CLN considered ideal were evaluated the cytotoxicity front of Caco-2 cells and J774 and the effects of cryoprotectants glucose (5%), mannitol (2.5%) and trehalose (2%). Qualitative analysis of the extract babassu obtained was proven to be in agreement with literature reports. For the preparation of NLS, we determined as optimum condition for the preparation time of 20 minutes period of ultrasonic energy amplitude 80, 5% and 5% lipid portion of surfactant. Based on the criteria of efficiency encapsulation EE ( $70.8 \pm 8.6\%$ ), particle size ( $228.43 \pm 24.82$  m), polydispersity index (Pdl) ( $0.25 \pm 0.031$ ) and zeta potencial (PZ) ( $1.35 \pm 0.69$ ) was elected the 5 CLN as ideal. Among the cryoprotectants as mannitol and trehalose proved promising due values of particle size and Pdl. The cytotoxicity assays showed that 5 CLN did not performed toxic effect against Caco-2 cells, indicating safety of oral administration, and was able to induce cell death in J774 macrophages, possibly by induction of necrosis and apoptosis. This study thus indicates that the use of 5 CLN can contribute to the treatment of MS by promoting cell death in macrophages.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> - Representação esquemática de NLS e CLS quanto a organização de estruturas da matriz lipídica e o composto ativo.	24
<b>Figura 2</b> - Ilustração fotográfica da palmeira de babaçu.	26
<b>Figura 3</b> - Representação do fruto da palmeira de babaçu e seus componentes.	27
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática de uma célula de neurônio, um nervo saudável e um nervo danificado pela desmielinização que ocorre na EM.	32
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática da fórmula estrutural do MTT bem como seu produto em reação de redução, o MTT formazan.	35
<b>Figura 6</b> - Imagem obtida por microscopia óptica (40x) de células Caco-2.	36
<b>Figura 7</b> - Imagem obtida por microscopia óptica (40x) de células J774.	37
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática de obtenção de NLS e CLN	45
<b>Figura 9</b> - Espectro de infravermelho do extrato lipofílico de babaçu	52
<b>Figura 10</b> - Cromatograma de íons totais presentes no extrato lipofílico de babaçu obtido	53
<b>Figura 11</b> - Parte do cromatograma dos íons selecionados <i>m/z</i> 127, <i>m/z</i> 158 para o éster do ácido caprílico; <i>m/z</i> 155, <i>m/z</i> 186 para o éster do ácido cáprico; <i>m/z</i> 183, <i>m/z</i> 214 para o éster do ácido láurico; <i>m/z</i> 211, <i>m/z</i> 242 para o éster do ácido mirístico; <i>m/z</i> 225, <i>m/z</i> 256 para o pentadecanoato de metila; <i>m/z</i> 239, <i>m/z</i> 270 éster do ácido palmítico; <i>m/z</i> 267 e <i>m/z</i> 296 para o éster do ácido esteárico.	54
<b>Figura 12</b> - Indicação das formulações 1 NLS a 14 NLS em relação ao tamanho de partícula obtido	57
<b>Figura 13</b> - Espectros de FTIR de Compritol ATO 888, Poloxamer 188 <sup>®</sup> bem como da amostra de 14 NLS obtida.	60
<b>Figura 14</b> - Representação da fórmula estrutural do tensoativo, Poloxamer 188 <sup>®</sup> , e do lipídeo, Compritol ATO 888, utilizados para o preparo das NLS.	61
<b>Figura 15</b> - Termogramas obtidos por DSC dos excipientes, Compritol e Poloxamer 188 <sup>®</sup> e da nanopartícula 14 NLS.	62

<b>Figura 16</b> - Espectros de FTIR do extrato de babaçu, Compritol ATO 888, Poloxamer 188 <sup>®</sup> e formulações 14 NLS e 5 CLN	67
<b>Figura 17</b> - Termogramas obtidos por DSC dos excipientes, Compritol e Poloxamer 188 <sup>®</sup> , e das formulações, 14NLS e 5 CLN, desenvolvidas.	68
<b>Figura 18</b> - Tamanho de partícula (nm) de 5 CLN recém preparado (antes da liofilização), liofilizada sem uso de crioprotetor e liofilizada com os crioprotetores glicose(5%), manitol (2,5%) e trealose (2%).	70
<b>Figura 19</b> - Representação da viabilidade celular, de células Caco-2, expressa em % em relação ao grupo controle (DMEM), das amostras: tampão HBSS, 14 NLS e diluições 1:2 e 1:3 em HBSS, extrato de babaçu puro e na concentração de 5 mg/ml em HBSS e 5 CLN e diluições 1:2 e 1:3 em HBSS. Tempo de ensaio de 3 h (n=6).	72
<b>Figura 20</b> - Representação da viabilidade celular de células J774, expressa em % em relação ao grupo controle (DMEM), das amostras: extrato de babaçu e respectiva diluição em DMEM na proporção 1:20; 14 NLS nas respectivas diluições nas proporções 1:1 e 1:20 e 1:200; 5 CLN nas respectivas diluições 1:1, 1:20 e 1:200. Tempo de ensaio de 24 h (n=6).	75
<b>Figura 21</b> – Gráfico da análise por citometria de fluxo de células J774 tratadas com DMEM, DMEM + LPS, 14 NLS, ou 5 CLN por 24 h.	78
<b>Figura 22</b> - Células J774 tratadas com etanol (OH), ácido palmítico (PA), ácido oleico (AO), ou ácido eicosapentaenoico (EPA) em diferentes concentrações por 24 h. O eixo y, representando feixe de luz frontal (Forward–light scatter) e o eixo x, representando feixe de luz perpendicular (side-light scatter), foram utilizados para indicar respectivamente tamanho e granulosidade das células como mostrado no gráfico de densidade obtido após análise em citômetro de fluxo. Um total de 10000 eventos foi avaliado para cada experimento (Lima <i>et al.</i> , 2006 <sub>a</sub> ).	80

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1</b> - Exemplo de doença autoimune, com respectiva localização e taxa de prevalência.	<b>Página</b> <b>30</b>
--	----------------------------

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> - Indicação de ácidos graxos encontrados no extrato lipofílico de babaçu, com nome vulgar, nomenclatura IUPAC, ponto de ebulição (P.E.), massa molecular (g/mol) e fórmula molecular.	<b>28</b>
<b>Tabela 2</b> - Valores de rendimento obtidos em cada extração.	<b>51</b>
<b>Tabela 3:</b> Indicação do nome vulgar do ácido graxo, fórmula molecular, massa molecular (g/mol) e íons diagnóstico dos produtos da esterificação.	<b>53</b>
<b>Tabela 4</b> - Indicação de condições de preparo das NLS, segundo tempo de preparo, amplitude de energia aplicada, % de lipídeos, % de tensoativo, Tamanho médio (nm) e Pdl.	<b>56</b>
<b>Tabela 5</b> - Dados de tamanho e Pdl nos intervalos de tempo 0, 7, 14 dias das formulações 7 NLS, 8NLS, 10NLS, 13 NLS e 14 NLS.	<b>59</b>
<b>Tabela 6</b> - Indicação de condições de preparo das CLN, segundo tempo de preparo, amplitude de energia aplicada, % de Compritol ATO 888, % extrato de babaçu % de tensoativo, Tamanho médio (nm) e Pdl	<b>64</b>
<b>Tabela 7</b> - Indicação das proporções dos constituintes da matriz lipídica e da EE pelo método direto dos CLN obtidos	<b>65</b>
<b>Tabela 8</b> Indicação das proporções dos constituintes do CLN em massa seca, segundo a EE.	<b>66</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABEM	<i>Associação Brasileira de Esclerose Múltipla</i>
ANVISA	<i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CG	<i>Cromatografia Gasosa</i>
CG-EM	<i>Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectro de Massa</i>
CLN	Carreador Lipídico Nanoestruturado
COX	Ciclooxigenase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria exploratória Diferencial
EE	Eficiência de Encapsulamento
EM	Esclerose Múltipla
Ev	Eletron Volt
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	<i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier</i>
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
INF	Interferon
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	3-(4,5-dimethylethiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
<i>m/z</i>	Massa/carga
NLS	Nanopartícula Lipídica Sólida
P.E.	Ponto de Ebulição
p/v	Peso/volume
PZ	Potencial Zeta
SFB	Soro Fetal Bovino
SC	Sinal de Crescimento
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutico
SNC	Sistema Nervoso Central
VB8	Viscogel B8



## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1 NANOSISTEMAS LIPÍDICOS	20
1.1.1 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	21
1.1.2 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLN)	23
1.1.3 ÁCIDOS GRAXOS	24
1.2 BABAÇU	25
1.3 DOENÇAS AUTOIMUNES	29
1.3.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA	30
1.3.1.1 A ESCLEROSE MÚLTIPLA E OS ÁCIDOS GRAXOS	33
1.4 AVALIAÇÃO PRELIMINAR IN VITRO DE SEGURANÇA E ATIVIDADE BIOLÓGICA	34
1.4.1 ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE CITOTOXICIDADE	35
1.4.2 LINHAGENS CELULARES	36
1.4.2.1 CELULAS CACO-2	36
1.4.2.2 CÉLULAS J774	37
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>39</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO LIPOFÍLICO DE BABAÇU	41
4.2 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DOS CONSTITUINTES PRESENTES NO EXTRATO DE BABAÇU POR CG-EM	41
4.2.1. PARÂMETROS UTILIZADOS NA CG-EM	41
4.2.2 ESTERIFICAÇÃO DO EXTRATO LIPOFÍLICO OBTIDO	42

4.2.3 ANÁLISE QUALITATIVA DOS COSTITUENTES PRESENTES NO EXTRATO DE BABAÇU	43
4.3 PREPARAÇÃO DOS CLN	43
4.3.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA OBTENÇÃO DE CLN	43
4.3.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS PRODUZIDAS	44
4.3.3 OBTENÇÃO DOS CLN	44
4.3.4 AVALIAÇÃO DO TAMANHO E ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE	45
4.3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA (PZ)	45
4.3.6 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	46
4.3.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRA VERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER R (FTIR)	46
4.3.8 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE ENCAPSULAMENTO PELO MÉTODO INDIRETO	46
4.3.9 AVALIAÇÃO DO USO DE CRIOPROTETORES	47
4.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	48
4.4.1 CULTIVO CELULAR	48
4.4.2 TESTE DE CITOTOXICIDADE	49
4.4.3 CITOMETRIA DE FLUXO	50
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
5.1 RENDIMENTOS DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO POR FTIR E CG-EM DO EXTRATO OBTIDO	51
5.2 OBTENÇÃO DE CLN	56
5.2.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DE NLS COMO MODELO PARA PREPARO DE CLN	56
5.2.2 CARACTERIZAÇÃO DA NLS UTILIZADA COMO	59

PROTÓTIPO PARA PRODUÇÃO DE CLN	
5.2.2.1 FTIR 14 NLS	59
5.2.2.2 DSC 14 NLS	61
5.2.3 PREPARO E AVALIAÇÃO DOS CLN SEGUNDO TAMANHO MÉDIO, PDI E PZ	63
5.2.4 EE DO EXTRATO DE BABAÇU NOS CLN	65
5.2.5 FTIR DO 5 CLN	66
5.2.6 DSC DO 5 CLN	67
5.2.7 AVALIAÇÃO DO USO DE CRIOPROTETORES PARA 5 CLN	69
5.3 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITOTOXICIDADE DO 5 CLN	71
5.3.1 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS CACO-2	71
5.3.2 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS J774	74
5.3.3 CITOMETRIA DE FLUXO DE CÉLULAS J774	76
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>82</b>
<b>7 PERSPECTIVAS</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>84</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 NANOSISTEMAS LIPÍDICOS

Um nanosistema ideal com aplicação para a saúde deve apresentar tamanho menor que 1µm e, sobretudo, apresentar alguma vantagem quanto às características físico-químicas e/ou biológicas do material quando não particulado. Com o desenvolvimento da nanotecnologia é possível produzir sistemas carreadores de fármacos com uma ampla variedade de materiais e técnicas (FANTHI, MOZAFARI & MOHEBBI, 2012; GUPTA & KOMPELLA, 2006).

Os nanosistemas que empregam matrizes lipídicas vêm sendo amplamente estudados devido a biocompatibilidade e versatilidade, uma vez que estes sistemas apresentam a possibilidade de emprego para administração de fármacos por via oral, pulmonar, tópica e parenteral (SEVERINO *et al.*, 2012; ÜNER & YENER, 2007 ;WISSING *et al.*, 2004).

A escolha da matriz lipídica, inicialmente, se direciona à melhora da solubilidade de fármacos como os de classe II ou IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB). No entanto, há a possibilidade do uso de matriz lipídica como forma de proteger o composto ativo da degradação, além de reduzir a toxicidade e melhorar a biodistribuição. Os principais nanosistemas desenvolvidos utilizando matriz lipídica podem ser divididos em lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados (ALLEN & CULLIS, 2013; DAS, NG & TAN, 2012; DAS *et al.*, 2011; GUTIÉRREZ *et al.*, 2010; HUYNH *et al.*, 2009).

Os lipossomas são estruturas vesiculares fechadas, formadas por bicamadas fosfolipídicas hidratadas. O interior destas vesículas é constituído por um domínio aquoso. Consequentemente forma-se uma estrutura com porção hidrofílica e hidrofóbica proporcionando aos lipossomas a capacidade de reter compostos de diferentes solubilidades. Os lipossomas utilizados como sistema carreador de fármacos apresentam tamanhos variando de 20 nm a vários micrômetros e são normalmente dispersos num meio aquoso (ATTAMA *et al.*, 2012).

As nanoemulsões são sistemas homogêneos, formados espontaneamente, pouco viscosos e termodinamicamente estáveis. São constituídos por uma mistura de óleo, água, tensoativos e co-solvente. Estes sistemas apresentam dimensões entre a escala micrométrica e nanométrica, transparência óptica, capacidade de veicular fármacos hidrofílicos e lipofílicos (FANTHI, MOZAFARI & MOHEBBI, 2012).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são um tipo de carreadores lipídicos coloidais, constituído de matriz cujo lipídeo mostra-se sólido às temperaturas corporal e ambiente, que contém lipídios e tensoativos de elevada biocompatibilidade (FREITAS & MÜLLER, 1999; SEVERINO *et al.*, 2012).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são NLS de segunda geração. Utilizadas para a liberação de ativos lipofílicos, a matriz lipofílica é constituída por lipídeos sólidos e líquidos à temperatura ambiente (ABDEL-MOTTALEB, NEUMANN & LAMPRECHT 2010; MÜLLER *et al.*, 2002).

Como exemplo de formulação já comercialmente disponível, que consiste em um nanossistema lipídico, tem-se o Ambisome<sup>®</sup>, que contém anfotericina B, e Myocet<sup>®</sup> que contém doxorubicina (ATTAMA *et al.*, 2012).

### 1.1.1 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Comparando as NLS com outros sistemas, como nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas, podemos citar algumas vantagens (MEHNERT & MADER, 2012; FANTHI, MOZAFARI & MOHEBBI, 2012; ÜNER & YENER, 2007):

- Alta eficiência de encapsulamento;
- Evita o uso de solventes orgânicos;
- Possibilidade de produção em larga escala e obtenção de produtos estéreis;
- Possibilidade de controlar o perfil de liberação de fármacos de acordo com a matriz sólida utilizada;
- Degradação lenta, o que permite uma liberação da substância bioativa por tempo prolongado;

-Liberação controlada, podendo gerar uma melhoria na biodisponibilidade do fármaco veiculado e/ou uma vetorização das partículas ao tecido alvo e que tem sido obtida pelo uso de NLS em diferentes vias de administração (ÜNER & YENER, 2007) tais como parenteral com o uso intravenoso, intramuscular ou subcutâneo (BHANDARI & KAUR, 2013; JOSHI & MÜLLER, 2009); oral (DESAI *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2011); retal (SZNITOWSKA *et al.*, 2001); oftálmico (GAN *et al.*, 2013); tópica (BOSE *et al.*, 2013; PADOIS *et al.*, 2011; PARDEIKE *et al.*, 2009).

Como método de obtenção das NLS, as seguintes técnicas podem ser empregadas:

- Homogeneização por forte agitação e aplicação de energia ultrassônica, utilizada para produção em pequena escala. O lipídeo empregado é aquecido à uma temperatura ente 5-10 °C acima da temperatura de fusão e uma solução contendo o tensoativo empregado, aquecida na mesma temperatura do lipídeo, é adicionada. O sistema é mantido sob agitação com aplicação de energia ultrassônica no intervalo de tempo pré-determinado. Após este período, o sistema é resfriado para a obtenção das NLS (DOMB, 1993; DAS *et al.*, 2011; DAS, WAY & REGINALD, 2012; MEHNERT & MÄDER, 2012);

- Homogeneização por alta pressão é empregada para produção em maior escala, não só para carreadores de fármacos como também para obtenção de nutrição parenteral. O lipídeo empregado é aquecido a uma temperatura ente 5-10 °C acima da temperatura de fusão e é adicionada uma solução contendo o tensoativo de escolha. Os homogeneizadores empregados possuem um circuito fechado em que a mistura é submetida a uma pressão alta, entre 100 a 2000 bar, e o sistema é forçado a passar por uma pequena abertura, na escala de micrômetros. A alta pressão do sistema faz com que as partículas obtidas sejam de dimensões nanométricas (FANTHI, MOZAFARI & MOHEBBI, 2012; FREITAS & MULLER, 1998; MEHNERT & MÄDER, 2012);

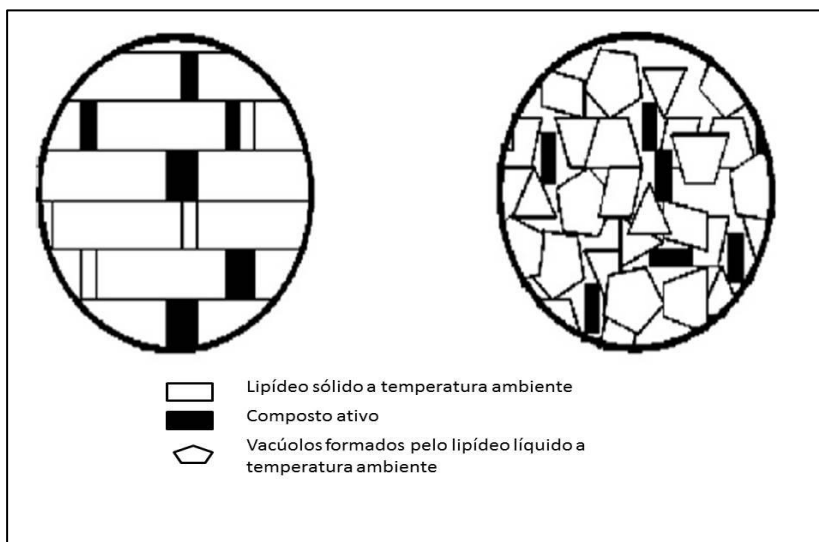
- Emulsificação e evaporação de solvente. O conteúdo lipídico é solubilizado em um solvente orgânico e, em seguida, é adicionada uma solução aquosa do tensoativo utilizado. Após a remoção do solvente, ocorre a precipitação da fração lipídica e conseqüente formação das NLS. Este método

é indicado para fármacos termossensíveis (MEHNERT & MÄDER, 2012; SJÖSTRÖM & BERGENSTÅHL, 1993);

- A técnica de preparo de microemulsão se baseia no princípio da diluição de microemulsão. Uma mistura de lipídeo, solvente, co-solvente e água encontra-se aquecida entre 5 a 10°C acima do ponto de fusão do lipídeo, em proporção que garanta a obtenção de uma mistura opticamente transparente. Geralmente utilizam-se lipídeos com ponto de fusão compreendido entre 65° e 70° C. A microemulsão obtida é vertida em água resfriada a aproximadamente 2° C. Conseqüentemente, o lipídeo solidifica formando a NLS (GASCO & ANTONELLI, 1993; SINHA *et al.*, 2010).

### 1.1.2 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLN)

O modo de preparo destes segue o mesmo procedimento proposto para as NLS. A mistura de lipídeos de diferentes pontos de fusão para a obtenção do CLN ocasiona a obtenção de uma nanopartícula, cujo ponto de fusão é inferior ao ponto de fusão do lipídeo sólido empregado que, dependendo do modo de preparo, pode gerar diferentes tipos de CLN. A matriz lipídica gerada tende a apresentar uma estrutura desorganizada, como observado na figura 1. Este sistema apresenta como vantagem, em relação às NLS, a modulação do perfil de liberação dos fármacos veiculados e uma maior estabilidade dos mesmos (DAS & CHAUDHURY, 2010; DAS, WAY & REGINALD, 2012; MÜLLER *et al.*, 2002).



**Figura 1:** Representação esquemática de NLS e CLS quanto à organização de estruturas de matriz lipídica e o composto ativo (Adaptado de MÜLLER *et al.*, 2002).

### 1.1.3 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos derivados de hidrocarbonetos que diferem pelo comprimento da cadeia carbônica, podendo apresentar de 4 a 36 ( $C_4$  a  $C_{36}$ ) átomos de carbono, e pelo número e localização das insaturações, frequentemente assumindo configuração do tipo *cis* (Z). A configuração *cis* da ligação dupla confere à cadeia do ácido graxo uma rigidez estrutural que influencia sua organização molecular com a redução de suas forças intermoleculares atrativas. Por isso, os ácidos graxos insaturados possuem pontos de fusão menores que os observados em seus análogos saturados (BRUICE, 2006; NELSON & COX, 2008).

Os ácidos graxos formam óleos e gorduras e servem de fonte de armazenamento de energia em organismos vivos. Os óleos vegetais são compostos principalmente por ácidos graxos insaturados, ou seja, que apresentam dupla ligação na cadeia carbônica e, por isso, tendem a ser líquidos à temperatura ambiente (BRUICE, 2006).

