

LARISSE ARAÚJO LIMA

**Nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio obtidas via
gelatinização iônica para a nanoencapsulação de quercetina**

Brasília - DF
2013

Universidade de Brasília
Faculdade UnB - Planaltina
Pós-Graduação em Ciências dos Materiais

LARISSE ARAÚJO LIMA

**Nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio obtidas via
gelatinização iônica para a nanoencapsulação de quercetina**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências de
Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências de Materiais da Universidade de Brasília -
Faculdade UnB - Planaltina

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Luis Parize

Brasília - DF
2013

LARISSE ARAÚJO LIMA

**Nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio obtidas via
gelatinização iônica para a nanoencapsulação de quercetina**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências de
Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências de Materiais da Universidade de Brasília
ó Faculdade UnB - Planaltina

Aprovada em: 18/07/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize ó Presidente

Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr.^a Janaína Deane de Abreu Sá Diniz

Universidade de Brasília - UnB

Prof.^a Dr.^a Otilie Eichler Vercillo

Universidade de Brasília - UnB

EPIGRAFE

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente à Deus, fonte inesgotável de amor.

Aos meus pais, Divino e Zélia, meu irmão Raul, por todo amor, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos amigos que tornaram a caminhada mais leve...

AGRADECIMENTO

À Deus pelo seu infinito amor...

Aos meus pais, Divino e Zélia, por todo amor e dedicação durante minha formação acadêmica, pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis.

Ao meu irmão Rael, por conseguir tirar de mim sorrisos durante o trajeto diário ao trabalho.

Aos meus queridos amigos, em especial, Ângela, Cecília e Josi, pelos momentos de alegria e incentivo durante essa longa caminhada. Tenham certeza que vocês fizeram e fazem toda a diferença em minha vida.

Ao professor Alexandre Luis Parize por toda atenção destinada à execução e conclusão deste estudo. Ensinar não é somente transferir conhecimento, mas dar condições para que outras pessoas possam construir sua própria produção e isso você o faz com maestria, pois saber ensinar é uma arte no qual poucos sabem fazer, e você o faz com excelência. Muito obrigada!

Aos professores da banca pela participação e sugestões para o trabalho.

A Faculdade UnB de Ceilândia (FCE), em especial ao Professor Marcelo e Juliano, aos técnicos Diego, Hugo e Telles pelo apoio e sugestões nas análises de Potencial Zeta.

Ao Instituto de Biologia (IB), em especial à professora Sônia Bão, à Técnica Ingrid e as alunas Ludmila e Mariana pelo apoio nas análises de microscopia.

Ao Instituto de Química (IQ), em especial ao Professor Joel e ao aluno Anderson pelo apoio nas análises de TGA e DSC, ao técnico Arilson pelas considerações e sugestões nas análises FTIR.

Ao Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico - CDT/UnB, em especial ao Eduardo, por todo apoio e compreensão durante todo o desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada!

À Faculdade UnB Planaltina - FUP pelo espaço cedido para realização desse estudo.

Enfim a todos que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão de mais essa etapa em minha vida! Muito Obrigado a todos!

RESUMO

Este estudo tem como objetivo geral a nanoencapsulação da quercetina utilizando nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio para verificar o efeito da adição de lecitina de gema de ovo nas propriedades dos sistemas desenvolvidos. As nanopartículas foram produzidas com o uso da técnica de gelatinização iônica onde a quitosana solubilizada em meio ácido é misturada a uma solução de tripolifosfato de sódio e lecitina sob constante agitação. Com uso da mesma metodologia, foram obtidas as nanopartículas contendo quercetina.

Os materiais obtidos foram caracterizados por medidas do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas obtidas, polidispersão dos sistemas desenvolvidos (PDI), FTIR, Potencial Zeta, TGA, DSC e foi realizada a quantificação de fármaco incorporado aos sistemas desenvolvidos (eficiência de encapsulação). Por meio da caracterização foi possível observar a influência da lecitina na obtenção das nanopartículas assim como a eficiência do método empregado no preparo das amostras.

Características como tamanho, carga das nanopartículas e polidispersão das amostras foram avaliadas observando o efeito do pH da solução de quitosana, a variação na concentração do polímero e a variação no volume do gelatinizador, verificando ainda a influência da presença ou ausência da lecitina e do ativo quercetina.

De forma geral, tanto para as amostras com a presença de quercetina como para as amostras sem quercetina constata-se que o tripolifosfato de sódio é responsável por uma significativa redução no tamanho das nanopartículas em decorrência da interação dos grupos amino protonados da quitosana com os grupos fosfatos do tripolifosfato de sódio. A adição de lecitina propicia uma diminuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas em decorrência das interações eletrostáticas promovendo assim um aumento na densidade de cargas positivas resultando em sistemas mais polidispersos e estáveis.

A quercetina demonstrou melhor eficiência de encapsulação com a presença de lecitina. Os perfis de TGA para nanopartículas preparadas em presença de lecitina apresentam maior estabilidade térmica, assim como as amostras contendo quercetina e lecitina.

Palavras-chaves: Gelatinização iônica; lecitina; nanopartículas; quercetina; quitosana; tripolifosfato de sódio.

ABSTRACT

This research has the aim to describe the nanoencapsulation of quercetin using nanoparticles chitosan / sodium tripolyphosphate developed by ionic gelatinization method. The effect of addition lecithin, in the nanoparticles preparation, was verified in the properties of the systems developed. The nanoparticles were produced using the ionic gelation technique where the solubilized chitosan in an acid medium is mixed with a solution of sodium tripolyphosphate and lecithin under constant stirring. Using the same methodology, we obtained nanoparticles containing quercetin.

All materials were characterized by measurements of the hydrodynamic diameter of nanoparticles, polydispersity (PDI) FTIR, Zeta Potential, TGA, DSC, and encapsulation efficiency for quercetin. Through the characterization was possible to observe the influence of lecithin in obtaining the nanoparticles as well as the efficiency of the method used for preparing the samples.

Characteristics such as size, charge and molecular weight distribution of the nanoparticles were evaluated according to the effect of the pH of the chitosan solution, the variation in polymer concentration and the variation in the volume of gelatinizer, still observing the influence of the presence or absence of lecithin and the active quercetin.

In general, for both samples with the presence of quercetin or without quercetin it appears that the sodium tripolyphosphate is responsible for a significant reduction on the size of the nanoparticles resulted from the interaction of protonated amino chitosan groups with phosphate groups of sodium tripolyphosphate. The addition of lecithin promotes a decrease in the hydrodynamic diameter of the nanoparticles as a result of electrostatic interactions promoting an increase in the density of positive charges resulting a more polydisperse and system stable.

Quercetin has demonstrated better encapsulation efficiency in the presence of lecithin. TGA profiles for the nanoparticles prepared in the presence of lecithin have greater thermal stability as well as the samples containing lecithin and quercetin.

Keywords: ionic gelatinization; lecithin; nanoparticles; quercetin; chitosan; sodium tripolyphosphate

SUMÁRIO

	Listas de Figuras.....	i
	Lista de Tabelas.....	ii
	Lista de Equações.....	iii
	Lista de siglas, símbolos e abreviaturas.....	iv
1	INTRODUÇÃO.....	5
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1	Quitosana.....	8
2.2	Surfactante.....	12
2.3	Quercetina.....	12
3	OBEJETIVO.....	15
3.1	Objetivo Geral.....	15
3.2	Objetivo Específico.....	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1	Métodos.....	16
4.1.1	Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD).....	16
4.1.2	Espectroscopia de absorção molecular UV-vis para quercetina.....	17
4.1.3	Curva padrão de calibração da quercetina.....	17
4.1.4	Preparação de nanopartículas de quitosana/ TPP.....	17
4.1.5	Preparação das nanopartículas de QTS/TPP contendo quercetina....	18
4.2	Caracterização das nanopartículas.....	20
4.2.1	Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão das NPs.....	20
4.2.2	Potencial Zeta.....	21
4.2.3	Eficiência de encapsulação da quercetina.....	21
4.2.4	Espectroscopia de infravermelho (FTIR).....	22
4.2.5	Análise Termogravimétrica (TG).....	22
4.2.6	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1	Determinação do grau de desacetilação.....	23
5.2	Espectroscopia de absorção molecular UV-vis para quercetina.....	24

5.3	Curva de calibração da quercetina.....	25
5.4	Preparação das NPs de QTS/TPP e QTS/TPP contendo quercetina.	26
5.5	Caracterização das nanopartículas.....	27
5.5.1	Caracterização das nanopartículas em relação ao efeito do pH da solução de quitosana.....	30
5.5.2	Caracterização do tamanho das nanopartículas em relação à variação na concentração do polímero quitosana.....	32
5.5.3	Caracterização do tamanho das nanopartículas em relação à variação no volume do gelatinizador.....	35
5.6	Caracterização das nanopartículas de QTS/TPP contendo o ativo quercetina.....	37
5.7	Eficiência de encapsulação da quercetina (%EE).....	40
5.8	Espectroscopia no Infravermelho.....	41
5.9	Análise Termogravimétrica (TGA).....	44
5.10	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	47
6.0	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
7.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Obtenção de quitosana por meio da desacetilação da quitina
- Figura 2.** Estrutura Lecitina - Fosfatidilcolina
- Figura 3.** Estrutura Quercetina
- Figura 4.** Suspensão coloidal de nanopartículas de QTS/TPP
- Figura 5.** Suspensão coloidal de nanopartículas de QTS/TPP/Quercetina
- Figura 6.** Nanoencapsulação da quercetina por nanopartículas de quitosana/TPP através da técnica de gelatinização iônica
- Figura 7.** Curva padrão de calibração da quercetina na solução tampão pH 4,0
- Figura 8.** Espectro de FTIR da quitosana
- Figura 9.** Esquema da representação das interações químicas formadas entre QTS e TPP na formação das nanopartículas via gelatinização iônica
- Figura 10.** Soluções de QTS/TPP com e sem a presença de quercetina
- Figura 11.** Dependência do pH para a solução de quitosana sem lecitina na formação de nanopartículas
- Figura 12.** Dependência do pH para a solução de quitosana contendo lecitina na formação de nanopartículas
- Figura 13.** Dependência da concentração de QTS em solução sem lecitina
- Figura 14.** Dependência da concentração de quitosana em solução com lecitina
- Figura 15.** Dependência do volume do TPP adicionado para formação de nanopartículas estáveis sem lecitina
- Figura 16.** Dependência do volume de TPP adicionado para formação de nanopartículas com lecitina
- Figura 17.** FTIR para as nanopartículas desenvolvidas na ausência de lecitina
- Figura 18.** FTIR para as nanopartículas desenvolvidas na presença de lecitina
- Figura 19.** Análises Termogravimétrica para amostras sem a presença de lecitina
- Figura 20.** Análises Termogravimétrica para amostras contendo lecitina
- Figura 21.** Termogramas obtidos por DSC para a quitosana (a), para QTS/TPP (b), QTS/TPP/Quercetina (c), QTS/TPP/Lecitina (d), QTS/TPP/Lecitina/Quercetina (e)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades para nanopartícula de QTS/TPP

Tabela 2. Propriedades para nanopartículas QTS/TPP contendo quercetina

Tabela 3. Eficiência de encapsulação em NPs de QTS

Tabela 4. Análise Termogravimétrica Diferencial com e sem a presença de lecitina/quercetina

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Grau de Desacetilação da Quitosana

Equação 2. Determinação da eficiência de encapsulação

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% EE - Eficiência de encapsulação
% GD - Grau Médio de Desacetilação
DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial
FTIR - Espectroscopia de Infravermelho
mg - miligrama
mg/mL - proporção massa/ volume
ml - mililitro
mV - milivolt
nm - nanômetros
NPs - nanopartículas
PDI - Índice de polidispersão
pH - Potencial Hidrogeniônico
pKa - Constante de acidez
QTS - Quitosana
Tg - Transição vítrea
TGA - Análise Termogravimétrica
TPP - Tripolifosfato de sódio
UV-Vis - Espectroscopia no Ultravioleta Visível

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é hoje um dos principais focos das atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação em todos os países industrializados (SÁ, 2003). Nanotecnologia é o termo utilizado para relacionar a aplicação da tecnologia em estruturas de dimensões nanométricas da matéria. Atualmente a nanociência está sendo utilizada para criar novos materiais, produtos e processos por meio da manipulação de átomos e moléculas.

O Programa Nacional de Nanotecnologia define nove temas de atuação e desenvolvimento: nanofabricação, nanometrologia, materiais nanoestruturados, nanotecnologia funcional, energia, nanotecnologia molecular, nanoagregados, funcionalização de materiais e software. Dentre esses nove temas, os materiais nanoestruturados são responsáveis por boa parte das aplicações nanotecnológicas, pois abrangem desde o desenvolvimento de biomateriais (engenharia da saúde) até sistemas de baixa dimensionalidade (SÁ, 2003).

Tendo em vista esse amplo cenário de desenvolvimento e dentro da perspectiva do desenvolvimento de novos produtos, a obtenção de nanopartículas poliméricas (NPs) utilizando biopolímeros como a quitosana (QTS) tem se tornado cada vez mais comuns e viáveis em decorrência de sua baixa toxicidade, boa estabilidade, simplicidade do método de obtenção, além do seu baixo custo quando comparado a outros reticulantes. Além dessas características, as nanopartículas de quitosana apresentam importantes propriedades farmacêuticas e estabilidade de fluidos biológicos que possibilitam sua aplicação como um eficaz agente de liberação (TIYABOONCHAI, 2003).

A quercetina constitui um importante flavonóide encontrado em diversos vegetais (cebola e brócolis), frutas (maça) e em bebidas (vinho tinto). A sua utilização é feita em decorrência de suas propriedades farmacológicas, anti-inflamatória, anticancerígena dentre outras, que auxiliam no tratamento de diversas doenças como câncer, diabetes e catarata.

Sendo a quitosana um excelente polímero de encapsulação e a quercetina um importante ativo farmacológico, a associação entre esses dois compostos caracteriza-se como sendo um sistema eficiente para liberação controlada deste ativo

Atualmente, na maioria das formulações à base de quercetina, torna-se necessário a sua complexação e interação com um suporte que viabilize a melhoria da

sua solubilidade e forneça características de proteção. Uma das alternativas utilizadas para sanar tais impossibilidades configura-se na utilização de sistemas baseados em nanopartículas poliméricas obtidas pela microencapsulação da quercetina em quitosana via técnica de gelatinização iônica utilizando um surfactante como a lecitina.

Neste estudo as nanopartículas de quitosana/TPP foram preparadas pelo método de gelatinização iônica, no qual a solução de quitosana dissolvida em solução de ácido acético foi adicionada à solução de TPP promovendo desta forma a complexação entre espécies de cargas opostas. As nanopartículas contendo o surfactante lecitina e o ativo quercetina foram preparadas utilizando a mesma metodologia adicionando a lecitina antes da impregnação da quercetina conforme Figura 1.



Figura 1 Esquema da técnica de gelatinização iônica

A literatura científica relata a utilização da técnica de gelatinização iônica na obtenção de nanopartículas e a associação entre a QTS, lecitina, TPP e quercetina. Por meio desses estudos foi possível observar as influências ocasionadas no tamanho das NPs, a eficiência de encapsulação, a polidispersão da solução e as influências em suas cargas em decorrência das interações entre esses compostos.

Com isto, verificou-se que o método de gelatinização iônica é um método eficaz, simples, rápido, não necessitando de equipamentos sofisticados para obtenção de nanopartículas poliméricas. Além disso, possibilita o desenvolvimento de nanopartículas

de forma controlada alcançando desta forma a propriedade desejada, como tamanho e carga superficial da partícula.

