



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALEXANDRE ESPADA REINAS

**Microencapsulação da fração hexânica obtida a partir do extrato alcoólico dos  
frutos de *Pterodon pubescens* Benth. (Sucupira branca)**

MARINGÁ  
2013

ALEXANDRE ESPADA REINAS

**Microencapsulação da fração hexânica obtida a partir do extrato alcoólico dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth. (Sucupira branca)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso

MARINGÁ  
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

R364m Reinas, Alexandre Espada  
Microencapsulação da fração hexânica obtida a partir do extrato alcoólico dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth. (Sucupira branca) / Alexandre Espada Reinas. -- Maringá, 2013.  
74 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mara Lane Carvalho Cardoso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.

1. *Pterodon pubescens* Benth - Extrato alcoólico - Fração hexânica. 2. Microencapsulação. 3. Vouacapanos. 4. Alginato quitosana. 5. Sucupira branca - Extrato alcoólico - Fração hexânica. 6. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). I. Cardoso, Mara Lane Carvalho, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 22.ed. 615.19

AMMA-00655


**ALEXANDRE ESPADA REINAS**

**MICROENCAPSULAÇÃO DA FRAÇÃO HEXÂNICA OBTIDA A  
PARTIR DO EXTRATO ALCOÓLICO DOS FRUTOS DE  
*PTERODON PUBESCEN BENTH.* (SUCUPIRA BRANCA)**

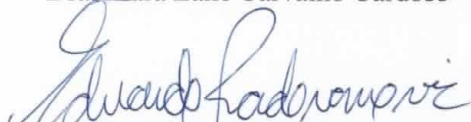
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 08 de março de 2013.

**BANCA EXAMINADORA**



Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso



Dr. Eduardo Radovanovic



Dr. Marcos Luciano Bruschi

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida, saúde, benção e proteção.

Minha profunda gratidão, a todas as pessoas, professores, técnicos de laboratório, que muito colaboraram na pesquisa, em especial a minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Mara Lane, por sua paciência, dedicação e ensinamentos.

Aos meus amigos e a todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para minha evolução pessoal e profissional.

E a minha família, especialmente aos meus pais, José e Teresa e a minha querida avó Aparecida, pelo apoio incondicional e incentivo.

Ao meu avô Joaquim, que junto de Deus, com certeza, sempre esteve olhando por mim.

**Muito Obrigado!**

“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor... Lembre-se. Se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo.”

*Albert Einstein*



## RESUMO

Os frutos do gênero *Pterodon* apresentam várias propriedades farmacológicas, dentre elas, a atividade anti-inflamatória. Verificou-se que o óleo dos frutos, e suas frações não apresentavam estabilidade em condições ambientais, necessitando refrigeração. Em face desta constatação, e sendo a microencapsulação uma técnica utilizada para proteger fármacos, principalmente aqueles que estão sujeitos à degradação, o presente trabalho teve como objetivo microencapsular a fração hexânica obtida a partir do extrato alcoólico dos frutos de sucupira branca (*Pterodon pubescens* Benth.) (FHPp) em um sistema polimérico constituído pela associação alginato de sódio–quitosana de baixo e médio peso molecular desacetiladas e grau técnico maior ou igual a 75% desacetilada empregando o método da coacervação complexa ou por *spray drying* preparada apenas com alginato de sódio. Verificou-se que é possível microencapsular a fração hexânica, avaliada pela quantificação dos vouacapanos presentes nas microcápsulas, uma vez que os resultados de rendimento ( $71,37 \pm 1,38$ ), eficiência de microencapsulação (93,22% aproximadamente) e perfil de liberação (75,88%) foram satisfatórios, para as microcápsulas preparadas com a associação alginato–quitosana de baixo peso molecular. A análise estatística por ANOVA revelou que as microcápsulas obtidas das diferentes associações poliméricas diferiram em relação ao teor dos vouacapanos em nível de  $p < 0,05$ , o que foi confirmado pelo post-hoc de Tukey e teste T student. Os resultados demonstraram que a melhor formulação obtida foi a preparada a partir da associação alginato – quitosana baixo peso molecular pelo método de coacervação. As análises de microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas produzidas por coacervação apresentaram formato esférico, lisas e aglomeradas. Essa aglomeração é devida principalmente às interações eletrostáticas entre as cadeias do alginato e quitosana. As microcápsulas obtidas por secagem em *spray drier* apresentaram superfície porosa e rugosa, uma característica do polímero utilizado, o alginato. Também pôde-se observar microcápsulas achatadas e em forma de disco, uma característica do processo de secagem em *spray drier*. As análises por difração de Raios-X (DRX) indicaram que as microcápsulas eram amorfas, semelhantes às características do alginato. Foram realizados experimentos de Infravermelho e Raman por Transformada de Fourier que indicaram através de bandas características a microencapsulação da fração em estudo. As análises térmicas indicaram que o sistema polimérico utilizado apresentou maior quantidade de água quando a FHPp foi microencapsulada.

**Palavras-chave:** *Pterodon pubescens*, microencapsulação, vouacapanos, alginato, quitosana



## ABSTRACT

The fruits of the genus *Pterodon* have several pharmacological properties, among them the anti-inflammatory activity. It was found that the fruit oil and its fractions showed no stability at ambient conditions, requiring refrigeration. Due to this finding, and being the microencapsulation, a technique used to protect drugs, especially those that are subject to degradation. The present study aimed to microencapsulate hexane fraction obtained from the alcoholic extract of the white sucupira fruits (*Pterodon pubescens* Benth.) (FHPp) in a binary polymer system consisting of the combination sodium alginate-chitosan low and medium molecular weight and deacetylated technical grade greater than or equal to 75% deacetylated using the complex coacervation method or by spray drying prepared with only sodium alginate. It has been found that it is possible to microencapsulate hexane fraction as assessed by quantification of vouacapans present in the microcapsules, since the yield ( $71.37 \pm 1.38$ ), microencapsulation efficiency (approximately 93.22%) and profile release (75.88%) were satisfactory for microcapsules prepared with the combination of alginate-chitosan low molecular weight. Statistical analysis by ANOVA revealed that the microcapsules obtained from different polymeric associations differed in relation to the content of vouacapans level of  $p < 0.05$ , which was confirmed by post-hoc Tukey test and T- Student. The results showed that the best formulation obtained was prepared from the combination alginate - low molecular weight chitosan by the coacervation method. The analysis of scanning electron microscopy of microcapsules produced by coacervation showed spherical, flat and crowded. This agglomeration is mainly due to the electrostatic interactions between the chains of alginate and chitosan. The microcapsules obtained by spray drying in drier porous and rough surface showed a characteristic polymer used, the alginate. It can also be observed microcapsules flattened and disk-shaped, a characteristic of the drying process in spray drier. The analysis by X-ray diffraction (XRD) showed that the microcapsules were amorphous similar to the alginate characteristics. The experiments of Raman and Infrared by Fourier Transform, indicated by feature bands, the microencapsulation of fraction under study. The thermal analysis showed that the polymer system used, had higher amounts of water when FHPp was microencapsulated.

**Keywords:** *Pterodon pubescens*, microencapsulation, vouacapan, alginate, chitosan

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
--------------------------	----

### CAPÍTULO 2

#### Artigo

Resumo.....	30
1. Introdução.....	30
2. Material e métodos.....	32
2.1. Material.....	32
2.2. <i>Obtenção do extrato Pterodon pubescens Benth. (EPp) e seu fracionamento (FHPp)</i> ...32	
2.3. Caracterização da fração hexânica.....	33
2.3.1. Determinação do índice de refração.....	33
2.3.2. Determinação da densidade absoluta.....	33
2.3.3. Caracterização química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS).....	33
2.4. Caracterização dos polímeros por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	34
2.5. Preparo das microcápsulas de alginato pelo método <i>Spray Drying</i> .....	34
2.6. Método de Preparo das Microcápsulas de alginato/quitosana reticuladas com CaCl <sub>2</sub> .....	35
2.7. Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC).....	35
2.8. Difração de Raios - X (DRX).....	35
2.9. Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR).....	35
2.10. Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman).....	36
2.11. Análise morfológica e granulométrica das microcápsulas.....	36
2.12. Rendimento de Microencapsulação e conteúdo de FHPp (FHPp%).....	36
2.13. Eficiência de Microencapsulação.....	37
2.14. Estudo de perfil de liberação <i>in vitro</i> da FHPp.....	37
2.15. Análise Estatística.....	38
3. Resultados e Discussão.....	38
3.1. Rendimento dos extratos e perfil químico.....	38
3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos polímeros.....	41
3.3. Análise morfológica e granulométrica.....	45
3.4. Rendimento de Encapsulação e Conteúdo em óleo .....	46

3.5. Eficiência de encapsulação.....	47
3.6. Análise Térmica das microcápsulas.....	49
3.7. Difração de Raios-X(DRX).....	51
3.8. Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	51
3.9. Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman).....	54
3.10. Estudo de perfil de liberação <i>in vitro</i> da FHPp.....	57
4. Conclusão.....	59
Referências.....	60

### **CAPITULO 3**

Sugestões para futuros trabalhos.....	66
---------------------------------------	----

### **ANEXOS**

Anexo I - Normas para publicação no <i>International Journal of Pharmaceutics</i> .....	68
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

**MEV**- Microscopia eletrônica de varredura

**FHPp** – Fração Hexânica de *Pterodon pubescens* Benth.

**ANOVA** – Análise de Variância

**CG/MS-TIC** – Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas/Total de Íons Cromatográficos

**CG/MS-SIM** - Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas/Sistema de monitoramento de íons

**FHPp%** - Conteúdo de FHPp

**EPp** - Extrato de *Pterodon pubescens*

**TGA** - Termogravimetria

**DRX** – Difração de Raios X

**DSC** – Calorimetria Diferencial Exploratória

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**FTIR**- Infravermelho por Transformada de Fourier

**FT-Raman** – Raman por Transformada de Fourier

**M** –microcápsulas cheias;

**MB**-microcápsulas brancas;

**AG**- alginato;

**AGQUITMPM**- alginato/quitosana peso molecular médio;

**AGQUIT75DES**-alginato/quitosana  $\geq 75\%$  desacetilada;

**AGQUITBPM** – alginato/quitosana baixo peso molecular.

**MAGSD** –Microcápsulas cheias de alginato *spray drier*

**D<sub>2</sub>O** - Água Deuterada

**DCI** – Ácido Clorídrico Deuterado

**QUITMPM**- Quitosana peso molecular médio

**QUIT75DES**- Quitosana  $\geq 75\%$  desacetilada

**QUITBPM-** Quitosana Baixo peso molecular

**LISTA DE TABELAS:**

**Tabela 1.** Regiões de íons monitorados por CG/MS/SIM

**Tabela 2.** Concentração dos vouacapanos 1,2,3 e 4 na FHPp obtidas pelo método CG/MS-SIM.

**Tabela 3.** Rendimento de encapsulação e conteúdo de FHPp (FHPp%)

**Tabela 4.** Eficiência de encapsulação dos vouacapanos.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1**– Estruturas químicas dos vouacapanos: A) Metil-6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxivouacapan-17 $\beta$ -oato e B) Metil-6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxivouacapan-17 $\beta$ -oato

**Figura 2** - Composição do alginato. (a) ácido  $\beta$ -D- manurônico (b) ácido  $\alpha$ -L- gulurônico (c) Fórmula estrutural da molécula de alginato de sódio.