Os ácidos graxos também podem ser encontrados como componentes de membranas celulares formando a bicamada lipídica, além de atuar em vias metabólicas, originar carreadores presentes na corrente circulatória e serem precursores de diversos hormônios sintetizados pelo organismo humano (NELSON & COX, 2008).



Os ácidos graxos essenciais correspondem às moléculas que não são sintetizadas pelo corpo humano, portanto devem ser obtidas através da dieta (JIANG, BRYCE & HORROBIN, 1998).

Estudos demonstram que estes compostos apresentam efeitos anti-inflamatórios e apresentam efeitos benéficos para o tratamento de artrite, asma, alergias e doenças de pele. E ainda podem contribuir para a diminuição da incidência e progressão de doenças como esclerose múltipla e lúpus (HENRY *et al*, 2002).

Estudos ressaltam as vantagens na ingestão de substâncias que ajudam na prevenção do câncer. Dentre elas, os ácidos graxos essenciais e não essenciais têm apresentado uma contribuição significativa. Estudos epidemiológicos e, principalmente, experimentais estabelecem relações entre a ingestão de alguns ácidos graxos, como linolêico e  $\gamma$ -linolêico, com a prevenção de câncer de mama, cólon, reto e próstata (ESCRICH *et al.*, 2007; JIANG, BRYCE & HORROBIN, 1998).

Henry e colaboradores (2002) avaliaram o efeito da ingestão de uma dieta rica em ácidos graxos sobre a inibição das enzimas cicloxigenase I e II (COX-I e COX-II) e, conseqüentemente, sobre o processo inflamatório. Concluíram que ácidos graxos saturados e insaturados apresentaram efeitos benéficos como antioxidantes e na inibição do processo inflamatório por exercer ação sobre as enzimas COX.

Uma excelente fonte de ácidos graxos saturados, insaturados e poliinsaturados é o coco obtido da palmeira do babaçu (MACHADO, CHAVES & ANTONIASSI, 2006).

## 1.2 BABAÇU

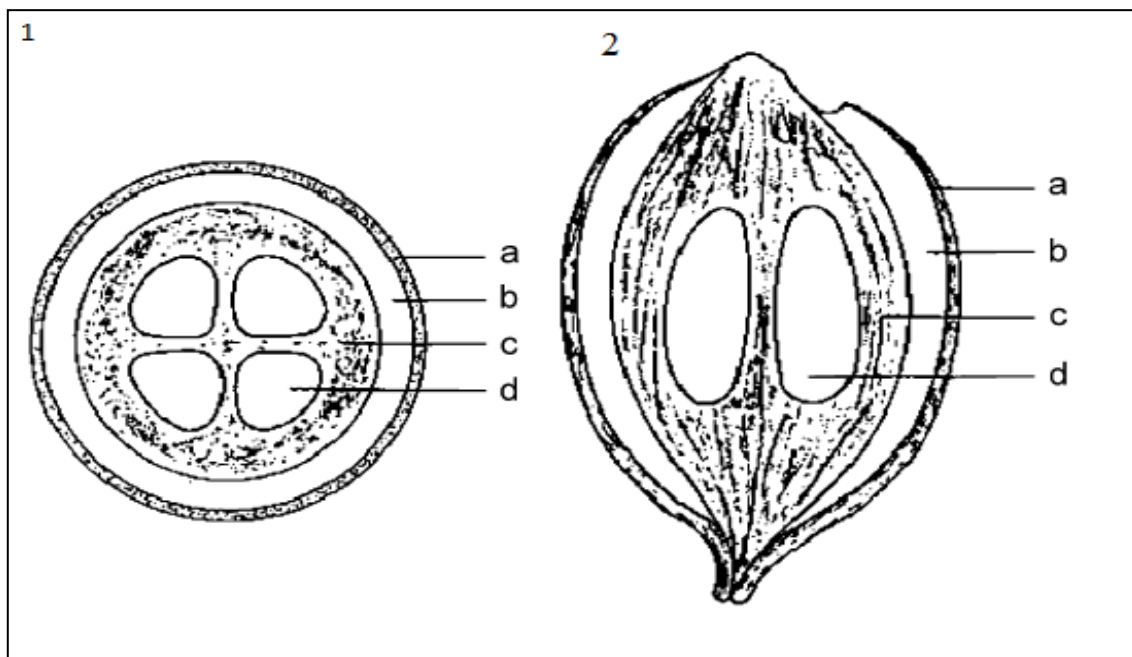
O Babaçu é uma palmeira com aproximadamente 20 metros, facilmente encontrada nas regiões norte e nordeste do Brasil. O nome babaçu refere-se a três diferentes gêneros da família Palmae são eles *Scheelea*, *Attalea* e *Orbigny*. As espécies mais comuns no Brasil são *Orbignya phalerata*, *Orbignya oleifera* e *Orbignya speciosa* (TEXEIRA, 2005; TEXEIRA, 2008). Esta última foi utilizada no presente trabalho.

Esta palmeira produz pequenos frutos (cocos) que se apresentam na forma de cachos, sendo em média 4 cachos por palmeira (figura 2) (TEXEIRA, 2005).



Figura 2: Ilustração fotográfica da palmeira de babaçu. (Fonte: <http://www.panoramio.com/photo/60897378>).

Os frutos possuem formato elipsoide, pesam de 90 a 280 g (figura 3) e exibem uma casca fina, denominada epicarpo, que envolve uma camada de amido secundário, denominada mesocarpo, e no interior do fruto há uma porção de madeira dura, denominada endocarpo, contendo de 3 a 4 amêndoas. A partir destas amêndoas, o óleo e seus constituintes lipofílicos são extraídos (BALICK, 1988; TEXEIRA, 2008).



**Figura 3:** Representação do fruto da palmeira de babaçu e seus componentes, (1- corte transversal e 2- corte longitudinal) epicarpo=a; mesocarpo=b; endocarpo=c; amêndoa=d. (Fonte: EMMERICH, 1989).

As amêndoas correspondem de 6 a 8 % do peso do coco integral e estão envoltas por um tegumento castanho, separadas umas das outras por paredes divisórias. Pesam em média de 3 a 4 g e contêm entre 60 a 68 % de óleo. As amêndoas são os componentes mais utilizados do fruto. Após secas à temperatura ambiente contêm aproximadamente 4 % de umidade, sem que este teor interfira na qualidade do óleo (SOLER *et al.*, 2007).

A Resolução nº482/99 da ANVISA, por meio do Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais, cita que o óleo de babaçu deve apresentar em sua composição química os ácidos graxos indicados na tabela 1.

**Tabela 1:** Indicação de ácidos graxos encontrados no extrato lipofílico de babaçu, com nome vulgar, nomenclatura IUPAC, ponto de ebulição (P.E.), massa molecular (g/mol) e fórmula molecular.

Nome vulgar	Nomenclatura IUPAC	Valores de referência (%)	P.E. (°C)	Massa molecular (g/mol)	Fórmula molecular
Ácido Cáprico	Ácido decanóico	1,2-7,6	270	172	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
Ácido Caprílico	Ácido octanóico	2,6-7,3	239,7	144	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
Ácido Esteárico	Ácido octadecanóico	1,8-7,4	383	284	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
Ácido Láurico	Ácido dodecanóico	40,0-55,0	225	200	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Ácido linoléico	Ácido <i>cis, cis</i> -9,12-octadecadienoico	1,4-6,6	202	280	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Ácido Mirístico	Ácido tetradecanóico	11,0-27,0	250,5	228,37	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Ácido Oleico	Ácido 9-octadecenóico	2,0-9,0	286	282	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Ácido Palmítico	Ácido hexadecanóico	5,2-11,0	215	256	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>

Fonte: ANVISA, 1999; SANTOS, 2008.

O babaçu é uma planta importante para a subsistência de comunidades indígenas do cerrado e da região amazônica brasileira. Estudos apontam diferentes possibilidades de uso que foram divididas em categorias distintas: consumo das amêndoas *in natura* para alimentação ou ainda o óleo obtido da amêndoa no preparo dos alimentos; uso do óleo obtido da amêndoa como cosmético para cabelo e pele; o uso das folhas como cobertura de tetos e paredes na construção de moradia; o uso de folhas e casca de frutos na fabricação de utensílios domésticos; e o uso do óleo obtido da amêndoa, puro ou misturado com urucum para emprego em ritual religioso (GONZALEZ-PEREZ *et al.*, 2012; SOUZA, 2012).

Souza e colaboradores (2011<sub>a</sub>) avaliaram o emprego dos derivados do babaçu pela população de uma comunidade de quebradeiras de coco de babaçu do Maranhão/Brasil. Observou-se que os produtos derivados de babaçu mais utilizados para fins medicinais eram o mesocarpo, um resíduo denominado "borra" e o óleo. A farinha de mesocarpo era utilizada por 90% dos entrevistados para tratamento da gastrite e inflamação e 77% para leucorréia. A borra era utilizada principalmente para o tratamento de feridas (60%) e o óleo para cicatrização de feridas (16%) e leucorréia (8%).

A partir da farinha do mesocarpo, Silva e Parente (2001) prepararam um extrato contendo polissacarídeos, principalmente glucanos, e comprovaram que em ratos este extrato apresentava aumento da atividade fagocítica e atividade anti-inflamatória. Nascimento e colaboradores (2006) também observaram que, em modelo animal, o extrato aquoso obtido a partir da farinha do mesocarpo do babaçu foi capaz de induzir a produção de mediadores inflamatórios, comprovada pela presença de macrófagos peritoneais ativados nos animais tratados com o extrato estudado.

Souza e colaboradores (2011)<sub>b</sub> avaliaram a ação de nanocompósitos contendo argila viscogel B8 (VB8) e extrato lipofílico obtido a partir das amêndoas do babaçu. Foi possível comprovar que este extrato apresentou ação, *in vitro*, em células de hiperplasia prostática benigna por reduzir a proliferação e induzir a necrose e celular. Além disso, foi avaliada a toxicidade aguda em animais. Ao final de 10 dias consecutivos da administração oral de 100 mg/kg do nanocompósito, os animais não demonstravam sinais de alterações comportamentais e lesões gástricas.

### 1.3 DOENÇAS AUTOIMUNES

Tolerância imunológica refere-se a não reatividade imunológica frente a um determinado antígeno específico. Desta forma, a auto-tolerância imunológica é uma propriedade fundamental do sistema imune que garante que não haverá uma resposta imune frente aos antígenos próprios. Uma falha desse sistema de auto-tolerância desencadeia uma resposta imune com ativação de linfócitos frente ao próprio organismo, ocasionando uma doença autoimune (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012).

Sendo assim, as doenças autoimunes podem ser relacionadas a (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2010; UEDA *et al.*, 2003; MARRACK *et al.*, 2001):

- Falha no mecanismo de auto-tolerância em células B e T, que pode levar a um desequilíbrio entre ativação dos linfócitos e o mecanismo de controle;
- Susceptibilidade genética e fatores ambientais, como infecções e lesões teciduais;

- Localização restrita a apenas um órgão ou sistêmica, dependendo da distribuição do antígeno alvo;
- Participação de vários mecanismos de resposta imune envolvidos;
- Evolução crônica e progressiva;
- Infecções virais e bacterianas, que podem contribuir para o desenvolvimento de uma resposta imune exacerbada;
- Alterações em tecidos causadas por processos inflamatórios, isquemia, injúrias ou traumas podem levar a uma exposição de auto antígenos;
- Alterações hormonais.

Existem mais de 40 doenças autoimunes identificadas, com número considerável de pacientes acometidos. No quadro 1 estão apresentadas algumas das doenças autoimunes, bem como o tecido/órgão atingido e prevalência.

QUADRO 1: Exemplo de doença autoimune, com respectiva localização e taxa de prevalência.

Doença	Tecido /órgão Alvo	Prevalência (%)
Tireoidite (auto imune)	Tireoide	1,0-2,0
Doença celíaca	Estômago	0,2-1,1
Vitiligo	Melanócito	0,4
Diabetes Tipo 1	Células $\beta$ do pâncreas	0,2-0,4
Esclerose múltipla	Neurônios do cérebro e medula espinhal	0,01-0,15
Artrite reumatoide	Articulações, pulmões, coração etc.	0,8
Doença de Graves	Tireoide	0,2-1,2

(FONTE: MARRACK et al, 2001).

### 1.3.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA

A Esclerose Múltipla (EM) é a causa mais comum de incapacidade neurológica em jovens, sendo diagnosticada entre 20 e 50 anos de idade, afetando aproximadamente 1 em cada 1000 pessoas na Europa e América do Norte (PUGLIATI, SOTGIU & ROSATI, 2002).

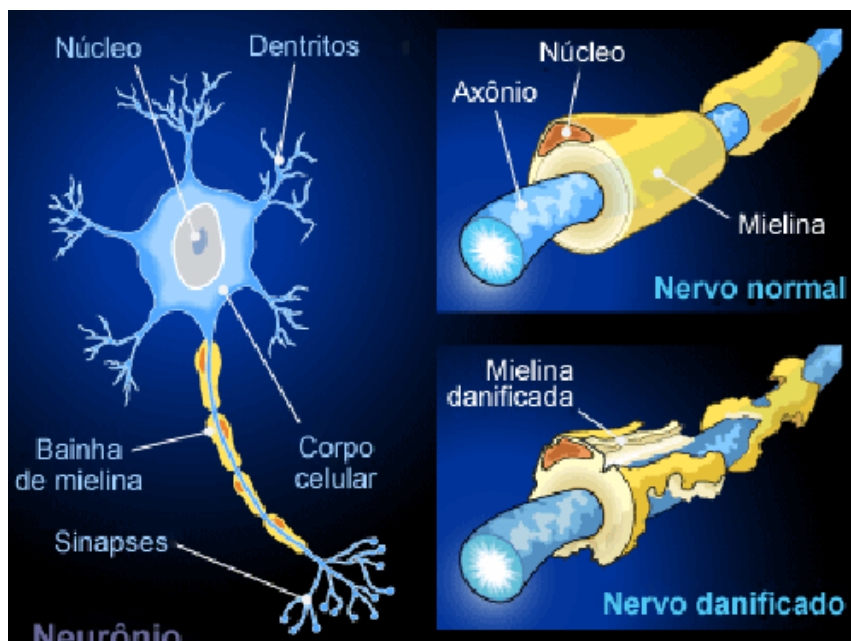
A Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM, 2012) estima que atualmente 35000 brasileiros sejam portadores de EM, com maior incidência em mulheres.

A EM é uma doença inflamatória crônica em que ocorre a desmielinização dos nervos do sistema nervoso central, associada à infiltração perivascular de leucócitos, astrogliose, lesão e/ou perda no axônio dos neurônios, neuro degeneração, bem como remielinização (VOGEL *et al.*, 2013; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012; BRUCK, *et al.*, 1996).

A bainha de mielina está diretamente relacionada na condução do impulso nervoso. Esta é composta por aproximadamente 40% de água. A massa seca da bainha de mielina do SNC apresenta alto teor lipídico, de 70 a 85%, e baixo teor proteico, de 15 a 30% (SHIER, BUTLER & LEWIS, 2007).

As células T CD4+ e TH1 tendem a reconhecer a bainha de mielina como antígeno e a atacam, ocasionando um processo inflamatório do sistema nervoso central (SNC) e resultando na ativação de microglia circunvizinhos aos neurônios e nervos espinhais. Conseqüentemente, há destruição da bainha de mielina e condução anormal dos impulsos nervosos. Os pacientes apresentam como sintomas sensação de fraqueza, paralisia, tremor unilateral, constipação, dor, fadiga, comprometimento cognitivo, perda de visão (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012; COMPSTON & COLES, 2008; COMPSTON, 2004).

Na figura 4 estão representados um neurônio normal, com destaque para um nervo saudável com a bainha de mielina íntegra e um nervo que sofreu desmielinização, em que a bainha de mielina foi danificada.



**Figura 4:** Representação esquemática de uma célula de neurônio, um nervo saudável e um nervo danificado pela desmielinização que ocorre na EM. (Fonte: <http://sistemanervoso2010.blogspot.com.br/2010/03/esclerose-multipla.html>)

Os macrófagos e micróglia encontram-se em abundância no local onde ocorre a lesão por desmielinização na EM. Alguns estudos apontam que há participação dessas células na formação da lesão e dano axonal (VOGEL *et al.*, 2013; COMPSTON & COLES, 2008; COMPSTON, 2004; POSER, 2000; BRUCK, 1996).

Os macrófagos, quando ativados, secretam mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico que são capazes de induzir o dano nas células (COMPSTON & COLES, 2008; COMPSTON, 2004; PARKINSON, 1997).

As causas do desenvolvimento da doença EM são associadas também a fatores que envolvem exposição ambiental e suscetibilidade genética (COMPSTON & COLES, 2008; BENVENISTE, 1997; MARTIN *et al.* 1992).

Alguns pacientes com EM relataram que foram infectados em idade mais avançada que o normal pelos vírus causadores do sarampo, caxumba e rubéola (VOGEL *et al.*, 2013; COMPSTON & COLES, 2008).

Acredita-se ainda que pessoas que desenvolveram infecção sintomática pelo vírus *Epstein-Barr* apresentam maior chance em desenvolver EM. Estudos apontam que há um mimetismo entre este vírus e uma proteína presente na



bainha de mielina, o que poderia justificar a reação imunológica com consequente desmielinização (LANG *et al.*, 2002; MARTYN *et al.*, 1993).

Alguns estudos também relacionam a EM à fatores como a exposição ao fumo durante a infância, toxinas e a deficiência de vitamina D (MIKAELOFF *et al.*, 2007; MARRIE, 2004).

O diagnóstico considera evidências clínicas da doença, imagens radiográficas e imagens de ressonância magnética, as quais mostram confluência anormal em 95% dos pacientes na porção branca do SNC (COMPSTON & COLES, 2008).

Até o momento não há cura para a EM. Os tratamentos disponíveis visam modificar o curso da doença diminuindo a progressão e promovendo o alívio dos sintomas. Atualmente existem 6 fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) que reduzem o avanço da EM que incluem interferon- $\beta$ , imunomodulador; acetato de gatilamer (Copaxone<sup>®</sup>), imunomodulador; mitozantrona (Novantrone<sup>®</sup>), antineoplásico; e natalizumab (Tysabri<sup>®</sup>), imunomodulador (VAN DER WALT *et al.*, 2010; VANDERLOCHT *et al.*, 2006).

#### 1.3.1.1 A ESCLEROSE MÚLTIPLA E OS ÁCIDOS GRAXOS

Na década de 50, estudos foram conduzidos para investigar a relação entre a progressão da EM e hábitos alimentares. Os ácidos graxos eram os que apresentavam maior foco de interesse em estudos experimentais e/ou clínicos. Constatou-se que na população da Noruega encontrava-se maior incidência de indivíduos com EM nas regiões onde havia maior ingestão de gorduras animais saturadas quando comparada às regiões com elevado consumo de peixe, e consequentemente gorduras poliinsaturadas (SWANK *et al.*, 1952 *apud* KOCH *et al.*, 2006).

Estudos epidemiológicos posteriores, que avaliaram a relação entre a ingestão de ácidos graxos poliinsaturados e EM, também constataram que havia efeito benéfico quanto à diminuição do risco da doença, entretanto não conseguiram estabelecer uma relação precisa entre consumo e incidência da doença (ZAHANG *et al.*, 2000).

Estudos apontam que os ácidos graxos mono e poliinsaturados possam participar da imunomodulação, ter atividade antioxidante, efeitos benéficos na

microcirculação, além de serem constituintes da bainha de mielina. Os ácidos graxos podem influenciar no processo inflamatório através de uma variedade de mecanismos, incluindo a atuação em receptores da superfície celular e intracelulares, os quais controlam a sinalização de células inflamatórias padrões de expressão de genes além de influenciar alterações na composição da porção lipídica de membranas celulares (CALDER, 2011).

A resolução da inflamação é um processo endógeno necessário para que haja o fim do processo inflamatório. Este processo é controlado por fatores celulares e humorais, tais como ácidos graxos, principalmente os poliinsaturados. Em estudo realizado por Prüss e colaboradores (2013), foi avaliada a influência de mediadores lipídicos em EM em 10 pacientes de ambos os sexos e idades variadas. Avaliando os níveis de ácido aracdônico e prostaglandinas foi possível concluir que as respostas das vias de mediadores lipídicos no fluido cerebrospinal mostraram-se distintas em pacientes com diferentes níveis de gravidade da EM.

#### 1.4 AVALIAÇÃO PRELIMINAR IN VITRO DE SEGURANÇA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Durante o desenvolvimento de fármacos e medicamentos, os ensaios pré-clínicos envolvem uma grande triagem para a avaliação da citotoxicidade, específica e não-específica, frente a várias linhagens celulares para a busca do alvo terapêutico bem como a avaliação da segurança de uso de novas substâncias farmacologicamente ativas (MASTERS, 2000).

Modelos animais sempre desempenham um importante papel na fase pré-clínica de desenvolvimento. Entretanto, há uma crescente pressão na sociedade acadêmica para que modelos de ensaio *in vitro* para avaliação de segurança e eficácia também sejam utilizados. No desenvolvimento de quimioterápicos para o tratamento do câncer, por exemplo, estudos *in vitro* vêm sendo amplamente empregados (ISO, 2009; ROGERO *et al.*, 2003; FRESHNEY, 2005).