A importância na caracterização desses sistemas de nanopartículas obtidos por métodos simples e eficientes se baseia na possibilidade de criação de sistemas mais estáveis nos quais é possível verificar e controlar o tamanho das NPs com intuito de maximizar a eficácia em medicamentos assim como promover uma melhor proteção do fármaco e direcionar sua atuação em sítios específicos minimizando assim efeitos colaterais nos organismos (DANTAS, 2010).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Quitosana

A quitosana - QTS é um copolímero (polissacarídeo catiônico) natural composto por unidades de *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina, obtida comercialmente a partir da quitina por meio da desacetilação em meio alcalino ligadas por meio de ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (BAO *et al.*, 2008).

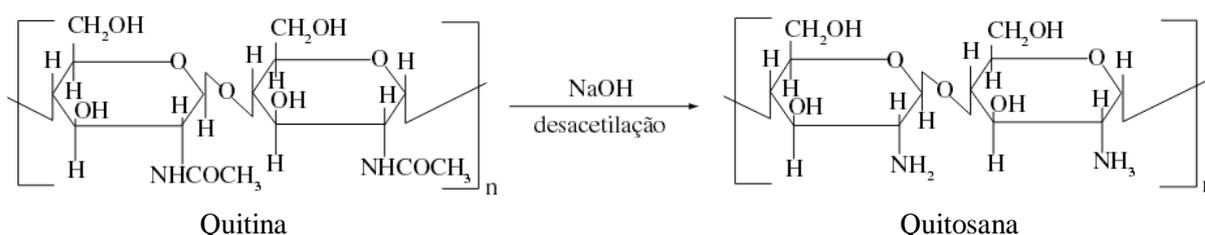


Figura 2 - Obtenção de quitosana por meio da desacetilação de quitina
Fonte: (SPIN-NETO, 2008)

Dependendo do grau médio de desacetilação (%GA) podem-se obter diversos tipos de quitosana com características distintas como solubilidade, pKa e viscosidade. À medida que se obtêm um elevado grau de desacetilação desse polímero percebe-se também o aumento da possibilidade de degradação. Outro fator que pode influenciar na degradação da quitosana é a forma como esta é obtida, sendo necessário assegurar que contaminantes tais como proteínas, endotoxinas e metais tóxicos não prejudiquem a acessibilidade enzimática influenciando a hidrólise do polímero (SILVA *et al.*, 2006).

A estrutura química da quitosana apresenta características especiais do ponto de vista tecnológico. Devido à sua elevada densidade de cargas positivas em solução ácida, o mesmo estabelece uma forte interação eletrostática entre os grupamentos aminos, permitindo assim atuar como um importante transporte de ativos ao se adsorver em superfícies carregadas negativamente (BAO *et al.*, 2008; LÓPES-LÉON *et al.*, 2005).

A quitosana possui um amplo campo de aplicabilidade, podendo ser utilizada em diversas áreas como na indústria alimentícia, na agricultura, no tratamento de águas residuais e principalmente na indústria farmacêutica, na qual é possível destacar o desenvolvimento de novas drogas com grande especificidade, melhor ação terapêutica e minimização de efeitos colaterais (TIYABOONCHAI, 2003; HUN-YU TSAI *et al.*,

2011). Além da aplicabilidade mencionada, a utilização da quitosana se justifica pelo fato da mesma oferecer um custo benefício menor quando comparada a outros biopolímeros (AZEVEDO *et al.* 2011). Na formação de nanopartículas o ativo é incorporado à solução de origem, em que nesse estudo é caracterizada por uma solução polimérica de quitosana, ligando-se a sua estrutura à medida que a nanopartícula se forma. Durante o processo de formação da matriz tridimensional, a ligação covalente do ativo se liga ao polímero constituinte dela resultando na sua imobilização permanente na matriz polimérica (COIMBRA, 2010).

Outros fatores favorecem o uso da quitosana no desenvolvimento de novos materiais, sendo um considerável fator a substituição de polímeros sintéticos por polímeros naturais a qual normalmente são biodegradáveis. Outras características como baixa toxicidade, hidrofiliabilidade e atividade microbiana fazem desse polímero e seus derivados um importante agente na preparação de membranas, no sistema de liberação de fármacos (SILVA *et al.*, 2006).

Em relação às propriedades físico-químicas da quitosana é possível citar a relação entre a sua solubilidade em soluções aquosas ácidas e a insolubilidade em soluções aquosas neutras ou básicas como característica bem conhecida desse polímero. Esta característica se justifica, pois sua solubilização é promovida pela protonação dos grupos NH_2 , ou seja, a solubilidade da quitosana depende da distribuição dos grupos aminos livres e N-acetil (SHI *et al.*, 2006).

Devido à sua importante atuação nos sistemas nanoparticulados algumas características necessitam ser avaliadas como forma de proporcionar sistemas mais eficientes. Características como tamanho das nanopartículas formadas, estabilidade dos compostos gerados, carga na superfície das partículas, degradação do polímero assim como sua eficiência de encapsulação fazem parte dessas avaliações.

A estabilidade de um composto é uma característica de suma importância para sua aplicação em diversos meios. O grau de desacetilação e a massa molecular da quitosana são importantes parâmetros, porque o aumento da massa molecular e do grau de desacetilação também resulta em um maior rendimento de reticulação (MENDES *et al.*, 2011).

Segundo Schaffazick *et al.* (2003) o potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão.

A determinação do potencial zeta de um sistema configura-se como sendo um bom mecanismo para verificação da estabilidade físico-química da suspensão coloidal de um sistema assim como a interação eletrostática do fármaco com a nanopartícula. Ao se observar, em módulo, valores altos desse potencial, pode-se perceber que grandes forças repulsivas estão presentes nesse sistema, minimizando-se assim a possibilidade de agregação das nanopartículas. Nessa perspectiva de alteração do potencial zeta destacam-se as formulações com a presença de fosfolipídios como a lecitina, na qual se observa a obtenção de resultado de um potencial negativo à interface (WEN FAN *et al.*, 2012).

Entre os vários métodos desenvolvidos para preparar nanopartículas de quitosana, a técnica de gelatinização iônica tem atraído considerável atenção por produzir amostras via um processo que não é tóxico, livre de solventes orgânicos, conveniente e controlável. Segundo a literatura, alguns autores citam o uso da técnica de gelatinização iônica no desenvolvimento de nanopartículas com aplicações farmacológicas.

A técnica de gelatinização iônica é baseada em interações iônicas entre o um dos componentes positivamente carregado (quitosana contendo grupos amino protonados) com uma espécie negativamente carregada atuando com um poliânion (tripolifosfato de sódio - TPP). A partir da interação entre as duas espécies ocorre a reticulação iônica, ocasionando a coagulação e gerando sistemas coloidais estáveis.

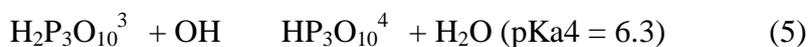
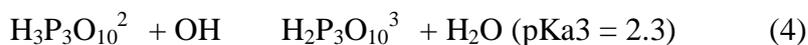
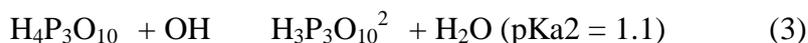
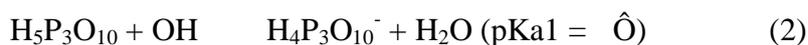
Ka-par *et al.* (2013) relatam em seu estudo a utilização de micropartículas de quitosana reticuladas por ânions de tripolifosfato (TPP) preparados por pulverização. Neste estudo o tamanho e a morfologia das micropartículas resultantes foram analisadas em decorrência da influência do TPP na solução e pela concentração da solução polimérica, apresentando características favoráveis à aplicações em microencapsulações.

Hafner e colaboradores (2011) constataram em seu trabalho que o uso da lecitina em nanopartículas de quitosana pode atuar como um sistema transportador coloidal alternativo em virtude da biocompatibilidade da quitosana em associação com a lecitina

tornando assim um sistema seguro e biocompatível em que frequentemente é utilizado para a preparação de nanossistemas.

Zhang e colaboradores (2006) também fizeram a caracterização físico-química e a atividade antioxidante da quercetina no encapsulamento de nanopartículas de quitosana preparadas com base na gelatinização iônica da quitosana com ânions tripolifosfato. O estudo demonstrou que a encapsulação de quercetina em nanopartículas de quitosana pode ser útil para melhorar a biodisponibilidade da quercetina em formulações farmacêuticas.

Segundo Laus *et al.* (2010) as interações ocorridas no processo de gelatinização iônica podem ser controladas pela densidade de carga do TPP e da quitosana, mantendo uma relação de dependência com pH da solução. O TPP pode ser dissolvido em água para se dissociar em OH^- e íons trifosfóricos, como mostrado nas seguintes reações:



A encapsulação da quercetina por meio das NPs de quitosana tem demonstrado um veículo de grande importância na disponibilização desse ativo. O sistema de encapsulação pode ser feito por meio da técnica de gelatinização iônica com adição de TPP, demonstrando bons resultados em relação ao tamanho e encapsulação do ativo.

2.2 Surfactantes

Segundo Nitschke e Pastore (2002) os surfactantes são moléculas anfifílicas constituídas por uma parte hidrofóbica e uma parte hidrofílica na qual a porção apolar é caracterizada em grande parte por uma cadeia hidrocarbonada e a porção polar caracterizada por uma parte iônica, não iônica ou anfotérica.

A função de surfactante consiste em distribuir nas interfaces entre as fases fluidas que apresentam diferença de polaridade. Por meio dessa distribuição é possível reduzir as tensões interfacial e superficial (NITSCHKE; PASTORE, 2002; CHUAH *et al.*, 2009).

Neste estudo usamos o surfactante lecitina extraído de gema de ovo para a melhoria das propriedades, como tamanho e carga das nanopartículas obtidas.

A lecitina é considerada um importante surfactante obtida de uma mistura de fosfolípidos de origem vegetal, especialmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina conforme Figura 3, e é considerado um seguro e biocompatível excipiente, já em uso em muitas formulações farmacêuticas, incluindo lipossomas (ENYI IT *et al.*, 2010).

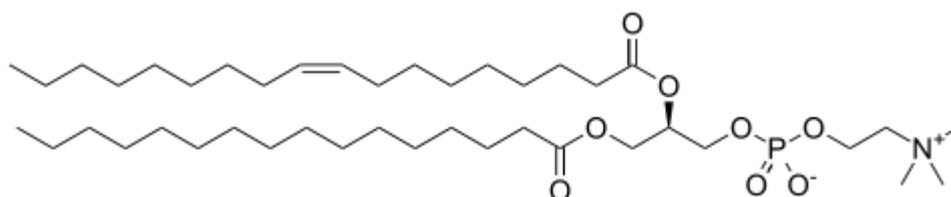


Figura 3 - Estrutura Lecitina (Fosfatidilcolina)

Em termos de propriedades físico-químicas a lecitina é um fluido de alta viscosidade, com aspecto de coloração âmbar, insolúvel em água e solúvel em álcool e éter.

A Lecitina é um dos surfactantes mais abundante na natureza e um dos mais versáteis. A versatilidade desse composto determina que esse seja utilizado de várias formas, cabendo a essa características tais como umedecer, dispersar, emulsificar, lubrificar e controlar a viscosidade e a cristalização do produto. Além disso, a lecitina pode executar várias dessas funções simultaneamente.

2.3 Quercetina

Os flavonóides são uma classe de compostos naturais encontrados em frutas, verduras e bebidas de considerável interesse científico e terapêutico. São caracterizados como um importante objeto de estudo devido à suas propriedades antioxidantes, antimicrobiana, anti-mutagênica, anticancerígena, anti-inflamatória dentre outras (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Os flavonóides são classificados em classes e subclasses, dentre as subclasses destaca-se os flavonóis cujo principal representante é a quercetina. O flavonóide quercetina é um antioxidante geralmente encontrado nos alimentos na forma glicosilada, às vezes, como -glicosidase. A natureza da glicosilação é conhecida por influenciar a eficiência de sua absorção (BEHLING *et al.*, 2004).

A substância possui aspecto de um pó amarelo-alaranjado, sendo pouco solúvel em água e bem solúvel em etanol ou em soluções alcalinas. Possui forma molecular $C_{15}H_{10}O_7$ e massa molecular equivalente a 302,24 na forma anidra e 338,24 em sua forma diidratada (COSTA, 2005).

Segundo Silva (2011) a solubilidade da quercetina é maior em meio aquoso do que quando solubilizada em uma fase oleosa. É considerado um composto instável em decorrência de sua auto-oxidação refletida pela alteração no pH, na qual em valores de pH maiores que 4,0 é possível observar a dissociação dos grupos hidroxilas. A quercetina possui duas regiões de absorção, 373 e 257 nm, e em decorrência de sua instabilidade a mesma pode sofrer sucessivos rearranjos.

A importância dos antioxidantes, como a quercetina, nos organismos vivos consiste na restrição da propagação das reações em cadeias e as lesões induzidas pelos radicais livres (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

A quercetina está presente nas frutas e vegetais, e é o flavonóide mais abundante encontrado no vinho tinto. Entretanto, esse antioxidante pode reagir com ferro e tornar-se um pró-oxidante (Figura 4) (GASPAR *et al.*, 1993 apud BIANCHI & ANTUNES, 1999).

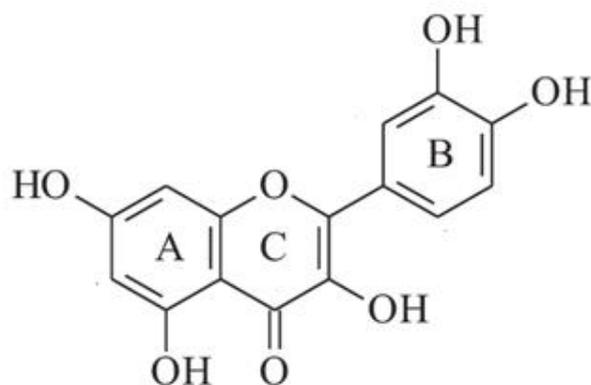


Figura 4 - Estrutura da Quercetina
Fonte: (TIMBOLA *et al.*, 2006)

A quercetina é formada por dois anéis aromáticos simbolizados (A e B), ligados ao anel pirano (C) conforme demonstrado na Figura 3.

O efeito pró-oxidante de alguns flavonóides está diretamente relacionado com o número de hidroxilas presentes na sua estrutura. A proporção de geração de radicais hidroxilas aumenta quando as mesmas estão situadas no anel. Desta forma a glicosilação e metilação de grupos hidroxilas surge como alternativa para atenuar o efeito pró-oxidantes (SCOTTI *et al.*, 2007).

A quercetina como representante dos flavonóis possui propriedades quelantes e estabilizantes de ferro, e por esse motivo inibe o processo de formação de radicais livres por meio da interação com os íons superóxido, na formação de radicais hidroxil e na peroxidação lipídica (BEHLING *et al.*, 2004).

Tendo em vista que a quantidade de antioxidantes é um fator importante na prevenção de danos oxidativos, diversas técnicas, como sistemas do tipo nanopartículas na microencapsulação de quercetina, vêm sendo utilizadas como forma de administrar compostos ou suplementos alimentares. Outro ponto importante é o fato de promover uma maior biodisponibilização, uma vez que a mesma é pouco solúvel em água (MEZZALIRA, 2005; NEMEN; LEMOS-SENN, 2011).