**Figura 3** - A gelificação dos blocos homopoliméricos da junção de ácido  $\alpha$ -L-gulurônico com íons cálcio. A ligação de cátions divalentes com o alginato: do modelo em "caixa-de-ovo".

**Figura 4** - Unidades estruturais da quitosana: (a) N-acetilglucosamina; (b) glucosamina.

**Fig. 1.** Perfil químico da FHPp antes e após o processo de microencapsulação por CG/MS-TIC.

**Fig. 2.** Perfil químico da FHPp por CG/MS-SIM , onde  $V_1$  ,  $V_2$  ,  $V_3$  e  $V_4$  são os vouacapanos presentes na fração e  $V_3$  e  $V_4$  são respectivamente, Metil-6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxivouacapan-17 $\beta$ -oato e Metil-6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxivouacapan-17 $\beta$ -oato

**Fig. 3.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  300 MHz (80°C) do alginato de sódio

**Fig. 4** Espectro RMN  $^1\text{H}$  400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$  (pH=3) (70°C) da quitosana de baixo peso molecular

**Fig. 5.** RMN  $^{13}\text{C}$  (100,25 MHz) - A) Quitosana de Peso Molecular Médio e B) Quitosana  $\geq$  75 % desacetilada

**Fig. 6.** Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas de a) Alginato/Quitosana peso molecular médio (5000x); b) Alginato/Quitosana 75% desacetilada(12000x); c) Alginato/Quitosana baixo peso molecular(2000x); d) Alginato por *spray dryer*(1500x); d<sub>1</sub>) (4500x); d<sub>2</sub>) (3000x).

**Fig. 7.** Distribuição granulométrica das microcápsulas de a) Alginato/Quitosana peso molecular médio; b) Alginato/Quitosana  $\geq 75\%$  desacetilada; c) Alginato/Quitosana baixo peso molecular; d) Alginato por *spray dryer*. (■) histograma de intervalos de classe e (—◆—) representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas.

**Fig. 8.** DSC microcápsulas brancas a); DSC microcápsulas com FHPp b); TG microcápsulas brancas c); TG microcápsulas com FHPp d). Onde: MB seriam microcápsulas Brancas; M –microcápsulas cheias; AG- alginato; AGQUITMPM- alginato/quitosana peso molecular médio; AGQUIT75DES-alginato/quitosana  $\geq 75\%$  desacetilada; AGQUITBPM – alginato/quitosana baixo peso molecular.

**Fig. 9.** DSC e TGA dos polímeros puros a) alginato de sódio, b) quitosana peso molecular médio, c) quitosana grau médio  $\geq 75\%$  desacetilada e d) quitosana de baixo peso molecular.

**Fig. 10.** Difração de Raios X dos polímeros (A)- AG – Alginato ; QUITBPM – quitosana de baixo peso molecular; QUIT75DES - quitosana grau técnico  $\geq 75\%$  desacetilada ;QUITMPM – quitosana de peso molecular médio; e das amostras de microcápsulas de FHPp (B) - MAGSD- Microcápsulas de alginato; MAGQUITMPM- Microcápsulas de alginato/quitosana Peso Molecular Médio ; MAGQUIT75DES -Microcápsulas de alginato/quitosana  $\geq 75\%$  desacetilada ; MAGQUITBPM - Microcápsulas de alginato/quitosana Baixo Peso Molecular

**Fig. 11.** FT-IR da Fração Hexânica de *Pterodon pubescens* (FHPp)

**Fig. 12.** FT-IR do Alginato de sódio

**Fig. 13.** FT-IR da quitosana de baixo peso molecular

**Fig. 14.** FT-IR dos excipientes e microcápsulas Brancas

**Fig. 15.** FT-IR das Microcápsulas com FHPp e Fração Hexânica de *Pterodon pubescens* (FHPp)

**Fig. 16.** FT-Raman do alginato

**Fig. 17.** FT-Raman quitosana baixo peso molecular

**Fig. 18.** FT – Raman da FHPp

**Fig. 19.** FT-Raman dos polímeros e microcápsulas brancas

**Fig. 20.** FT-Raman das microcápsulas com FHPp

**Fig. 21.** Metil 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxivouacapan-17 $\beta$ -oato (1673 cm<sup>-1</sup>)

**Fig. 22.** Perfil de liberação *in vitro* de vouacapanos da associação alginato/quitosana baixo peso molecular



## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

Uma grande parte da população considera as plantas como um recurso de valor irrisório não tão eficaz para o tratamento de suas enfermidades, outra, porém, prefere a fitoterapia, pois acredita que terá menor incidência de efeitos colaterais e correndo menos riscos com a sua utilização. (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

O avanço científico, somado com a necessidade da população e com o interesse econômico envolvendo a fitoterapia, vem proporcionando o crescimento desta. No mercado mundial, cerca de 80% das pessoas utilizam plantas para curar suas doenças (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Ultimamente, em relação às plantas medicinais tem-se verificado avanço científico notório, nos estudos químicos e farmacológicos, o que pode ser observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, tanto em congressos como em periódicos.

Ocorreu o surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998), o que justifica o propósito de estudo de plantas medicinais como alternativa em setores onde princípios ativos sintéticos são amplamente utilizados.

O óleo extraído do fruto de *Pterodon pubescens* Benth apresenta várias propriedades farmacológicas já comprovadas, como ação anticancerígena, atividade antinociceptiva e atividade anti-inflamatória, principalmente contra a artrite (VIEIRA et al., 2008; COELHO et al., 2005; CARVALHO et al., 1999).

Embora a fração oleosa extraída dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth apresente uma acentuada atividade anti-inflamatória, o sabor e odor desta, é extremamente desagradável, o que poderia limitar o uso do mesmo em uma terapia. Somado a isso, a sua exposição à luz e temperatura ambiente, reduz sua estabilidade química.

Hoscheid et al. (2012) observou que o óleo dos frutos, e suas frações não apresentavam estabilidade em condições ambientais, necessitando refrigeração. Em face desta constatação, torna-se difícil o emprego deste insumo em preparações farmacêuticas sem que haja a proteção dos constituintes lipofílicos, facilmente oxidados pelo ar e luz.

Considerando que um dos recursos mais empregados na indústria alimentícia atual, para proteger componentes oleaginosos de processos oxidativos é a microencapsulação dos

óleos alimentícios em sistemas poliméricos e que a indústria farmacêutica de ponta já tem aderido a este recurso no intuito, de promover melhor qualidade tecnológica e terapêutica de muitos fármacos, acreditamos que é possível minimizar os problemas relacionados à instabilidade do óleo de sucupira a partir da microencapsulação do mesmo empregando polímeros naturais como os polissacarídeos. Estes polímeros apresentam vantagens como atoxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo, além de serem encontrados em abundância na natureza (OLIVEIRA, 2004).

A tecnologia de microencapsulação torna-se, portanto, uma possível ferramenta para mascarar o sabor e odor deste óleo, bem como aumentar a sua estabilidade química .

Esta ainda é requisitada para garantir que o material encapsulado alcance a área de ação sem produzir efeitos adversos pelos locais onde passa. Há vários trabalhos com a sucupira Branca (*Pterodon pubescens* Benth.) na área de fitoquímica, porém a planta foi muito pouco abordada na parte de tecnologia, sendo veiculado em poucas formulações (SANTOS FILHO et al., 1987; SERVAT et al., 2010), tendo um vasto campo de aplicação que deve ser explorado.

### 1.1 Gênero *Pterodon*

O gênero *Pterodon* compreende cinco espécies nativas brasileiras: *P. abruptus* Benth, *P. apparicioni* Pedersoli, *P. emarginatus* Vog., *P. pubescens* Benth. e *P. polygalaeflorus* Benth. A investigação química destas espécies foi motivada pela descoberta da ação cercaricida do óleo do fruto de *P. pubescens* Benth (MAHAJAN; MONTEIRO, 1973), bem como das quatro outras espécies (FASCIO, 1976), além de atividade antimicrobiana *in vitro* obtida do óleo de *P. pubescens* Benth contra bactérias gram-negativas (NETO, 1976).

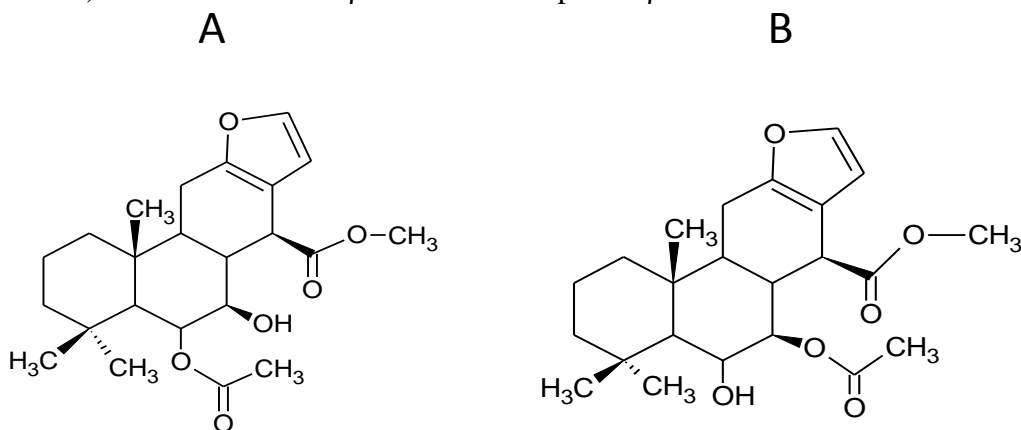
Na década de 60, o 14,15-epoxigeranilgeraniol foi isolado do óleo dos frutos de *P. pubescens* e mostrou ser eficiente como agente quimioprolático na esquistossomose (MORS, 1967). Em 1970, novos diterpenóides foram obtidos de *P. emarginatus* (MAHAJAN; MONTEIRO, 1973). No mesmo ano, dois novos terpenos foram isolados do óleo do fruto de *P. pubescens* (FASCIO, 1976).

Os diterpenos encontrados nas espécies *P. pubescens* foram eficientes na profilaxia da esquistossomose (SANTOS FILHO, 1987). Quatorze diterpenos furânicos foram descritos e isolados do óleo do fruto do gênero *Pterodon*, entre outras substâncias, das quais quatro pertencem a espécies de *P. polygalaeflorus* Benth (FASCIO, 1976). Do extrato hexânico de sementes de *P. polygalaeflorus* Benth, foi obtido óleo essencial por arraste de vapor, no qual

os seguintes constituintes foram identificados:  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\gamma$ - e  $\delta$ -cadieno (CAMPOS, 1994). Da fração insaponificável do extrato etanólico de sementes, foi isolado e identificado o ácido  $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapan-17-óico. Dando prosseguimento ao estudo fitoquímico das referidas espécies, foi isolado o diterpeno vouacapânico:  $6\alpha$ -hidroxi- $7\beta$ -acetoxivouacapan-14(17)-eno. A estrutura deste diterpeno foi determinada por métodos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN. (CAMPOS, 1994).