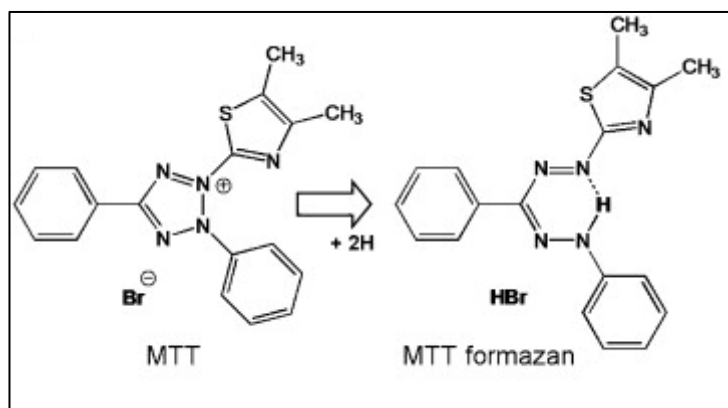
O ímpeto para mudança origina-se a partir de considerações de ordem financeira, uma vez que os testes *in vitro* apresentam vantagens econômicas consideráveis sobre o ensaio *in vivo*. Há também a presença de limitações dos

modelos animais em relação ao metabolismo humano, visto que, cada vez mais diferenças metabólicas entre as espécies vêm sendo identificadas. Por último, há a pressão moral para reduzir a experimentação animal (MASTERS, 2000).

#### 1.4.1 ENSAIO *IN VITRO* DE CITOTOXICIDADE

Os estudos de citotoxicidade que avaliam os efeitos de fármacos sobre as células medem alterações de estruturas vitais e vias metabólicas, como a integridade de membrana e respiração celular, respectivamente. Estes ensaios *in vitro* são utilizados para determinar a lise das células (morte celular), inibição do crescimento celular, formação de colônias e outras alterações sobre as células (ISO, 2009; MASTERS, 2000).

Uma técnica amplamente utilizada envolve o emprego de um sal de tetrazólio, o MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), que ao sofrer redução, por desidrogenases e agentes redutores presentes nas mitocôndrias de células viáveis, resulta em um sal de formazan insolúvel e de coloração violeta (figura 5). Sendo assim, a formação do cristal é diretamente proporcional à viabilidade celular (MASTERS, 2000; STOCKERT *et al.*, 2012).



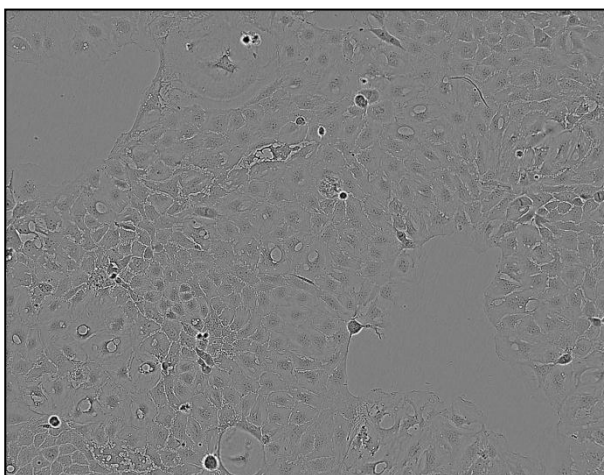
**Figura 5:** Representação esquemática da fórmula estrutural do MTT bem como seu produto em reação de redução, o MTT formazan (Fonte: STOCKERT *et al.*, 2012).

## 1.4.2 LINHAGENS CELULARES

### 1.4.2.1 CELULAS CACO-2

Durante os últimos anos, o emprego de linhagens celulares de epitélio intestinal, tais como Caco-2 e HT29, aumentou dramaticamente em diversos campos de pesquisa; incluindo o setor de ciências farmacêuticas (ARTURSSON, PALM & LUTHMAN, 2012; YAMASHITA *et al.*, 2000).

As células Caco-2 (figura 6) são células provenientes do epitélio intestinal humano que apresentam a capacidade de realizar mitose e gerar, em ensaios *in vitro*, uma membrana formada por monocamada de células ligadas por junções intercelulares, logo após atingirem a confluência. Embora as células Caco-2 sejam provenientes de células isoladas de carcinoma de cólon humano, quando cultivadas em condições ideais adquirem características semelhantes ao epitélio intestinal saudável, como a presença de microvilosidades na porção apical, hidrólise enzimática e sistema de carreadores com função de transporte de açúcares, aminoácidos e várias moléculas similares (YAMASHITA *et al.*, 2000).



**Figura 6:** Imagem obtida por microscopia óptica (40x) de células Caco-2 (Fonte: [http://www.hpacultures.org.uk/media/C58/A8/86010202\\_CACO-2\\_96hr\\_post\\_seeding.jpg](http://www.hpacultures.org.uk/media/C58/A8/86010202_CACO-2_96hr_post_seeding.jpg), 2011).

Um exemplo de emprego das células Caco-2 é a avaliação preditiva da permeabilidade intestinal de fármacos e sistemas nanoparticulados. Além de facilitar a avaliação rápida da absorção intestinal, é possível prever os mecanismos de absorção segundo transporte passivo, intercelular e/ou intracelular do fármaco em estudo quando administrado por via oral. A maioria dos estudos que avaliaram o transporte ativo investigaram dois sistemas, o transportador de peptídeos e a glicoproteína (ARTURSSON, PALM & LUTTMAN, 2012; MILOVIC *et al.*, 2001).

Em alguns casos de formulações desenvolvidas para administração por via oral, além da segurança, busca-se prolongar o tempo de residência intestinal, promover um aumento da permeabilidade pela mucosa do epitélio e consequentemente favorecer a absorção do fármaco (LIU *et al.*, 2013). Desta forma, estudos *in vitro* possibilitam prever a segurança, por meio de ensaio de citotoxicidade, e a atividade biológica, por meio de ensaios de permeabilidade, de fármacos e formulações visando à administração por via oral (FRESHNEY, 2005).

#### 1.4.2.2 CÉLULAS J774

A resposta inflamatória consiste em um processo complexo que inclui a produção de inúmeros mediadores, desencadeando uma sequência de eventos. Esta resposta é importante para o estabelecimento de diferentes reações e estímulos imunológicos. Alguns dos mediadores envolvidos são produzidos pelos macrófagos (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012).

Os monócitos são denominados macrófagos ao saírem da corrente sanguínea. Os macrófagos (figura 7) são células especializadas no processo de fagocitose, sendo de grande importância para o sistema imune por incluir mecanismos de defesa do organismo hospedeiro participando do sistema imunológico humoral. Agentes como interferon (INF), lipopolissacarídeo (LPS), lecitina e alguns extratos vegetais têm comprovada ação no estímulo da atividade dos macrófagos (NASCIMENTO *et al.*, 2006; FUJIHARA *et al.*, 2003; SHIER, BUTLER & LEWIS, 2007).



**FIGURA 7:** Imagem obtida por microscopia óptica (40x) de células J774 (Fonte: o autor).

Os macrófagos ainda atuam na manutenção da homeostase, reparação e regeneração de tecidos. Essa diversidade de atuação reflete uma ampla variação do estado de ativação e resposta dessa célula. Por exemplo, os macrófagos, quando ativados, podem inibir o crescimento de uma variedade de células tumorais e microrganismos, através da fagocitose, produção de óxido nítrico, peróxido de nitrogênio e citocinas (HOTHERSALL, 1997; NASCIMENTO *et al.*, 2002).

Por outro lado, há doenças relacionadas à promoção do processo inflamatório causada por uma ativação excessiva desta célula de defesa frente a células saudáveis do próprio hospedeiro. Dentre elas podemos citar artrite, aterosclerose, artrite reumatoide e doença intestinal inflamatória (LIMA *et al.*, 2006<sub>a</sub>).

Devido à ampla atuação do macrófago, os estudos *in vitro* envolvendo este tipo celular tornam-se cada vez mais atraentes. Duas abordagens principais vêm sendo empregadas, como o isolamento de macrófagos precursores, seguido pelo cultivo e o uso de linhagens de macrófagos, como as linhagens RAW 264 e J774 (ZHUANG *et al.*, 2012).

## 2 JUSTIFICATIVA

O já consagrado uso popular dos diversos produtos obtidos a partir do babaçu (*Orbignya speciosa*) aliado aos grandes avanços no desenvolvimento de sistemas lipídicos, que possibilitam a veiculação de substâncias lipofílicas, torna o desenvolvimento de CLN contendo extrato lipofílico de babaçu uma alternativa promissora na prevenção e tratamento de doenças cujo emprego de ácidos graxos apresenta vantagens já comprovadas. A obtenção das nanopartículas de babaçu possibilita o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos em consonância com a política nacional de plantas medicinais, a qual visa garantir à população brasileira o acesso seguro a medicamentos fitoterápicos e o uso racional de medicamentos fitoterápicos, bem como reconhecer e promover as práticas populares e tradicionais do uso de plantas medicinais (BRASIL, 2007; BRASIL, 2006).

### 3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consistiu na obtenção de extrato de amêndoas de babaçu e seu uso para o desenvolvimento e caracterização de CLN, como sistema carreador, seguido da avaliação *in vitro* do seu efeito frente a macrófagos (J774).

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos consideraram-se;

- Obtenção de extratos lipofílicos a partir da amêndoa de babaçu;
- Caracterização por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (CG-EM), utilizando-se o ácido mirístico como marcador, e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do extrato lipofílico obtido;
  - Avaliação da melhor condição para obtenção dos CLN de extrato lipofílico de babaçu e utilizando como variáveis tempo de aplicação, amplitude da energia ultrassônica e tempo de agitação magnética;
  - Caracterização dos CLN por meio de determinação de tamanho de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta (PZ), FTIR, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e eficiência de encapsulamento (EE);
    - Avaliação da redispersão em água dos CLN secos por liofilização utilizando glicose, manitol e trealose como crioprotetores;
    - Avaliação da citotoxicidade dos CLN em cultura de célula de epitélio intestinal (Caco-2) e macrófago de rato (J774);
    - Avaliação do efeito das formulações em células J774, considerando às variáveis tamanho e granulosidade celular, utilizando citometria de fluxo.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO LIPIFÍLICO DE BABAÇU

Para a obtenção do extrato foram selecionadas amêndoas que apresentavam casca íntegra, gentilmente doadas pela empresa TOBASA Bioindustrial de babaçu S.A. (Tocantinópolis-TO). As amêndoas foram descascadas com auxílio de uma faca e mantidas sob refrigeração (entre 3 ° a 5 °C) imersas em etanol 96° GL P.A. (TEDIA\_BRASIL), por no máximo 24 h, até serem processadas.

Para cada extração com extrator de Soxhlet foram selecionadas aproximadamente 70 g de amêndoas descascadas e trituradas, por trituração mecânica, que foram submetidas à extração em balão de 1000 ml, por 2 h utilizando-se 200 ml de diclorometano (grau HPLC/TEDIA\_BRASIL) aproximadamente 50 ml do etanol (grau P.A./ TEDIA\_BRASIL), utilizado para recobrir as amêndoas descascadas durante o período de armazenamento sob refrigeração.

Após a extração, foi realizada a remoção do solvente por rota-  
evaporação (RV-10 IKA\_EUA), com velocidade de rotação de 65 rpm e temperatura de banho de 45 °C, por 40 minutos.

O rendimento do processo foi calculado considerando-se a massa de babaçu inicial e a massa de extrato pós-extração (tabela 2). O extrato obtido foi armazenado em frasco de vidro fechado e sob refrigeração até o momento do uso.

### 4.2 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DOS CONSTITUINTES PRESENTES NO EXTRATO DE BABAÇU POR CG-EM

#### 4.2.1. PARÂMETROS UTILIZADOS NA CG-EM

As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso modelo QP 2010 ultra (SHIMADZU) acoplado a espectrômetro de massas quadrupolar EM ChromopackWorkstation Saturno CP3800 (SHIMADZU) a 70 Ev e a

coluna capilar empregada apresentava como fase estacionária 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano (Rtx-5MS\_ Restek, EUA) e como fase móvel foi utilizado gás hélio.

O volume de injeção utilizado foi de 1 µl, sem divisão de fluxo e a temperatura do injetor mantida a 190 °C.

Para cada análise cromatográfica foi utilizada a seguinte condição de variação da temperatura da coluna: a temperatura inicial de 30 °C foi mantida por 1 min, em seguida foi aquecida a 150 °C com uma taxa de 20 °C/min. Ao atingir a temperatura de 150 °C esta foi mantida por 3 min. Posteriormente, a coluna foi aquecida a 310 °C com uma taxa de 25 °C/min. Tendo alcançado a temperatura de 310 °C, esta foi mantida por 5 min.

A interface entre a coluna e o detector foi mantida a uma temperatura de 280 °C e a fonte iônica foi mantida a 230 °C.

A faixa de massas foi de  $m/z$  30-300. Para a obtenção dos espectros de massas foi utilizada varredura linear e monitoramento seletivo de íons para determinação das amostras.

Uma avaliação qualitativa dos picos obtidos foi realizada por meio da comparação entre similaridade dos espectros de massa dos picos obtidos em relação ao banco de dados da biblioteca de espectros (NIST11) do equipamento; considerou-se satisfatória uma similaridade maior ou igual a 90%.

#### 4.2.2 ESTERIFICAÇÃO DO EXTRATO LIPOFÍLICO OBTIDO

O extrato obtido foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplada o espectro de massa (CG-EM). As amostras analisadas foram submetidas à esterificação através de metilação com diazometano 2,0 M em dietiléter, obtendo-se assim, o éster correspondente de cada ácido graxo presente no extrato.

Foram pesados, analiticamente, 20 mg do extrato de babaçu obtido em um balão volumétrico de 10 ml. Em seguida foram adicionados aproximadamente 5 ml de acetato de etila, grau HPLC, seguido de 2 gotas de trimetilsilildiazometano 2,0 M em dietiléter. O sistema foi delicadamente agitado por 1 minuto e posteriormente adicionados 250 µl de uma solução de

pentadecanoato de metila de concentração 800 µg/ml, para obtenção de uma concentração final de 20 µg/ml e metanol, grau HPLC (TEDIA\_Brasil), para remover o excesso de trimetilsilildiazometano e garantir que não houvesse resíduo do agente esterificante na solução.

#### 4.2.3 ANÁLISE QUALITATIVA DOS CONSTITUINTES PRESENTES NO EXTRATO DE BABAÇU

Para a análise qualitativa dos ácidos graxos presentes no extrato de babaçu utilizou-se o método cromatográfico descrito no item 4.2.1. As amostras foram preparadas segundo o item 4.2.2 e as análises realizadas em triplicata.

Os picos presentes nos cromatogramas foram avaliados considerando-se a similaridade dos espectros de massa obtidos em relação ao banco de dados da biblioteca de espectros (NIST11) do equipamento. Considerou-se satisfatória uma similaridade maior ou igual a 90%.

Para garantir que não houve co-eluição dos analitos, foi avaliada a pureza dos picos considerando os íons moleculares conforme apresentado na tabela 4.

### 4.3 PREPARAÇÃO DOS CLN

#### 4.3.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA OBTENÇÃO DE CLN

Para a obtenção dos CLN foram selecionados o lipídio compritol ATO 888 (beenato de glicerilo) (doado por Gattefosse\_França), o tensoativo Poloxamer 188<sup>®</sup> (BASF\_Alemanha), água destilada e o extrato de babaçu. O método de preparo foi adaptado de Müller e colaboradores (1997) e Mühlen colaboradores (1998).

Previamente, para determinação as melhores condições de obtenção de CLN, foram avaliados a concentração do tensoativo (2,5 e 5%), a concentração de lipídeos (5% e 10%), o tempo de preparo (20, 30 e 40 min.) e a amplitude da energia ultrassônica aplicada (80% e 100%).

A porção de lipídeo pesada foi colocada em um Becker para que pudesse ser aquecida em chapa aquecedora (HS-7 IKA\_EUA) a uma

temperatura entre 80-85 °C, correspondente entre 5 e 10°C acima do ponto de fusão do lipídio. Em seguida, foi adicionada uma solução, aquecida a 85 °C, contendo o tensoativo e realizada a agitação do sistema com auxílio de agitador magnético (HS-7 IKA\_EUA). Foi aplicada energia ultrassônica com ultrasonicador (Hielscher Ultrasonics – Alemanha), durante o intervalo de tempo selecionado. A temperatura do sistema foi mantida em 74±2 °C.

Após o tempo determinado, o sistema obtido foi resfriado em banho de gelo com agitação magnética e aplicação de energia ultrassônica por 10 minutos. O método de obtenção das NLS está demonstrado na figura 8.

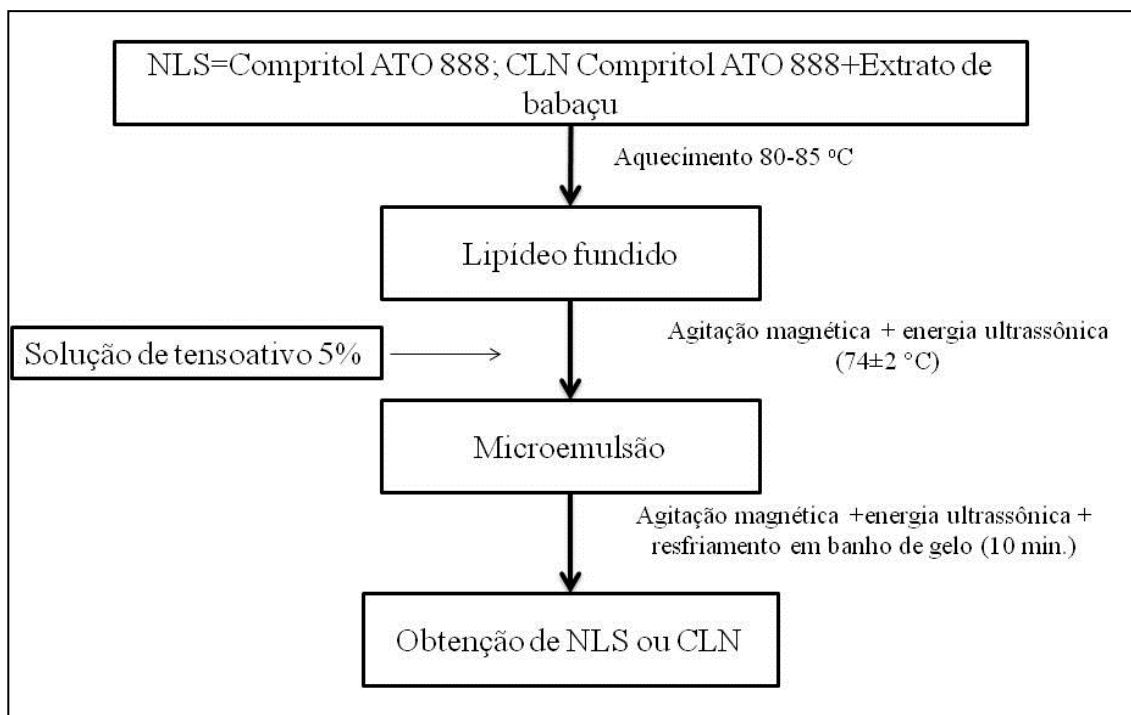
#### 4.3.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS PRODUZIDAS

As partículas obtidas foram armazenadas por 48 h em tubos *falcon* de 15 ml (Corning®\_EUA) de polietileno. As formulações que não sofreram agregação foram selecionadas para realização de teste de estabilidade, à temperatura de 25 °C em frascos de vidro âmbar. Nos intervalos de 0, 7, 14 dias foram verificados o tamanho de partícula e o índice de polidispersividade, conforme item 4.3.4.

#### 4.3.3 OBTENÇÃO DOS CLN

Baseado nos critérios de distribuição de tamanho e índice de polidispersividade estipulou-se como condições ótimas de preparo o uso de 5% de porção lipídica e como tensoativo uma solução de 5% de Poloxamer 188® em água destilada. O tempo de agitação magnética com aplicação de energia ultrassônica foi de 20 minutos e a amplitude da energia aplicada de 80% (figura 8).

Determinada a fração lipídica para cada formulação avaliou-se as seguintes proporções de compritol ATO 888 e babaçu: 4,5% e 0,5%; 4,25% e 0,75%; 4% e 1%; 3,75% e 1,25%; 3,5% e 1,5%.



**Figura 8:** Representação esquemática de obtenção de NLS e CLN

#### 4.3.4 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO E ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (Pdl)

A determinação da distribuição de tamanho de partículas e índice de polidispersividade foi realizada baseando-se no princípio do espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando o analisador de partícula Malvern Zetasizer S (Malverns Instrument, Malvern, Reino Unido).

Para isto, as amostras foram diluídas em água ultra-pura e a leitura foi realizada em triplicata, à temperatura de 25 °C.

#### 4.3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA (PZ)

Foi determinado o potencial zeta das formulações DE CLN desenvolvidas. As amostras foram diluídas em solução de Poloxamer 188<sup>®</sup> 5% e as leituras foram realizadas em Malvern Zetasizer ZS (Malverns Instrument, Malvern, Reino Unido). As determinações foram feitas em triplicata, à temperatura de 25 °C.

#### 4.3.6 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial foi utilizada para identificar o ponto de fusão do lipídeo e tensoativos utilizados, investigar o estado polimórfico dos componentes do CLN e prever os componentes presentes na superfície da nanopartícula. Aproximadamente 0,7-1,5 mg do material foi colocado em porta amostras de alumínio de 40  $\mu$ L e selado. As amostras foram levadas a um aquecimento de 35 a 200  $^{\circ}$ C à uma taxa de 10  $^{\circ}$ C/min em calorímetro DSC-60 (Shimadzu, Japão).

#### 4.3.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRA VERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A determinação do espectro de infravermelho do extrato de babaçu foi efetuada utilizando o acessório que permite a realização da leitura de amostras líquidas por reflexão total atenuada (ATR).

Os espectros de infravermelho das amostras sólidas, Compritol ATO 888, Lutrol F68 e das nanopartículas foram obtidos pela preparação de pastilhas de KBr (Sigma Aldrich, EUA) contendo 2-3% da amostra avaliada. Para análise das NLS e CLN, as amostras foram previamente liofilizadas.