Atualmente, na maioria das formulações à base de quercetina torna-se necessário a sua complexação e interação com um suporte que viabilize a melhoria da sua solubilidade e forneça características de proteção. Uma das alternativas utilizadas para sanar tais impossibilidades configura-se na utilização de sistemas nanoparticulados baseados em nanopartículas poliméricas (NASTI *et al.*, 2009; MIN-LANG TSAI, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse estudo é desenvolver sistemas nanoparticulados a base de quitosana/tripolifosfato de sódio, pela técnica de gelatinização iônica, visando a nanoencapsulação de quercetina. Será avaliado concomitantemente, o efeito da presença e da ausência do surfactante lecitina, nas propriedades dos sistemas desenvolvidos.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar o biopolímero quitosana via determinação do grau de desacetilação;
- ✓ Avaliar as características espectroscópicas da quercetina utilizando a técnica de espectroscopia UV-Vis.
- ✓ Preparar nanopartículas poliméricas de quitosana/TPP pelo método de gelatinização iônica, na ausência e na presença de lecitina;
- ✓ Avaliar como o pH da solução de quitosana, a concentração da solução de quitosana e o volume de tripolifosfato de sódio influenciam as propriedades das nanopartículas formadas.
- ✓ Caracterizar o diâmetro, a polidispersão e o potencial zeta das nanopartículas formadas;
- ✓ Nanoencapsular o flavonóide quercetina utilizando as nanopartículas desenvolvidas;
- ✓ Determinar a eficiência de encapsulação da quercetina nas nanopartículas a base de quitosana/TPP;
- ✓ Avaliar as características espectroscópicas (FTIR) e a estabilidade térmica das amostras desenvolvidas (DSC e TGA).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Quitosana (99% de pureza) (massa molecular médio) - da Sigma-Aldrich com massa molar de $190000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, fornecido pelo representante e determinada através de método viscosimétrico. O tripolifosfato de sódio foi fornecido pela Sigma-Aldrich com 90% de pureza. A lecitina extraída de gema de ovo (75%) - (fosfatidilcolina) foi fornecido pela Sigma-Aldrich. A quercetina (95% de pureza) foi obtida pela Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes utilizados são de grau analítico.

4.1 Métodos

4.1.1 Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD)

O grau de desacetilação (GD) expressa o conteúdo médio de grupos amino (NH_2) livres presentes na quitosana. Neste estudo, o teor destes grupos foi determinado através da técnica de espectroscopia de infravermelho (FTIR), aplicando-se o método descrito por Prado *et al.*, 2011. Neste método, aproximadamente 1,5 mg de quitosana foram macerados com uma quantidade suficiente de KBr seco e limpo, e a partir desta mistura obteve-se uma pastilha. O espectro foi registrado em um espectrofotômetro FT-IR Varian 640-IR com representando a média de 32 *scans* com resolução de 2 cm^{-1} na região de $4000 \text{ ó } 400 \text{ cm}^{-1}$.

O grau de desacetilação da quitosana foi obtido pela análise do espectro de FTIR da quitosana, a partir dos picos entre $1320 \text{ e } 1420 \text{ cm}^{-1}$ obtidos no espectro de FTIR, que mostram a conversão das unidades N-acetilglicosamina em grupos amino, e utilizando-se a equação 1.

$$\%GD = 100 \text{ ó } \frac{(A_{1320} / A_{1420}) \text{ ó } 0,3822}{0,03133} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde A_{1320} e A_{1420} correspondem à absorbância da glicosamina.

4.1.2 Espectroscopia de absorção molecular UV-Vis para a quercetina

Os espectros de UV-vis para a quercetina foram realizados em um espectrofotômetro UV-vis U2M Quimis, a partir de uma solução do corante 0,02 mmol/L, preparada em tampão/etanol em uma razão 70:30. O tampão utilizado foi pH 4,0 ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 0,1 mol.L⁻¹) e a análise foi conduzida na faixa de 350 a 750 nm variando-se o comprimento de onda de 5 em 5 nm.

4.1.3 Curva padrão de calibração da quercetina

A curva de calibração para a quercetina foi determinada em um espectrofotômetro UV-vis U2M Quimis a partir de uma solução do corante preparada utilizando-se 10,0 mg de quercetina e dissolvida em solução composta de solução tampão/etanol na proporção de 70:30.

A partir das diluições adequadas da solução estoque, foram realizadas as medidas de absorbância no comprimento de onda de 373 nm.

4.1.4 Preparação de nanopartículas de quitosana/ TPP

As nanopartículas de quitosana/TPP foram preparadas de acordo com o método de gelatinização iônica descrito por Calvo *et al.* (1997). A solução de quitosana foi obtida dissolvendo-se 200 mg de QTS em 100 mL de solução de ácido acético (0,2 mol/L) sob constante agitação por cerca de 40 minutos. A solução de quitosana após total dissolução apresenta-se sob um aspecto claro, transparente e sem a presença de grumos (Figura 5). A concentração de TPP foi fixada em 1,0 mg/mL dissolvida em água miliQ.

Com base nas condições de gelatinização as nanopartículas de quitosana foram produzidas adicionando-se a solução de TPP à solução de quitosana promovendo desta forma a complexação entre espécies de carga oposta. O processo de gelatinização foi realizado sob constante agitação magnética por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente.

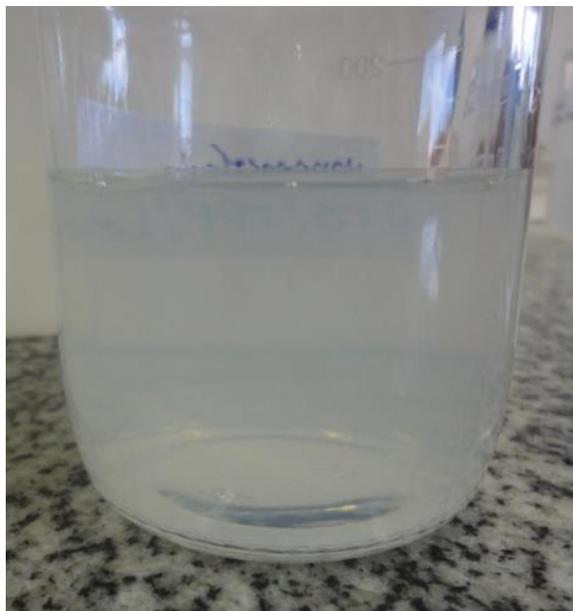


Figura 5 - Suspensão coloidal de nanopartículas de QTS/TPP

Para avaliar os efeitos do surfactante sobre as nanopartículas, lecitina foi acrescida com as soluções de quitosana, a um volume constante fração (1:20) das soluções finais (por exemplo, adição de 0,750 mL de uma solução etanólica de lecitina (3,5%) em 10 ml de QTS/TPP). A gelatinização iônica das soluções contendo lecitina com TPP é semelhante à descrito anteriormente.

Após a efetiva obtenção das nanopartículas, estas foram transferida para tubos falcon, centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm em uma centrífuga Hettich Zentrifugen, modelo Rotina 420 gr à 25°C. A amostra foi ressuspensa em água tipo 1, centrifugada novamente e o material resultante foi acondicionado à -18°C para ser liofilizado utilizando um liofilizador Terrone L-300 a uma temperatura de -45°C e pressão de 9,9 bar obtendo-se NPs na forma de pó, que possibilitou a caracterização físico-química do material obtido.

4.1.5 Preparação das NPs de QTS/TPP contendo quercetina

A nanoencapsulação da quercetina foi realizada utilizando-se a mesma metodologia, empregada posteriormente, com pequenas alterações conforme o esquema

da Figura 6. A quercetina (30 mg em um mínimo volume de 2ml de etanol) foi adicionada à solução polimérica de quitosana, promovendo sua interação com a mesma e apresentando aspecto uniforme.



Figura 5 - Suspensão coloidal de QTS/ TPP/ Quercetina

Após a impregnação e estabilização do flavonóide na solução de quitosana, a solução de TPP foi adicionada lentamente à solução contendo QTS/quercetina sob agitação magnética constante por aproximadamente 30 minutos ocorrendo assim a formação efetiva das nanopartículas de QTS/TPP/quercetina conforme esquema da Figura 6. As nanopartículas contendo o surfactante lecitina foram preparadas utilizando as metodologias descritas anteriormente, adicionando à solução de quitosana 750 μ l de lecitina antes da impregnação da quercetina.

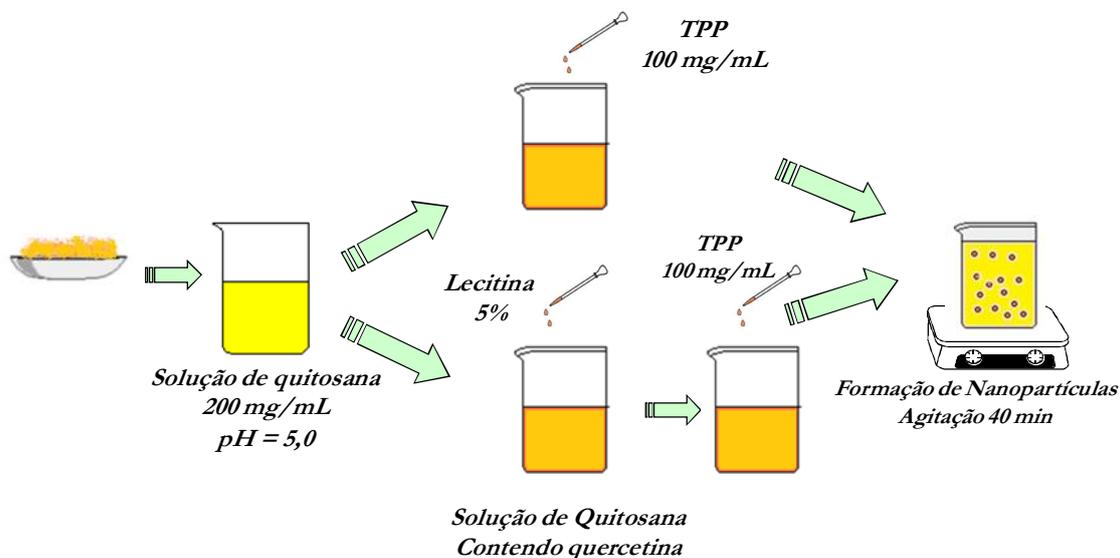


Figura 6 - Nanoencapsulação da quercetina por nanopartículas de quitosana/ TPP através da técnica de gelatinização iônica

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.2.1 Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão das NPs

A caracterização do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão das nanopartículas preparadas neste trabalho foi realizada utilizando-se o equipamento de espalhamento de luz dinâmico Nano-Zetasizer ó ZS, modelo ZEN3600 - Malvern Instruments. O equipamento opera com uma fonte de luz (laser vermelho de 5 mW, He-Ne), comprimento de onda em 633 nm, e detector posicionado em um ângulo fixo de 173° em relação ao ângulo de incidência e as medidas são realizadas à temperatura ambiente utilizando água como dispersante.

Para realizar as análises de tamanho e polidispersão (PDI) as amostras foram submetidas a agitação por cerca de 30 min., proporcionando assim a suspensão das nanopartículas. Após agitação transferiu-se uma alíquota de 25,0 μ L da amostra para uma cubeta de poliestireno com 1,0 cm de caminho óptico e acrescentou-se cerca de 1,0 mL de água tipo 1. Cada análise foi realizada em triplicata, sendo que cada análise representa a média de 12 leituras em cada ponto e os dados foram tratados com o software

Zetasizer

6.20[®].

Para caracterização do diâmetro e a polidispersão das nanopartículas foram observados o efeito do pH da solução polimérica de quitosana (3,5 a 6,0), a concentração de quitosana em solução (0,5 a 3,0 mg/mL) e o volume de agente de gelatinização iônica (0,5 a 10 mL) (TPP). Este estudo foi repetido para as amostras que contém lecitina. (QTS/TPP/Lecitina).

Para as nanopartículas de QTS/TPP (2,0 mg/mL de QTS e 10mL de TPP) contendo quercetina foram realizadas as mesmas análises para a solução polimérica já contendo o ativo disperso considerado apenas os valores de pH = 4,0; 5,0 e 6,0 da solução polimérica da quitosana, mas utilizando a concentração da solução de quitosana e o volume de gelatinizador iônico definidos anteriormente. Foram também repetidas essas análises para as nanopartículas contendo lecitina.

4.2.2 Potencial zeta

Para determinar o potencial zeta das NPs, 1,0 mL da suspensão coloidal preparada para medida de tamanho e PDI foi transferida para uma célula eletroforética e as medidas foram realizadas utilizando-se o mesmo equipamento utilizado para medidas de tamanho (Nano-Zetasizer ZS), alterando apenas a configuração do equipamento do modo size para o modo zeta. Os dados foram coletados a 25° C e tratados com o software Zetasizer 6.20[®].

4.2.3 Eficiência de encapsulação da quercetina

A eficiência de encapsulação (%EE) da quercetina foi determinada através do método direto empregando-se medidas espectroscópicas no comprimento de onda máximo de absorção da quercetina e aplicando-se os valores obtidos na equação da curva de calibração padrão do corante referente à solução tampão pH 4,0.

Para cada uma das medidas aproximadamente 10,0 mg das nanopartículas de quitosana/TPP e quitosana/TPP/lecitina contendo quercetina preparadas com o pH 5,0 da solução polimérica de quitosana, foram dissolvidas em 70,0 mL de solução tampão pH 4,0 ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 0,1 mol.L⁻¹) e posteriormente adicionado 30,0 mL de etanol. Após a extração da quercetina nanoencapsulada nas nanopartículas para à solução tampão/etanol, com posterior precipitação da QTS/TPP e QTS/TPP/lecitina, uma alíquota de cada solução foi coletada e analisada utilizando-se um

espectrofotômetro UV-vis U2M Quimis no comprimento de onda máximo de 373 nm, obtendo-se a concentração de quercetina encapsulada. A quantificação da eficiência de encapsulamento (%EE) foi determinada utilizando-se a equação 2:

$$\%EE (\%) = \frac{\text{Quantidade de quercetina encapsulada}}{\text{Quantidade inicial de quercetina}} \times 100\% \quad \text{(Equação 2)}$$

4.2.4 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Amostras de todas as matérias-primas e das nanopartículas produzidas neste estudo, foram maceradas com KBr seco e limpo originando pastilhas de KBr. Os espectros de infravermelho para todas as amostras foram obtidos na região de 4000 ó 400 cm^{-1} com um espectrofotômetro FT-IR Varian 640-IR com resolução de 2,0 cm^{-1} , via análise média de 32 *scans*.

4.2.5 Análise Termogravimétrica (TG)

As análises termogravimétricas foram realizadas utilizando equipamento Shimadzu TG 60. Amostras de todas as matérias-primas e das nanopartículas produzidas neste estudo, foram analisadas. A temperatura durante a análise variou da temperatura ambiente até 700°C, com razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de ar a 50 mL/min, a fim de verificar a degradação dos biopolímeros e das nanopartículas formadas através destes, bem como avaliar a estabilidade térmica dos materiais desenvolvidos neste estudo.

4.2.6 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As análises de DSC dos biopolímeros e das nanopartículas foram realizadas em um calorímetro Shimadzu DSC 60.

A análise foi realizada em duas corridas: a primeira corrida foi realizada de 25°C a 150°C para destruir a história térmica dos materiais preparados. Após esta corrida, a amostra é resfriada até a temperatura ambiente e realiza-se a segunda corrida variando a temperatura de 25°C a 350°C em atmosfera de N₂ com fluxo de 50 mL/min, com taxa de aquecimento de 10°C/min.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do Grau de Desacetilação.

O grau de desacetilação mede a quantidade de monômeros desacetilados na cadeia de um polímero. A importância dessa determinação consiste no fato de muitas das propriedades físicas e químicas apresentadas pela quitosana estarem relacionadas diretamente com os parâmetros obtidos.

De acordo com Santos *et al.* (2011) o grau de desacetilação pode ser aferido por vários métodos tais como espectroscopia no infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear de carbono 13, espectroscopia de UV-Vis dentre outros.