Hoscheid et al, (2012), também isolou quatro furanoditerpenos com esqueleto vouacapânico, dois foram totalmente identificados, os isômeros de posição apresentados na Figura 1. Esses quatro furanoditerpenos foram os marcadores utilizados no desenvolvimento do presente trabalho com o objetivo de quantificar a presença da fração hexânica de *P. pubescens* Benth (FHPp) no interior das microcápsulas.

**Figura 1** – Estruturas químicas dos vouacapanos: A) Metil- $6\alpha$ -acetoxi- $7\beta$ -hidroxivouacapan-17 $\beta$ -oato e B) Metil- $6\alpha$ -hidroxi- $7\beta$ -acetoxivouacapan-17 $\beta$ -oato



**Fonte:** Hoscheid, 2011.

Sucupira é uma árvore nativa do Brasil, sendo encontrada predominantemente na região do cerrado, utilizada para o tratamento de reumatismos, principalmente artrite reumatoide.

O óleo isolado das sementes de *Pterodon pubescens* tem proporcionado em suma, produtos químicos da classe dos sesquiterpenos (MORS et al., 1967, NETO, 1976), diterpenos lineares (MORS et al., 1967) e furanoditerpenos com esqueleto vouacapano e vinhaticano (ARRIAGA et al., 2000; CAMPOS et al, 1994; DEMUNER et al., 1996; FASCIO et al, 1976; MAHAJAM E MONTEIRO, 1973), além de flavanóide taxifolina (ARRIAGA et al., 2000).

Sabino (1995) mostrou que o óleo de semente de *Pterodon pubescens* inibe a proliferação de células mononucleares de sangue periférico humano e promove a morte dessas células por apoptose (SABINO et al., 1996). Sabino et al. (1999a) demonstraram ausência de atividade mutagênica e de toxicidade aguda em camundongos. SABINO et al. (1999b) demonstraram o efeito antiartrítico do extrato hidroalcoólico (etanol 15%) das sementes de *P. pubescens* no modelo de artrite induzida por colágeno II (CIA).

Coelho et al, (2001) avaliaram a toxicidade subaguda do extrato hidroalcoólico das sementes de *P. pubescens* em ratos também pelo modelo de artrite induzida por colágeno II (CIA). O tratamento oral com este extrato reduziu o índice de artrite sem qualquer alteração concomitante do exame hematológico, análise histopatológica, e peso absoluto ou relativo de muitos órgãos e muitos parâmetros clínicos e bioquímicos quando comparados com o grupo controle.

Vieira et al, (2008) relatam em seu trabalho a atividade antiproliferativa do óleo da semente de *Pterodon pubescens* Benth e o seu princípio de atividade nas células do melanoma humano, no qual a fração dietil éter do extrato etanólico de *Pterodon pubescens* Benth apresentou forte atividade quando submetida ao fracionamento com eluição gradiente em hexano e acetato de etila, sendo o furano diterpeno I isolado neste trabalho o principal responsável por esta atividade.

Spindola et al, (2011) relatam o possível mecanismo de ação antinociceptivo do geranilgeraniol e do metil-éster 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ - dihidroxivouacapano-17 $\beta$ -oato no qual diferentes modelos animais foram utilizados para entender as propriedades antinociceptivas apresentadas pelos compostos.

Nucci et al, (2012) também avaliaram a antinocicepção induzida pelo extrato oleaginoso dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth em modelos animais para dor aguda e crônica. Neste trabalho são confirmados os dados prévios mostrados na literatura, atestando que a administração sistêmica do extrato oleaginoso de *Pterodon pubescens* Benth causa significativa inibição contra ambas as fases de resposta a dor induzida por injeção intraplantar de formalina e formação de edema.

Euzébio et al, (2009) relata em seu trabalho o efeito do ácido 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17  $\beta$  –oico e de seus derivados lactônicos no crescimento de células de câncer humano, este metabólito secundário de algumas espécies do gênero *Pterodon* (Leguminosae) apresenta múltiplas atividades biológicas como anti-inflamatória, analgésica, papel regulador no crescimento da planta, anti-edematogênica, inibitória do sistema foto-II, desacoplador da fotossíntese e propriedades antifúngicas.

Miranda et al, (2012) isolaram quatro sesquiterpenos das folhas de *Pterodon pubescens* Benth. Sendo :  $\alpha$ -cadinol (1), óxido de cariofileno (2), eudesm-4(15)-eno-1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (3) e (+)-oplopanona (4). Estas substâncias, foram caracterizadas espectroscopicamente por RMN, e estão sendo descritas pela primeira vez nesta espécie.

Pereira et al, (2012) demonstraram que a fração terpênica do extrato etanólico das sementes de *Pterodon pubescens* Benth. apresenta atividade anti-leucêmica, contendo farnesol, geranilgeraniol e derivados vouacapânicos em sua composição.

Menna-Barreto et al, (2008) observaram a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* do óleo da semente de *Pterodon pubescens* Benth. sendo o geranilgeraniol o seu maior componente bioativo. O geranilgeraniol inibiu a proliferação de formas amastigotas em concentrações que não afetaram as células hospedeiras de mamíferos. A microscopia eletrônica de transmissão e a citometria de fluxo, indicaram que a mitocôndria, organela que desempenha papel central na apoptose, mostrou epimastigotas e tripomastigotas como principal alvo do geranilgeraniol.

## 1.2 Atividade anti-inflamatória

O óleo de *Pterodon pubescens* Benth. apresentou atividade anti-edematogênica aguda e tópica quando testada nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido por óleo de cróton, respectivamente (SILVA et al., 2004).

Recentemente, Hoscheid (2011) avaliou a atividade anti-inflamatória aguda, pelo modelo de pleurisia induzida por carragenina observando diminuição no volume de exsudato inflamatório em animais tratados com doses de 250 e 500 mg/kg da parte hexânica do extrato etanólico de *P. pubescens*, e também na migração leucocitária, na dose de 500 mg/kg.

## 1.3 Microencapsulação

Microencapsulação é uma técnica que possibilita que substâncias sólidas ou líquidas possam estar presentes no interior de matrizes poliméricas ou possam ser revestidas com polímeros (UDDIN; HAWLADER; ZHU, 2001; VENKATRAMAN et al., 2000). A microencapsulação consiste no isolamento de substâncias ativas (no estado líquido, sólido ou gasoso), para se obterem produtos com forma esférica e tamanho micrométrico, em que o material ativo ou do núcleo, é protegida por uma membrana a partir do ambiente circundante. (NESTERENKO et al, 2013)

Nos dias atuais, a microencapsulação vem sendo utilizada em diversas áreas. Na área farmacêutica, pode ser empregada com as seguintes finalidades: controlar ou prolongar a liberação de fármacos; diminuir as flutuações plasmáticas de certos fármacos, diminuindo ocorrência de efeitos colaterais, especialmente quando administrado por via oral; proteger substâncias que degradam facilmente pela ação externa de agentes, tais como umidade, luz e oxigênio, promovendo uma melhoria na sua estabilidade; proteger fármacos degradáveis no trato gastrointestinal, como proteínas e hormônios; mascarar o sabor e/ou odor desagradáveis de certas substâncias, a diluição do material do núcleo quando é preciso ser usados em quantidades muito pequenas ou de transformação de compostos líquidos em sólidos.. (BERKLAND et al., 2004; VENKATRAMAN et al., 2000; NESTERENKO et al, 2013).

As microcápsulas são produzidas pelo envolvimento do material ativo ou núcleo com o material de parede ou encapsulante e podem ter diâmetros entre unidades de micrometros até milímetros e apresentar diversas formas, dependendo dos materiais e métodos utilizados (ABURTO et al., 1998).

A técnica de microencapsulação mais antiga e provavelmente a mais utilizada, envolve a separação de fases por coacervação, que consiste na deposição do polímero ao redor do agente ativo a ser recoberto pela alteração das características físico-químicas do meio, tais como a temperatura, a força iônica, o pH ou a polaridade (SUAVE et al., 2006). Essa técnica abrange a associação reversível de dois polímeros e possui algumas vantagens frente a outras técnicas como a possibilidade de se trabalhar com biopolímeros e também a ausência de solvente orgânico, além de condições brandas de temperatura no processamento (PRATA, 2006).

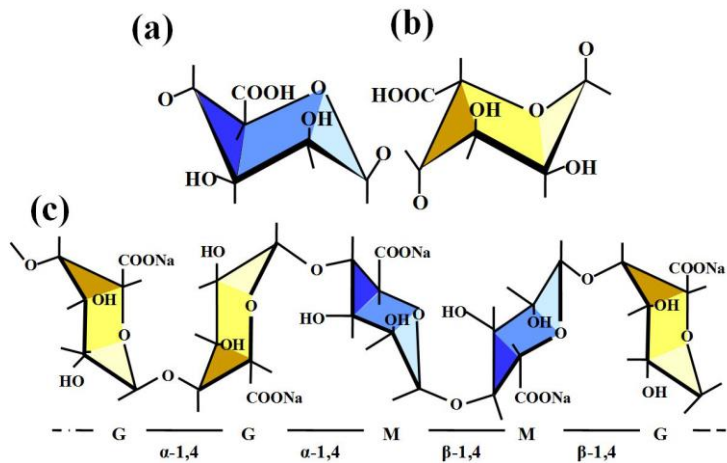
O método de emulsificação e evaporação de solvente baseia-se em dissolver o fármaco e o polímero em um solvente orgânico e logo após, emulsificar em uma solução aquosa, contendo um estabilizante ou emulsificante sob agitação. Feita em temperatura adequada, a evaporação do solvente orgânico, leva à formação das micropartículas, onde a emulsão obtida por esta técnica, denominada óleo em água (O/A), é aplicada apenas nos casos em que o polímero e o fármaco são insolúveis em água. Baixas eficiências de encapsulação são obtidas quando se utilizam fármacos hidrossolúveis, devido a estes tenderem a difundir e solubilizar-se na fase aquosa (GIBAUD; BONNEVILLE E ASTIER, 2002; WANG E WANG, 2002).