Em ambas as situações foi utilizado o equipamento IR Prestige (Shimadzu, Japão) com variação de 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.3.8 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE ENCAPSULAMENTO (EE) PELO MÉTODO INDIRETO

A avaliação do extrato de babaçu encapsulado nas nanopartículas produzidas foi realizada de modo indireto, através da quantificação do extrato presente no sobrenadante após o processo de preparação das amostras.

Logo após a preparação dos CLN, item 4.3.3, uma alíquota de 5 g da suspensão de nanopartículas foi transferida para um tubo de centrifugação Amicon<sup>®</sup>-Ultra-15(Millipore Merck, EUA), no qual foi adicionado 10 g de água destilada. Com o tubo tampado, a amostra foi homogeneizada e posteriormente

submetida à centrifugação em centrífuga Ependorff a 6000 rpm por 2 h. O preparo das formulações foi realizado em triplicata.

Após a centrifugação, o produto da filtração foi recolhido em um balão de fundo redondo de 50 mL, cujo peso vazio já havia sido previamente determinado, que seguiu para a rotaevaporação (RV-10 IKA, EUA) por 2 h em banho-maria a 70 °C, com o objetivo de remover a água do sistema.

Terminado o processo de rotaevaporação, o balão contendo os resíduos de extrato de babaçu permaneceu por 4 horas em dissecador à vácuo, para remoção de qualquer resíduo de água. Em seguida, o balão foi pesado e o valor anotado. Para garantir que não haveria interferentes na análise, o mesmo procedimento foi realizado com a formulação 14 NLS.

A determinação da EE foi realizada segundo a equação apresentada a seguir

$$EE = (\text{Peso}_{5 \text{ CLN pós}} - \text{Peso}_{\text{balão}}) - (\text{Peso}_{\text{média}14 \text{ NLS}} - \text{Peso}_{\text{balão}})$$

onde,  $\text{Peso}_{5 \text{ CLN pós}}$  corresponde ao peso obtido no balão após o processo de rotaevaporação da alíquota da amostra 5 CLN,  $\text{Peso}_{\text{balão}}$  corresponde ao peso do balão utilizado antes da adição da alíquota do sobrenadante da amostra analisada e  $\text{Peso}_{\text{média}14 \text{ NLS}}$  refere-se ao peso médio encontrado no balão após o processo de rotaevaporação das alíquotas da amostra 14 NLS.

#### 4.3.9 AVALIAÇÃO DO USO DE CRIOPROTETORES NA LIOFILIZAÇÃO

Com o objetivo de obter partículas com boa estabilidade e assim manter a conformação, tamanho e índice de polidispersividade, foi avaliado o uso de crioprotetores para o processo de secagem por liofilização. Os crioprotetores e proporções testadas foram a glicose (Sigma Aldrich, EUA) 5% p/v e o Manitol (Sigma Aldrich, EUA) a 2,5 p/v%.

Após o preparo da formulação 5 CLN, foi adicionada a solução contendo o crioprotetor selecionado. As amostras foram congeladas a -80 °C e realizada a secagem por liofilização, por 4 dias.

Cerca de 20 mg da amostra seca foi adicionada a um Becker contendo 20 ml de água destilada e submetida à agitação mecânica por 10 minutos. Uma alíquota da suspensão formada foi utilizada para determinação de tamanho de partícula e Pdl, conforme indicado no item 4.3.4.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Com o intuito de investigar a segurança da administração da formulação por via oral, foram utilizadas como modelo *in vitro* as células de epitélio intestinal Caco-2.

As células J774 foram utilizadas para avaliar *in vitro* os possíveis efeitos no processo inflamatório dos CLN contendo extrato de babaçu.

##### 4.4.1 CULTIVO CELULAR

As células Caco-2 foram obtidas através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ) e mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (LGCBio) complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (LGCBio) e antibiótico (penicilina, 1000 U/ml, e estreptomicina, 10000 µg/ml) (LGCBio). Essas células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, a 37 °C em garrafas de cultura de células de 75 cm<sup>3</sup>(Corning®\_EUA), sendo feitas trocas de meio de cultura a cada 2-3 dias.

As células J-774 foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina (LAFEX/UFSC). As células foram mantidas em meio DMEM (GIBCO\_EUA) complementado com 10% SFB (GIBCO\_EUA) e antibiótico (penicilina, 1000 U/ml, e estreptomicina, 10000 µg/ml) (GIBCO\_EUA) e incubadas em estufa com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, a 37 °C em garrafas de cultura de células de 75 cm<sup>3</sup>(Corning®\_EUA), com trocas de meio de cultura a cada 2-3 dias.



#### 4.4.2 TESTE DE CITOTOXICIDADE

Para o experimento de citotoxicidade, as células Caco-2 e J774 foram semeadas nas respectivas concentrações de  $3 \times 10^4$  células/poço e  $10^4$  células/poço, em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação, foi avaliada a citotoxicidade das formulações.

Para avaliação da citotoxicidade frente às células Caco-2, após o período de incubação, as formulações 14 NLS e 5 CLN, recém preparadas, foram diluídas em DMEM estéril suplementado com 10% de SFB, nas proporções 1:1; 1:2 e 1:3. As diluições foram postas em contato com as células por um período de 3 h, estimando-se o tempo de trânsito gástrico. As análises foram feitas em triplicata para cada diluição testada.

Para avaliação da citotoxicidade frente às células J774, após o período de incubação, as formulações 14 NLS e 5 CLN, recém preparadas, foram diluídas em DMEM estéril suplementado com 10% de SFB, nas proporções 1:1; 1:20 e 1:200. As diluições foram postas em contato com as células por um período de 24 h. As análises foram feitas em triplicata para cada diluição testada.

Após o período de incubação das células em contato com as amostras testadas, o sobrenadante de cada poço foi removido, as células lavadas com 200  $\mu$ l/poço de tampão HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Sigma Aldrich\_EUA), seguido da adição 200  $\mu$ l de solução de 0,625 mg/ml de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma Aldrich\_EUA) em HBSS. Imediatamente após a adição da solução de MTT, a placa foi incubada em estufa por 3 horas.

Posteriormente, o sobrenadante foi totalmente removido e uma alíquota de 100  $\mu$ L de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma Aldrich\_EUA) foi adicionada a cada poço para a solubilização do cristal de formazan formado. Foi procedida uma leve agitação por 60 segundos para a solubilização do cristal e a leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de placa de Elisa com comprimento de onda de 570 nm.

#### 4.4.3 CITOMETRIA DE FLUXO

A avaliação das características de tamanho e granulosidade dos macrófagos testados, células J774, frente às nanopartículas foi realizada em placas de 6 poços na concentração  $2 \times 10^6$  células/poço. As células foram semeadas e mantidas incubadas em DMEM suplementado por 24 h. Após este período, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 1 ml da formulação da nanopartícula testada, 14 NLS e 5 CLN, e 1 ml de meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB. Realizou-se uma delicada homogeneização e a placa contendo as células J774 e o material testado seguiu para incubação por mais 24 h. Para cada formulação a análise foi realizada em duplicata.

Com o intuito de obter um resultado referente ao comportamento dos macrófagos na forma ativada, foi realizado o cultivo das células em DMEM suplementado com SFB e adicionada uma solução de LPS (serotype O111:B4\_ Sigma Aldrich) para uma concentração final de 100 ng/ml. As células foram mantidas em estufa de incubação por 24 h, do mesmo modo como foram realizados os testes com as amostras de NLS e CLN.

Após o período de 24 h de incubação, o sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas em tampão HBSS. Uma alíquota de 0,3 ml de meio contendo as células suspensas foi selecionada. Foram analisadas um total de 50000 células em citômetro de fluxo FACScan(Becton Dickinson, EUA). Os parâmetros tamanho e a granulosidade das células foram avaliados com auxílio do software FCS Express 4 Demo.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre grupos foram inicialmente realizadas com análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* GraphPadPrism 5 com intervalo de confiança de 0,05.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RENDIMENTOS DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO POR FTIR E CG-EM DO EXTRATO OBTIDO

O rendimento da extração foi calculado em função da diferença entre a massa inicial de babaçu utilizada e a massa obtida após o processo de extração seguido de remoção do solvente. Constatou-se que houve um rendimento médio de  $53,38 \pm 2,43\%$  nos 7 extratos preparados. Os valores de rendimento estão indicados na tabela 2.

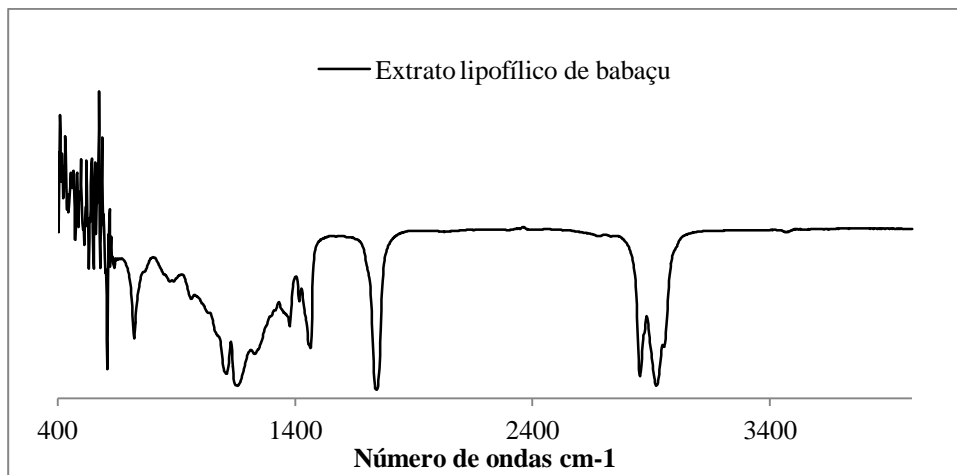
**Tabela 2:** Valores de rendimento obtidos em cada extração.

Extração	Porcentagem de rendimento (%)
Extração 1	55,78
Extração 2	56,64
Extração 3	52,05
Extração 4	54,20
Extração 5	49,71
Extração 6	55,71
Extração 7	54,24

Em todos os processos de extração obteve-se um rendimento igual ou superior a 49% e não foi observada diferença significativa entre a quantidade de extrato obtido em cada extração, indicando uma adequada reprodutibilidade do processo. Segundo Machado e colaboradores (2006) a amêndoa é composta por aproximadamente 60% de óleos e o restante é denominado torta. Considerando os valores obtidos nas extrações, conclui-se que o processo escolhido mostrou-se satisfatório uma vez que removeu quase que totalmente o conteúdo lipídico presente nas amêndoas.

Segundo Mourad (2006) os óleos de soja, girassol, canola e coco apresentam os rendimentos de 18,5%, 38-48%, 40-45%, 57%, respectivamente. O rendimento obtido no processo de extração empregado nas amêndoas do babaçu mostrou-se satisfatório quando comparado a fontes já consagradas para obtenção de óleos vegetais comestíveis.

Após a extração, foi realizada uma análise qualitativa do extrato obtido por meio de FITR e foram detectadas bandas características dos principais grupos funcionais de ácidos graxos, constituintes do extrato (Figura 9).

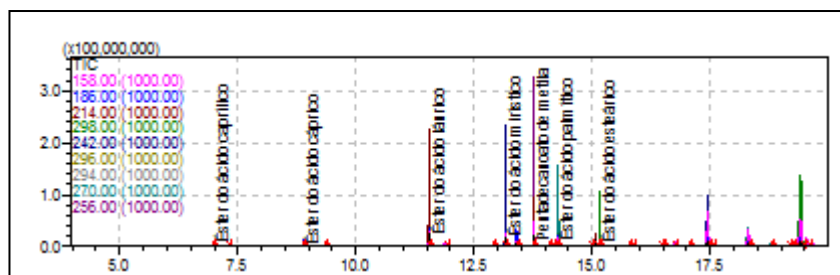


**Figura 9:** Espectro de infravermelho do extrato lipofílico de babaçu

O espectro apresenta as bandas de absorção vibracional na região entre 2928 e 2950  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas às deformações axiais das ligações carbono hidrogênio (C–H) referentes às saturações, abundantes em cadeias carbônicas de ácidos graxos. A absorção intensa em torno de 1750  $\text{cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento do grupo funcional carbonila (C=O). A presença de grupo funcional éster (C–O–C=O) é confirmada pela absorção intensa em 1180  $\text{cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). O mesmo foi observado na análise do óleo de babaçu realizada por Santos (2008) para a obtenção de biodiesel de babaçu.

Os resultados observados pela análise de FTIR indicam que o processo extrativo não promoveu alterações quanto à natureza dos constituintes. Os grupos funcionais identificados por FTIR são característicos de ácidos graxos, corroborando com os resultados encontrados pela análise qualitativa em CG-EM.

Para a análise qualitativa do extrato de babaçu por CG-EM, realizou-se o processo de esterificação com diazometano. Na figura 10 está apresentado o cromatograma dos íons totais obtidos, bem como a identificação dos picos dos ácidos graxos.



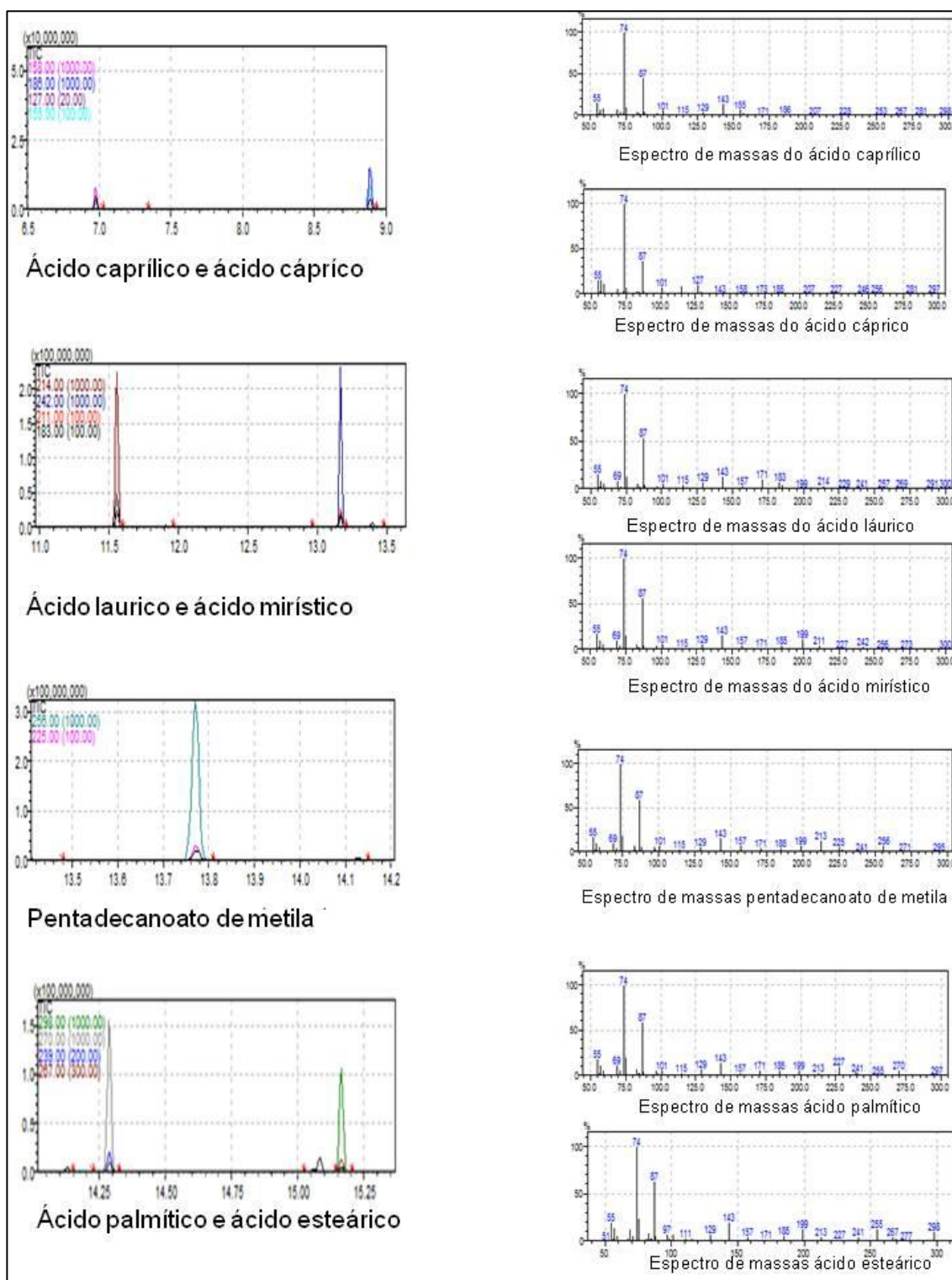
**Figura 10** Cromatograma de íons totais presentes no extrato lipofílico de babaçu obtido.

Após a análise por CG-EM do extrato de babaçu obtido foi possível indicar os ácidos graxos identificados, a tempo de retenção encontrado, fórmula molecular, a massa molecular e íons diagnóstico considerados (tabela 3).

**Tabela 3:** Indicação do nome vulgar do ácido graxo, fórmula molecular, massa molecular (g/mol) e íons diagnóstico dos produtos da esterificação.

Nome vulgar	Tempo de retenção (min.)	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	Íons diagnóstico (m/z)
Ácido Caprílico	6,98	$C_9H_{18}O_2$	158	127; 158
Ácido Cáprico	8,92	$C_{11}H_{22}O_2$	186	155; 186
Ácido Láurico	11,56	$C_{13}H_{26}O_2$	214	183; 214
Ácido Mirístico	13,2	$C_{15}H_{30}O_2$	242	211; 242
Pentadecanoato de metila	13,8	$C_{16}H_{32}O_2$	256	225; 256
Ácido Palmítico	14,32	$C_{19}H_{34}O_2$	270	239; 270
Ácido Esteárico	15,2	$C_{19}H_{38}O_2$	296	267; 296.

Para garantir que não houve co-eluição dos analitos, cada pico obtido na CG-EM foi avaliado quanto à presença dos íons diagnósticos. Na figura 11 estão representados os picos cromatográficos dos ésteres derivados dos ácidos carboxílicos presentes no extrato de babaçu bem como os espectros de massas referente a cada analito.



**Figura 11:** Parte do cromatograma dos íons selecionados  $m/z$  127,  $m/z$  158 para o éster do ácido caprílico;  $m/z$  155,  $m/z$  186 para o éster do ácido cáprico;  $m/z$  183,  $m/z$  214 para o éster do ácido laúrico;  $m/z$  211,  $m/z$  242 para o éster do ácido mirístico;  $m/z$  225,  $m/z$  256 para o pentadecanoato de metila;  $m/z$  239,  $m/z$  270 éster do ácido palmítico;  $m/z$  267 e  $m/z$  296 para o éster do ácido esteárico.

Os ácidos graxos identificados no extrato obtido foram: ácido cáprico, ácido caprílico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido oleico e ácido esteárico. Pode-se comprovar que o método utilizado foi eficaz quanto à separação dos ácidos graxos de interesse devido à verificação da pureza dos picos segundo a identificação dos íons diagnósticos.

Os ácidos graxos identificados correspondem ao preconizado pela ANVISA por meio da Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Entretanto, segundo esta resolução o óleo de babaçu deve conter entre 1,4 e 5,5% de ácido linoleico, o qual não foi possível a identificar no extrato avaliado. Possíveis justificativas podem ser o método de processamento das amêndoas que originam produtos diferentes, uma vez que a ANVISA trata de óleos e o material analisado no presente trabalho corresponde a um extrato lipofílico, ou pela variação genética existente entre a população de palmeiras de babaçu.

Em trabalho realizado por Machado e colaboradores (2006), avaliando a composição de óleos de babaçu refinados e hidrogenados, não foi possível identificar a presença do ácido linoleico. Em estudo realizado por Silva (2011) avaliou-se a variação genética por marcadores morfoagronômicos e moleculares em populações de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) naturais dos estados do Piauí, Ceará e Maranhão. Foi possível identificar diferenças genotípicas entre as amostras analisadas. Estas diferenças podem ocasionar alterações na proporção dos compostos presentes nas amêndoas. Provavelmente, o trabalho realizado pela ANVISA não refletiu estas diferenças, sendo inadequado para padronizar o óleo de babaçu.

Os íons diagnóstico são fragmentos resultantes da colisão ou radiação sofrida pelas moléculas devido ao processo de ionização gerado pelo detector de espectrometria de massa. Os íons diagnóstico são amplamente empregados em estudos envolvendo conformações estruturais e arranjo espacial (EBERLIN, 2006). Assim, são capazes de auxiliar na identificação do analito, uma vez que uma determinada substância pode produzir íons com razão de massa/carga ( $m/z$ ) bem característicos, de modo a criar uma identidade para a molécula analisada.

A fragmentação dos ácidos carboxílicos, assim como dos seus derivados ésteres, são governadas pela quebra  $\alpha$  dos dois lados da carbonila, assim como o rearranjo de McLafferty. O íon diagnóstico  $m/z$  74 é característico de

ésteres de ácidos carboxílicos, sem ramificação, formado através do rearranjo de McLafferty. Esse íon é o pico base nos espectros de massas de C<sub>6</sub> a C<sub>26</sub> (SILVERSTEIN, 2005). A combinação do íon diagnóstico *m/z* 74 com o íon diagnóstico *m/z* 87 sugere o espectro de massas de um éster metílico.

## 5.2 OBTENÇÃO DE CLN

### 5.2.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DE NLS COMO MODELO PARA PREPARO DE CLN

Para o desenvolvimento de CLN foi realizada uma avaliação das condições de preparo utilizando as variáveis concentração do tensoativo (2,5 e 5%), concentração de lipídeos (5% e 10%), tempo de preparo (20, 30 e 40 minutos) e amplitude da energia ultrassônica aplicada (80% e 100%). As formulações obtidas estão apresentadas na tabela 4, denominadas de 1 NLS a 14 NLS. Estas formulações foram preparadas em triplicata, bem como a respectiva determinação de tamanho de partícula e Pdl.