A quitosana é obtida por meio da desacetilação da quitina, na qual o grupo funcional aceto amino da molécula é hidrolisado gerando um grupo amino característico. A presença do grupo amino que modifica a estrutura polimérica da quitina propicia melhor interação com outros grupos funcionais do que a estrutura de origem (quitina) (SANTOS *et al.*, 2011; NETO, C.G.T, 2005). Segundo Canella e Garcia (2001) e Ozcan *et al.* (2013) a compreensão dos grupos NH_2 é uma importante forma de caracterizar a desacetilação da quitina e conseqüentemente as influências no desempenho final do polímero.

Embora a quitosana seja um polímero oriundo da quitina e esses sejam considerados polímeros distintos, a determinação do grau de desacetilação é um importante fator que determinará a estrutura do polímero predominante, sendo considerado o polímero quitosana quando o valor obtido for superior a 50% e solúvel em ácidos (BARROS *et al.*, 2006).

Neste estudo o grau de desacetilação pode ser aferido por meio da técnica de espectroscopia de infravermelho conforme Figura 7. A utilização dessa técnica se justifica pela facilidade, precisão e rapidez na obtenção dos resultados.

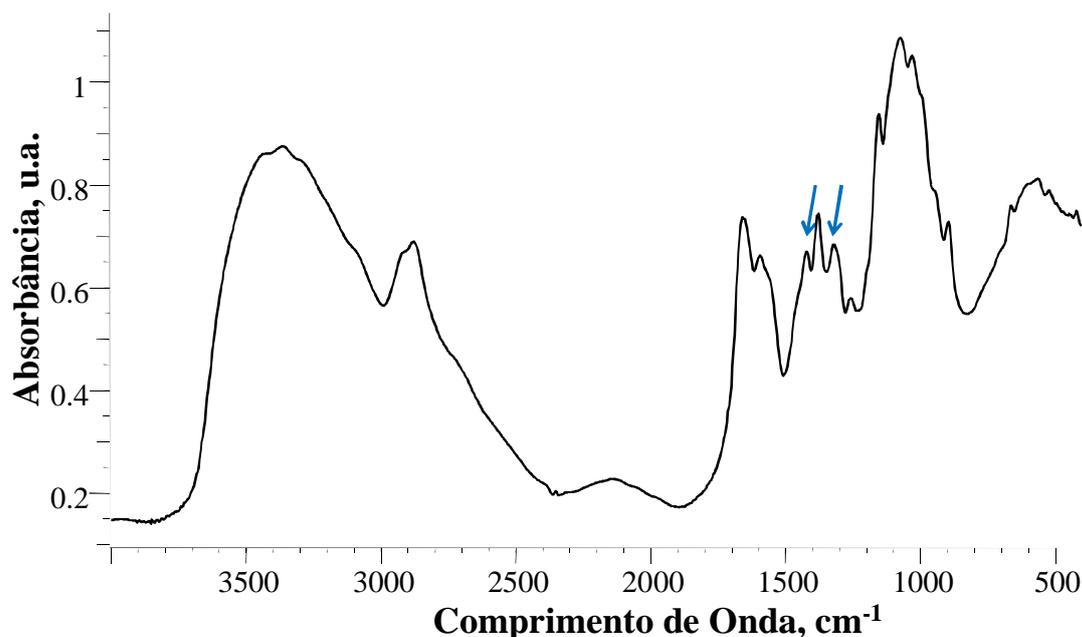


Figura 7- Espectro de FTIR da quitosana.

A porcentagem de grupos amino livres (%GD) foi calculada conforme descrito no item 4.1.1 e considerando-se os picos 1320 e 1420 cm^{-1} referentes ao anel glicosamino obtidos no espectro de FTIR que mostram a conversão das unidades N-acetilglicosamina em grupos amino.

De acordo com Canella e Garcia (2001) em resultados em que a quitosana apresente o grau de desacetilação superior a 50% sugere-se que os grupos N-acetil encontram-se distribuídos no esqueleto polimérico de forma aleatória.

O grau de desacetilação obtido por este método foi de 81,86 %, o que mostra que o polímero estudado é de fato a quitosana. Sendo o resultado obtido condizente com o grau apresentado pela quitosana comercial a qual apresenta valores entre 70 e 95%.

5.2 Espectroscopia de absorção molecular UV-vis para quercetina

A espectrofotometria na região UV-VIS é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de sua robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações. A partir da obtenção do espectro de UV-Vis é possível caracterizar grupos cromóforos (grupo insaturado e covalente responsável pela absorção da radiação eletromagnética) na sua estrutura molecular de flavonoides.

Timbola *et al.* (2006) relata que a oxidação da quercetina envolve a perda de um elétron e de um próton conduzindo à formação de uma orto-semiquinona, que pode ser

ainda oxidada pela perda de outro elétron e de outro próton formando a para-quinona meteto. Este intermediário pode, posteriormente, transformar-se em outros análogos devido à tautomerização. A oxidação da quercetina em um único estágio por dois elétrons e dois prótons leva diretamente à formação de uma orto-quinona, que poderá se interconverter em paraquinonas.

O pH influencia significativamente na oxidação da quercetina, na qual observa-se que em pH superior a 4,0 há formação de pelo menos duas espécies iônicas em decorrência da dissociação do grupo hidroxila (SILVA, 2011; TZU-HUI WU, 2008).

A Quercetina apresenta duas bandas de absorção a 257 e 373 nm, referindo-se a conjugações no anel B e anel A, respectivamente (conforme Figura 3, página 13). Após a electrólise uma nova banda de absorção aparece em torno de 290 nm, enquanto que as bandas em 257 e 373 nm apresentaram intensidades mais baixas. Após purificação a banda de absorção a 373 nm tornou-se menos pronunciada e a banda de absorção em 257 nm praticamente desapare (TIMBOLA *et al.* 2006; ENYI IT *et al.*, 2010).

O espectro não foi demonstrado nesse estudo devido a uma baixa resolução, porém observou-se que a absorção máxima foi 373 nm.

5.3 Curva de Calibração da Quercetina.

A curva padrão de calibração da quercetina foi determinada utilizando-se a técnica de UV-vis com a finalidade de auxiliar na determinação da eficiência de encapsulação da quercetina nas nanopartículas desenvolvidas.

A curva de calibração para a quercetina foi obtida a partir de uma solução do ativo preparada utilizando-se 10,0 mg de quercetina e dissolvida em solução composta de solução tampão/etanol na proporção de 70:30.

A partir das diluições adequadas da solução estoque, foram realizadas as medidas de absorbância no comprimento de onda de 373 nm para a solução preparada no tampão pH 4,0 ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 0,1 mol.L⁻¹).

Foi obtida a curva padrão de calibração representada pela Figura 8, a qual foi utilizada para medir a eficiência de encapsulação da quercetina nas nanopartículas desenvolvidas neste estudo.

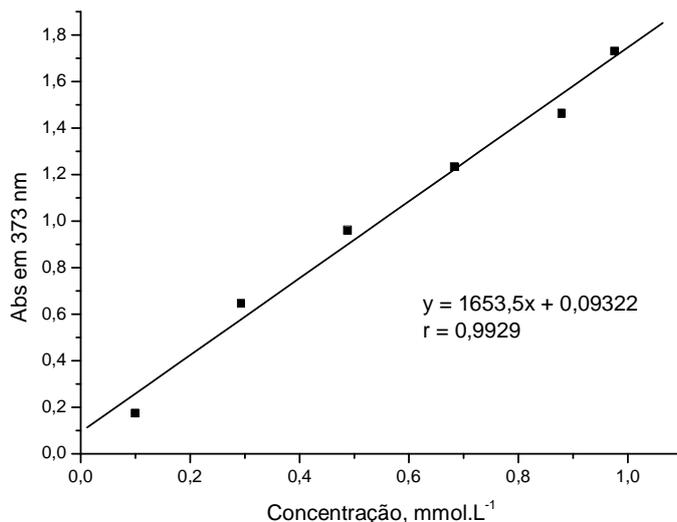


Figura 8 - Curva padrão de calibração da quercetina na solução tampão pH 4,0.

5.4 Preparação das NPs de QTS/TPP e QTS/TPP contendo quercetina

Neste estudo a suspensão coloidal de nanopartículas de quitosana/TPP foi obtida pela interação eletrostática entre os grupos amino carregados positivamente da quitosana em meio ácido com os grupos PO_4^{3-} do tripolifosfato conforme esquema mostrado abaixo (Figura 9).

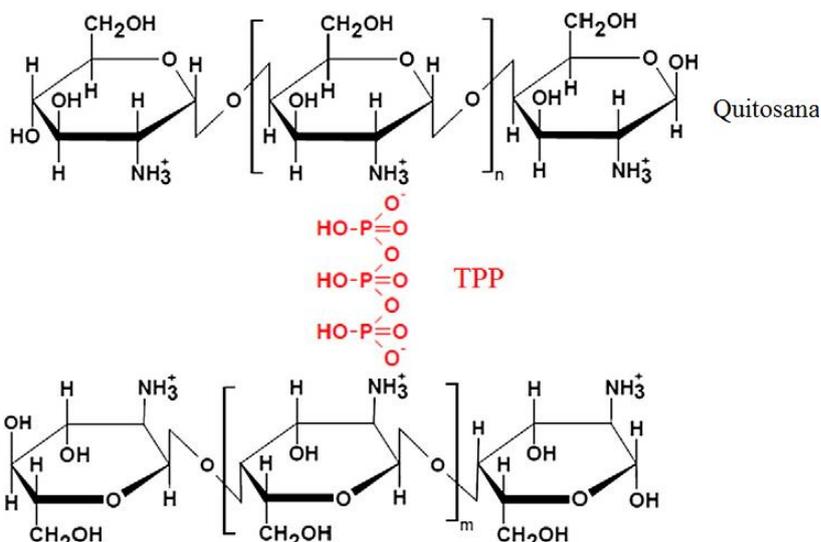


Figura 9 - Esquema de representação das interações químicas formadas entre QTS e TPP na formação das nanopartículas via gelatinização iônica

Fonte: (KATIPAR *et al.*, 2013).

A formação das nanopartículas foi observada pelo aparecimento da opalescência na solução final, o que indica boa estabilidade conforme observa-se na Figura 10.



Figura 10 - Suspensão coloidal de nanopartículas de QTS/TPP na presença (A) e na ausência de quercetina (B).

A forma sólida das nanopartículas de QTS/TPP obtida através do processo de liofilização teve a aparência de pó fino e esbranquiçado, já as nanopartículas de QTS/TPP contendo quercetina também tiveram a aparência de pó amarelo, cor característica do flavonóide.

Com isso, verificou-se que o método de gelatinização iônica é um método eficaz, simples, rápido, não necessitando de equipamentos sofisticados para obtenção de nanopartículas poliméricas. Além disso, possibilita o desenvolvimento de nanopartículas de forma controlada alcançando dessa forma a propriedade desejada, como tamanho e carga superficial da partícula.

5.5 Caracterização das nanopartículas

Sistemas nanoparticulados podem ser afetados em decorrência da variação de alguns fatores como tamanho, estabilidade e polidispersão das nanopartículas a fim de se obter melhorias e maior eficiência em suas diversas aplicações.

Especialmente, o tamanho das nanopartículas caracteriza-se como sendo um dos fatores mais significativos quando relacionado à aplicabilidade dos materiais nanoestruturados. Uma consequência da diminuição do tamanho das nanopartículas está na eficácia de absorção em um meio específico. Um exemplo em que o tamanho das

nanopartículas apresenta melhor eficiência de absorção diz respeito a sua aplicação farmacêutica. Em um sistema polidisperso as nanopartículas maiores geralmente têm maior capacidade de carga de drogas, enquanto que as nanopartículas pequenas deverão ter uma eficiência mais elevada na entrega de droga para os tecidos ou células (WEN FAN *et al.*, 2012).

Modificações no tamanho das nanopartículas podem ser obtidas variando algumas características como concentração do polímero, volume do gelatinizador e alteração no pH da solução polimérica.

Outro fator relevante que pode alterar o tamanho das nanopartículas é a incorporação de um surfactante. Neste estudo foi observado o efeito da adição da lecitina como surfactante nas variações da concentração do polímero, no volume do gelatinizador e na alteração de pH da solução polimérica.

O efeito da adição de lecitina é considerado como sendo uma combinação de dois fatores opostos. Por um lado, a lecitina dispersa sobre a superfície das nanopartículas tende a aumentar a repulsão electrostática, tornando assim as nanopartículas mais compactas. Por outro lado, a lecitina encapsulada nas nanopartículas tem uma tendência para causar inchaço nas limitações das paredes das nanopartículas por meio das forças de repulsão eletrostáticas (SONVICO *et al.*, 2006).

A ligação hidrofóbica ocorrida com a lecitina promove um aumento na densidade de carga catiônica por volume das nanopartículas de QTS-TPP, supondo que a densidade das nanopartículas QTS-TPP não é alterada pela adição de lecitina. Assim, a diminuição dos tamanhos médios de partículas de QTS poderia ser causada principalmente pelo aumento da força de repulsão eletrostática entre as partículas QTS e lecitina presente. Ao mesmo tempo, pode-se também considerar que a probabilidade de agregação da partícula é menor quando a carga de superfície é aumentada por adição do surfactante, resultando assim na formação de partícula de menor tamanho (HUN-YU TSAI *et al.*, 2011).

Neste estudo foram realizadas as variações citadas acima observando o comportamento na formação das nanopartículas em decorrência da presença ou não do surfactante lecitina conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades para as nanopartículas quitosana/ TPP

	pH da solução polimérica ^a				Concentração da solução polimérica ^a				Variação do volume do gelatinizador ^a			
	pH	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mv)	Concentração (mg/mL)	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mv)	Volume (mL)	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mv)
Sem Lecitina	3,5	283,8 ± 18,2	0,483 ± 0,04	+50,6 ± 2,8	0,5	187,1 ± 11,3	0,379 ± 0,04	-5,7 ± 0,8	0,5	519,2 ± 26,6	0,545 ± 0,01	+47,1 ± 1,5
	4,0	318,7 ± 8,3	0,512 ± 0,08	+43,5 ± 0,8	1,0	196,3 ± 20,3	0,543 ± 0,13	+9,4 ± 1,7	1,0	506,5 ± 20,7	0,559 ± 0,12	+42,4 ± 0,6
	4,5	396,7 ± 6,9	0,349 ± 0,04	+30,4 ± 0,6	1,5	216,9 ± 0,8	0,266 ± 0,01	+18,5 ± 0,5	2,0	399,1 ± 3,6	0,551 ± 0,10	+40,1 ± 1,4
	5,0	480,3 ± 11,5	0,336 ± 0,03	+21,1 ± 3,6	2,0	239,3 ± 3,0	0,417 ± 0,01	+26,1 ± 1,2	3,0	314,8 ± 4,5	0,474 ± 0,06	+33,7 ± 0,4
	5,5	547,9 ± 1,9	0,608 ± 0,10	+15,7 ± 1,3	3,0	637,9 ± 16,4	0,449 ± 0,03	+46,1 ± 0,9	5,0	245,1 ± 11,1	0,502 ± 0,02	+21,5 ± 0,8
	6,0	578,3 ± 8,6	0,529 ± 0,11	-2,4 ± 0,7					10	135,2 ± 2,3	0,394 ± 0,06	+17,4 ± 1,2
Com Lecitina	pH	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mv)	Concentração (mg/mL)	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mv)	Volume (mL)	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mv)
	3,5	171,8 ± 4,4	0,481 ± 0,01	+56,5 ± 0,6	0,5	195,1 ± 8,3	0,640 ± 0,14	+27,1 ± 0,9	0,5	271,8 ± 13,4	0,516 ± 0,02	+43,9 ± 0,6
	4,0	174,9 ± 2,9	0,482 ± 0,01	+48,2 ± 1,9	1,0	206,3 ± 9,6	0,790 ± 0,08	+30,4 ± 0,6	1,0	220,4 ± 1,5	0,491 ± 0,01	+42,3 ± 1,8
	4,5	216,7 ± 9,1	0,795 ± 0,16	+44,1 ± 2,4	1,5	234,9 ± 7,2	0,483 ± 0,05	+35,2 ± 0,7	2,0	201,2 ± 5,7	0,568 ± 0,07	+44,5 ± 0,5
	5,0	256,7 ± 8,5	0,561 ± 0,13	+38,2 ± 0,6	2,0	259,7 ± 3,5	0,617 ± 0,05	+37,3 ± 1,5	3,0	260,7 ± 11,3	0,563 ± 0,09	+43,8 ± 0,8
	5,5	305,7 ± 11	0,741 ± 0,02	+33,1 ± 3,4	3,0	281,6 ± 1,7	0,531 ± 0,02	+48,4 ± 0,6	5,0	184,9 ± 12,3	0,6 ± 0,1	+41,3 ± 1,8
6,0	343,3 ± 7,6	0,579 ± 0,11	+30,2 ± 0,5					10	164,1 ± 2,7	0,489 ± 0,09	+21,5 ± 1,2	

^a análises em triplicatas, cada análise representa a média de 12 análises, n=3

Em soluções em que a concentração da quitosana é mais elevada é possível produzir partículas de tamanho maior, assim como soluções em que há variação no volume de TPP e mudanças no pH podem afetar as propriedades físico-químicas, tais como tamanho de partícula, a intensidade da carga de superfície e a tendência de agregação das partícula (BAO *et al.*, 2008).