## **1.4 Polímeros**

### **1.4.1 Alginato**

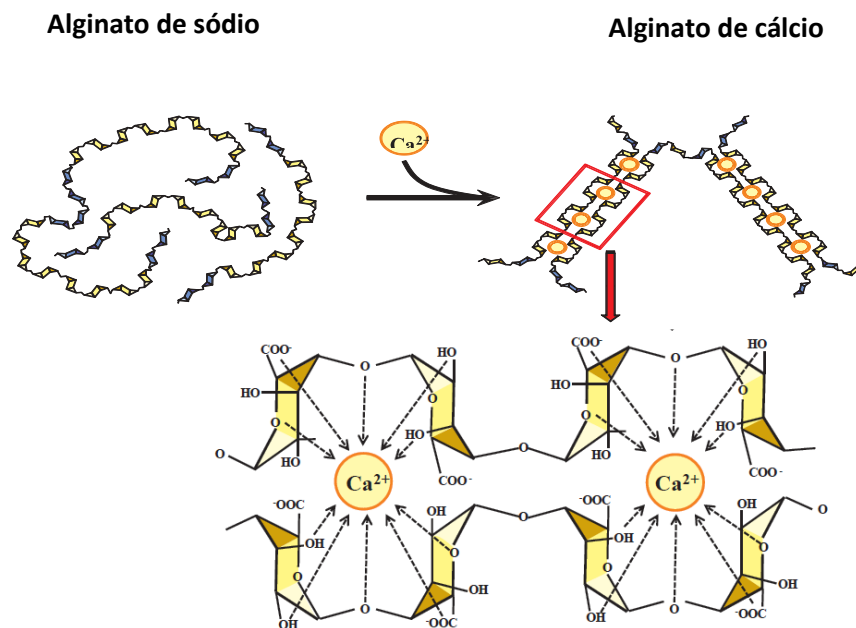
É um polissacarídeo hidrofílico, extraído de algas marrons. Quando a gelificação acontece, o alginato reage com cátions divalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ , e  $\text{Ba}^{2+}$ , e substitui os íons sódio do ácido gulurônico, ligando estes grupos gulurônicos para formar uma estrutura em caixa-de-ovo.

**Figura 2** - Composição do alginato. (a) ácido  $\beta$ -D- manurônico (b) ácido  $\alpha$ -L- gulurônico (c) Fórmula estrutural da molécula de alginato de sódio.



Fonte: KASHIMA, K.; IMAI, M.; 2012.

**Figura 3**-A gelificação dos blocos homopoliméricos da junção de ácido  $\alpha$ -L-gulurônico com íons cálcio. A ligação de cátions divalentes com o alginato: do modelo em "caixa-de-ovo".



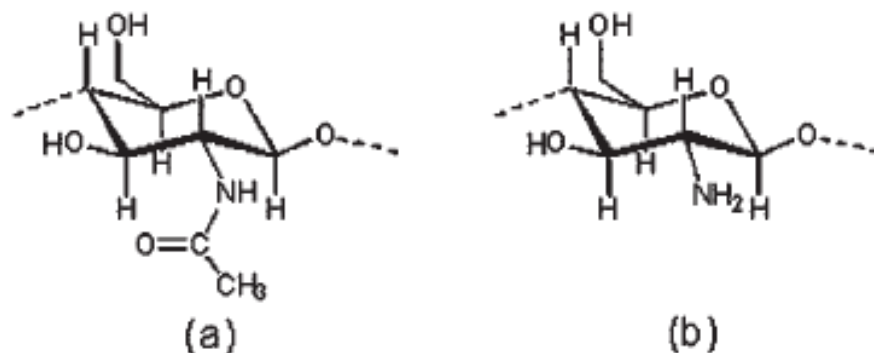
Fonte: Traduzido de KASHIMA, K.; IMAI, M.; 2012.

Contudo, deve ser salientado que cátions monovalentes e o  $Mg^{+2}$  não reagem com o alginato para formar hidrogéis (SHI et al., 2011). O alginato pertence a um grupo de polímeros hemicompatíveis, não foi encontrado nenhum acúmulo em órgãos e apresenta evidência de degradação *in vivo*. As propriedades das micropartículas do gel de alginato de cálcio faz dele um dos carreadores mais largamente utilizados para sistemas de liberação controlada. Revestir essas partículas com outros polímeros incluindo quitosana tem demonstrado aumentar a estabilidade durante o armazenamento e a meia vida deles em fluidos biológicos (GAZORE et al., 2009)

#### 1.4.2 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo catiônico linear composto essencialmente de  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) unidades de glucosamina ligadas juntas com alguma proporção de unidades de N-acetilglucosamina, conforme figura 2.

**Figura 4** - Unidades estruturais da quitosana: (a) N-acetilglucosamina; (b) glucosamina.



**Fonte:** PENICHE et al., 2003.

A quitosana ocorre raramente na natureza. É geralmente obtida por extensa desacetilação da quitina, um homopolímero de  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) N-acetil-D-glucosamina ligada, presente nas carapaças de crustáceos, moluscos, as paredes celulares de fungos, e da cutícula dos insetos. Deve ser salientado que a microestrutura da quitosana depende do fato de a reação de desacetilação ter sido realizada em condições homogêneas ou heterogêneas. A formação de complexos polieletrólitos com poliânions tem sido usada frequentemente para obter coberturas utilizando quitosana (PENICHE et al., 2003). Um exemplo disso, é a complexação com o alginato.



## **2. Objetivos Gerais:**

O objetivo do presente trabalho foi microencapsular a fração hexânica do extrato alcoólico obtido dos frutos de sucupira branca (*Pterodon pubescens* Benth.) em um sistema alginato de sódio e/ou alginato/quitosana, assim como, caracterizar as microcápsulas obtidas.

## REFERÊNCIAS

- ABURTO, L.D. **Microencapsulação de óleo essencial de laranja por atomização**. 1998. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
- ARRIAGA, A.M.C.; DE CASTRO, M. A. B.; SILVEIRA, E. R. E BRAZ-FILHO R. Further Diterpenoids Isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. São Paulo, v. 11, n. 2, p. 187-190, 2000.
- BERKLAND, C.; KIPPER, M. J.; NARASIMHAN B.; KYEKYOON K.K.; PACK, D. W. Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres. **Journal of Controlled Release**. Amsterdam, v. 94, n.1, p.129-141, 2004.
- CAMPOS, A.M.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; TEIXEIRA, T.C. Diterpenoids from *Pterodon polygalaeflorus*. **Phytochemistry**. New York, v. 36, n. 2, p. 403-405, 1994.
- CARVALHO, J.C.T.; SERTIÉ, J.A.A.; BARBOSA, M.V.J.; PATRÍCIO, K.C.M.; CAPUTO, L.R.G.; SARTI, S.J.; FERREIRA, L.P.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology**. Limerick, v. 64, p. 127-133, 1999.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a partir de Plantas Medicinais. Conceitos sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. **Química nova**. São Paulo, v. 21, p. 99-105, 1998.
- COELHO, L.P.; REIS, P.A.; DE CASTRO, F.L.; GAYER, C.R., LOPES, C.S; SILVA, M.C.C.; SABINO K.C.C.; TODESCHINI, A.R.; COELHO, M.G. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of ethnopharmacology**. Limerick, v. 98, p. 109-116, 2005.

COELHO, M.G.P.; MARQUES, P.R.; GAYER, C.R.M.; VAZ, L.C.A., NETO, J.F.N.; SABINO, K.C.C. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. **Journal of ethnopharmacology**. Limerick, v. 77, p. 159-164, 2001.

DEMUNER, A.J.; DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.A.; PILO-VELOSO, D.; FERREIRA-ALVES, D.L.; HOWARTH, O.W. Structure and Plant Growth Regulatory Activity of New Diterpenes from *Pterodon Polygalaeflorus*. **Journal of Natural Products**. Cincinnati, v. 59, p. 770-772, 1996.

EUZÉBIO, F.P.G.; DOS SANTOS, F.J.L.; PILO-VELOSO, D.; RUIZ, A.L.T.G.; DE CARVALHO, J.E.; FERREIRA-ALVES, D.L.; DE FÁTIMA, A. Effect of  $6\alpha,7\beta$ -dihydroxyvouacapane-17 $\beta$ -oic acid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells. **Bioorg Chem**. New York, v.37, p. 96-100, 2009.

FASCIO, M.; MORS, W. B.; GILBERT, B.; MAHAJAN, M. B.; MONTEIRO M. B.; DOS SANTOS FILHO, D.; VICHNEWSKI, W. Diterpenoid Furans from *Pterodon* species. **Phytochemistry**. New York, v. 15, p. 201-203, 1976.

GAZORI, T.; KHOSHAYAND.M.R.; AZIZI, E.; YAZDIZADE, P.; NOMANI, A.; HARIRIAN, I. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. **Carbohydrate Polymers**. v.77, Amsterdam, p. 599-606, 2009.

GIBAUD, S.; BONNEVILLE, A.; ASTIER, A. Preparation of 3,4-diaminopyridine microparticles by solvent-evaporation methods. **International journal of pharmaceutics**. Amsterdam, v. 242, p. 197-201, 2002.

HOSCHEID, J. **Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de compostos presentes na fração hexânica do extrato alcoólico de *Pterodon pubescens* Benth. Por CG/MS**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

HOSCHEID, J.; REINAS, A.; CORTEZ, D.A.G.; DA COSTA, W.F.; CARDOSO, M.L.C. Determination by CG-MS-SIM of furanoditerpenes in *Pterodon pubescens* Benth.: Development and validation. **Talanta**. cidade, v. 100, p. 372-376, 2012.

KASHIMA, K.; IMAI, M.; Advanced Membrane Material from Marine Biological Polymer and Sensitive Molecular-Size Recognition for Promising Separation Technology, in: Ning, R. Y. (Eds.), Advancing Desalination . **In Tech , Chapters**. Nihon, p. 3-36, 2012.

MAHAJAN, J.R.; MONTEIRO, M.B. New Diterpenoids from *Pterodon Emarginatus* Vog. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2**. London, p. 520-525, 1973.

MENNA-BARRETO, R.F.S.; LARANJA, G.A.T.; SILVA, M.C.C.; COELHO, M.G.P.; PAES, M.C.; OLIVEIRA, M.M.; DE CASTRO, S.L. Anti-Trypanosoma cruzi activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. **Parasitology Research**. Berlin, v. 103, p. 111-117, 2008.

MIRANDA, M. L. D.; GONÇALVES, L.F.; GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R. Estudo Fitoquímico das Folhas de *Pterodon pubescens* – Leguminosae. in: **Anais da 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia. 2012.

MORS, W.B.; DOS SANTOS FILHO, D.; FASCIO, M.; MONTEIRO, H.; GILBERT, B. AND PELLEGRINO, J. Chemoprophylactic Agent in Schistosomiasis: 14, 15 epoxygeranylgeraniol. **Science**. v. 157, n. 3791, p. 950-951, 1967.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU V.; Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**. v.42, p.469-479, 2013.

NETO, J.J. Contribuição ao Estudo Farmacognóstico dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth. Parte III-Identificação cromatográfica em fase gasosa, química e ação microbiológica do óleo do fruto. **Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto**. Ribeirão Preto, v. 10, n. 2, p. 317-327, 1976.