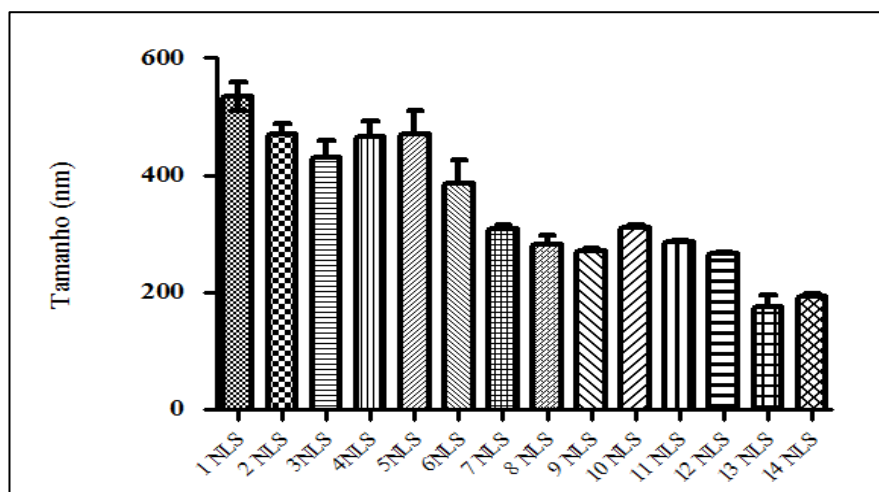
**Tabela 4:** Indicação de condições de preparo das NLS, segundo tempo de preparo, amplitude de energia aplicada, % de lipídeos, % de tensoativo, Tamanho médio (nm) e Pdl.

NLS	Tempo (min.)	Amplitude(%)	% Lipídeo	% tensoativo	Tamanho médio (nm)	Pdl
1 NLS	20	80	10	2,5	534,17 ± 23,92*	0,269 ± 0,033
2 NLS	30	80	10	2,5	469,27 ± 31,57*	0,254 ± 0,012
3NLS	40	80	10	2,5	429,87 ± 49,52*	0,262 ± 0,013
4NLS	20	100	10	2,5	466,97 ± 43,70*	0,318 ± 0,035
5NLS	30	100	10	2,5	470,40 ± 70,04*	0,300 ± 0,048
6NLS	40	100	10	2,5	386,40 ± 67,36*	0,313 ± 0,017
7 NLS	20	80	5	2,5	307,40 ± 14,61*	0,268 ± 0,009
8 NLS	30	80	5	2,5	281,50 ± 28,26*	0,283 ± 0,051
9 NLS	40	80	5	2,5	271,01 ± 6,66	0,211 ± 0,018
10 NLS	20	100	5	2,5	310,97 ± 7,71*	0,322 ± 0,056
11 NLS	30	100	5	2,5	285,10 ± 5,47*	0,227 ± 0,010
12 NLS	40	100	5	2,5	266,67 ± 4,15	0,213 ± 0,007
13 NLS	20	100	5	5	174,87 ± 4,20	0,274 ± 0,036
14 NLS	20	80	5	5	193,13 ± 6,00	0,281 ± 0,030

\* diferença significativa para 14 NLS (p<0,05)

A distribuição de tamanho de partícula obtido das formulações 1 NLS a 14 NLS está apresentada na figura 12.





**Figura 12:** indicação das formulações 1 NLS a 14 NLS em relação ao tamanho de partícula obtido

Os resultados encontrados estão de acordo com os observados por Müller e colaboradores (1997) e Mühlen colaboradores (1998), os quais obtiveram nanopartículas produzidas com Compritol ATO 888 e Poloxamer 188, com tamanho aproximado de 250 nm.

A partir de análise estatística foi possível observar que, quanto ao tamanho de partícula, não há diferença significativa entre as formulações 9 NLS, 12 NLS, 13 NLS e 14 NLS. Quanto aos valores de Pdl obtido, não houve diferença significativa dos valores entre as formulações desenvolvidas.

A formulação 9 NLS é constituída por 5% de lipídeo e 2,5% de tensoativo e para o preparo empregou-se o tempo de 40 minutos com aplicação de energia ultrassônica de amplitude 80%. Já as formulações 12 NLS e 13 NLS são constituídas por 5% de lipídeo e 5% de tensoativo com tempo de preparo de 20 e 40 minutos, respectivamente, e aplicação de energia ultrassônica de amplitude 100%.

Segundo os dados obtidos, a redução da porção lipídica favorece a diminuição do tamanho de partícula bem como o valor de Pdl. Além disso, há relatos de que a redução da concentração da proporção lipídica pode melhorar a estabilidade e dispersão de NLS, diminuindo a agregação durante o processo de preparo e armazenamento (FREITAS & MÜLLER, 1999).

E ainda, para escolha da melhor condição de preparo, as formulações recém-preparadas foram armazenadas em tubos *falcon* transparentes à

temperatura ambiente. Foi possível observar que as formulações de 1 NLS a 6 NLS, 9 NLS, 11 NLS e 12 NLS, formavam um sistema altamente viscoso num período igual ou inferior à 48 h após o preparo, possivelmente devido a um processo de gelificação pela perda da estabilidade das cargas e maior agregação das nanopartículas geradas.

Em estudo de Freitas e Müller (1998), que avaliou a estabilidade de NLS contendo Compritol ATO 888 (10%) e Poloxamer (1,2%), produzidas por homogeneização à alta pressão, verificou-se que as formulações produzidas apresentavam perda de estabilidade quando expostas à luz e temperatura ambiente, ocasionando uma diminuição do PZ e aumento do tamanho das partículas. Acredita-se que este aumento de tamanho pode ser resultante da diminuição da repulsão eletrostática existente entre as partículas formadas, facilitando a formação de uma rede, possivelmente devido à capacidade de formação de gel do tensoativo utilizado. As mesmas formulações quando armazenadas ao abrigo da luz, em frascos âmbar, apresentavam boa estabilidade num período igual ou superior a 3 anos.

Com a realização da triagem inicial, foram selecionadas como candidatas a prosseguir no estudo as formulações: 7 NLS, 8 NLS, 10 NLS, 13 NLS, 14 NLS, pois não apresentaram indícios de perda da estabilidade, quando acondicionadas em tubo falcon transparente e temperatura ambiente por 48 h.

As formulações selecionadas foram preparadas e acondicionadas em frasco de vidro âmbar e mantidas à temperatura de 25 °C. Os valores de tamanho de partícula e Pdl foram avaliados nos intervalos de 0; 7 e 14 dias conforme indicado na tabela 5.

**Tabela 5:** Dados de tamanho e Índice de Polidispersividade (Pdl) nos intervalos de tempo 0, 7, 14 dias das formulações 7 NLS, 8NLS, 10NLS, 13 NLS e 14 NLS.

NLS	Tamanho (nm)	Tamanho (nm)	Tamanho (nm)	Pdl	Pdl	Pdl
	t=0	t=7	t=14	t=0	t=7	t=14
<b>7 NLS</b>	307,40 ± 14,61*	384,00 ± 46,01	474,20 ± 102,63*	0,268±0,009	0,304±0,026	0,527±0,183*
<b>8 NLS</b>	281,50 ± 28,26*	656,00 ± 275,23*	361,43 ± 84,10*	0,211 ± 0,018	0,406±0,127	0,362±0,001
<b>10 NLS</b>	310,97 ± 7,71*	973,40 ± 94,45*	256,53 ± 20,81	0,322 ± 0,056	0,479±0,017*	0,567±0,051*
<b>13 NLS</b>	174,87 ± 34,2	279,63 ± 19,53	279,57 ± 18,32	0,274 ± 0,036	0,255±0,016	0,252±0,009
<b>14 NLS</b>	193,13 ± 6,00	261,07 ± 35,04	299,80 ± 69,20	0,281 ± 0,030	0,272±0,007	0,305±0,059

\* diferença significativa para 14 NLS ( $p < 0,05$ )

Comparando-se os resultados das tabelas 4 e 5, as amostras 13 NLS e 14 NLS, preparadas com 5% de tensoativo, apresentaram os resultados mais promissores. Entretanto, a formulação 14 NLS foi escolhida por utilizar menor amplitude de energia ultrassônica e minimizar possíveis perdas de estabilidade da formulação ao longo do período de armazenamento. Forças de cisalhamento podem influenciar o processo de gelificação de NLS. O uso da energia ultrassônica, apesar de garantir a formação de partículas de tamanhos reduzidos e com estreita variação de tamanho, pode contribuir na perda da estabilidade (FREITAS & MÜLLER, 1999).

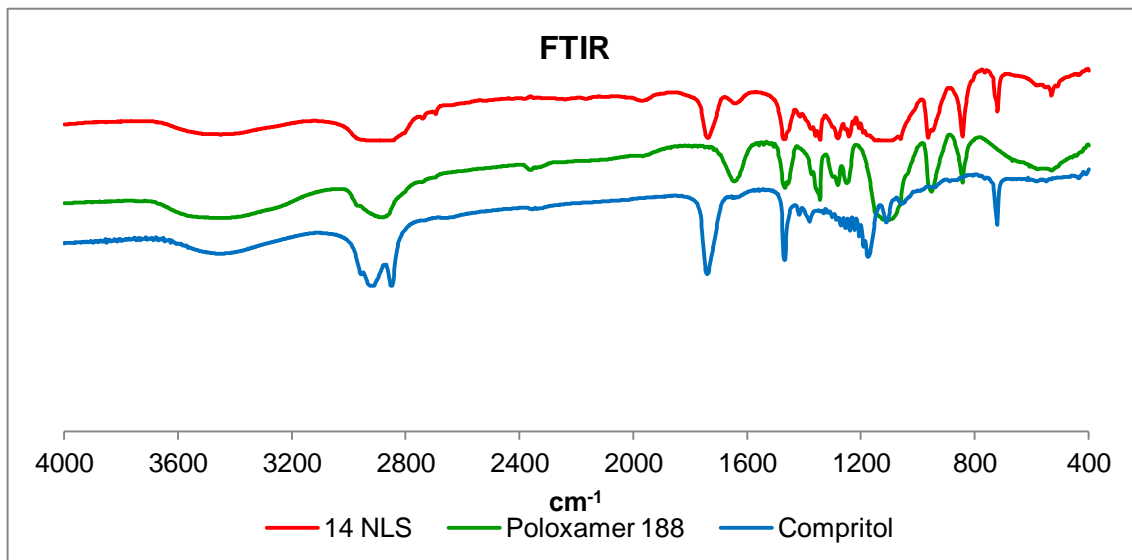
Portanto, foi estabelecido o modo de preparo empregado na formulação 14 NLS, que utiliza 5% de porção lipídica, 5% de solução de tensoativo em água destilada, tempo de preparo de 20 minutos sob agitação magnética e aplicação de energia ultrassônica com amplitude de 80%. Após este período há a aplicação de agitação magnética e energia ultrassônica em banho de gelo por 10 minutos.

## 5.2.2 CARACTERIZAÇÃO DA NLS UTILIZADA COMO PROTÓTIPO PARA PRODUÇÃO DE CLN

### 5.2.2.1 FTIR 14 NLS

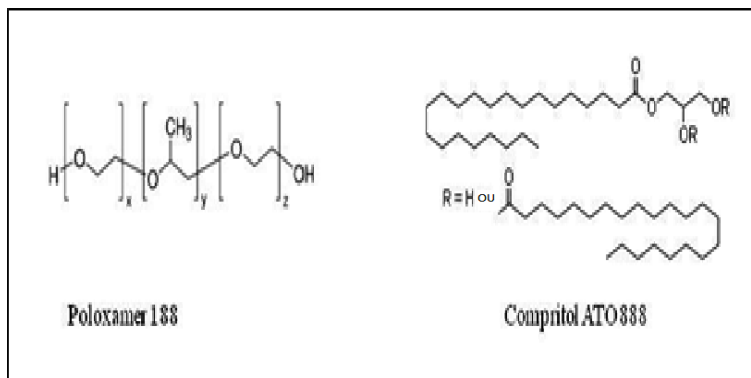
A técnica de FTIR foi empregada para uma avaliação qualitativa dos excipientes utilizados no preparo da 14 NLS e investigar a possibilidade de se identificar a presença destes na NLS formada. Na figura 13 estão

representados os espectros do Poloxamer 188<sup>®</sup>, Compritol ATO 888 e da 14 NLS formada.



**Figura13:** Espectros de FTIR de Compritol ATO 888, Poloxamer 188 bem como da amostra de 14 NLS obtida.

Como observado por Xie e colaboradores (2009) o espectro de infravermelho do Poloxamer 188<sup>®</sup> utilizado apresenta as bandas características em 3447, 2886, e 1112 cm<sup>-1</sup> devido ao estiramento das ligações presentes na hidroxila (O-H) ligação carbono hidrogênio (C-H) e ligação carbono oxigênio (C-O). No espectro de infravermelho da amostra de Compritol ATO 888 avaliada, é possível observar uma banda característica em 2820 cm<sup>-1</sup>, devido ao estiramento da ligação carbono hidrogênio (C-H) e outra banda em 1705 cm<sup>-1</sup>, proveniente do estiramento da ligação carboxila (C = O) presente na molécula. Na figura 14 estão apresentadas as fórmulas estruturais dos excipientes utilizados. Assim é possível comprovar a presença das bandas referentes aos grupos funcionais observadas na figura 13.



**Figura 14:** Representação da fórmula estrutural do tensoativo, Poloxamer 188<sup>®</sup>, e do lipídeo, compritol ATO 888, utilizados para o preparo das NLS. (refazer figura)

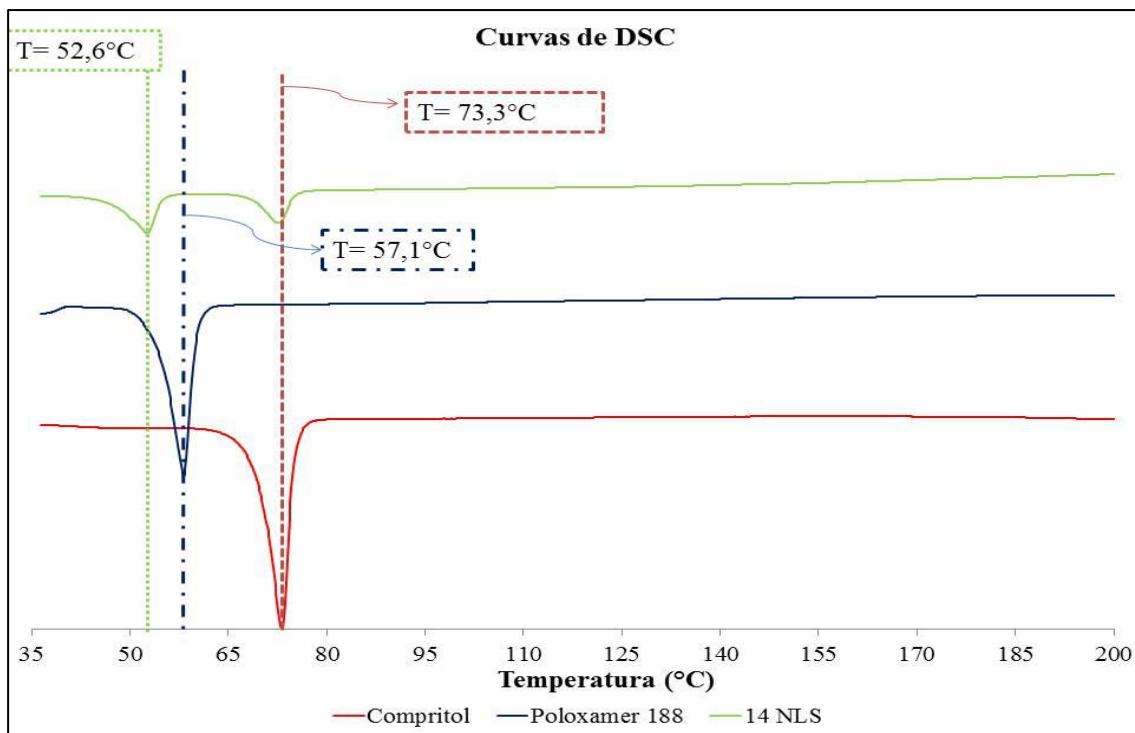
No espectro da formulação 14 NLS analisada, é possível identificar os picos na região de 2880 e 1112  $\text{cm}^{-1}$ , característicos do tensoativo e o pico na região de 1705  $\text{cm}^{-1}$ , característicos do lipídeo. Portanto, é possível prever que os excipientes empregados encontram-se na NLS gerada.

#### 5.2.2.2 DSC 14 NLS

Foram realizadas análises de DSC para verificar o ponto de fusão dos componentes utilizados na formulação, o grau de cristalinidade, bem como avaliar se o processo de obtenção da 14 NLS alterou a cristalinidade de seus constituintes.

O Compritol ATO 888 é constituído por uma mistura de glicerídeos. Este lipídeo é conhecido por apresentar um polimorfismo complexo, pois a cristalinidade do material pode ser influenciada pela temperatura e condições de armazenamento. Por sua vez, o perfil de liberação de fármacos e degradação das NLS está diretamente relacionado à estrutura cristalina formada (HAMDANI *et al.* 2003).

Na figura 15 estão apresentados os termogramas do Compritol ATO 888, Poloxamer 188<sup>®</sup> e da 14 NLS obtida.



**Figura 15:** Termogramas obtidos por DSC dos excipientes, compritol e Poloxamer 188® e da nanopartícula 14 NLS.

Segundo Brubach e colaboradores (2007), o compritol ATO 888 apresenta ponto de fusão declarado na faixa de 70 °C. Freitas e Muller (1999) avaliaram a faixa de fusão, por DSC, deste lipídeo e a encontraram na faixa de 63-77 °C, sendo o pico em 72,2 °C. O valor encontrado de pico endotérmico em 73,3 °C (figura 15) está de acordo com os relatos da literatura.

Assim como observado por Guhagarkar e colaboradores (2009), o Poloxamer 188® apresentou ponto de fusão em 57,1 °C. Alguns trabalhos relatam o ponto de fusão em aproximadamente 56 °C, indicando que o resultado encontrado pela análise de DSC do tensoativo empregado está de acordo com os relatos de literatura (ANDREWS *et al.*, 2009; NEWA *et al.* 2007).

Na formulação 14 NLS, previamente preparada e seca por liofilização, também é possível observar a presença de um pico endotérmico próximo a 73,3 °C assim como na análise do compritol, o que é um pressuposto de que foi mantido certo grau de cristalinidade do lipídeo, após o preparo da formulação e a sua secagem. Segundo Brubach e colaboradores (2007), o resfriamento rápido do compritol ATO 888 conduz a uma recristalização na

forma metaestável, forma que tende a se converter, a diferentes velocidades, na forma estável.

Há também um pico próximo a 52,6 °C, porém com uma intensidade menor do que os observados nos constituintes analisados separadamente.

Em estudo realizado por Kovacevic e colaboradores (2011) foram desenvolvidas NLS de Cutina<sup>®</sup> com Miglyol<sup>®</sup>812 como porção lipídica e Plurol<sup>®</sup>Stearique WL1009 (PS) como surfactante. Foi observado que, havia um alargamento da base do pico referente ao tensoativo utilizado na análise de DSC da NLS, indicando que o início do processo de fusão ocorria em temperaturas mais baixas bem como uma diminuição da altura do pico. Este fenômeno foi considerado como uma alteração no perfil cristalino do tensoativo.

Diante de tais resultados, a presença do primeiro pico endotérmico presente na curva de DSC da formulação 14 NLS em temperatura inferior ao ponto de fusão do tensoativo permite supor que houve uma interação entre o Poloxamer e o Compritol e consequente alteração na estrutura cristalina do tensoativo.

### 5.2.3 PREPARO E AVALIAÇÃO DOS CLN SEGUNDO TAMANHO MÉDIO, PDI E PZ

Após a determinação do tempo, amplitude de energia ultrassônica e proporção da fração lipídica empregadas, iniciou-se o preparo dos CLN.

Respeitando-se a proporção de 5% de lipídeos na formulação foram testados as seguintes proporções de compritol ATO 888 e extrato de babaçu: 4,5% e 0,5%; 4,25% e 0,75%; 4% e 1%; 3,75% e 1,25%. 3,5% e 1,5%. As formulações obtidas são apresentadas na tabela 6, de 1 CLN a 5 CLN. Estas formulações foram preparadas em triplicata, bem como a determinação de tamanho de partícula, Pdl e PZ.

**Tabela 6:** Indicação de condições de preparo das CLN, segundo tempo de preparo, amplitude de energia aplicada, % de Compritol ATO 888, % extrato de babaçu % de tensoativo, Tamanho médio (nm), Índice de Polidispersividade (Pdl) e Potencial zeta (PZ).

CLN	% Compritol ATO 888	% extrato de babaçu	% tensoativo	Tamanho médio (nm)	Pdl	PZ(mV)
1 CLN	4,5	0,5	5	228,43 ± 24,82	0,25 0,031	0,80 ±0,57
2 CLN	4,25	0,75	5	210,83 ± 19,18	0,218 ±0,008	1,03 ±0,84
3 CLN	4,0	1,0	5	221,167 ± 10,31	0,227 ±0,015	0,90 ±0,22
4 CLN	3,75	1,25	5	245,70 ± 8,70	0,212 ±0,017	0,74 ±0,21
5 CLN	3,5	1,5	5	228,43 ± 24,82	0,25 ±0,031	1,35 ±0,69

p<0,05

O valor de Pdl está relacionado à distribuição de tamanho da população de partículas obtidas. Quanto menor o valor de Pdl menor será a variação existente na população (HOU *et al.*, 2002).

Segundo os dados de tamanho e Pdl apresentados na tabela, pode-se concluir que as formulações de CLN obtidas não apresentaram diferença significativa quando comparadas à formulação 14 NLS. Portanto, o acréscimo do extrato de babaçu não representou desvantagem frente a estes parâmetros avaliados.