5.5.1 Caracterização das nanopartículas em relação ao efeito do pH da solução de quitosana

Neste estudo foram observados as alterações no tamanho de formação das nanopartículas segundo a variação do pH entre 3,5 a 6,0 na solução de quitosana na presença e ausência do surfactante, sob temperatura ambiente e volume constante de 10 mL de quitosana.

Na Figura 11 é possível observar os efeitos ocasionados nas nanopartículas em decorrência da dependência do pH para soluções de quitosana sem lecitina na formação de nanopartículas.

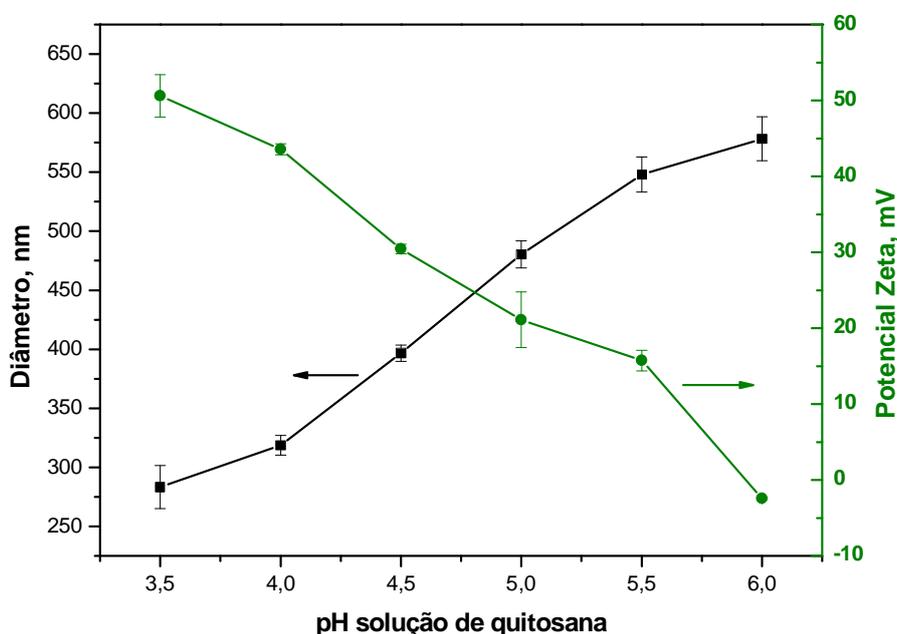


Figura 11 - Dependência do pH para a solução de quitosana sem lecitina na formação de nanopartículas

Para valores mais baixos de pH, foram observados uma diminuição no tamanho médio das nanopartículas devido à interação dos NH_3^+ da QTS com PO_4^{3-} dos grupos presentes no TPP, no qual o tamanho das nanopartículas situam-se entre 283,8 nm (pH

4,0) e 578,3 nm (pH 6,0). Os valores de potencial zeta para os mesmos parâmetros mostram as mudanças na carga de superfície das nanopartículas. Os valores demonstram uma diminuição no valor do potencial zeta à medida em que o pH vai sendo aumentado, tornando o valor da carga superficial das nanopartículas mais negativo. Os valores obtidos variam entre -2,4 mV (pH 6,0) e +50,6 mV (pH 3,5).

A presença de cargas negativas das partículas indicam a redução nos valores da carga superficial das nanopartículas em decorrência da desprotonação da quitosana com a diminuição do grupo NH_3^+ e aumento de NH_2 assim como sua interação com o TPP. Uma vez que o teor de grupos NH_3^+ diminui o reflexo da carga da superfície das nanopartículas se deve as cargas do TPP.

Em relação à polidispersão, a melhor polidispersão foi obtida para amostra com pH 5,0 evidenciada por um PDI em torno de 0,336.

Foram observados ainda o comportamento no tamanho de formação das nanopartículas com a presença do surfactante lecitina. A Figura 12 demonstra a dependência do pH para soluções de quitosana contendo lecitina.

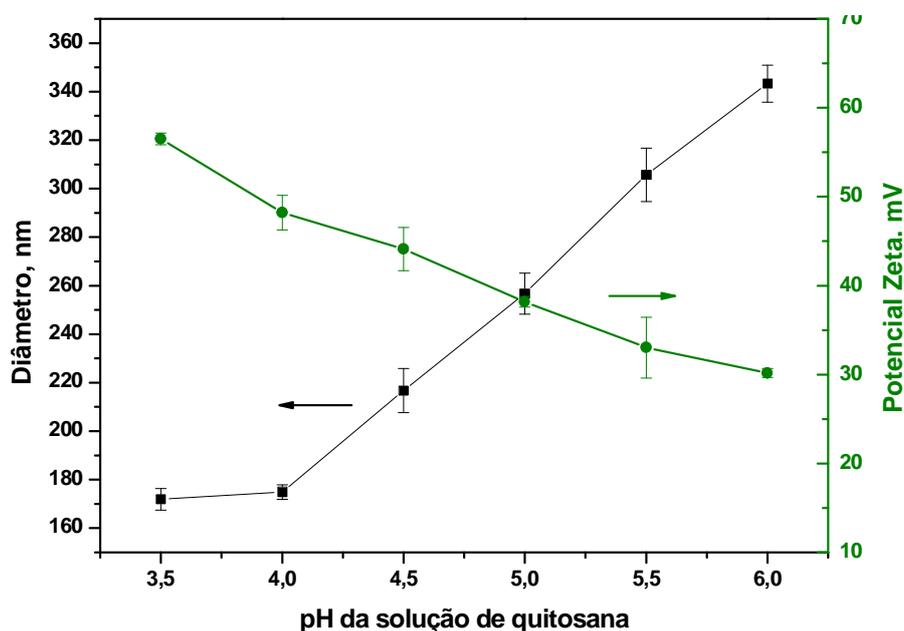


Figura 12 - Dependência do pH para a solução de quitosana contendo lecitina na formação de nanopartículas

Para as amostras contendo lecitina observa-se que o tamanho das nanopartículas variam entre 171,8 nm (pH 3,5) e 343,3 nm (pH 6,0) conforme Tabela 1. À medida em que ocorre um aumento no pH da solução polimérica constata-se um aumento no tamanho da NPs assim como ocorrido com as amostras na ausência de lecitina, porém

quando comparados esses dois experimentos constata-se que as amostras contendo lecitina sob as mesmas variações de pH demonstraram nanopartículas de tamanhos menores, confirmando assim a contribuição do surfactante no tamanho das NPs.

A diminuição no tamanho das NPs sob influência de lecitina pode ser explicado pela interação eletrostática que ocorre entre a quitosana e o surfactante, na qual as moléculas de lecitina, tendem a formar um núcleo caracterizados pelas cadeias alifáticas da lecitina enquanto as moléculas de quitosana formam uma camada hidrófila decorrente da interação da QTS com os grupos fosfatos da lecitina para proteção da estrutura interna (BAO *et al.*, 2008).

Em relação à polidispersão das amostras contendo lecitina obteve-se uma melhor polidispersão na amostra de pH 5,0 conforme Tabela 1. Em geral valores de PDI menores 0,5 caracterizam-se como sistemas mais monodispersos.

Para valores de potencial zeta observa-se valores variando entre +30,2 mV (pH 6,0) e +56,5 (pH 3,5). Observa-se que os valores são mais positivos dos que os valores encontrados sem o surfactante. Esse fato pode ser explicado em decorrência da presença de um grupo NH_3^+ na estrutura do surfactante que aumenta a densidade de cargas positivas na superfície das NPs formadas.

Essas observações também foram feitas em outros trabalhos como relatam Hafner e colaboradores (2011) em que o valor potencial zeta referente às nanopartículas de lecitina/quitosana apresentaram uma ligeira diminuição da carga após algum tempo de armazenamento em virtude da formação de ligações de hidrogênio entre a lecitina e os grupos aminos da quitosana carregadas positivamente, resultando assim na neutralização parcial de carga na superfície das NPs.

5.5.2 Caracterização do tamanho das nanopartículas em relação à variação na concentração do polímero quitosana

A caracterização do tamanho das nanopartículas em relação a variação na concentração do polímero quitosana foi feito mediante a variação de concentração entre 0,5 e 3,0 mg/mL, sob pH constante e temperatura ambiente. O experimento foi realizado com e sem a adição de surfactante.

— A Figura 13 demonstra a variação da concentração de quitosana em solução sem adição de lecitina.

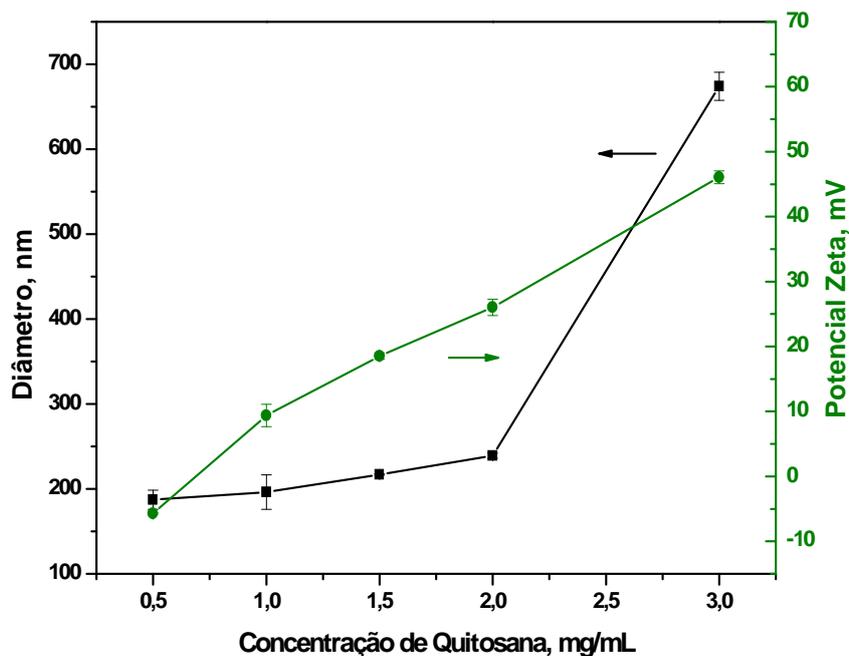


Figura 13 - Dependência da concentração de QTS em solução, sem lecitina

Variando a concentração de QTS sem adição de lecitina os resultados no tamanho médio das nanopartículas variaram em 187,1 nm (0,5 mg/mL) e 637,9 (3,0 mg/mL) conforme Tabela 1. Para valores mais elevados de concentração de QTS o tamanho médio das nanopartículas aumenta. Este resultado pode ser explicado em decorrência dos grupos amino carregados positivamente ao longo das cadeias de polímero que se ligam com os fosfatos carregados negativamente de TPP por atração eletrostática. Em uma solução de maior concentração existem mais cadeias de quitosana por volume resultando na formação de nanopartículas de maior diâmetro hidrodinâmico (HAFNER *et al.*, 2011; HENECZKOWSKI *et al.*, 2001).

Em relação aos valores de PDI sem a presença de lecitina, foi obtido uma melhor polidispersão para a amostra com concentração de 1,5 mg/mL de QTS, caracterizando-se assim a boa monodispersão em 0,266 conforme demonstra a Tabela 1.

A variação nos valores de potencial zeta sem a presença de lecitina apresentaram variações de -5,7 (0,5 mg/mL) e +46,1 (3,0 mg/mL). Assim como a presença de valores negativos na variação de pH da solução, os valores negativos obtidos em baixa concentração no polímero demonstram uma diminuição da carga da nanopartícula em decorrência da amenização ocorrida pela diminuição da presença dos grupos aminos conjugados presentes na quitosana.

O experimento também foi realizado com a adição do surfactante lecitina. A Figura 14 demonstra a variação no tamanho das nanopartículas em decorrência da adição do surfactante.

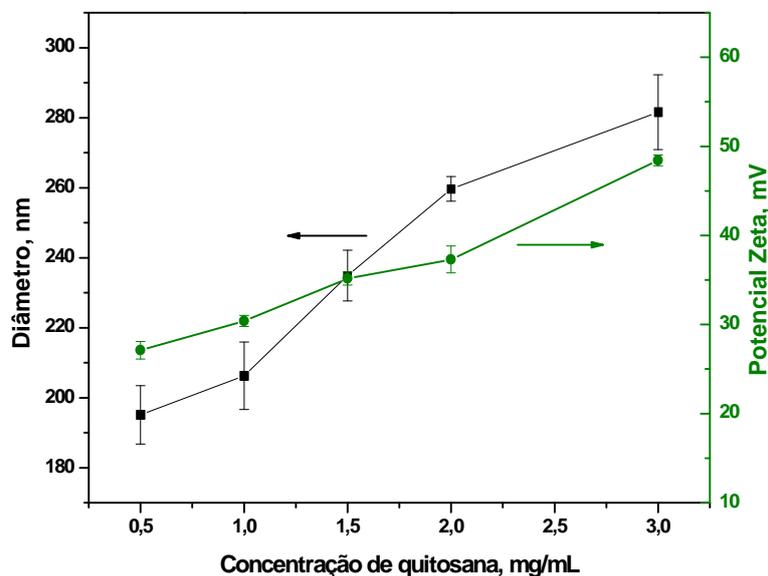


Figura 14 - Dependência da concentração de quitosana em solução com lecitina

Na presença de lecitina, foi observada uma maior agregação do sistema desenvolvido, e o tamanho médio das nanopartículas foi reduzido, variando entre 206,3 nm (1mg/mL) a 281,6 (3,0 mg / mL) conforme Tabela 1. A lecitina nesse sistema tem um efeito de um agente de reticulação iônica, e foi utilizado com êxito para formar nanopartículas estáveis.

Pode ser observado que as nanopartículas formadas possuem uma tendência para aumentar o diâmetro médio hidrodinâmico com o aumento da concentração de quitosana tanto na presença e na ausência de lecitina. A presença da lecitina pode influenciar na diminuição do diâmetro da nanopartícula devido a formação de múltiplas camadas de lecitina na superfície da nanopartícula, levando a uma compactação do sistema formado.