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

OLIVEIRA, C.P.A. **Produção e caracterização de partículas de hidrogéis para aplicações em cosméticos**. 2004. 178f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

PENICHE, C.; ARGÜELES-MONAL, W.; PENICHE, H.; ACOSTA, N. Chitosan: An attractive biocompatible polymer for microencapsulation. **Macromolecular bioscience**. Weinheim, v. 3, p. 511-520, 2003.

PEREIRA, M.F.; MARTINO, T.; DALMAU, S.R.; PAES, M.C.; BARJA-FIDALGO, C.; ALBANO, R.M.; COELHO, M.G.P.; SABINO, K.C.C. Terpenic fraction of *Pterodon pubescens* inhibits nuclear factor kappa B and extracellular signal regulated protein Kinase 1/2 activation and deregulates gene expression in leukemia cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. London, v. 12, p. 231, 2012.

PRATA, S.A. **Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa**. 2006, 267f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

SABINO, K.C.C. **Estudos Imunofarmacológicos e Toxicológicos de Extratos de Sementes de *Pterodon Pubescens***. 2001. 139f. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

SABINO, K.C.C.; GAYER, C.R.M.; VAZ, L.C.A.; SANTOS, L.R.L.; FELZESZWALB, I.; COELHO, M.G.P. In Vitro and in Vivo Toxicological Studies of the *Pterodon Pubescens* Seed oil. **Toxicology Letters**. Amsterdam, v. 108, p. 27-35, 1999a.

SABINO, K.C.C.; CASTRO, F.A.; OLIVEIRA, J.C.R.; DALMAU, S.R.A.; COELHO, M.G.P. Successful Treatment of Collagen-Induced Arthritis in Mice with Hydroalcohol

Extract of Seeds of *Pterodon Pubescens*. **Phytotherapy Research**. London, v. 13, p. 613-615, 1999b.

SABINO, K.C.C.; OLIVEIRA, A.M.; COELHO, M.G.P.; C.S. DALMAU, S.R. CD4 and CD8 Labelling for the Evaluation of Early Apoptosis in Human Blood Lymphocytes. **Medical Science Research**. Essex, v. 24, p. 487-489, 1996.

SANTOS FILHO, D.; SARTI S.J.; KATZ, N.; ARAÚJO N.; ROCHA FILHO, P.A.; ABREU E.J.; & BORTOLIM, M.E. Atividade quimioprolifática de sabonetes contendo óleo essencial de frutos de *Pterodon pubescens* na esquistossomose mansoni. Intern. Symp. on Schistosomiasis. Mem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.82, p. 343 - 345,1987.

SERVAT, L.; SPINDOLA, H.M.; QUEIROZ, DE C.A.M; MAIOCHI, C.A.; SOUSA, I.M.O; RODRIGUES, R.A.F.; RUIZ, A.L.T.G.; TINTI, S.V.; CARVALHO, J.E.; FOGGIO, M.A. Estabilidade de microcápsulas produzidas com vouacapanos isolados das sementes de *Pterodon pubescens*, in: **Anais da 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia. 2010

SHI, P.; HE, P.;TEH,T.K.H.; MORSI, Y.S.; GOH, J.C.H. Parametric analysis of shape changes of alginate beads. **Advanced powder technology**. Tokyo, v. 210, p. 60-66, 2011.

SILVA, M.C.C.; GAYER, C.R.M.; LOPES, C.S.; CALIXTO, N.O.; REIS, P.A.; PASSEAS, C.P.B.; PAES, M.C.; DALMAU, S.R.; SABINO, K.C.C.; TODESCHINI, A.R.; COELHO, M.G.P. Acute and Topic Antiedematogenic fractions Isolated From The Seeds of *Pterodon pubescens*. **Journal of pharmacy and pharmacology**. London, v. 55, p. 135-141, 2004.

SPINDOLA, H.M.; SERVAT, L.; RODRIGUES, R.A.F.; SOUSA, I.M.O.; CARVALHO, J.E.; FOGGIO, M.A. Geranylgeraniol and  $6\alpha,7\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth.: Further investigation on the antinociceptive mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 656, p.45–51, 2011.

SUAVE, J.; DALLAGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**. Santa Catarina, v. 7, p. 12-20, 2006.

UDDIN, M.S.; HAWLADER, M.N.A.; ZHU, H.J. Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. **Journal of microencapsulation**. London, v. 18, p. 199-209, 2001.

VIEIRA, C.R.; MARQUE, M.F.; SOARES, P.R.; MATUDA, L.; DE OLIVEIRA, C.M.A.; KATO, L.; DA SILVA, C.C.; GUILLO, L.A. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells. **Phytomedicine**. Stuttgart, v. 15, p. 528–532, 2008.

WANG, F. J.; WANG, C. H. Effects of fabrication conditions on the characteristics of etanidazole spray-dried microspheres. **Journal of microencapsulation**. London, v. 19, n. 4, p. 495-510, 2002

VENKATRAMAN, S.; DAVAR, N.; CHESTER, A.; KLEINER, L. An Overview of Controlled Release Systems, in: Wise, D.L. (Eds.), Handbook of pharmaceutical controlled release technology. **Marcel Dekker**. New York, p. 431-463, 2000.

## CAPÍTULO 2

Artigo a ser submetido ao *International Journal of Pharmaceutics*

### **Microencapsulação da fração hexânica obtida a partir do extrato alcoólico dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth. (Sucupira branca)**

Alexandre Espada Reinas<sup>a</sup>, Mara Lane Carvalho Cardoso<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas- Departamento de Farmácia-DFA – Universidade Estadual de Maringá- Avenida Colombo 5790, CEP:87020-900 Maringá, PR, Brasil.

Bloco K-80 – Sala 12 e-mail: [alexandrereinas@hotmail.com](mailto:alexandrereinas@hotmail.com); [mlanecc@yahoo.com.br](mailto:mlanecc@yahoo.com.br)

#### RESUMO

A fração hexânica obtida do extrato alcoólico dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth(FHPP), foi microencapsulada em sistemas poliméricos constituídos pela associação alginato–quitosana de baixo peso molecular (BPM), médio peso molecular (MPM) e maior que 75% desacetilada (75DES) empregando o método da coacervação complexa e alginato por *spray drier*(AGSD). A influência do processo e parâmetros de formulação foram avaliados pela morfologia e eficiência de encapsulação da fração hexânica. As microcápsulas obtidas pelo método de coacervação apresentaram-se na forma de escamas ligeiramente amareladas, inodoras, e com sabor agradável. A liberação *in vitro* da FHPP a partir das microcápsulas foi estudada usando meio de simulação gastrointestinal sem enzimas. O diâmetro médio das microcápsulas foi 0,5885 µm (BPM), 0,4679 µm(75DES), 0,9033 µm(MPM), e 2,0725 µm(AGSD). O segundo melhor rendimento (71,37), a melhor eficiência de encapsulação (93,22% aproximadamente) e perfil de liberação (75,88%), determinados pelo teor dos marcadores vouacapânicos por CG/MS-SIM foram observados nas microcápsulas preparadas a partir da associação polimérica alginato – quitosana BPM. A maior liberação, aproximadamente 54% em 3 horas, foi em pH 1,2, onde ocorre o entumescimento das cadeias de quitosana, sendo o mecanismo de liberação do tipo super caso II.

**Keywords:** *Pterodon pubescens* , microcapsules, oil, CG-MS

#### 1. Introdução

Sucupira é o nome vulgar dado a algumas espécies de gênero *Pterodon* e *Bowdichia*, ambos, pertencem à família das Leguminosas, Papilionáceas. O gênero *Pterodon* compreende



cinco espécies nativas do Brasil: *P. pubescens* Benth., *P. apparicioni* Pedersoli., *P. abruptus* Benth., *P. polygalaeformis* Benth. e *P. emarginatus* Vog. (Mors et al., 1967).

É uma árvore nativa do Brasil, sendo encontrada predominantemente na região do cerrado, sendo utilizada para o tratamento de reumatismos, principalmente artrite reumatóide,.

O óleo extraído do fruto de sucupira branca apresenta várias propriedades farmacológicas já comprovadas, como ação anticancerígena, atividade antinociceptiva e atividade anti-inflamatória, principalmente contra a artrite. (Carvalho et al., 1999; Coelho et al., 2005; Vieira et al., 2008)

Atividade anti-edematogênica aguda e tópica quando testada nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido por óleo de cróton, respectivamente (Silva et al., 2004). Recentemente, Hoscheid (2011) avaliou a atividade anti-inflamatória aguda, pelo modelo de pleurisia induzida por carragenina observando diminuição no volume de exsudato inflamatório em animais tratados com doses de 250 e 500 mg/kg da parte hexânica do extrato etanólico de *P. pubescens*, e também na migração leucocitária, na dose de 500 mg/kg.

Hoscheid et al. (2012) observou que o óleo das sementes, e suas frações não apresentam estabilidade em condições ambientais, necessitando refrigeração. Em face desta constatação, torna-se difícil o emprego deste insumo em preparações farmacêuticas sem que haja a proteção dos constituintes lipofílicos, facilmente oxidados pelo ar e luz. Estes polímeros apresentam vantagens como atoxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo, além de serem encontrados em abundância na natureza (Oliveira, 2004).

A microencapsulação é uma técnica que consiste no isolamento de substâncias ativas (no estado líquido, sólido ou gasoso), para se obterem produtos com forma esférica e tamanho micrométrico, em que o material ativo ou do núcleo, é protegida por uma membrana a partir do ambiente circundante no interior de matrizes poliméricas ou possam ser revestidas com polímeros. (Venkatraman et al., 2000; Uddin, 2001; Nesterenko et al, 2013)

A técnica de microencapsulação mais antiga e provavelmente a mais utilizada, envolve a separação de fases por coacervação, que consiste na deposição do polímero ao redor do agente ativo a ser recoberto pela alteração das características físico-químicas do meio, tais como a temperatura, a força iônica, o pH ou a polaridade (Suave et al. 2006). Essa técnica abrange a associação reversível de dois polímeros e possui algumas vantagens frente a outras técnicas como a possibilidade de se trabalhar com biopolímeros e também a ausência de solvente orgânico, além de condições brandas de temperatura no processamento (Prata, 2006).

Estes polímeros apresentam vantagens como atoxicidade, biocompatibilidade,

biodegradabilidade, baixo custo, além de serem encontrados em abundância na natureza (Oliveira, 2004).

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi microencapsular a fração hexânica obtida do extrato alcoólico dos frutos de sucupira branca (*Pterodon pubescens Benth.*).

## 2. Material e métodos

### 2.1. Material

Alginato com uma fração de ácido gulurônico de 0,28 (Sigma Aldrich, São Paulo, Brazil),  $\text{CaCl}_2$  e Tween 80 (Vetec, Duque de Caxias, Brazil), Quitosanas de peso molecular médio,  $\geq 75\%$  desacetilada e de baixo peso molecular (Sigma Aldrich, São Paulo, Brazil).