O PZ é utilizado para determinar a carga existente na superfície da partícula e prever uma baixa estabilidade do material gerado. A repulsão entre as partículas devido à carga superficial elevada pode prevenir a formação de aglomerados. Então, valores próximos à neutralidade tendem a gerar um processo de agregação das partículas ou ainda a formação de gel (DAS & CHAUDHURY, 2011; DAS, WAY & TAN, 2012).

Segundo Riddick (1968) *apud* Freitas e Müller (1998), uma medida de PZ maior ou igual a  $|60|$  mV é considerada excelente. Contudo valores iguais ou maiores que  $|30|$  mV são considerados satisfatórios para uma boa estabilidade física.

Os valores de PZ foram determinados nas formulações recém-preparadas e estão apresentados na tabela 6. Os valores encontrados para as formulações de 1 CLN a 5 CLN apresentaram-se sem diferença estatística significativa e próximos de zero, indicando que as cargas superficiais das nanopartículas produzidas estão próximas à neutralidade, o que poderia prejudicar a estabilidade das formulações obtidas.



Entretanto, segundo Freitas & Müller (1998), formulações de NLS contendo Compritol e Poloxamer 188<sup>®</sup>, quando armazenadas em frascos de vidro siliconizado, ao abrigo da luz e sob refrigeração, mantiveram-se estáveis por um período de 3 anos.

#### 5.2.4 EE DO EXTRATO DE BABAÇU NOS CLN

As formulações foram avaliadas quanto à eficiência de encapsulamento do extrato de babaçu baseados em análise gravimétrica. As suspensões de nanopartículas foram diluídas e, em seguida, centrifugadas para que as nanopartículas geradas pudessem ser separadas do sobrenadante aquoso.

Foram avaliadas a EE das formulações 1 CLN a 5 CLN. Este processo também foi realizado com a formulação 14 NLS, para que os resíduos obtidos no preparo dos CLN fossem desconsiderados.

Todas as massas utilizadas foram pesadas para que fosse calculada a EE. Na tabela 7 estão apresentados os valores de EE das formulações de 1 CLN a 5 CLN.

**Tabela 7:** Indicação das proporções dos constituintes da matriz lipídica e da eficácia de encapsulamento (EE) pelo método direto dos CLN obtidos.

CLN	% Compritol ATO 888	% extrato de babaçu	%EE
1 CLN	4,5	0,5	97,5 ±7,4
2 CLN	4,25	0,75	94,8 ±10,2
3 CLN	4,0	1,0	91,7 ±6,5
4 CLN	3,75	1,25	85,2 ±7,9
5 CLN	3,5	1,5	70,8 ±8,6

A formulação 1 CLN foi a que apresentou maior porcentagem de EE, entretanto ela foi preparada com apenas 0,5% de babaçu na porção lipídica. A formulação 5 CLN, apesar de ter apresentado o menor valor de EE, demanda uma maior porção de extrato de babaçu que as demais no seu preparo. Assim, a formulação 5 CLN foi considerada como a mais adequada.

Após a avaliação da EE, foi possível calcular a fração de babaçu presente no CLN seco. Na tabela 8 está a indicação das proporções dos constituintes do CLN em massa seca, segundo a EE.

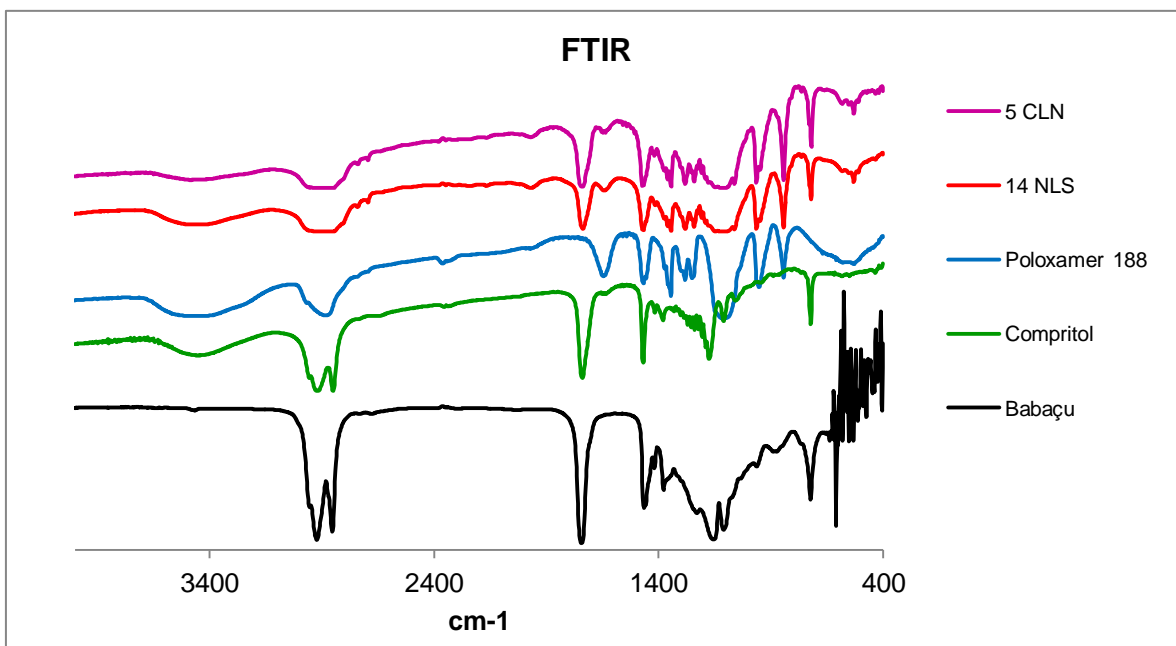
Tabela 8: Indicação das proporções dos constituintes do CLN em massa seca, segundo a EE.

CLN	% Compritol ATO 888	% extrato de babaçu	Poloxamer 188®
1 CLN	45	4,775±0,37	50,0
2 CLN	42,5	7,11±0,76	50,0
3 CLN	40	9,17±0,65	50,0
4 CLN	37,5	10,65±0,98	50,0
5 CLN	35	10,62± 1,29	50,0

Baseado em avaliação estatística, concluiu-se que não houve diferença estatística significativa do conteúdo de extrato de babaçu encapsulado quando comparadas as formulações 3 CLN, 4 CLN e 5 CLN. Entretanto, considerando-se a baixa sensibilidade do método utilizado e os possíveis erros implícitos pelas várias etapas de manipulação e transferência do material para diferentes recipientes optou-se pela escolha do 5 CLN como candidato às avaliações posteriores.

#### 5.2.5 FTIR DO 5 CLN

Os espectros de FTIR do extrato de babaçu, Compritol ATO 888, Poloxamer 188® e das formulações obtidas, 14 NLS e 5 CLN, estão apresentados na figura 16. Com o intuito de realizar uma análise qualitativa da presença do extrato de babaçu no CLN os espectros de FTIR foram comparados.

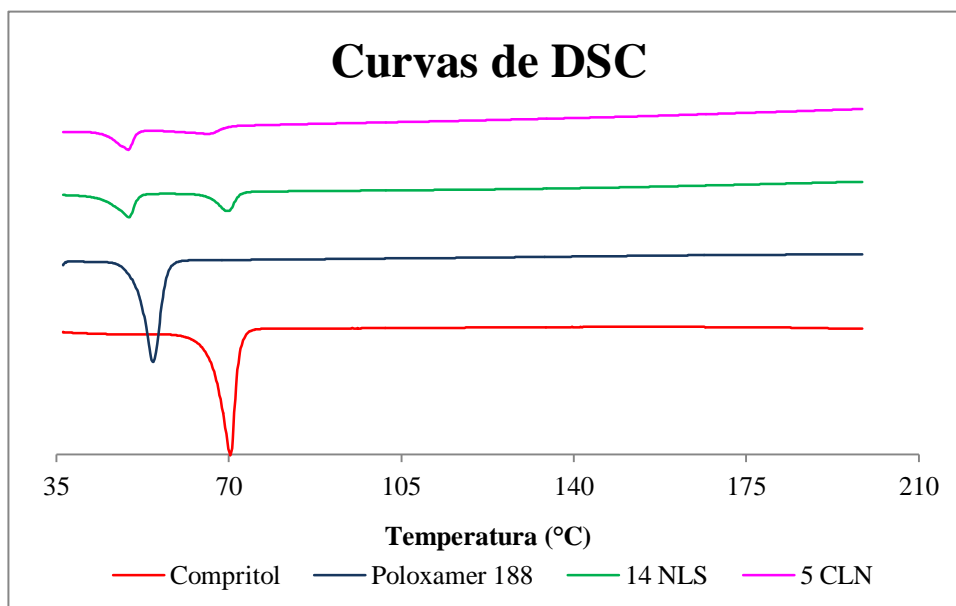


**Figura 16** - Espectros de FTIR do extrato de babaçu, Compritol ATO 888, Poloxamer 188<sup>®</sup> e formulações 14 NLS e 5 CLN.

Comparando-se os espectros, detectou-se que os picos característicos presentes no extrato de babaçu visualizados em 2982-2950, 1750 e 1180  $\text{cm}^{-1}$ , também são encontrados nos espectros do tensoativo e lipídeo utilizados na preparação do 5 CLN, conforme observado no item 5.2.2.1. Com isso, somente a técnica de FTIR não foi eficaz para comprovar que o babaçu está presente no sistema formado, sendo necessária outra técnica, como EE, para comprovar a participação do extrato de babaçu na formação do CLN.

#### 5.2.6 DSC DO 5 CLN

Comparando os termogramas da amostra de 5 CLN frente à 14 NLS, pode-se observar que o pico em 52,6 °C é mantido, mas há uma diminuição do pico em 73,3 °C, correspondente à matriz lipídica sólida formada pelo compritol ATO 888 (figura 17).



**Figura 17:** Termogramas obtidos por DSC dos excipientes, Compritol e Poloxamer 188®, e das formulações, 14NLS e 5 CLN, desenvolvidas.

No preparo do 5 CLN foram utilizados 3,5% de compritol ATO 888 e 1,5% de extrato lipofílico de babaçu. Comparando as formulações 14 NLS e 5 CLN, observou-se que a presença do extrato lipofílico de babaçu alterou o comportamento cristalino do Compritol.

De acordo com Müller e colaboradores (2000) (*apud KOVACEVIC et al.*, 2011) quando há baixas concentrações de porção óleo, as moléculas de óleo podem estar distribuídas com a matriz formada pelo lipídeo sólido para a formação do CLN. No caso de uma concentração excessiva de óleo, maior que o limite da solubilidade do óleo na matriz lipídica, tem-se então um tipo de CLN no qual ocorre a formação de nanocompartimentos. Durante o processo de resfriamento para a obtenção dos CLN o óleo precipita separadamente na matriz lipídica.

Baseando-se nos termogramas de DSC do CLN obtidos, deve-se considerar a hipótese da formação de microgotículas de óleo dispersas na matriz lipídica, pois há uma alteração do pico endotérmico que corresponde a uma menor cristalinidade da porção lipídica, quando comparado à análise do lipídeo puro.

### 5.2.7 AVALIAÇÃO DO USO DE CRIOPROTETORES PARA 5 CLN

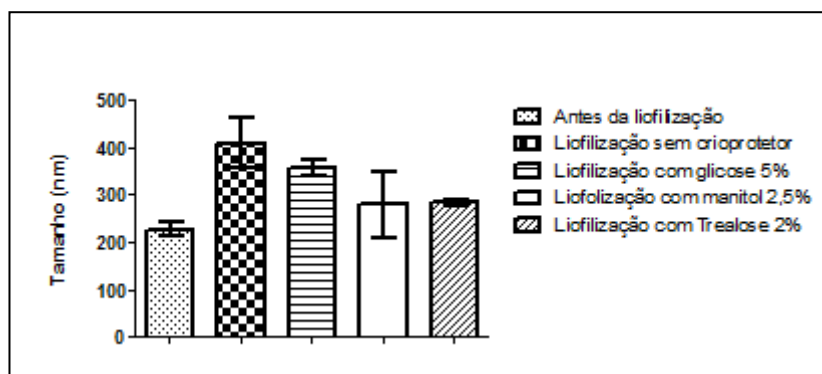
Técnicas como centrifugação, liofilização e evaporação são amplamente utilizadas com o intuito de concentrar e secar suspensões de carreadores de fármacos (VAUTHIER, CABANE & LABARRE, 2008).

A liofilização é um processo amplamente utilizado para secagem e melhora da estabilidade de produtos farmacêuticos, como vacinas, proteínas, lipossomas e nanopartículas. Entretanto, esta técnica pode promover alguns estresses nos sistemas nanoparticulados, especialmente causados pelo processo de descongelamento e desidratação. Durante o congelamento pode ocorrer a separação de fases entre o gelo e a solução de crioprotetor. (ADBELWAHED *et al.*, 2006). E ainda há a possibilidade de ocorrer agregação das partículas possivelmente pela alta concentração de nanopartículas em algumas regiões da suspensão (VAUTHIER, CABANE & LABARRE, 2008).

Os crioprotetores mais citados na literatura para a liofilização de sistemas nanoparticulados são açúcares, como a trealose, sacarose, glicose e manitol. Estes crioprotetores têm a capacidade de imobilizar a partícula dentro de uma matriz vítrea formada pelo crioprotetor e assim prevenir a agregação, além de proteger contra o estresse mecânico causado pelos cristais de gelo formados (ZIMMERMANN *et al.*, 2000).

Visando a busca de um sistema nanoparticulado que apresentasse maior estabilidade física e garantisse a integridade física das partículas produzidas, avaliou-se o uso de crioprotetores, com amplo uso na literatura, como forma de proteger as partículas durante o processo de secagem por liofilização e que proporcionasse uma rápida redispersão em meio aquoso do material nanoparticulado. Para isso, foi avaliada a influência dos carboidratos glicose, manitol e trealose (SCHWARZ & MEHNERT, 1997; KUO & CHUNG, 2011).

Para avaliar a vantagem do uso de crioprotetor para secagem do 5 CLN, quanto à manutenção do tamanho médio, foram observados os tamanhos de partícula da formulação 5 CLN recém preparada e após a liofilização sem uso de crioprotetor e com os crioprotetores glicose (5%), manitol (2,5%) e trealose (2%). Na Figura 18 está apresentada a distribuição dos valores de tamanho de partícula das condições avaliadas.



**Figura 18:** Tamanho de partícula (nm) do 5 CLN recém preparado (antes da liofilização), liofilizada sem uso de crioprotetor e liofilizada com os crioprotetores glicose (5%), manitol (2,5%) e trealose (2%).

Observou-se que o tamanho médio do 5 CLN antes da liofilização era de  $228,43 \pm 24,82$  nm e após a liofilização sem crioprotetor, com glicose (5%), manitol (2,5%) e trealose (2%) o tamanho médio observado foi de  $410,60 \pm 89,61$  nm;  $358,93 \pm 28,68$ ;  $279,76 \pm 118,95$  nm e  $285,23 \pm 11,56$  nm, respectivamente. Comparando o tamanho médio das partículas antes e após o processo de liofilização, verificou-se que houve um aumento considerável de tamanho sem uso de crioprotetor e quando liofilizadas com glicose (5%). Dentre os crioprotetores testados, a trealose a 2% e manitol a 2,5% mostraram-se como escolhas promissoras por apresentarem um menor tamanho de partícula que as demais após a liofilização e uma diferença significativa quando comparadas com a liofilização com glicose e sem uso de crioprotetor.

Análises estatísticas indicam que somente para a liofilização com manitol a 2,5%, não houve diferença significativa quanto ao tamanho de partículas, entretanto os valores obtidos com manitol indicam um desvio bastante acentuado. Para a trealose houve diferença significativa quanto ao tamanho antes e após a secagem, porém o tamanho médio mostrou-se mais uniforme que o manitol.

Em estudo realizado por Schwarz & Mehnert (1997), foram preparadas NLS pela técnica de homogeneização por alta pressão contendo compritol como matriz lipídica e avaliou-se a eficiência de diferentes crioprotetores bem como a influência da concentração. Foram utilizados os crioprotetores glicose, manose, maltose e trealose nas concentrações 10, 12,5 e 15% respectivamente. Segundo os autores, a trealose a 15% mostrou-se como um

promissor sistema de criopreservação mesmo após observarem que o diâmetro médio das partículas inicialmente de 160 passou para 330 nm após a liofilização, representando um aumento de aproximadamente 106% do tamanho inicial.

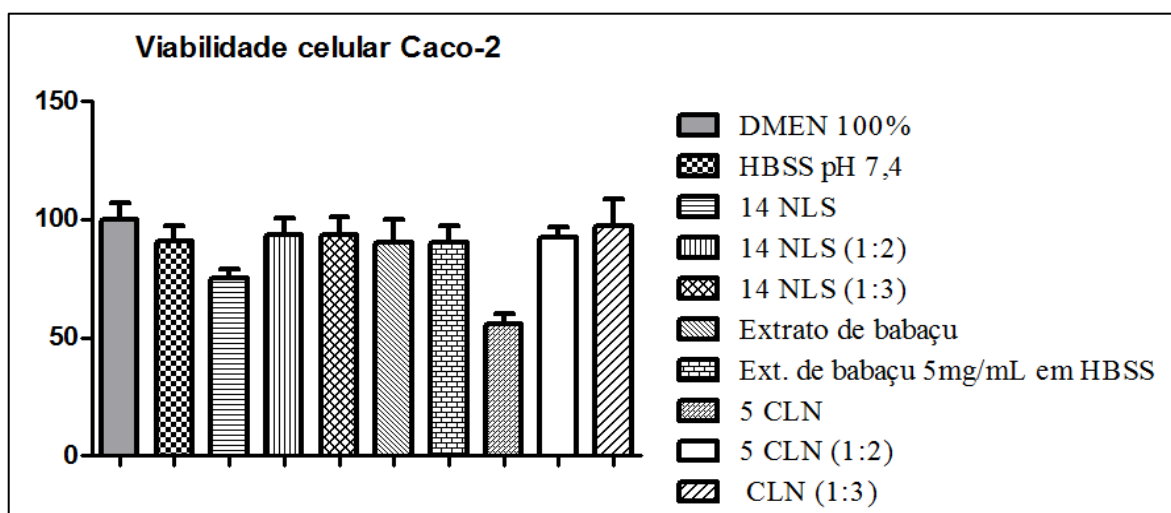
Kuo & Chung (2011) desenvolveram NLS contendo compritol, tripalmitina e manteiga de cacau como sistema carreador de estavudina delavirdina e saquinavir e utilizaram como crioprotetor a trealose a 2%. Não observaram alteração significativa quanto ao tamanho das partículas e de EE antes e após liofilização. Concluiu-se que o emprego do crioprotetor visando uma maior estabilidade da partícula gerada não alterou as características iniciais.

### 5.3 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DO 5 CLN

Considerando os valores de EE, determinado de modo indireto, os resultados de espectros de FTIR e as curvas de DSC dos CLN desenvolvidos, optou-se pelo 5 CLN como melhor candidato para avaliação *in vitro* de segurança e eficácia do sistema produzido, comparando-se os resultados com o sistema 14 NLS o qual não possuía extrato lipofílico de babaçu.

#### 5.3.1 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS CACO-2

As formulações 14 NLS e 5 CLN bem como o extrato de babaçu foram testadas quanto ao efeito tóxico frente às células Caco-2 em diferentes proporções. As diluições foram feitas em tampão HBSS com pH 7,4. Na figura 19 estão representados os perfis de viabilidade celular em porcentagem (%) das células Caco-2 frente às formulações 14 NLS e 5 CLN nas respectivas diluições, ao diluente utilizado e ao extrato de babaçu, em relação ao grupo controle, mantido em contato exclusivamente com meio de cultura DMEM suplementado com SFB.



**Figura 19:** Representação da viabilidade celular de células Caco-2, expressa em % em relação ao grupo controle (DMEM), das amostras: tampão HBSS, 14 NLS e diluições 1:2 e 1:3 em HBSS, extrato de babaçu puro e na concentração de 5 mg/ml em HBSS e 5 CLN e diluições 1:2 e 1:3 em HBSS (n=6).

Foi possível observar que o tampão HBSS não apresentou efeito tóxico, quando mantido em contato com as células Caco-2 por 3 h, uma vez que a viabilidade celular foi de  $90,82 \pm 6,75\%$  em relação às células do grupo controle (DMEM). Pode-se concluir que é um veículo adequado para as diluições das amostras testadas: 14 NLS, 5 CLN e extrato de babaçu.

A amostra de extrato de babaçu foi testada, frente às células Caco-2, sem realizar diluição, apresentando uma viabilidade celular de  $86,52 \pm 6,26\%$ , e diluída em HBSS para uma concentração final de 5 mg/ml cuja viabilidade celular obtida foi de  $90,43 \pm 6,84\%$ .

O extrato de babaçu tanto na forma não diluída quanto na diluída, não apresentou efeitos tóxicos quando mantido em contato com as células por 3 h, indicando a segurança da administração por via oral. Mesmo sendo o extrato e o meio de diluição dois líquidos imiscíveis, o extrato testado diretamente em contato com a célula, já se mostrou como não tóxico, garantindo a confiabilidade do resultado da viabilidade celular da proporção 5 mg/ml.

Em estudo realizado por Rosa e colaboradores (2012), foi avaliada a citotoxicidade do óleo de *Cynomorium coccineum L.*, o qual é composto principalmente pelos ácidos graxos: ácido oleico (38%), ácido linoleico (20%), ácido palmítico (15%) e ácido  $\alpha$ -linolênico (10.8%). Foram testadas diferentes concentrações de óleo (50-1000  $\mu\text{g/ml}$ ) e observou-se uma resposta dependente da dose bastante significativa, comprovada pela redução da



viabilidade celular em doses maiores ou iguais a 100 µg/ml. Entretanto, segundo as condições testadas, este fenômeno não foi observado para o extrato de babaçu.