Segundo Souto *et al.* (2012) o tamanho das nanoesferas é determinado pela concentração do polímero na fase interna da emulsão. Para um determinado volume da fase interna, o aumento da concentração do polímero aumenta a viscosidade dessa fase, obtendo-se nanoesferas de maiores dimensões, devido à maior dificuldade de dispersão da fase interna na fase externa.

Para a variação nos valores de PDI em relação à mudança de concentração do polímero com a presença de lecitina a amostra com concentração de 1,5 mg/mL demonstrou ser mais polidisperso conforme demonstra Tabela 1. Este resultado confirma a melhor polidispersão da amostra com concentração de 1,5 mg/mL tanto com a ausência de lecitina como em sua presença.

A variação nos valores de potencial zeta em referência à alteração na concentração do polímero entre 0,5 mg/mL e 3,0 mg/mL com a presença de lecitina, apresentou valores variando entre +27,1 mV(0,5 mg/mL) e +48,4 mV (3,0 mg/mL). Assim como as amostras sem a presença de lecitina, o menor valor de potencial zeta obtido em sistemas com a presença do surfactante foi atribuído à menor concentração do polímero em decorrência da minimização da interferência dos grupos aminos contidos na quitosana.

5.5.3 Caracterização do tamanho das nanopartículas em relação a variação no volume do gelatinizador

A caracterização do tamanho das nanopartículas em relação a variação no volume do gelatinizador foram feitas mediante a variação de volume entre 0,5 e 10,0 mL sob pH constante e temperatura ambiente. O experimento foi realizado com e sem a adição de surfactante conforme Figura 15 e 16.

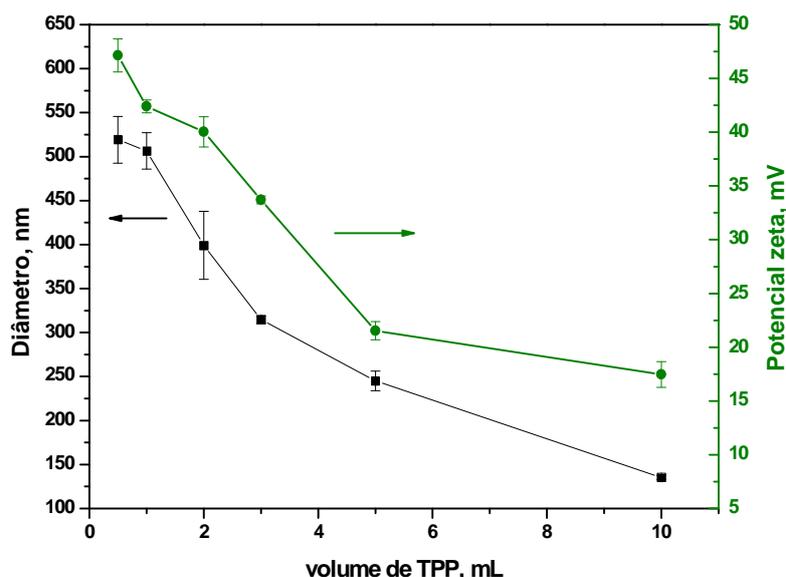


Figura 15 - Dependência do volume do TPP adicionado para formação de nanopartículas estáveis sem lecitina.

Com relação ao tamanho das nanopartículas sob influência da variação do gelatinizador foram obtidos valores variando entre 135,2 nm (10,0 mL) e 519,2 nm (0,5 mL TPP).

Assim como o aumento do volume de TPP gera a diminuição no tamanho das nanopartículas, o potencial zeta diminuiu quase linearmente devido à neutralização dos grupos amino protonados por ânions TPP.

Os valores obtidos para o potencial zeta variam entre +17,4 mV (10,0 mL TPP) e +47,1 mV (0,5 mL TPP) conforme Tabela 1. A grande densidade de carga positiva, devido ao elevado grau de desacetilação e protonação faz com que as moléculas de quitosana tenham um grande número de potenciais sítios de ligação cruzada. Conforme o volume TPP aumenta na nanopartícula o tamanho diminui devido ao aumento da densidade de interação entre quitosana e TPP.

Foi observado também a variação no tamanho da partícula em decorrência do volume do gelatinizador com a adição de lecitina de acordo com a Figura 16. As concentrações elevadas de tensoativo reduzem a tensão interfacial, aumentando a área da superfície e conseqüentemente originando nanopartículas de menores dimensões (WEN FAN *et al.* 2012).

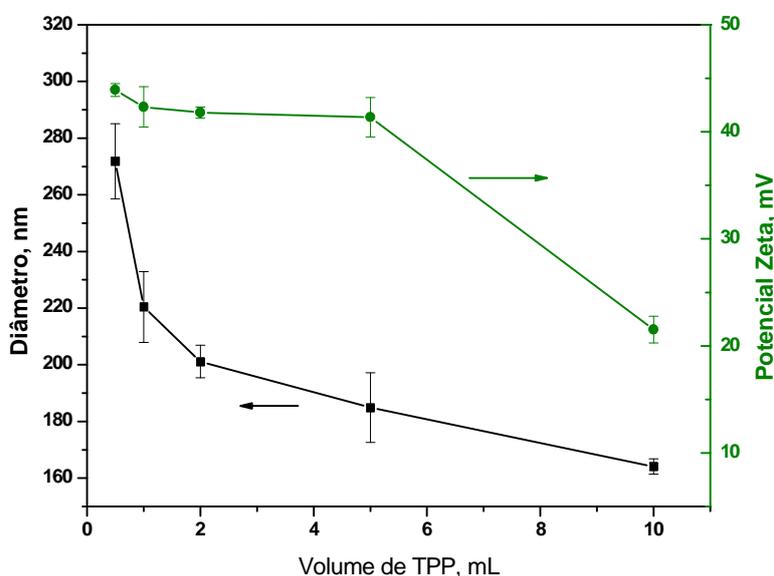


Figura 16 - Dependência do volume de TPP adicionado para formação de nanopartículas estáveis com lecitina

Para as amostras contendo lecitina o tamanho das NPs variam entre 164,1 nm (10,0 mL TPP) e 271,8 nm (0,5 mL TPP) conforme Tabela 1. É possível observar que à medida em que o volume de TPP aumenta o diâmetro das partículas tende a diminuir

ainda mais em decorrência das interações que ocorrem entre os grupos fosfatos contidos no tripolifosfato com os grupos aminos da quitosana. A existência de maior quantidade de grupos PO_4^{3-} leva a um aumento de densidade de cargas opostas o que leva a uma maior complexação envolvendo interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio associadas ao processo de gelatinização da quitosana na formação da nanopartículas (WEN FAN *et al.* 2012).

A melhor polidispersão do sistema na presença de lecitina foi observado para a amostra com maior volume de TPP, apresentando valor de 0,489 (10,0 mL TPP) conforme Tabela 1, o que caracteriza um sistema bem monodisperso.

Os valores de potencial zeta com a presença de lecitina também corroboram os valores obtidos relacionados ao tamanho e PDI das NPs, Foram obtidos valores variando entre +21,5 mV (10,0 mL TPP) e + 44,5 mV (2,0 mL TPP).

5.6 Caracterização das nanopartículas de QTS/TPP contendo o ativo quercetina

A caracterização das nanopartículas contendo quercetina foram feitas apenas em decorrência da dependência do pH variando em 4,0; 5,0 e 6,0.

A variação no tamanho das partículas também pode ser observado em relação a mudança de pH da solução conforme descrito no item 5.5.1, porém com a adição do ativo quercetina. A Tabela 2 mostra a variação nos valores do diâmetro, PDI e potencial zeta.

Tabela 2 - Propriedades para nanopartículas QTS/TPP contendo Quercetina

Amostras		pH da solução de quitosana								
		4.0 ^a			5.0 ^a			6.0 ^a		
		Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Sem Lecitina	Nanopartícula sem ativo	318,7± 8,3	0,512 ± 0,08	+43,5 ±0,8	480,3 ±11,5	0,336 ±0,03	+21,1 ±3,6	578,3 ±8,6	0,529 ±0,11	- 2,4 ±0,7
	Nanopartículas contendo quercetina	431,2± 1,3	0,453 ±0,04	+51,7 ±3,5	527,1 ±12,4	0,520 ±0,03	+43,3 ±4,3	610,9 ±3,8	0,506 ±0,02	+31 ±2,0
Com Lecitina	Nanopartícula sem ativo	174,9± 2,9	0,482 ±0,01	+48,2 ± 1,9	256,7 ±8,5	0,561 ±0,16	+38,2 ±0,6	343,3 ±7,6	0,579 ±0,11	+30,2 ±0,5
	Nanopartículas contendo quercetina	402,3 ±5,3	0,433 ±0,04	+49,5 ±1,9	442,2 ±8,5	0,572 ±0,04	+43,2 ±1,9	414,6 ±4,8	0,463 ±0,04	+47,4 ±0,9

^a análises em triplicata, cada análise representa a média de 12 análises, n=3

De acordo Souto *et al.* (2011) quando o princípio ativo se encontra disperso, em lugar de dissolvido, na fase orgânica, a sua tendência para se difundir para a fase aquosa é maior, reduzindo a sua incorporação nas nanopartículas. A utilização de um agente tensoativo na fase interna aumenta a molhabilidade das partículas sólidas do princípio ativo, contribuindo para a sua permanência nesta fase e permitindo aumentar a eficiência de encapsulação.

Para as nanopartículas sem lecitina e sem o ativo foi observado uma variação nos valores das nanopartículas entre 318,7 nm (pH 4,0) e 578,3 (pH 6,0). Para as nanopartículas com a presença de lecitina porém sem o ativo obtém-se valores de tamanhos entre 174,9 nm (pH 4,0) e 343,3 nm (pH 6,0). Tanto para as amostras contendo lecitina como para as amostras sem lecitina observa-se que para valores menores de pH, o tamanho das nanopartículas é reduzido em decorrência de uma maior agregação do sistema desenvolvido conforme observado na Tabela 2. A presença de lecitina contribui de forma mais significativa na redução do tamanho das NPs.

Para as nanopartículas sem lecitina contendo quercetina obtém-se valores referentes ao tamanho das nanopartículas variando entre 431,2 nm (pH 4,0) e 610,9 nm (pH 6,0). Para nanopartículas com a presença da lecitina e da quercetina observa-se variações no tamanho das NPs variando entre 402,3 nm (pH 4,0) e 414,6 nm (pH 6,0). Nos dois experimentos observa-se redução nos valores das nanopartículas em valores menores de pH conforme observado na Tabela 2, porém quando se relaciona os experimentos contendo ou não o surfactante lecitina, as amostras que as contém sofrem redução bem maior.

Com relação à polidispersão do sistema observa-se que para as amostras sem a presença de lecitina e quercetina a amostra com pH 5,0 apresenta melhor valor de PDI, 0,336 conforme Tabela 2, evidenciando que sistemas com valores de PDI inferiores a 0,5 oferecem melhor monodispersão e conseqüentemente melhor estabilidade. Para as amostras sem lecitina, porém com a presença do ativo quercetina a amostra com pH 5,0 oferece melhor polidispersão.

Para os sistemas contendo lecitina, tanto para as amostras com a presença da quercetina como para as amostras sem a presença do ativo observa-se uma melhor polidispersão para as amostras com menor pH, apresentando valores de 0,482 e 0,433 respectivamente.

Os valores de potencial zeta obtidos para as nanopartículas sem a presença de lecitina sem o ativo quercetina variam entre -2,4 mV (pH 6,0) e +43,5 mV (pH 4,0).

Para as amostras sem a presença de lecitina contendo quercetina observa-se variação de valores entre +31 mV (pH 6,0) e +51,7 mV (pH 4,0). Em ambos os experimentos observa-se valores menores de potencial para pH 6,0. Os valores negativos observados refletem a desprotonação da quitosana, com isso evidencia-se a presença dos grupos PO_4^{-3} contidos no TPP.

Com a presença de lecitina, porém sem o ativo os valores obtidos de potencial zeta variam entre +30,2 mV (pH 6,0) e +48,2 mV (pH 4,0). Para as amostras com a presença de lecitina e quercetina observam-se valores variando entre +47,4 mV (pH 6,0) e +43,2 mV (pH 5,0).

5.7 Eficiência de encapsulação da quercetina (%EE)

A importância do estudo da eficiência de encapsulação de um ativo, nesse caso a quercetina, se dá pelo fato de se poder prever e estabelecer a concentração do ativo presente na nanopartícula ao longo de uma série de variações. Essas variações podem, por exemplo, refletir na atuação de um medicamento em um meio biológico. A eficiência de encapsulação pode ser influenciada por vários fatores como temperatura, pH, concentração e natureza do polímero (LECORE *et al.*, 1997).

Segundo Yang e colaboradores (2000) o efeito da temperatura na encapsulação de um fármaco pode ser potencializada quando as nanopartículas são submetidas a temperaturas inferiores a 30°C e superiores a 80°C. Essa influência pode ser percebida em decorrência do enrijecimento da parede da nanopartícula que será influenciada a baixa temperatura pela diminuição de liberação do ativo durante a evaporação do solvente ou em decorrência da interação entre a nanoesfera e a água a altas temperaturas pela rápida evaporação do solvente.

Com relação à concentração do polímero, Lecore *et al.* (1997) afirmam que a maior quantidade do polímero pode influenciar a eficiência de encapsulação.

Para determinação da eficiência de encapsulação da quercetina nas nanopartículas produzidas pelo método de gelatinização iônica foram preparadas amostras de nanopartículas com a solução de quitosana no pH 5,0 na ausência e na presença de lecitina. Assim, a eficiência de encapsulação (%EE) do flavonóide foi calculada com uso da curva de calibração que relaciona a quantidade de quercetina encapsulada e a quantidade total de quercetina usada no preparo das nanopartículas. Os dados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Eficiência de encapsulação quercetina em NPs de QTS/TPP.

Amostra	Quercetina adicionada (mg)	Quercetina incorporada (mg)	Eficiência de encapsulação (%EE)^a
Sem Lecitina	30,5 mg ± 0,4	3,9 mg ± 1,2	12,8 ± 2,0 %
Com Lecitina	30,7 mg ± 0,3	15,3 mg ± 1,8	49,8 ± 1,3 %

^a realizado em triplicata, n=3.

A quercetina é um fármaco hidrofóbico e pouco solúvel em água. A medida em que as nanopartículas são produzidas sem a presença de um agente compatibilizante, um surfactante, observa-se que o mesmo não aparece dissolvido a nível molecular nos sistemas desenvolvidos. Nas nanopartículas sem lecitina observa-se baixa taxa de incorporação do quercetina.

A quantidade de quercetina incorporada pode ser aumentada se usássemos uma temperatura superior.

Quando adicionamos lecitina, observou-se que a incorporação de quercetina nas amostras é aumentado e o fármaco passa a estar mais dissolvido nas nanopartículas produzidas

5.8 Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia é o estudo das interações eletromagnéticas que ocorrem em uma determinada matéria. Por meio dos resultados obtidos por essa técnica é possível identificar e analisar os grupos funcionais existentes na estrutura do composto (PARIZE, 2009).

As Figuras 17 e 18 revelam espectros para nanopartículas desenvolvidas na ausência e presença de lecitina.