### 2.2. Obtenção do extrato *Pterodon pubescens Benth.* (EPp) e seu fracionamento (FHPp)

Frutos secos (30g) de *P. pubescens Benth.*, conservados ao abrigo da luz, umidade e calor, foram submetidos a três extrações consecutivas em etanol, pelo método da turboextração. Em cada extração de quinze minutos foram utilizados 200 mL de etanol 99,95%, totalizando 600 mL de solvente para cada 30 gramas de fruto. Realizou-se a filtração do extrato em papel de filtro. Os extratos foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo a vácuo utilizando temperatura inferior a 40°C. O EPp foi acondicionado em recipiente fechado e armazenado sob temperatura de -20 °C até seu fracionamento, onde em 1,0 g do EPp foi adicionado 50 mL de hexano seguido de 50 mL de água. O sistema foi então submetido a banho de ultra-som por 10 minutos e a fração hexânica (FHPp) foi coletada. O mesmo procedimento foi repetido por mais duas vezes utilizando 40 e 30 mL de hexano:água (1:1) respectivamente. Em seguida, à porção aquosa foram adicionados 75 mL de hexano. A mistura foi agitada por 5 minutos e a FHPp foi coletada (Hoscheid, 2011). As frações hexânicas foram reunidas e concentradas até retirada do solvente sendo acondicionado em recipiente fechado e armazenado sob temperatura de -20 °C até sua utilização.

### 2.3. Caracterização da fração hexânica

#### 2.3.1. Determinação do índice de refração

O índice de refração foi verificado para a FHPp em Refratômetro (DIGIT<sup>®</sup>) a temperatura de 20°C (Farmacopéia Brasileira 5<sup>a</sup> edição, 2010).

#### 2.3.2. Determinação da densidade absoluta

A densidade da fração hexânica foi determinada a temperatura de 20 °C com auxílio de um picnômetro de 50 mL e balança analítica (Farmacopéia Brasileira 5<sup>a</sup> edição, 2010).

#### 2.3.3. Caracterização química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS)

A análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) foi realizada em cromatógrafo a gás equipado com um detector seletivo de massas, e um injetor automático, todos da Thermo Electron Corporation , modelos Focus GC, DSQ II tipo quadrupolo e (TRIPLUS AS ) respectivamente (Marietta, USA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica do tipo HP-5 (5% fenil metilpolisiloxano-apolar) (30 m x 0,25mm). As condições cromatográficas foram: Hélio como gás de arraste com vazão de 1,0 mL/min, Split 1: 20, energia de ionização de 70 Ev, temperatura do detector: 270° C, temperatura do injetor: 260° C, volume de injeção: 1,0 µL. Temperatura do forno: Inicial 100 °C (1min.), após isso 4° C/min. até 270 °C (por 5min.)

Os fragmentos de massa monitorados foram de 50 a 650. Como eluente foi utilizado clorofórmio grau HPLC. Monitoramento de íons selecionados em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS/SIM).

A identificação e análise qualitativa da FHPp foi realizada em modo scan completo. Em seguida, os fragmentos mais abundantes e com maior massa molecular foram selecionados como alvo característico para a quantificação nas análises. Para esta finalidade o espectrômetro de massa foi alterado para o modo SIM permitindo maior precisão (Peng et al., 2007).

**Tabela 1.**

Regiões de íons monitorados por CG/MS/SIM

<b>Região (min.)</b>	<b>Íons monitorados</b>
<b>43 - 44.5</b>	131; 145 ; 146
<b>44.5 - 45.3</b>	105; 145 ; 197
<b>45.3 - 48.5</b>	131; 178; 312

A concentração dos vouacapanos foi determinada através das curvas de calibração desenvolvidas e validadas anteriormente por Hoscheid et al. (2012). As quais são reta 1:  $y=91752,182x+48472,32$  ( $R^2= 0.9924$ ); reta 2:  $y=102540,6x-749194,83$  ( $R^2=0.9924$ ) e reta 3:  $y=100632,42x-1610689,55$  ( $R^2=0.9935$ ), respectivamente vouacapanos 1, 2 e 3,4. Hoscheid et al. (2012) identificou os vouacapanos 3 e 4 como sendo respectivamente metil-6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxivouacapan-17 $\beta$ -oato e metil-6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxivouacapan-17 $\beta$ -oato, os vouacapanos 1 e 2 não foram totalmente identificados.

#### 2.4. Caracterização dos polímeros por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos de RMN dos polímeros alginato e quitosana foram realizados em Espectrômetro de RMN Agilent, mod. Mercury Plus multinuclear 300MHz (Palo Alto, Canada) Magneto NMR 300-OXFORD e RMN Bruker Avance III 400 MHz (Karlsruhe, Alemanha) respectivamente. As amostras foram diluídas em água deuterada e ácido clorídrico deuterado (DCl), foram realizadas análise unidimensionais: RMN  $^1\text{H}$  (300MHz;400MHz), RMN  $^{13}\text{C}$  (100,25 MHz).

#### 2.5. Preparo de microcápsulas de alginato pelo método de spray drying

Solução de Alginato 3% (p/v) adicionado de 1 mL FHPp e 1 % de Tween 80 homogeneizadas em IKA<sup>®</sup> T25 digital Ultra Turrax<sup>®</sup> (Staufen, Alemanha) a 16.000rpm foram atomizados em Spray Drier Büchi 191(Flawil 1, Suíça) sob as seguintes condições: Temperatura de entrada: 170°C, aspiração: 85%, Alimentação: 1,7 mL/min e pressão de 1,0 Bar. (Teste 1). O teste foi feito em triplicata.

## 2.6. Preparo das microcápsulas de alginato/quitosana reticuladas com $\text{CaCl}_2$

Solução de alginato 2,5 % (p/v) com adição de 0,25 g Tween 80 e de 2,0 ml de FHPp emulsionados a 8.000 rpm atomizados com a utilização do atomizador do Spray Drier Büchi 191 (Flawil 1, Suíça) sob as seguintes condições: alimentação: 1 mL/min e pressão de 0,5 Bar, em solução de quitosana peso molecular médio 0,10% (p/v) em ácido acético 1% (v/v) /  $\text{CaCl}_2$  2,0% (p/v) homogeneizadas a 4.000 rpm. Todo o processo foi executado sob temperatura de - 4°C em banho de gelo. Foi realizada filtração grosseira, centrifugação a 3.600 rpm e liofilização em equipamento Christ<sup>®</sup> Loc-2M (Osterode am Harz, Alemanha) sob as seguintes condições: amostras previamente congeladas e secas a -55 °C sob pressão elevada (Teste 2). Os testes 3 e 4 foram realizados nas mesmas condições do teste 2, alterando apenas o tipo de quitosana. O teste 3 foi efetuado com quitosana  $\geq 75\%$  desacetilada e o teste 4 com quitosana de baixo peso molecular . Todos os testes foram feitos em triplicata.

## 2.7. Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

Análises termogravimétricas e de calorimetria diferencial exploratória dos polímeros, da FHPp e das microcápsulas formadas foram realizadas com o objetivo de avaliar as variações de massa em função da temperatura dos materiais formados e avaliar possíveis interações entre os polímeros e a FHPp. As análises foram efetuadas em um analisador simultâneo NETZSCH STA 409 PC Luxx<sup>®</sup> (Wittelsbacherstr, Alemanha) sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 50,0 mL min<sup>-1</sup> e taxa de aquecimento de 10°C/min, numa faixa de temperatura de 25 a 600°C.

## 2.8. Difração de Raios-X (DRX)

As análises de difração de Raios-X dos polímeros, da FHPp e das microcápsulas formadas foram realizadas em difratômetro de Raios- X modelo Shimadzu LabX XRD-6000 (Kyoto, Japão), sob condições  $\text{CuK}\alpha_1$ , 0,1542 nm, 40 KV, 40 mA – Scans entre intervalos de  $2\theta$  , faixa de 5° a 90°, velocidade : 0,5 graus , 2  $\theta$ /min.

## 2.9. Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR)

Os experimentos de infravermelho dos polímeros, da FHPp e das microcápsulas formadas foram realizados no espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) BOMEN, mod. MB-100C26 (Quebec, Canada). As análises foram realizadas no intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 1  $\text{cm}^{-1}$  com amostras em pastilhas de KBr.

#### 2.10. Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman)

Os experimentos de FT-Raman dos polímeros, da FHPp e das microcápsulas formadas foram realizados utilizando o equipamento Bruker modelo Senterra (Ettlingen , Alemanha), parâmetros de análise: Potência entre 200-250mW; Scans 100-1500, Resolução 4  $\text{cm}^{-1}$ ; Fenda : 5mm; Comprimento de onda: 1064 nm.

#### 2.11. Análise morfológica e granulométrica das microcápsulas

As análises da superfície das micropartículas foram feitas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um microscópio Shimadzu SS550 Super Scan (Kyoto, Japão) e um metalizador IC 50 íon coater (Kyoto, Japão). A análise granulométrica foi feita usando o software Image Pro Plus versão 4.5.0.29 para Windows (Warrendale, USA), utilizando como parâmetro o diâmetro de Feret (Barber, 1993). Foram medidas, no mínimo, 1000 partículas e a distribuição de tamanho das mesmas foi determinada.

#### 2.12. Rendimento de Microencapsulação e conteúdo de FHPp (FHPp%)

O rendimento de microencapsulação foi calculado pela quantidade usada de polímeros e da FHPp e a quantidade final em peso obtidas de microcápsulas. As análises foram feitas em triplicata

- Método de análise da quantidade de FHPp encapsulada, utilizando a fórmula:

$$FHPp(\%): \frac{MFHPp - MC}{MFHPp} \times 100\%, \quad \text{Onde:}$$

**FHPp (%)**: Conteúdo de FHPp

**MFHPp**: Microcápsula contendo FHPp em seu interior

**MC** : Microcápsula após o processo de extração com utilização de solvente

Para o cálculo do rendimento foram pesados 200 mg de microcápsulas cheias, a extração foi procedida da seguinte forma: 1 lavagem com 50 ml de hexano e mais duas lavagens com 30 mL de hexano.

O resíduo seco proveniente da parte polimérica das microcápsulas foi introduzido em estufa a 80 °C por 40 minutos para evaporação do solvente residual.

### 2.13. Eficiência de encapsulação

O líquido proveniente da extração do experimento anterior foi evaporado em evaporador rotatório para posterior cálculo da quantidade de FHPp presente no interior das microcápsulas através de análise por CG/MS-SIM.

### 2.14. Estudo de perfil de liberação *in vitro* da FHPp

O perfil de liberação *in vitro* da FHPp a partir das microcápsulas foi determinado em um aparelho de dissolução Erweka modelo DT-800 (Heusenstamm, Alemanha), com cubas com capacidade para um volume total de 900,0 mL e com controle de temperatura, por meio de banho termostático.

Utilizou-se um volume de 500,0 mL de tampão 1,2 e 6,8 (USP 32, 2009) como meios de dissolução para garantir uma condição *sink* e temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C . Utilizou-se o aparato I (cesto) com abertura de malha entre 0,36 e 0,44 mm(USP 32, 2009).