A amostra 14 NLS foi testada frente às células Caco-2 sem realizar diluição, ou seja, do modo como foi obtida após a preparação, e diluída em HBSS nas proporções 14NLS/HBSS 1:2 e 1:3. Os valores de viabilidade celular encontrados foram de  $75,09 \pm 4,01\%$ ;  $93,4 \pm 7,12\%$ ;  $93,6 \pm 7,28\%$  respectivamente.

Apesar de não ter sido realizada a avaliação dos excipientes empregados, isoladamente, para o desenvolvimento da NLS, acredita-se que os excipientes selecionados foram adequados uma vez que não foi observado efeito tóxico frente às células testadas. Huang e colaboradores (2008) avaliaram o efeito do Poloxamer 188<sup>®</sup> na glicoproteína-P, uma proteína de membrana relacionada ao sistema de efluxo de fármacos, utilizando o celiprolol como fármaco modelo. Os autores concluíram que o tensoativo em solução, nas concentrações de 0,03, 0,1 e 0,3%, além de não apresentar efeito tóxico frente às células Caco-2, também atuava como um potente inibidor da glicoproteína-P. Tal fato sugere que o Poloxamer 188<sup>®</sup> pode contribuir para o aumento da biodisponibilidade dos fármacos administrados em formulações que contenham o tensoativo.

O 5 CLN recém preparado e não diluído apresentou uma viabilidade celular bastante reduzida,  $59,77 \pm 19,95\%$ . Já as amostras diluídas em HBSS nas proporções 1:2 e 1:3 apresentaram uma viabilidade celular de  $87,76 \pm 9,81\%$  e  $97,14 \pm 11,45\%$ , respectivamente. Comparando com os resultados obtidos com a 14 NLS, é possível observar que a adição de babaçu ao sistema diminuiu a viabilidade celular somente quando a formulação foi testada sem que houvesse diluição. Conforme os resultados observados nas análises de DSC (item 5.2.6), o 5 CLN apresenta um menor grau de cristalinidade da matriz lipídica que a 14 NLS. Segundo Wissing e colaboradores (2004) a capacidade oclusiva de um carreador lipídico está diretamente relacionada ao tamanho da partícula, concentração e cristalinidade da matriz lipídica. Conclui-se que o 5 CLN devido ao menor grau de cristalinidade promoveu uma maior oclusão sobre as células, dificultando as trocas gasosas e, conseqüentemente, diminuindo a viabilidade celular.

Outra possível explicação poderia ser o fato de que os ácidos graxos em contato com as membranas celulares podem alterar o perfil lipídico da membrana celular, modificando a fluidez, a sinalização das vias de transdução mediada por lipídeos e a peroxidação lipídica, causando uma menor viabilidade celular (ESCRICH *et al.*, 2007; NANO *et al.*, 2003).

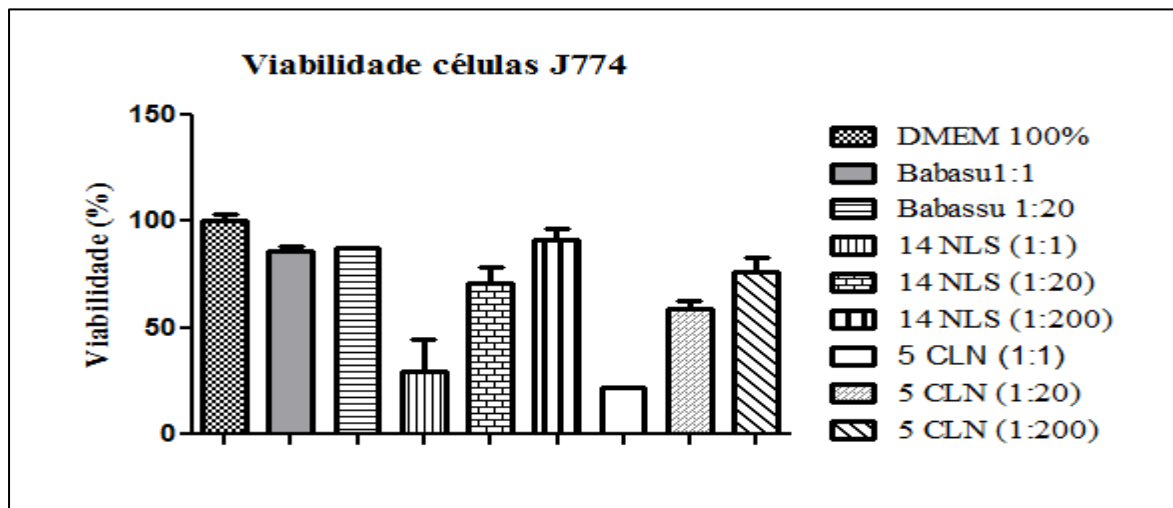
Apesar de não ter sido avaliada a permeabilidade do sistema, este pode ser considerado promissor para a administração por via oral do extrato de babaçu, devido à baixa citotoxicidade, segundo as condições testadas e, ainda, pelo fato de as partículas geradas apresentarem um tamanho inferior a 300 nm.

Em estudo realizado por Abdelwahed e colaboradores (2006), partículas com tamanho de 100 nm apresentaram absorção *in vitro* utilizando célula Caco-2 2,5 vezes maior que as partículas com 1  $\mu\text{m}$  e 6 vezes maior que as que apresentavam 10  $\mu\text{m}$ .

Os excipientes

### 5.3.2 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS J774

As formulações 14 NLS e 5 CLN bem como o extrato de babaçu foram testados quanto ao efeito tóxico frente as células J774 em diferentes proporções. As diluições foram feitas em meio DMEM suplementado. Na figura 20 estão expressos os valores de viabilidade celular em porcentagem (%) em relação ao grupo controle mantido em contato exclusivamente com meio de cultura DMEM suplementado.



**Figura 20:** Representação da viabilidade celular de células J774, expressa em % em relação ao grupo controle (DMEM), das amostras: extrato de babaçu nas diluições 1:1 e 1:20; 14 NLS nas diluições 1:1, 1:20 e 1:200; 5 CLN nas diluições 1:1, 1:20 e 1:200. Tempo de ensaio de 24 h (n=6).

As amostras foram deixadas em contato com as células J774 por um período de 24 h. O valor de viabilidade celular foi expresso em relação à porcentagem do valor encontrado em relação ao grupo controle.

Para as amostras de babaçu nas diluições 1:1 e 1:20 foram encontrados os valores de  $85,6 \pm 2,6\%$  e  $87,25 \pm 0,17\%$  respectivamente. Devido ao longo período de teste, não foi avaliada a citotoxicidade do extrato lipofílico diretamente em contato com a célula, uma vez que a baixa viabilidade celular poderia ser causada pelo efeito oclusivo dos lipídeos sobre as células o que impediria as trocas gasosas e não devido aos constituintes do extrato.

Os valores de viabilidade celular das células J775 frente à 14 NLS nas proporções 1:1, 1:20 e 1:200 foram  $29,30 \pm 15,62\%$ ;  $70,81 \pm 7,33\%$  e  $91,04 \pm 5,41\%$ , respectivamente. Apenas na proporção 1:200 não foi observada uma citotoxicidade significativa. Possivelmente nesta proporção, a concentração das partículas não contribuiu para um efeito oclusivo, dificultando assim a viabilidade celular.

Os valores de viabilidade celular dos macrófagos testados frente ao 5 CLN nas proporções 1:1, 1:20 e 1:200 foram  $22,04 \pm 0,33\%$ ;  $59,05 \pm 3,56\%$  e  $76,40 \pm 6,17\%$ , respectivamente. Em todas as proporções testadas foi verificado o efeito tóxico frente às células J774. Quando comparado as mesmas diluições da 14 NLS, é possível observar que o 5 CLN apresentou menos porcentagem

de viabilidade celular, indicando que a presença do extrato lipídico de babaçu influenciou no efeito tóxico.

Em estudo realizado por Lima e colaboradores (2006<sub>a</sub>), foi avaliada a citotoxicidade de ácidos graxos (ácido araquidônico; ácido docosaenoico; ácido eicosapentaenoico; ácido linoleico, ácido oleico; ácido palmítico, ácido esteárico) frente a células de macrófagos (J774). Observou-se que todos os ácidos graxos testados induziram perda da integridade da membrana celular, aumentaram a fragmentação do DNA e diminuíram o potencial elétrico transmembrana mitocondrial. A citotoxicidade não estava diretamente relacionada às ligações duplas, carbono-carbono, das moléculas de ácidos graxos e estes apresentaram a seguinte ordem decrescente de efeito tóxico: ácido palmítico > ácido docosaenoico > ácido esteárico = ácido eicosapentaenoico = ácido araquidônico > ácido oleico > ácido linoleico. O ácido palmítico (AP), utilizado numa concentração de 75  $\mu\text{mol/l}$  induziu uma perda significativa da integridade da membrana, acima de 23%, aumentou em 26,5% a fragmentação do DNA da célula e diminuiu em 32,5% o potencial transmembrana mitocondrial (MTP). O ácido esteárico (AS) somente induziu a perda da integridade de membrana e fragmentação do DNA celular frente a uma dose de 150  $\mu\text{mol/l}$ , não foi observado efeito quanto ao MTP. O ácido oleico (AO), quando utilizada uma concentração de 225  $\mu\text{mol/l}$  reduziu em 58% a integridade de membrana, no entanto a fragmentação do DNA foi de 15,2 % frente a uma concentração de 200  $\mu\text{mol/l}$  e a perda de MTP 25,6% frente a uma concentração de 100  $\mu\text{mol/l}$ .

### 5.3.3 CITOMETRIA DE FLUXO DE CÉLULAS J774

A avaliação das células J774 quanto a variações de tamanho e granulosidade frente às formulações 14 NLS e 5 CLN foi realizada com o auxílio da técnica de citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é uma ferramenta amplamente utilizada em análises clínicas e pesquisa para definir as características morfológicas de células ou partículas. Estas avaliações são realizadas à medida que as células ou partículas, suspensas em um fluido inerte, passam através de um feixe de luz, raio laser. Esta técnica foi desenvolvida baseada no contador *Coulter*, que

detecta o tamanho das células. Este equipamento é amplamente utilizado na hematologia e vem evoluindo ao longo dos anos (WIKERSON, 2012).

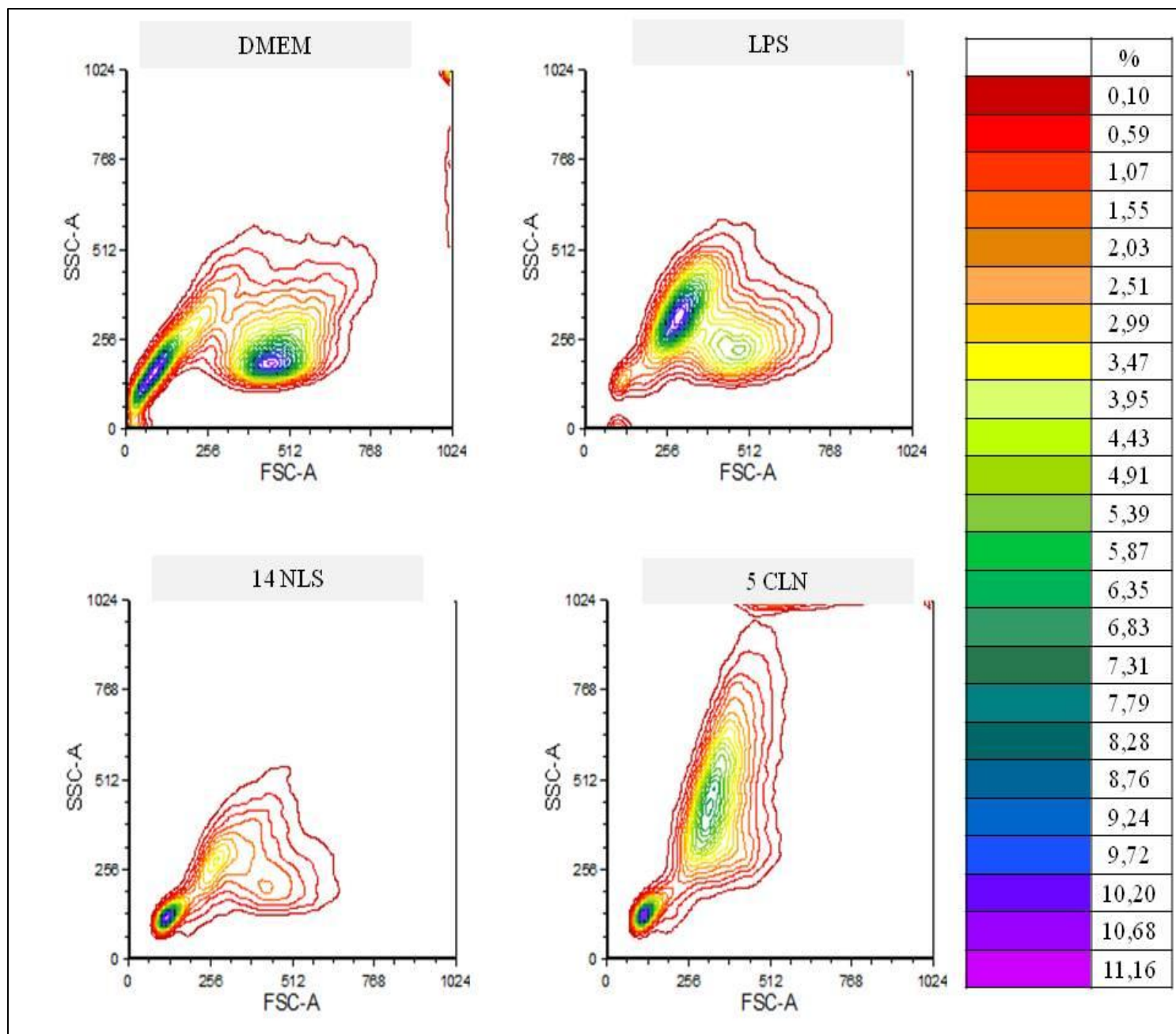
Em princípio, na citometria de fluxo, feixes de luz unidirecionais são emitidos e ao atingir uma célula a luz é espalhada em todas as direções. O equipamento então capta esses parâmetros de espalhamento de luz. Detectores frontais e perpendiculares à fonte de emissão do feixe de luz fornecem, respectivamente, dados referentes à morfologia celular, como o tamanho relativo e granulosidade do citoplasma, bem como irregularidades de membrana (LIMA *et al.*, 2006a).

Foram avaliados os parâmetros de tamanho e granulosidade de células J774 frente à DMEM suplementado com 10% de SFB; DMEM suplementado com 10% de SFB e LPS em uma concentração de 100 ng/ml (LEITE *et al.*, 2007); 14 NLS com diluição 1:1 em DMEM suplementado; 5 CLN com diluição 1:1 em DMEM suplementado.

O poço contendo apenas meio de cultura DMEM suplementado foi utilizado como controle de qualidade do experimento, uma vez que macrófagos apresentam um comportamento específico de valores de tamanho e granulosidade.

O poço contendo LPS (100 ng/ml) DMEM suplementado foi utilizado para avaliar o comportamento dos macrófagos quando estimulados, ou seja, no processo inflamatório. O LPS é um lipopolissacarídeo presente na membrana externa de bactérias gram-negativas. A literatura o descreve como potente ativador de macrófagos e monócitos. O macrófago quando ativado, apresenta uma elevada secreção de interleucinas, principalmente interleucinas pró-inflamatórias IL-1, IL-2 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), as quais podem contribuir para a ocorrência de choque séptico (DINARELLO, 1996; MENG & LOWELL, 1997; FANG *et al.*, 2004).

Na figura 21, estão representados os resultados obtidos da relação tamanho (Forward Light Scatter\_FSC-A) e granulosidade (Side Light Scatter\_SSC-A) das células J774 frente às diferentes condições avaliadas. O gráfico em curva de nível demonstra uma representação da concentração populacional das células (eventos) avaliadas.



**Figura 21:** Gráfico da análise por citometria de fluxo de células J774 tratadas com DMEM, DMEM + LPS, 14 NLS, ou 5 CLN por 24 h. O eixo y, representando feixe de luz frontal (Forward-light scatter\_ FSC-A) e o eixo x, representando feixe de luz perpendicular (side-light scatter\_ SSC-A), foram utilizados para indicar respectivamente tamanho e granulosidade das células como mostrado no gráfico de curva de nível obtido após análise em citômetro de fluxo. Um total de 50000 eventos foi avaliado para cada experimento.

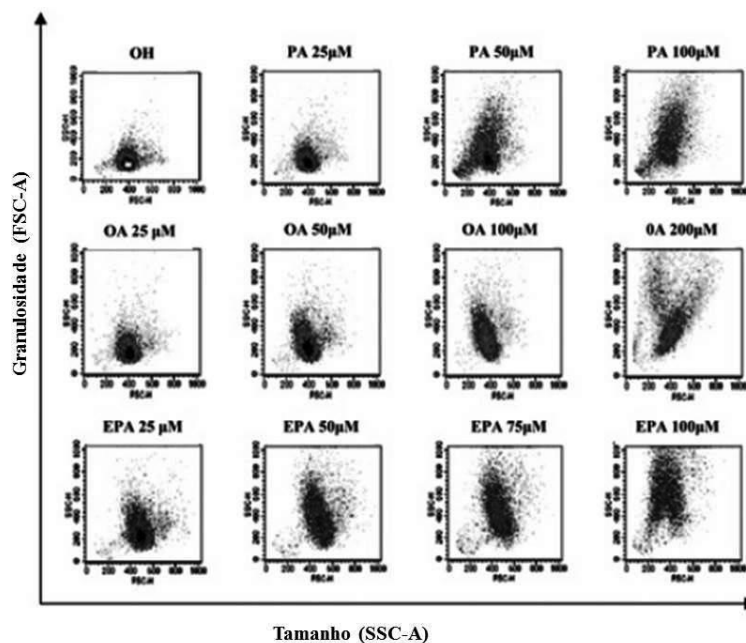
Na figura 21 o gráfico DMEM representa o comportamento normal dos macrófagos, em relação a tamanho e granulosidade. Observam-se duas concentrações populacionais distintas, uma próxima aos eixos é denominada *debris*, que corresponde a morte celular espontânea ou fragmentos celulares. A outra região corresponde às células saudáveis.

No gráfico LPS observa-se uma pequena região de *debris* e duas concentrações populacionais, com destaque à população mais próxima ao eixo SSC-A. Este comportamento indica que há uma alta produção e armazenamento de citocinas e demais substâncias que favorecem a destruição do conteúdo fagocitado. A outra região se assemelha à encontrada no gráfico referente ao controle DMEM (NASCIMENTO *et al.*, 2002).

Quando observado o gráfico 14 NLS, que representa o comportamento das células frente à formulação 14 NLS na proporção 1:1, verifica-se que há uma intensa concentração na região correspondente ao *debris*, o que era esperado devido à viabilidade celular de  $29,30 \pm 15,62\%$ . As células consideradas viáveis apresentaram um comportamento semelhante ao encontrado no gráfico LPS.

No entanto, os macrófagos quando em contato com a formulação 5 CLN, na proporção 1:1, apesar de ter uma região de *debris* marcante, apresentaram células com índice ainda maior de granulosidade quando comparados ao LPS e 14 NLS, sendo altamente perceptível a influência do extrato de babaçu presente na partícula gerada.

Lima e colaboradores (2006<sub>a</sub>) observaram que células J774 tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de ácidos graxos apresentaram mudanças morfológicas importantes, observadas através de citometria de fluxo. Todos os ácidos graxos testados promoveram redução no tamanho celular e aumento do número de grânulos (figura 22).



**Figura 22:** Células J774 tratadas com etanol (OH), ácido palmítico (PA), ácido oleico (AO), ou ácido eicosapentaenoico (EPA) em diferentes concentrações por 24 h. O eixo y, representando feixe de luz frontal (Forward-light scatter) e o eixo x, representando feixe de luz perpendicular (side-light scatter), foram utilizados para indicar respectivamente tamanho e granulosidade das células como mostrado no gráfico de densidade obtido após análise em citômetro de fluxo. Um total de 10000 eventos foi avaliado para cada experimento (Lima *et al.*, 2006<sub>a</sub>).

Os resultados obtidos com o 5 CLN foram considerados satisfatórios ao serem comparados com os de Lima e colaboradores (2006<sub>a</sub>) que atribuíram este comportamento à indução da apoptose e necrose das células J774, e ainda, indicaram que esta citotoxicidade não era estritamente relacionada ao comprimento da cadeia carbônica e ao número de insaturações. O mecanismo de morte celular pode ser atribuído às alterações causadas no potencial elétrico de membrana e ao acúmulo intracelular de lipídeos neutros.

Existem relatos na literatura de que os ácidos graxos exercem função de modulação por outros mecanismos incluindo: regulação dos níveis intracelulares de cálcio em astrócitos e produção de ceramida em macrófagos; (GRANDL *et al.*, 2006; SERGEEVA *et al.*, 2005).

Embora o uso de ácidos graxos, em alta concentração, tenha induzido a morte celular de macrófagos é importante ressaltar que, segundo Lima e colaboradores (2006)<sub>b</sub>, os ácidos graxos palmítico, esteárico, oleico, linoléico, araquidônico, eicosapentaenoico, usados na concentração de 5  $\mu\text{mol/l}$  podem modular a função dos macrófagos, o que pode ser comprovado pelo estímulo da produção de óxido nítrico.



Uma possível vantagem para este comportamento seria o uso dos ácidos graxos como aliados no tratamento da esclerose múltipla.

Em 1996, Bruck e colaboradores relataram a importante participação dos macrófagos na progressão da esclerose múltipla. Os macrófagos, quando ativados, podem contribuir para a destruição da bainha de mielina dos neurônios.