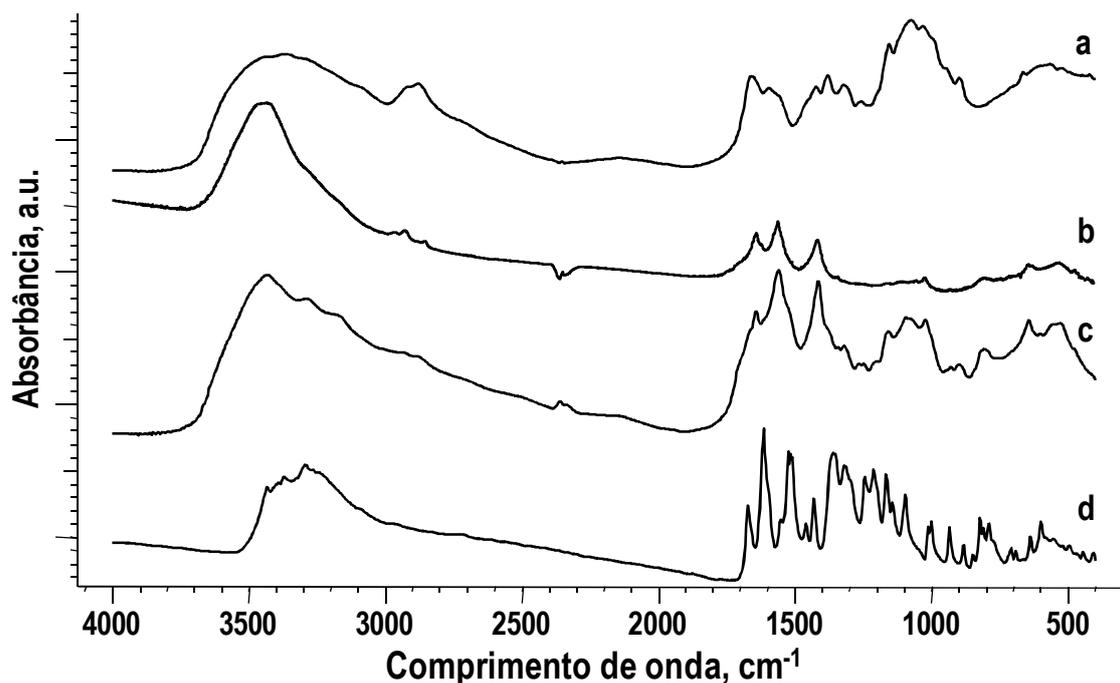


Figura 17 - FTIR para as nanopartículas desenvolvidas na ausência de lecitina
 (a) QTS, (b) QTS/TPP, (c) QTS/TPP/QTS/TPP/quercetina, (d) quercetina.

O espectro de quitosana revelou a presença de algumas bandas características em 3367 cm^{-1} (v-OH). Dentre as principais bandas percebe-se a amida I (deformação axial C = O) situada em 1658 cm^{-1} e em 1589 cm^{-1} referente ao grupo NH_2 (Figura 17a). A banda intensa em 3363 cm^{-1} relaciona-se com a vibração de estiramento O-H e / ou N-H, assim como as ligações de hidrogênio nas cadeias de polissacáridos. Em $1,377\text{ cm}^{-1}$ observa-se uma faixa na deformação angular CH_2 simétrica.

As bandas de absorção em 1153 cm^{-1} (estiramento assimétrico C-O-C) em $1,072$ e $1,029\text{ cm}^{-1}$ (vibrações envolvendo o alongamento C-O) de FTIR foi produzido porém não demonstrado no trabalho.

O espectro mostrou TPP suas bandas características nas região de 1095 cm^{-1} relacionadas ao grupo fosfato (P = O).

Na Figura 17b em 1644 cm^{-1} observa-se a formação das nanopartículas QTS/TPP após a formação, de nanopartículas a banda de 1658 cm^{-1} reduziu drasticamente ou desapareceram e um novo pico foi formada em 1637 cm^{-1} . A amida II pico a 1589 cm^{-1} foi deslocada para 1528 cm^{-1} nas nanopartículas confirmando que os grupos amino foram envolvidos em ligação cruzada com fosfato. FTIR das NPs de QTS

mostra um pico de absorção a 1217 cm^{-1} o que indica $\text{P} = \text{O}$ alongamento indicando a presença do grupo.

Na Figura 17c mostra o espectro das nanopartículas de quitosana e tripolifosfato de sódio contendo quercetina observa-se um aumento nas bandas de 2922 e 2852 cm^{-1} caracterizando a presença do flavanóide nas nanopartículas.

A banda em 1559 cm^{-1} referente ao grupo NH_3^+ é deslocada para 1565 cm^{-1} indicando que a quercetina nas nanopartículas associa-se via ligação de hidrogênio com o grupo NH_3^+ .

O espectro de infravermelho obtido pela quercetina (figura 17d) apresentou picos característicos em 3349 até 3290 cm^{-1} (O-H fenol), 1667 cm^{-1} (C = O carbonila de cetona), 1616 cm^{-1} (C = C de anel aromático), 1359 cm^{-1} (C-OH) e 1244 cm^{-1} (C-O-C). Estes valores também foram evidenciados no estudo de Borghetti e colaboradores (2009).

Na Figura 18 observam-se os espectros de infravermelho contendo lecitina.

Na Figura 18 observam-se os espectros de infravermelho contendo lecitina.

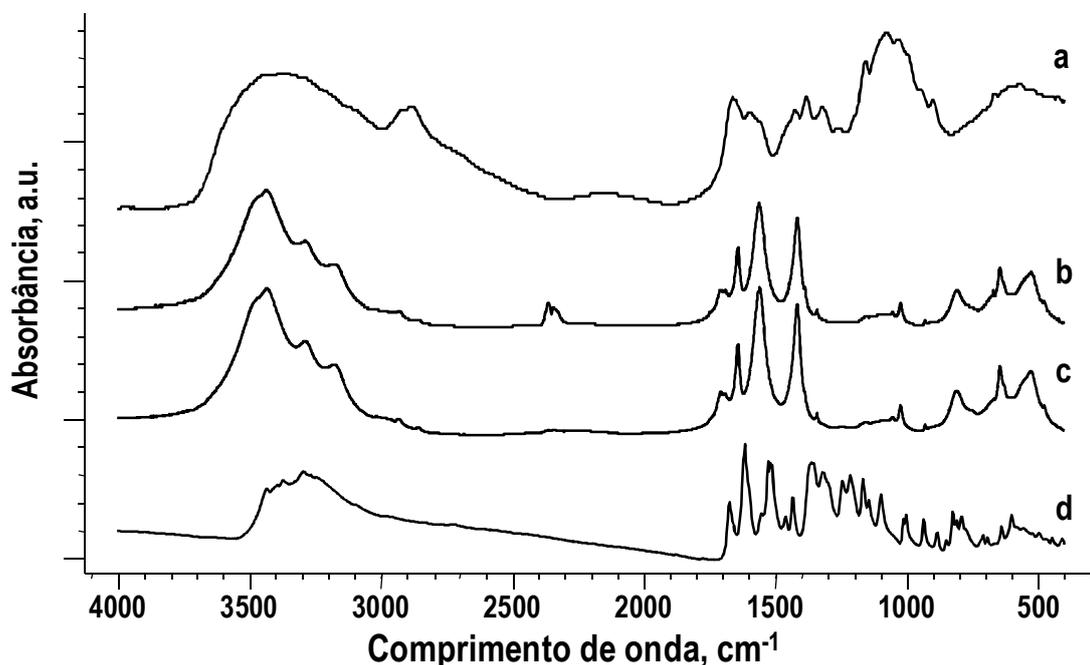


Figura 18 - FTIR para as nanopartículas desenvolvidas na presença de lecitina
(a) QTS, (b) QTS/TPP, (c) QTS/TPP/QTS/TPP/lecitina/quercetina, (d) quercetina.

Para as amostras contendo o surfactante lecitina observa-se o surgimento de bandas em 3284 e 3171 cm^{-1} referentes aos estiramentos do grupamento amina presentes no surfactante. Adicionalmente observa-se na Figura 18b e Figura 18c o surgimento de

uma nova banda em 1705 cm^{-1} referente à carbonila dos ácidos graxos da lecitina. Desta forma observa-se que o surfactante está disperso em toda amostra e auxilia na dispersão do flavonóide nas nanopartículas. Esses dados indicam que a quercetina está ligada a quitosana via ligação de hidrogênio, onde os OH fenólicos se ligam aos grupos amino da quitosana (PARIZE, 2009).

5.9 Análise Termogravimétrica (TGA)

A técnica de Termogravimetria é uma das análises térmica de suma importância para sistemas poliméricos. Por meio dessa análise é possível observar a variação da massa, seja essa por ganho ou perda, em função do tempo/ temperatura quando esse sistema é submetido a temperaturas pré-estabelecidas. Dessa forma é possível avaliar as alterações ocorridas na massa das substâncias, a faixa de temperatura a qual as mesmas adquirem estabilidade em relação a sua composição química, a temperatura em que começam a se decompor além do monitoramento de outras reações como oxidação, combustão e desidratação (CANEVAROLO JR., 2004).

As Figuras 19 e 20 apresentam os dados referentes às curvas de TGA para as amostras produzidas neste estudo. Os dados obtidos pela análise termogravimétrica diferencial estão apresentados na Tabela 4.

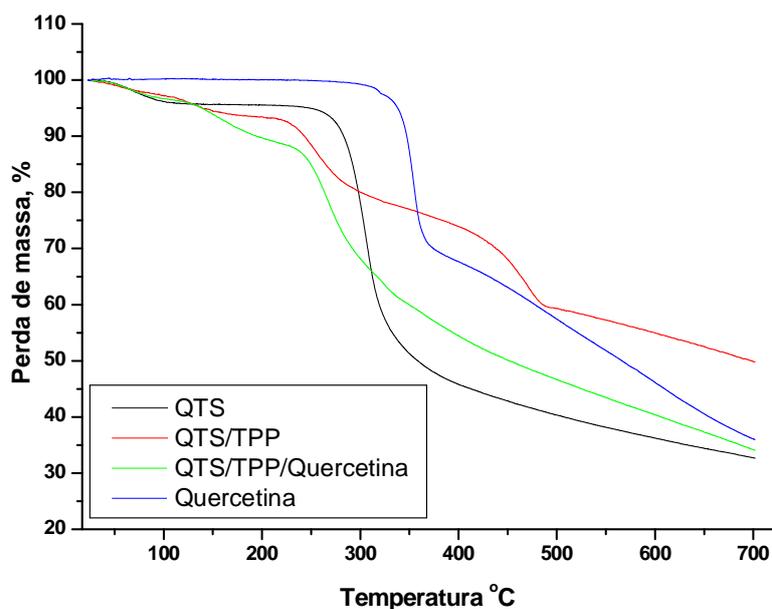


Figura 19 - Análises Termogravimétrica para amostras sem a presença de lecitina

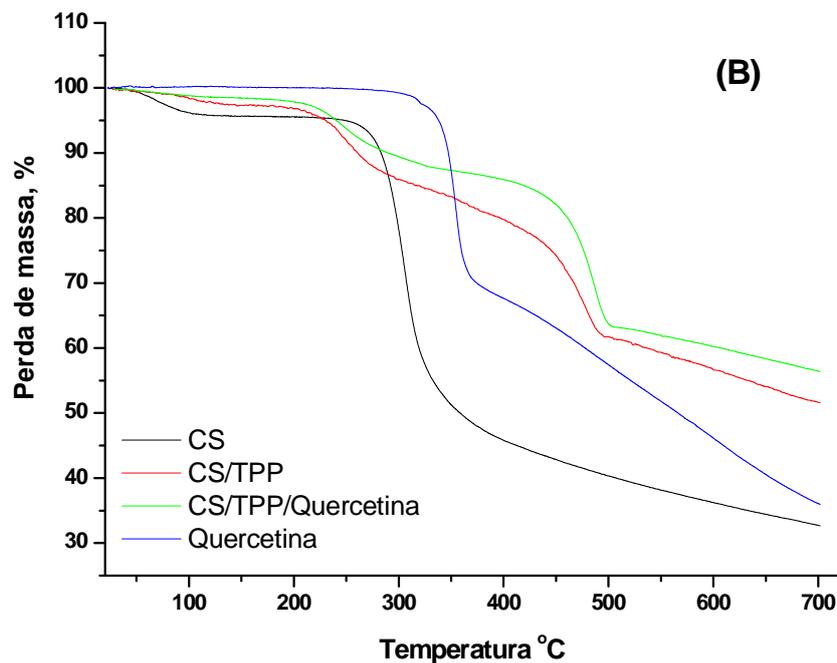


Figura 20 - Análises Termogravimétrica para amostras contendo lecitina

Tabela 4 - Dados da Análise Termogravimétrica Diferencial.

Amostra		Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Massa residual, (%) ^c
		T ₁ ^a	P ₁ ^b	T ₂ ^a	P ₂ ^b	T ₃ ^a	P ₃ ^b	
Quitosana		70,0	4,3	311,0	63,1			32,64
Sem Adição de Lecitina	QTS/TPP	69,0	6,12	246,0	19,2	471,0	20,6	54,04
	QTS/TPP/QUERCETINA	51,0	3,04	154,0	7,87	283,0	54,6	34,20
Com Adição de Lecitina	QTS/TPP/	78,0	2,6	256,0	16,5	474,0	29,3	51,57
	QTS/TPP/QUERCETINA	51,5	1,5	250,0	11,7	476,0	30,2	56,66
Quercetina		356,0	63,9					36,1

^a Temperatura de máxima velocidade de degradação, °C

^b Porcentagem de perda de massa em cada estágio de degradação

^c Massa residual a 700°C

A partir da Tabela 4 verifica-se que a quitosana apresenta duas regiões de perda de massa, a primeira em 70°C referente à perda de água residual e a outra em 311°C referente à degradação do polímero.

Para a quercetina foi desenvolvido apenas um pico em 356 °C. Sendo a quercetina um composto hidrofóbico não se observa uma quantidade significativa de água em outros estágios.

Para os sistemas formados sem a adição de lecitina observa-se três estágios de perda de massa. Para o sistema formado por quitosana e TPP observa-se que no primeiro e o segundo estágio ocorre a perda de massa em 69°C e 246°C atribuídos para a perda de água, já o terceiro estágio corresponde à decomposição (térmica) da quitosana, a vaporização e eliminação de produtos voláteis. Para o sistema formado por QTS/TPP com a presença do ativo quercetina observa-se também que no primeiro e no segundo estágio ocorre perda de massa em 51°C e 154 °C referente a facilidade de retirada de água em virtude da hidrofobicidade da quercetina.

As perdas de massa referentes à perda de água nos sistema justifica-se pela afinidade dos polissacáridos com a água e, portanto, pela facilidade de hidratação, resultando assim em macromoléculas com estruturas desordenadas observadas em todas as amostras (DUDHANI; KOSARAJU, 2010). Considerando a estrutura da quitosana, verifica-se que moléculas de água são limitadas por dois grupos polares, hidroxila e amina, presente nessa macromolécula.

A amostra (QTS/TPP) sem quercetina é mais estável quando comparada com a amostra contendo o ativo conforme demonstra a Tabela 3. Este fato pode ser explicado pela falta de interação entre o sistema QTS/TPP com a quercetina sem a presença de lecitina. Uma vez que o ativo não associa-se de forma eficaz, a amostra desestabiliza apresentando baixa estabilidade térmica.

Para os sistemas formados com a adição de lecitina foram observados perdas de massa na primeira fase referente a perda de água. A segunda, corresponde à decomposição (térmica e oxidativa) da quitosana assim como a vaporização e eliminação de produtos voláteis. O terceiro estágio é representado pela decomposição termica da amostra. Uma vez que a lecitina é adicionada à amostra observa-se que a amostra contendo quercetina e lecitina tem sua estabilidade termica aumentada.