O tempo de ensaio foi de 24 h, com tempos de amostragem (5,0 mL) em 30 min, 60 min, 90 min, 150 min, 180 min, 240 min, 300min, 480 min, 720 min e 1440 min, com reposição de volume. Com troca de meio entre 150 e 180 min.

Para analisar o mecanismo de liberação, os resultados foram analisados por meio da equação geral que descreve a liberação de fármaco a partir de sistemas poliméricos matriciais (Korsmeyer et al., 1983, Peppas et al., 1985), utilizando:

$$M_t / M_\infty = k \cdot t^n \quad \text{Eq. 1.}$$

Onde:  $M_t / M_\infty$  é a fração de fármaco liberado,  $t$  é o tempo de liberação,  $k$  é a constante cinética de incorporação de características estruturais e geométricas do dispositivo de liberação e  $n$  é o expoente o qual pode indicar o mecanismo de liberação do fármaco (Bruschi et al., 2006; Jones et al., 2000)

### 2.15. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada para avaliar o nível de significância dos ensaios de eficiência de encapsulação utilizando análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para avaliar as diferenças entre as médias de cada teste. Teste T student foi empregado para comparar os métodos de encapsulação. Para todos os casos o nível de significância  $\alpha$  adotado foi de 5%, as análises foram realizadas utilizando o software STATISTICA® 10.0. (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA)

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Rendimento dos extratos e perfil químico

A obtenção do extrato etanólico foi realizada a partir de 30,74 g de frutos secos de *P. pubescens* empregando como solvente extrator 600 mL de etanol 99.95%. Após extração por turbólise, o extrato foi evaporado gerando um total de 11,45 g de extrato seco (EPp). O rendimento deste processo extrativo foi de 37,25 %.

Posteriormente realizou-se a partição líquido-líquido para obtenção da fração hexânica *Pterodon pubescens* Benth (FHPp). A partição iniciou com 1.06 g do extrato etanólico de *P. pubescens* obtendo 0.98 g de FHPp correspondendo ao um rendimento de 92.45 %. A fração FHPp apresentou um elevado rendimento, além disso, possui baixa polaridade, favorecendo a extração de compostos apolares, como os diterpenos furânicos ou vouacapanos.

O controle de qualidade da fração FHPp apresentou densidade (g/mL) 0.9380 e índice de refração 1.487. Resultados semelhantes foram encontrados por Hoscheid (2011) ao caracterizar a FHPp.

Pelo método CG/MS-SIM foi determinado a concentração dos vouacapanos 1,2,3 e 4 na FHPp como pode ser observado na Tabela 3.

**Tabela 2.**

Concentração dos vouacapanos 1,2,3 e 4 na FHPp obtidas pelo método CG/MS-SIM.

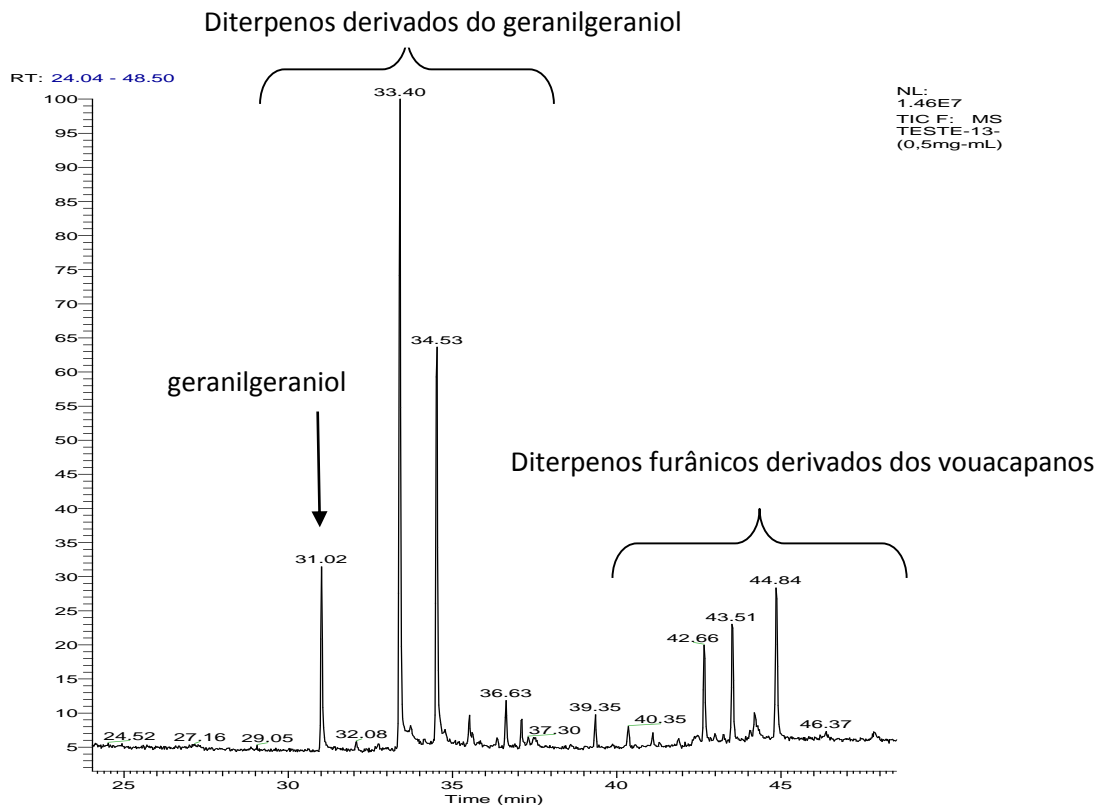
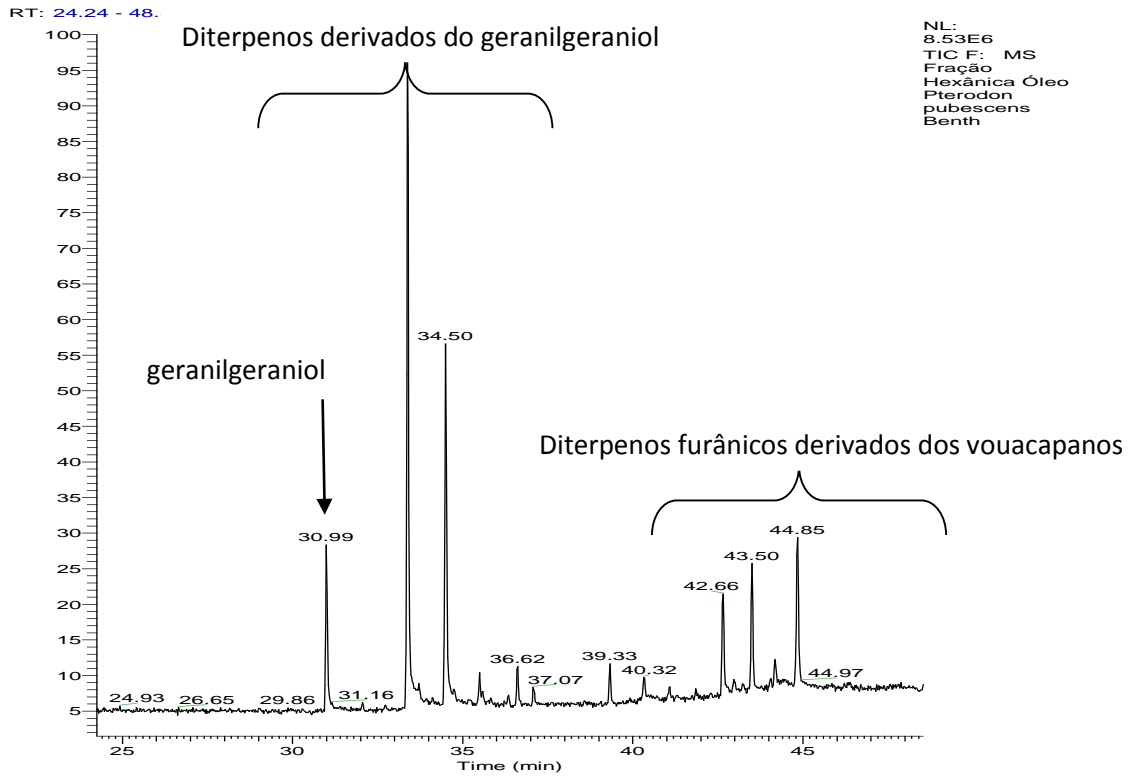
Vouacapanos	1	2	3 e 4
Concentração média ( $\mu\text{g/mL}$ )*	6.92	18.45	29.64
Desvio padrão	0.30	0.36	0.53
CV (%)	4.33	1.93	1.78

\* n = 9.



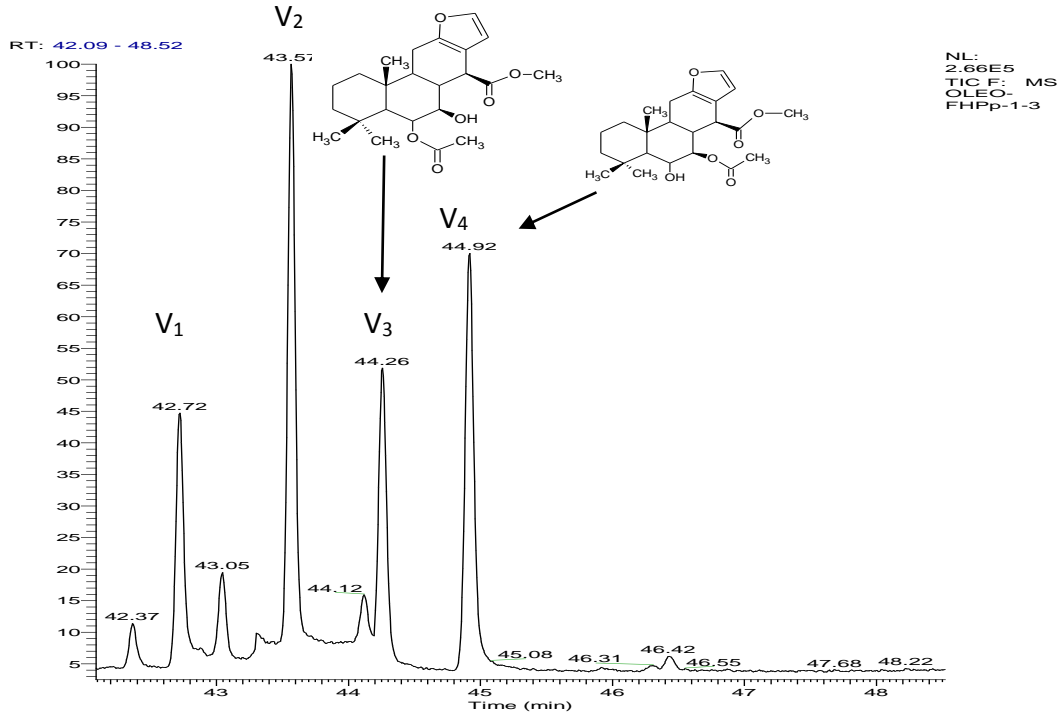
As áreas dos vouacapanos 3 e 4 foram somadas, devido ao método anteriormente validado por Hoscheid et al. (2012). Aonde não se conseguiu separá-los completamente uma vez que são isômeros, desta maneira representando 53.88 %. Os vouacapanos 1 e 2 representaram 12.58 e 33.54 % respectivamente.