Segundo Vogel e colaboradores (2013) os macrófagos que apresentam função de desmielinização são os mais encontrados nas áreas lesadas. Um mecanismo para controlar a progressão da doença seria diminuir o número de macrófagos circundantes.

Sendo assim, o comportamento de indução de morte celular, observado pela citometria de fluxo das células J774 frente ao 5 CLN, aliado a ausência de efeito tóxico da mesma frente às células Caco-2, indica que a formulação possa ser uma alternativa promissora no tratamento da EM, dificultando a progressão da doença, e administrada por via oral com ou sem associação deste carreador com outros fármacos indicados para esta patologia.

Além dos macrófagos, os linfócitos também são descritos como células que apresentam papel crucial na progressão da EM. Burns e colaboradores (1979) descreveram a capacidade dos ácidos graxos, presentes nos óleos de coco e girassol, em contribuir para uma maior permeabilidade do metotrexato, um dos fármacos utilizados no tratamento da EM, em células L1210, que são originárias de leucemia de murinos. Com isso, outra possível vantagem do uso do 5 CLN no tratamento da EM seria a possibilidade de os ácidos graxos do babaçu, presente no CLN, facilitarem a permeabilidade do metotrexato em células linfocitárias.

## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho conclui que:

- Foi possível obter extratos lipofílicos de babaçu com composição e rendimento compatíveis aos dados de literatura;
- O método proposto para a avaliação qualitativa do extrato de babaçu obtido utilizando-se a técnica de CG-EM foi capaz de promover uma separação eficiente dos constituintes;
- Após avaliação do modo de preparo de NLS, variando-se a proporção de lipídeos e tensoativos e tempo de preparo, a 14 NLS mostrou-se como um modelo adequado como forma de preparo de CLN;
- O CLN proposto foi capaz de carrear o extrato de babaçu, sendo considerada a formulação 5 CLN a mais promissora;
- O 5 CLN desenvolvido não desempenhou, na proporção 1:2 atividade tóxica frente às células Caco-2, sendo considerado um bom candidato para administração via oral;
- A presença do extrato de babaçu no 5 CLN foi capaz de induzir a morte celular em células J774, sendo considerado uma alternativa promissora ao tratamento da esclerose múltipla ou de outras doenças inflamatórias.

## 7 PERSPECTIVAS

Com os resultados promissores obtidos com o presente trabalho propõe-se:

- Desenvolvimento e validação de um método por CG-EM para quantificação do extrato lipofílico de babaçu presente no 5 CLN desenvolvido, baseado na Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003, ANVISA;
- Avaliação da estabilidade da formulação 5 CLN sem liofilizar e liofilizada, segundo a resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005;
- Estudo de citotoxicidade das formulações 5 CLN liofilizadas e comparação com os dados obtidos no presente estudo;
- Ensaio *in vivo*, utilizando modelo animal, para avaliar a toxicidade crônica, por via oral do 5 CLN;
- Avaliação *in vivo*, utilizando modelo animal, da eficácia do 5 CLN frente a esclerose múltipla e se há efeito sinérgico quando administrado com metotrexato.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Cellular and Molecular Immunology**. 7 ed, Philadelphia: Elsevier, 2012.

ABDEL-MOTTALEB, Mona M.A.; NEUMANN, Dirk; LAMPRECHT, Alf. In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). **International Journal of Pharmaceutics**. v. 390, p. 208-213. 2010

ADBELWAHED, Wassim *et al.* Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 58, p. 1688-1713, 2006.

ALLEN, Theresa M.; CULLIS, Pieter R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 65, p. 36-48, 2013.

ANDREWS, Gavin P. *et al.* Characterisation of the Thermal, Spectroscopic and Drug Dissolution Properties of Mefenamic Acid and Polyoxyethylene–Polyoxypropylene Solid Dispersions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 98, n.12, p. 4545-4556, 2009.

ANVISA. Resolução n.482, de 23 de setembro de 1999. Aprovação, regulamento técnico, padrão de identidade e qualidade de óleos e gorduras.

ARTURSSON, Per; PALM, Katrin; LUTHMAN, Kristina. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, p. 280-289. 2012

Associação Brasileira de Esclerose Múltipla **O que é a Esclerose Múltipla. 2012.** Disponível em: [http://www.abem.org.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=61&Itemid=54](http://www.abem.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=54). Acesso em: 10 de dezembro de 2012

ATTAMA, Anthony A. *et al.* Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development. **Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems**, p. 107-140, 2012.

BALICK, Michael J. The Use of Palms by the Apinayé and Guadajajara Indians of Northeastern Brazil. **Advances in Economic Botany**. v. 6, p. 65-90, 1988.

BANJANAC, Mihailo *et al.* Anti-inflammatory mechanism of action of azithromycin in LPS-stimulated J774A.1 cells. **Pharmacological Research** v. 66, p. 357-362, 2012.

BENVENISTE, Etty N. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Molecular Medicine**. v. 75, p. 165-173, 1997.

BHANDARI, Rojit; KAUR, Indu P. Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of isoniazid-solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 441, p. 202-212, 2013

BOSE, Sonali *et al.* Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 441, p. 56-66, 2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília, 2007. Disponível em: <[http://www.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/Programa\\_Nacional\\_de\\_Plantas\\_Mediciniais\\_e\\_Fitoter%C3%A1picos..pdf](http://www.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/Programa_Nacional_de_Plantas_Mediciniais_e_Fitoter%C3%A1picos..pdf)>. Acesso em: 29 de mar de 2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília, 2006. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf)>. Acesso em: 29 de mar de 2013

BRUBACH, J. *et al.* Structural and thermal characterization of glyceryl behenate by X-ray diffraction coupled to differential calorimetry and infrared spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 336, p. 248-256, 2007.

BRUCK, *et al.*, Macrophages in Multiple Sclerosis. **Immunobiology**. v. 195, p. 588-600, 1996.

BRUICE, Paula Y. **Organic Chemistry**. 4 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2006.

BURNS, Patrick C.; SPECTOR, Arthur A. Membrane fatty acid modification in tumor cells: A potential therapeutic adjunct. **Lipid**. v. 22, n. 3, p. 178-184, 1987

CALDER PC. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. **European Journal of Pharmacology**. v. 688, n. 1, p. 50-58, 2011.

COMPSTON, Alastair; COLES, Alasdair. Multiple sclerosis. **Seminar**. v. 172, p. 1502-1517, 2008.

COMPSTON, Alastair. The pathogenesis and basis for treatment in multiple sclerosis. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. v. 106, p. 246-248, 2004.

DAS, Surijat; NG, Wai K.; TAN, Reginald B.H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 47, p. 139-151, 2012

DAS, Surijat *et al.* Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug:

Effects of process variables. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 88, p. 483-489. 2011.

DAS, Surajit; CHAUDHURY, Anumita. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. **PharmSciTech**. v. 12, n. 1, p. 62-76, 2010.

DESAI, Preshita P *et al.* Overcoming poor oral bioavailability using nanoparticle formulations – opportunities and imitations. **Drug Discovery Today: Technologies**. v. 9, n. 2, p. 87-95, 2012

DINARELLO, Charles. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**. v. 87, n. 5, p. 2095-2147, 1996;

DOMB, Abraham J. **Lipspheres for controlled delivery of substances**. US 5,188,837, 3 de outubro de 1991, 23 fevereiro 1993

EBERLIN, Marcos N. Structurally diagnostic ion/molecule reactions: class and functional-group identification by mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 41, p. 141-156, 2006.

EMMERICH, Francisco. **Modelo Granular, Percolação-Resistividade, SER e Módulo de Elasticidade de Materiais Carbonosos: Aplicação ao Endocampo de Babaçu Tratado termicamente Até 2200°C**. 1987. 122 f. Tese (Doutorado em Física) \_ Instituto de Física, Universidade Estaduas de Campinas, Campinas 1987.

EPSTEIN, Mara M. *et al.* Dietary Fatty Acid Intake and Prostate Cancer Survival in Örebro County, Sweden. **American Journal of Epidemiology**. v. 176, n. 3, p. 240-252, 2012.

FANG, Jia-You *et al.* Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 70, p. 633-640, 2004

FANTHI, Milad; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**. v. 23, p. 13-27, 2012.

FREITAS, Chrysantha; MULLER, Rainer. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN<sup>TM</sup>) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 168, p. 221-229, 1998

FREITAS, Chrysantha; MULLER, Rainer. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>) and crystallinity of the lipid phase. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 47, p. 125-132, 1999.

FRESHNEY, Ian R. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. 15 ed. Nova Jersey: John Wiley, 2005.

FUJIHARA, Mitsuhiro et al. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 100, p. 171-194, 2003.

GAN, Li *et al.* Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. **Drug Discovery Today**. v. 18, n. 5/6, p. 290-297, 2013

GASCO, Maria R.; ANTONELLI, Lungo P. **Method for Producing Solid Lipid Microspheres having a Narrow Size Distribution**. US005250236A, 2 ago 1991, 5 out 1993.

GRANDL, M. *et al.* E-LDL and Ox-LDL differentially regulate ceramide and cholesterol raft microdomains in human macrophages. **Cytometry A**. v. 69, n. 3, p.189–191, 2006.

GONZALEZ-PEREZ, Sol Elizabeth *et al.* Conhecimento e usos do babaçu (*Attalea speciosa* Mart. e *Attalea eichleri* (Drude) A. J. Hend.) entre os Mebêngôkre-Kayapó da Terra Indígena Las Casas, estado do Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 26, n. 2, p. 295-308, 2012

GUHAGARKAR, Swati A. *et al.* Nanoparticles of Polyethylene Sebacate: A New Biodegradable Polymer. **PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 935-942, 2009.

GUPTA, Ram R.; KOMPELLA, Uday B. **Nanoparticle Technology for Drug Delivery**. Drug and the Pharmaceutical Science. Nova York: Taylor & Francis Group, 2006

GUTIÉRREZ, J.M. *et al.* Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science** v. 13, p. 245-251, 2010.

HAMDANI, J. *et al.* Physical and thermal characterisation of Precirol<sup>®</sup> and Compritol<sup>®</sup> as lipophilic glycerides used for the preparation of controlled-release matrix pellets. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 260, p. 47–57, 2003.

HENRY, Geneive E. *et al.* Antioxidant and Cyclooxygenase Activities of Fatty Acids Found in Food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 2231-2234, 2002.

HOTHERSALL, John S. *et al.* Induction of nitric oxide synthesis in J774 cells lowers intracellular glutathione : effect of modulated glutathione redox status on nitric oxide synthase induction. **Biochemical Journal**. v. 322, p. 477-481, 1997

HOU, DongZhi *et al.* The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). **Biomaterials**. v. 24, p. 1781-1785, 2002.

HUANG, Jiangeng *et al.* Effect of pluronic F68 block copolymer on P-glycoprotein transport and CYP3A4 metabolism. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 356, p. 351-353, 2008.

HUYNH, N.T. *et al.* Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 379, p. 201-209, 2009.

ISO. **Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity** (10993-5). Bruxelles: CEN, 2009. 52 p.

JIANG, Wen; BRYCE, Richard P.; HORROBIN, David F. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. **Critical Reviews in Oncology:Hematology**. v. 27, p. 179-209, 1998.

JOSHI, Medha D.; MÜLLER, Rainer H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 71, p. 161-172, 2009.

KOCH, Marcus *et al.*, Erythrocyte membrane fatty acids in benign and progressive forms of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 244, p. 123-126, 2006.

KOVACEVIC, A *et al.* Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 406, p. 163-172, 2011.

KUO, Young-Chic; CHUNG, Chiu-Yen. Solid lipid nanoparticles comprising internal Compritol 888 ATO, tripalmitin and cacao butter for encapsulating and releasing stavudine, delavirdine and saquinavir. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 88, p. 682-690, 2011

LANG, Heather L. E. *et al.* A functional and Structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. **Nature Immunology**. v. 3, n. 10, p.940-943, 2002.

LEITE, Daniela F. P. *et al.* Multidrug resistance related protein (ABCC1) and its role on nitrite production by the murine macrophage cell line RAW 264.7. **Biochemical Pharmacology**. V. 73, p. 665-674, 2007.

LIMA, Thais M. *et al.* Comparative toxicity of fatty acids on a macrophage cell line (J774). **Clinical Science**. v. 111, p. 307-317, 2006<sub>a</sub>.

LIMA, Thais M. *et al.* Fatty acid control of nitric oxide production by macrophages. **FEBS Letters**. v. 580, p. 3287-3295, 2006<sub>b</sub>.

LIU *et al* Biocompatibility, cellular uptake and biodistribution of the polymeric amphiphilic nanoparticles as oral drug carriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 103, p. 345-353, 2013.



LUO, Cheng-Feng *et al.* Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of puerarin solid lipid nanoparticles following oral administration. **International Journal of Pharmaceutics** v. 410, p. 138-144, 2011.

MACHADO, Getulio C.; CHAVES, José Bonifácio P.; ANTONIASSI, Rosemar. Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco de Babaçu. **Revista Ceres**. v. 53, n. 308, p. 463-470, 2006

MARRACK, Philippa *et al.* Autoimmune disease: why and where it occurs. **Nature**. v.7, n. 8, p. 899-905, 2001.

MARRIE, Ruth Ann. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. **Neurology**. v. 3, p. 709-718, 2004

MARTYN, C N *et al.* Symptomatic Epstein-Bar virus infection and multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**. v. 56, p. 167-168, 1993.

MARTIN, Roland *et al.* Immunological aspects of demyelinating diseases. **Annual Review of Immunology**. v. 10, p. 153-187, 1992.

MASTERS, John R. **Animal Cell Culture**. 3 ed. Nova York: Oxford University Press, 2000.

MEHNERT, Wolfgang; MÄDER, Karsten. Solid lipid nanoparticles; Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, p. 83-101, 2012.

MENG, Fanying; LOWELL, Clifford A. Lipopolysaccharide (LPS)-induced Macrophage Activation and Signal Transduction in the Absence of Src-Family Kinases Hck, Fgr, and Lyn. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 185, n. 9, p. 1661-1670, 1997.

MIKAELOFF, Yann *et al.* Parental smoking at home and the risk of childhood-onset multiple sclerosis in children. **Brain**. v. 130, p. 2589-2595, 2007.

MILOVIC, Vladan *et al.* Permeability Characteristics of Polyamines Across Intestinal Epithelium Using the Caco-2 Monolayer System: Comparison Between Transepithelial Flux and Mitogen-Stimulated Uptake Into Epithelial Cells. **Nutrition**. v. 17, p. 462-466, 2001.

MOURAD, Anna L. Principais culturas para obtenção de óleos vegetais combustíveis no Brasil.. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 6., 2006. Disponível em: <[http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=MSC000000022006000200029&lng=en&nrm=abn](http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC000000022006000200029&lng=en&nrm=abn)>. Acesso em: 31 mar. 2013.

MÜHLEN, Annette; SCHWARZ, Cora & MEHNERT, Wolfgang. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 45, p. 149-155, 1998.

MÜLLER, R. H. *et al.* Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 54, p. 131-155, 2002.

MÜLLER, R.H. *et al.* Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes. **Journal of Controlled Release**. v. 47, p. 261-269, 1997.

NANO, Jean-Louis *et al.* Effects of fatty acids on the growth of Caco-2 cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 69, p. 207-215, 2003.

NASCIMENTO, Flávia R.F *et al.* Macrophage activation induced by *Orbignya phalerata* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 103, p. 53-58, 2006.

NASCIMENTO, Flávia *et al.* Dual Role for Nitric Oxide in Paracoccidioidomycosis: Essential for Resistance, but Overproduction Associated with Susceptibility. **The Journal of Immunology**. v. 168, p. 4593-4600, 2002.

NELSON & COX, **Lehninger Principles of Biochemistry**. Nova York: W.H Freeman and Company, 2008.

NEWA, Madhuri *et al.* Preparation, characterization and in vivo evaluation of ibuprofen binary solid dispersions with Poloxamer 188®. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 343, p. 228-237, 2007.

PADOIS, Karine *et al.* Solid lipid nanoparticles suspension versus commercial solutions for dermal delivery of minoxidil. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 416, p. 30-304, 2011.

PARDEIKE, Jana *et al.* Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 366, p. 170-184, 2009.

PARKINSON, John *et al.* The role of nitric oxide in multiple sclerosis. **Journal of Molecular Medicine**. v. 75, p. 174-186, 1997.

POSER, Charles. The pathogenesis of multiple sclerosis: a commentary. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. v. 102, p. 191-194, 2000.

PRÜSS, Harald *et al.* Proresolution Lipid Mediators in Multiple Sclerosis — Differential, Disease Severity-Dependent Synthesis — A Clinical Pilot Trial. **PLoS ONE**. v. 8, n. 2, p. 1-5, 2013.

PUGLIATTI, Maura; SOTGIU, Stefano; ROSATI, Giulio. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. v. 104, p. 182-191, 2002.

ROGERO, Sizue O. *et al.* Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**. v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003

ROSA, Antonella. *et al.* Chemical composition and effect on intestinal Caco-2 cell viability and lipid profile of fixed oil from *Cynomorium coccineum* L. **Food and Chemical Toxicology**. v. 50, p. 3799-3807. 2012

SANTOS, Joselene R. J. **Biodiesel de babaçu: avaliação térmica, oxidativa e misturas Binárias**. 2008. 103f. Tese (Doutorado em Química) \_ Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**. v. 157, p. 171-179, 1997.

SERGEEVA, M *et al.* Regulation of intracellular calcium levels by polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid and docosahexaenoic acid, in astrocytes: possible involvement of phospholipase A2. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, 633–646, 2005.

SEVERINO, Patricia *et al.* Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. **Journal of Drug Delivery**. v. 2012, p. 1-10, 2012.

SHIER, David; BUTLER, Jackie & LEWIS, Ricki. **Hole's Human Anatomy & Physiology**. Ed. 11. Nova York: McGraw-Hill, 2007

SILVA, Ana P. S. **Caracterização físico-química e toxicológica do pó de mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart): subsidio para o desenvolvimento de produtos**. 2011.96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

SILVA, Bernardete P.; PARENTE, José P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**. v. 72, p. 887-893, 2001.

SILVERSTEIN, Robert M. *et al.* **Spectrometric identification of organic compounds**. 7 ed. Nova Jersey: John Wiley, 2005.

- SINHA, Vivek R. *et al.* Solid Lipid Nanoparticles (SLN'S) – Trends and Implications in Drug Targeting. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**. V. 1, p. 212-238, 2010.
- SJÖSTRÖM, Brita; BERGENSTÅHL, Björn. Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 88, p. 53-62, 1993.
- SOLER *et al.* Tecnologia de quebra do coco babaçu (*Orbignya speciosa*). **Ciência e tecnologia de alimentos**. v. 27, n. 4, 2007.
- SOUZA, Mércia H.S.L. *et al.* Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 133, p. 1-5, 2011<sub>a</sub>.
- SOUZA, Pedro A.V.R. *et al.* Effects of a nanocomposite containing *Orbignya speciosa* lipophilic extract on Benign Prostatic Hyperplasia. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 135, p. 135-146, 2011<sub>b</sub>.
- SOUZA, Iracema P. **Avaliação a implantação de uma unidade de extração do óleo do coco babaçu para o desenvolvimento sustentável de comunidades tradicionais da região amazônica**. 2012. 118 F. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente Urbano e Industrial) \_ Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- STOCKERT, Juan C. *et al.* MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**. v. 114, p. 785-796, 2012.
- SZNITOWSKA *et al.* Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 52, p. 159-163, 2001.
- TEXEIRA, Marcos A. Heat and power demands in babassu palm oil extraction industry in Brazil. **Energy Conversion and Management**. n. 46, p. 2068-2074, 2005.
- TEXEIRA, Marcos A. Babassu—A new approach for an ancient Brazilian biomass. **Biomass and Bioenergy**. n. 32, p. 857-864, 2008.
- UEDA, Hironori *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. **Nature**. v. 423, p. 506-511, 2003.
- ÜNER, Mileke; YENER, Gülgün. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. **International Journal of Nanomedicine**. V. 2, n. 3, p. 289-300, 2007.

VAN DER WALT, Anneke *et al.* Neuroprotection in multiple sclerosis: A therapeutic challenge for the next decade. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 126, p. 82-93, 2010.

VANDERLOCHT, Joris *et al.* Current trends in multiple sclerosis research :an update on pathogenic concepts. **Acta Neurologica Belgica**. v. 106, p. 180-190, 2006.

VAUTHIER, C.; CABANE, B. & LABARRE, D. How to concentrate nanoparticles and avoid aggregation?. **European Journal of Pharmaceutics and Biofarmaceutics**. v. 69, p. 466-475, 2008.

VOGEL, Daphne Y. S. *et al.* Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. **Journal of Neuroinflammation**. p. 10-35 2013.

WIKERSON, Melinda J. Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine. **Veterinary medicine & small animal clinician**. V. 42, p. 53-71. 2012.

WISSING, S. A. *et al.* Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56, p. 1257-1272, 2004.

YAMASHITA, Shinji *et al.* Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 10, p. 195-204, 2000.

XIE, Shuyu *et al.* Solid lipid nanoparticle suspension enhanced the therapeutic efficacy of praziquantel against tapeworm. **International Journal of Nanomedicine**. v. 6, p. 2367-2374, 2009.

ZAHANG, Shumin *et al.* Dietary Fat in Relation to Risk of Multiple Sclerosis among Two Large Cohorts of Women. **American Journal of Epidemiology**. v. 152, n. 11, p. 1056-1064, 2000.

ZHUANG, Lihui *et al.* Pure populations of murine macrophages from cultured embryonic stem cells. Application to studies of chemotaxis and apoptotic cell clearance. **Journal of Immunological Methods**. v. 385, p. 1-14, 2012.

ZIMMERMANN, E. *et al.* Influence of different parameters on reconstitution of lyophilized SLN. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 196, p. 211-213, 2000.