Perfis de TGA para nanopartículas preparadas em presença de lecitina apresentam maior estabilidade térmica, assim como as amostras contendo quercetina e lecitina.

5.10 Calorimetria diferencial de Varredura (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica termoanalítica empregada de forma complementar à Termogravimetria (TG).

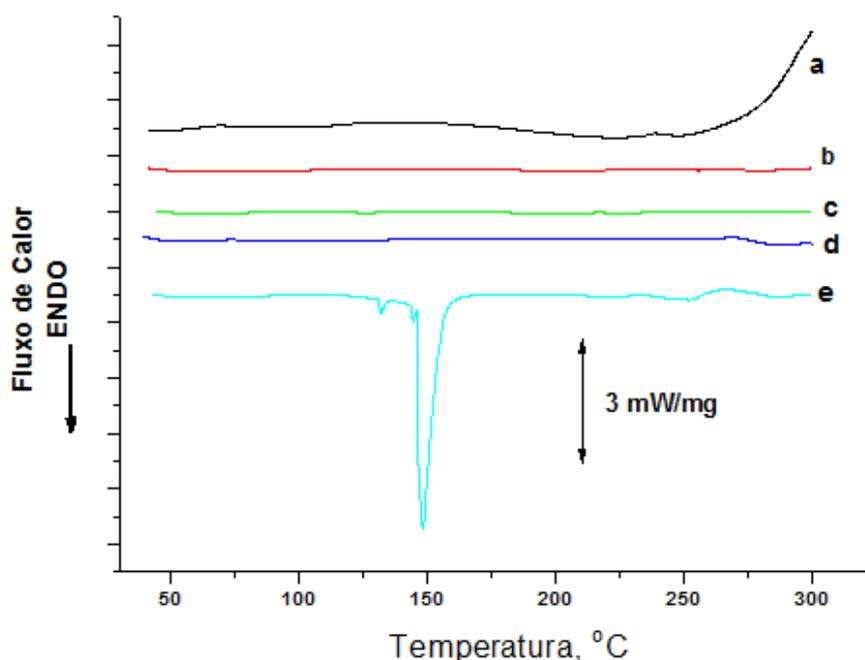


Figura 21 - Termogramas obtidos por DSC para a quitosana (a), para QTS/TPP (b), QTS/TPP/Quercetina (c), QTS/TPP/Lecitina (d), QTS/TPP/Lecitina/Quercetina (e) QTS/TPP/lecitina/quercetina

Observa-se para QTS uma região endotérmica entre 60 e 120°C referente à retirada de água da amostra evidenciadas sempre na primeira corrida. Pode-se ainda observar que decomposição do polímero quitosana pura por volta de 296°C.

Na região localizada entre 60 e 120°C pode geralmente ser encontrada para quitosana a sua temperatura de transição vítrea (T_g). Esta temperatura indica a saída da quitosana de um sistema semicristalino para um sistema amorfo.

Dessa forma foi realizada a primeira corrida para remover a quantidade de água existente na amostra, destruindo sua história térmica e possibilitando uma melhor observação das características das amostras analisadas que estão apresentadas na Figura 21. Para a quitosana (Figura 21a) foi observado uma T_g em 123,2 °C, e foi observado

que a quercetina apresenta um pico fino de fusão em 351 °C (dados não apresentados), como o observado por Yuying Zhang *et al.*, 2008.

Para as nanopartículas de quitosana/TPP (Figura 21b) foi observado uma Tg em torno de 144,3 °C. esse valor indica que o TPP reticula a estrutura da quitosana tornando a amostra mais rígida. Quando adicionamos lecitina a este sistema verifica-se que a mesma se posiciona entre as cadeias de quitosana durante o processo de reticulação e formação das nanopartículas, reduzindo a Tg para 129 °C.

Para as nanopartículas de QTS/TPP/Quercetina a Tg foi observada em 135°C. Para as nanopartículas de QTS/TPP/lecitina/Quercetina observa-se que com o aumento da eficiência de encapsulação a quercetina apresenta-se na forma semicristalina apresentando seu ponto de fusão em torno de 148°C. A adição de quercetina nas amostras proporciona interação entre a quitosana e a quercetina, tornando as amostras mais rígida.

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os objetivos propostos e a partir dos resultados obtidos neste trabalho, considera-se que:

- A quitosana é um biopolímero com importante custo benefício utilizado como agente encapsulante da quercetina;
- A preparação das nanopartículas por meio da técnica de gelatinização iônica demonstrou ser eficiente, simples, rápida e de baixo custo.
- A dependência do pH da solução polimérica, a concentração do polímero e a variação no volume do gelatinizador promovem alterações significativas no tamanho, carga e polidispersão das amostras
- A determinação do grau de desacetilação da quitosana evidenciou um resultado de 81,86%, demonstrando assim resultados condizentes com o grau apresentado pela quitosana comercial.
- A utilização consorciada do gelatinizador TPP e o surfactante Lecitina produzem significativa redução no tamanho das partículas;
- O tamanho das nanopartículas sofrem aumento em decorrência da maior concentração do biopolímero usado em sua preparação.
- A adição do surfactante lecitina produz significativa melhoria no tamanho, polidispersão e carga das NPs em todas as situações variadas no estudo;
- A quercetina demonstrou maior incorporação com a presença de lecitina apresentando 49,7% de eficiência de encapsulação;
- Os perfis de TGA para as nanopartículas preparadas em presença de lecitina apresentam maior estabilidade térmica, assim como as amostras contendo quercetina e lecitina.

7.0 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AZEVEDO, J. R; SIZILIO, R.H; BRITO, M.B; COSTA, A.M.B; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.S; SANTOS, M.R.V; LIRA, A.A.M; NUNES, R.S. Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. **J Therm Anal Calorim.** v. 106, p. 685-689, 2011.

BAO, Hongqian; LI, Lin; ZHANG, Hongbin. Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosanóTPP nanoparticles in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 328, p. 270-277, 2008.

BARROS, Francisco C. F; CAVALCANTE, Rivelino M., CARVALHO, Tecia V., DIAS, Francisco S., QUEIROZ, Danilo C., VASCONCELLOS, Luiz C. G.; NASCIMENTO, Ronaldo F. Produção e caracterização de esferas de quitosana modificada quimicamente. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 74, n. 4, 2006.

BEHLING, Estela Beatriz; SENDÃO, Milena Cristina; FRANCESCATO, Heloisa, Della Coletta; ANTUNES, Maria Greggí Lusânia; BIANCHI, Maria de Lourdes Pires. Flavonóide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Revista Alimentação e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, Araraquara, 2004.

BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Greggí. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, maio/ago, Campinas, 1999.

BORGHETTI, Greice S; LULA, Ivana S.; SINISTERRA, Ruben D.; BASSANI, Valquiria L. Quercetin/ -Cyclodextrin Solid Complexes Prepared in Aqueous Solution Followed by Spray-drying or by Physical Mixture. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 1, 2009.

CALVO, P., C. REMUNAN-LOPEZ, J. L. VILA-JATO, ALONSO, M. J.. Chitosan and chitosan/ethylene oxide propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. **Pharmaceutical Research**. v.14, n. 10, p. 1431-1436, 1997.

CANELLA, Kathya Maria Nilza de Carvalho; GARCIA, Rosangela Balaban G. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel-influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

CANEVAROLO JÚNIOR, Sebastião V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004.

CHUAH, A. M; KUROIWA, T., ICHIKAWA, S., KOBAYASHI, I., NAKAJIMA, M. Formation of Biocompatible Nanoparticles via the Self-Assembly of Chitosan and Modified Lecithin. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, 2009.

COIMBRA, Patrícia Manuela Almeida. **Preparação e caracterização de sistemas de liberação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. 2010. 268 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Universidade de Coimbra, 2010.

COSTA, Iguatã de Melo. **Estudo de pré-formulação com o composto polifenólico quercetina**. 2005. 198 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, 2005)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

DANTAS, Fábio Moyses Lins. **Processo de produção de nanopartículas contendo substâncias ativas e suas composições farmacêuticas**. BR n. PI 0802233-0, 17 jul.2012, 07 out. 2010.

DUDHANI, Anitha R; KOSARAJU, Shantha L. Carbohydrate Polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 243-251, 2010.

HAFNER, Anita; DÜRRIGL, Marjana; PEPIC, Ivan; FILIPOVIC´-GRC´ IC, Jelena. Short- and Long-Term Stability of Lyophilised Melatonin Loaded Lecitin/Chitosan nanoparticles. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 59, n. 9, p.1117-1123, 2011.

HENECZKOWSKI, Maciej; KOPACZ, Maria; NOWAK, Darota; KUZNIAR, Anna. Infrared Spectrum Analysis of some flavanoids. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 58, n. 6, p. 415-420, 2001.

HUN-YU TSAI, CHIEN-CHIH CHIU, PING-CHIH LIN, SU-HWEI CHEN, SHIH-JER HUANG, LI-FANG WANG. Antitumor Efficacy of Doxorubicin Released from Crosslinked Nanoparticulate Chondroitin Sulfate/Chitosan Polyelectrolyte Complexes. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 5, p. 680-688, 2011.

KATPAR, Ond ej; JAKUBEC, Martin; TĚ PÁNEK, Franti-ek. Characterization of spray dried chitosanóTPP microparticles formed by two- and three-fluid nozzles. **Powder Technology**, v. 240, p. 31-40, 2013.

LAUS, Rogério; COSTA, Thiago G.; SZPOGANICZ, Bruno; FÁVERE, Valfredo T. Adsorption and desorption of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent. **Journal of Hazardous Materials**, v.183, p. 233-241, 2010.

LECORE, P., et al. In vitro controlled release kinetics of local anesthetics from PDLA and PLGA microspheres. **J. Microencapsulation**, v. 14, p. 243-255, 1997.

LÓPES-LÉON, T.; CARVALHO, E.L.S., SEIJO, B., ORTEGA-VINUESA, J.L., BASTOS-GONZÁLEZ, D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 283, p. 344-351, 2005.

MENDES, Adriano A.; OLIVEIRA, Pedro C. de; CASTRO, Heizir F. de; GIORDANO, Raquel de L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MEZZALIRA, Graziela. **Caracterização de suspensões de nanopartículas poliméricas estudadas como carreadores de fármacos através de técnicas de espalhamento de luz e raio-x a baixo ângulo**. 2005. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MIN-LANG TSAI; RONG-HUEI CHEN; SHI-WEI BAI; WEI-YU CHEN. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 756-761, 2011.

NASTI, Alessandro; ZAKI, NM; DE LEONARDIS, P; UNGPHAIBOON, S, Sansongsak P, Rimoli MG, Tirelli N.. Chitosan/TPP and Chitosan/TPP-hyaluronic Acid Nanoparticles: Systematic Optimisation of the Preparative Process and Preliminary Biological Evaluation. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 8, 2009.

NEMEN, Daiane; LEMOS-SENNA, Elenara. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n.3, p. 408-413, São Paulo, 2011.

NITSCHKE, Márcia; PASTORE, Gláucia Maria. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n.5, p. 772-776, São Paulo, 2002.

NETO, C.G.T. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. **Carbohydrate Polymers**, v.62, p. 97-103, 2005.

OZCAN, Ipek; AZIZOĞLU, Erkan; ENYIGİT, Taner; ÖZYAZICI, Mine; ÖZER, Özgen. Enhanced dermal delivery of diflucortolone valerate using lecithin/chitosan nanoparticles: in-vitro and in-vivo evaluations. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 461-475, 2013.

PARIZE, Alexandre Luis. **Desenvolvimento de sistema microparticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma**. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Federal de Santa Catarina. 2009. 176 f. Florianópolis, 2009.

PRADO, A. G. S.; PESCARA, I. C.; EVANGELISTA, S. M.; HOLANDA, M. S.; ANDRADE, R. D.; SUAREZ, P. A. Z.; ZARA, L. F. Adsorption and preconcentration of divalent metal ions in fossil fuels and biofuels: Gasoline, diesel, biodiesel, diesel-like and ethanol by using chitosan microspheres and thermodynamic approach. **Talanta**. 2011; 84:7596765.

SÁ, Gilberto Fernandes de *et al.* **Desenvolvimento da nanociência e da nanotecnologia**. Brasília, 2003.

SANTOS, M.C; CIRILO, A. T. de O; NUNES, M. L. Determinação do grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão *Saburicaö* (*Macrobrachium jelskii*, Miers, 1877). **Scientia Plena**, v. 7, n.9, 2011.

SENYIGIT, Taner; SONVICO, Fábio; BARBIERI, Stefano; ÖZER, Özgen , SANTI, Patrizia, COLOMBO, Paolo. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-

propionate capable of accumulation in pig skin. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 368-373, 2010.

SCOTTI, Luciana; SCOTTI, Marcus Tullius; CARDOSO, Carmen; PAULETTI, Patrícia; CASTRO-GAMBOA, Ian; BOLZANI, Vanderlan da Silva; VELASCO, Maria Valéria Robles; MENEZES, Carla Maria de Souza, FERREIRA, Elizabeth Igne. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividades antioxidantes visando seu uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v. 43, n. 2, abr/jun. p. 153-166, 2007.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n.5, p. 726-737, São Paulo, 2003.

SHI, C., ZHU, Y., RAN, X.; WANG, Meng; SU, Yongping; CHENG, Tianmin. therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. **Journal of Surgical Research**, v. 133, p. 185-192, 2006.

SILVA, Hélio S.R. Costa; SANTOS, Kátia S.C.R. dos; FERREIRA, Elizabeth I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, São Paulo, 2006.

SILVA, Luis Felipe Costa. **Desenvolvimento de microesferas lipídicas contendo quercetina para a administração pulmonar visando o tratamento de asma**. Dissertação (Mestrado em Farmácia)- Universidade Federal de Santa Catarina. 2011. 145 f. Florianópolis, 2011.

SOUTO, Eliana B; SEVERINO, Patrícia; SANTANA, Maria Helena A; PINHO, Samantha C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1762-1769, São Paulo, 2011.

_____. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados- parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SONVICO, F.; CAGNANI, A., ROSSI, A., MOTTA, S., DI BARI, M.T.,CAVATORTA, F., ALONSO, M.J., DERIU, A., COLOMBO, P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, p. 67-73, 2006.

SPIN-NETO, Rubens; PAVONE, Chaíne; FREITAS, Rubens Moreno de; MARCANTONIO, Rosemary Adriana Chiérici; MARCANTONIO-JÚNIOR, Elcio. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2008.

ENYI IT, Taner; SONVICO, Fabio; BARBIERI, Stefano; ÖZER, Özgen; SANTI, Patrizia; COLOMBO, Paolo. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p.368-373,2010.

TIMBOLA, Ana K; SOUZA, Cristine D. de; GIACOMELLI, Cristiano; SPINELLI, Almir. Electrochemical Oxidation of Quercetin in Hydro-Alcoholic Solution. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 1, p. 139-148, 2006.

TIYABOONCHAI, Waree. Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 51-56, 2003.

TZU-HUI WU; FENG-LIN YEN; LIANG-TZUNG LIN; TONG-RONG TSAI; CHUN-CHING LIN; THAU-MING CHAM. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, p. 1606168, 2008.

WEN FAN; WEN FANA, WEI YAN, ZUSHUN XU, HONG NI. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 21-27, 2012.

YANG, Y.Y., HUI-HUI CHIA; TAI-SHUNG CHUNG. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by Double emulsion method. **Chemical Engineering Science**, v. 55, p. 2223 -2236, 2000.

YUYING ZHANG; YAN YANG, KAI TANG, XING HU, GUOLIN ZOU. Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity of Quercetin-Loaded Chitosan Nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, p. 891-897, 2008.

ZHANG, Yuying. Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity of Quercetin-Loaded Chitosan Nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107,p.8916897,2008.