Ao analisar a concentração dos vouacapanos 1 e 2 foi possível observar que eles apresentaram maior concentração quando comparados com os dados obtidos por Hoscheid (2011) que representaram 2.79 e 24.57 % respectivamente. Os vouacapanos 3 e 4 apresentaram menor concentração em relação ao obtido por Hoscheid (2011) que representou 72.63 %.



**Fig. 1.** Perfil químico da FHPp antes e após o processo de microencapsulação por CG/MS-TIC

Ao analisarmos a Fig. 1 também foi possível evidenciar que a microencapsulação não comprometeu a qualidade química da FHPp, ou seja, a fração permaneceu estável em sua composição.



**Fig. 2.** Perfil Químico da FHPp por CG/MS-SIM, onde V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub> e V<sub>4</sub> são os vouacapanos presentes na fração e V<sub>3</sub> e V<sub>4</sub> são respectivamente, Metil-6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxivouacapan-17 $\beta$ -oato e Metil-6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxivouacapan-17 $\beta$ -oato

### 3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos polímeros

O espectro de RMN H<sub>1</sub> é considerado ser o método mais confiável para determinar a composição M/G (ácido manurônico / ácido gulurônico) e a estrutura de blocos detalhada (F<sub>M</sub> e F<sub>G</sub>) e (F<sub>GG</sub>, F<sub>MM</sub>, F<sub>MG</sub>, F<sub>GM</sub>). A fig.3. mostra os espectro RMN de próton que permite determinar a composição (M/G) do alginato de sódio por comparação dos sinais das áreas (H<sub>G</sub>-1 (I<sub>A</sub>), H<sub>M</sub>-1+H<sub>GM</sub>-5 (I<sub>B</sub>) e H<sub>G</sub>-5 (I<sub>C</sub>) usando as equações propostas por Grasdalen et al. (1979):

$$F_G = I_A / (I_B + I_C)$$

$$F_M = 1 - F_G$$

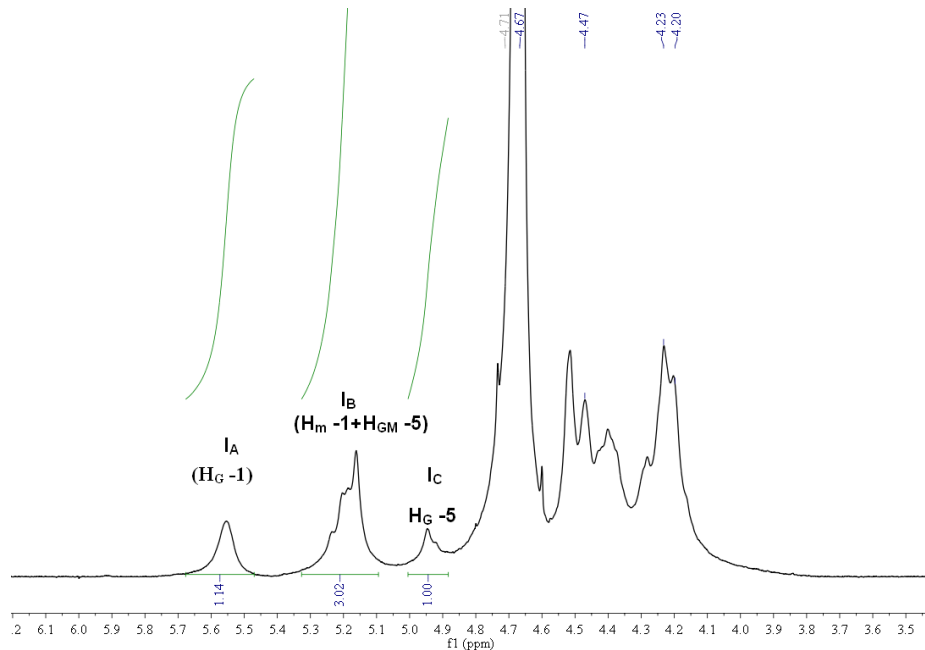
$$M/G = (1 - F_G) / F_G$$

As seguintes relações foram então usadas para estabelecer as proporções das diferentes sequências :

$$F_{GG} = I_C / (I_B + I_C)$$

$$F_{GG} + F_{GM} = F_G$$

$$F_{MM} + F_{MG} = F_M$$



**Fig. 3.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  (300MHz) (80°C) do alginato de sódio

$$F_G = I_A / (I_B + I_C) \rightarrow 1,14 / (3,02 + 1,00) \rightarrow 1,14 / 4,02 \rightarrow 0,2835$$

$$F_M = 1 - F_G \rightarrow 1,00 - 0,2835 = 0,7165$$

$$M/G = (1 - F_G) / F_G \rightarrow (1 - 0,2835) / 0,2835 \rightarrow 0,7165 / 0,2835 = 2,5273$$

$$F_{GG} = I_C / (I_B + I_C) \rightarrow 1,00 / (3,02 + 1,00) = 1,00 / 4,02 = 0,2487$$

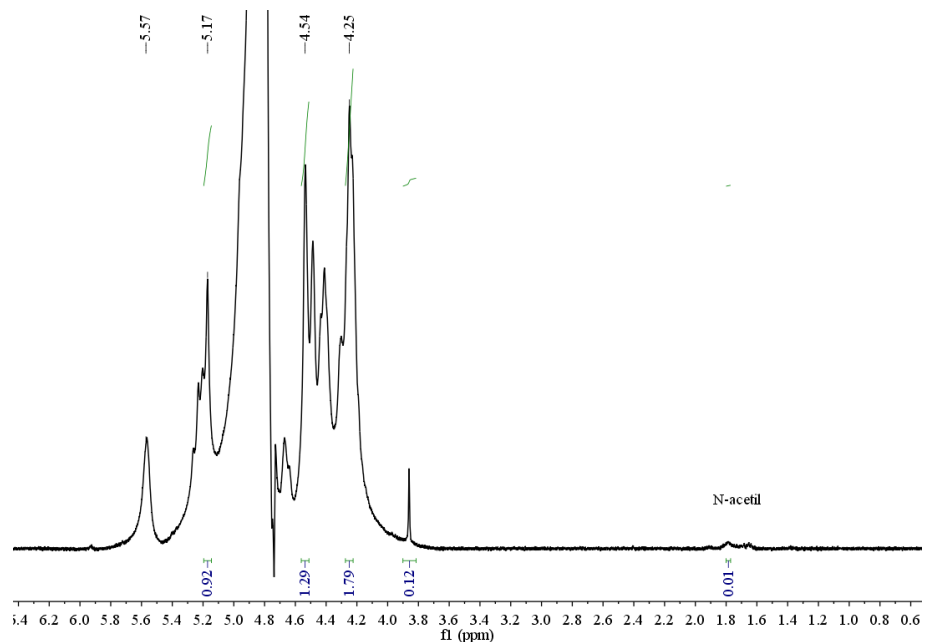
$$F_{GG} + F_{GM} = F_G \rightarrow 0,2487 + F_{GM} = 0,2835 \rightarrow F_{GM} = 0,0348$$

$$F_{MM} + F_{MG} = F_M \rightarrow F_{MM} + 0,0348 = 0,7165 \rightarrow F_{MM} = 0,6817$$

A partir dos cálculos apresentados, verificamos que a proporção de ácido manurônico (0,7165) é maior que a de ácido gulurônico (0,2835) o que interfere de maneira prejudicial no processo de microencapsulação, uma vez que, quanto maior a proporção de ácido gulurônico,

melhor é o processo. O mesmo método de caracterização do alginato foi utilizado por Fenoradosa et al, (2010) e Torres et al, (2007) em seus respectivos trabalhos.

O alginato é um polissacarídeo hidrofílico, extraído de algas marrons. Quando a gelificação acontece, o alginato reage com cátions divalentes, como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$ , e  $\text{Ba}^{+2}$ , e substitui os íons sódio do ácido gulurônico, ligando estes grupos gulurônicos para formar uma estrutura em caixa-de-ovo. Contudo, deve ser salientado que cátions monovalentes e o  $\text{Mg}^{+2}$  não reagem com o alginato para formar hidrogéis (Shi et al., 2011). As propriedades das micropartículas do gel de alginato de cálcio fazem dele um dos carreadores mais largamente utilizados para sistemas de liberação controlada. Revestir essas partículas com outros polímeros incluindo quitosana tem demonstrado aumentar a estabilidade durante o armazenamento e a meia vida deles em fluidos biológicos (Gazore et al., 2009).

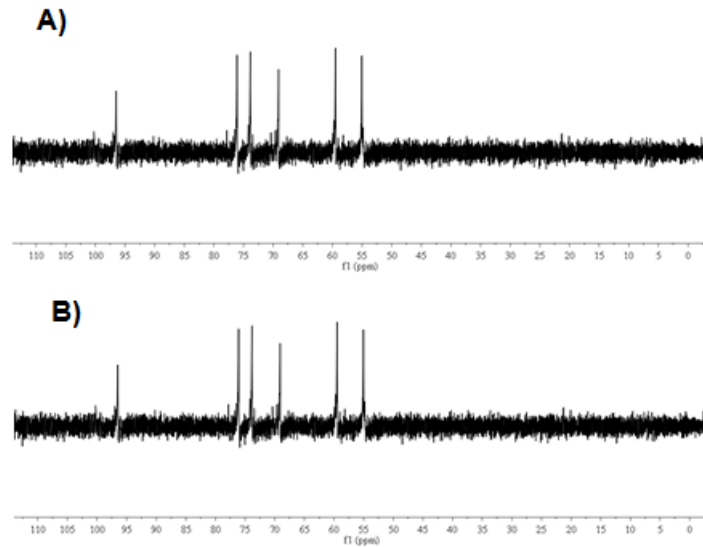


**Fig. 4.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$  (pH=3) ( $70^\circ\text{C}$ ) da quitosana de baixo peso molecular

Analisando a Fig.4. podemos verificar que o grau de acetilação da quitosana é praticamente nulo, pois o pico referente ao grupo N-acetil (1,8 ppm) é praticamente zero. (0,01). O mesmo pico é identificado como sendo de prótons N-acetil em (2,04 ppm) por Varum et al, (1991a). Este mesmo método de caracterização da quitosana foi utilizado por De Alvarenga et al.,(2010).

No entanto, o grau de desacetilação das demais quitosanas utilizadas neste trabalho foram semelhantes, e os espectros de  $\text{C}13$  das demais quitosanas estão apresentados na Fig.

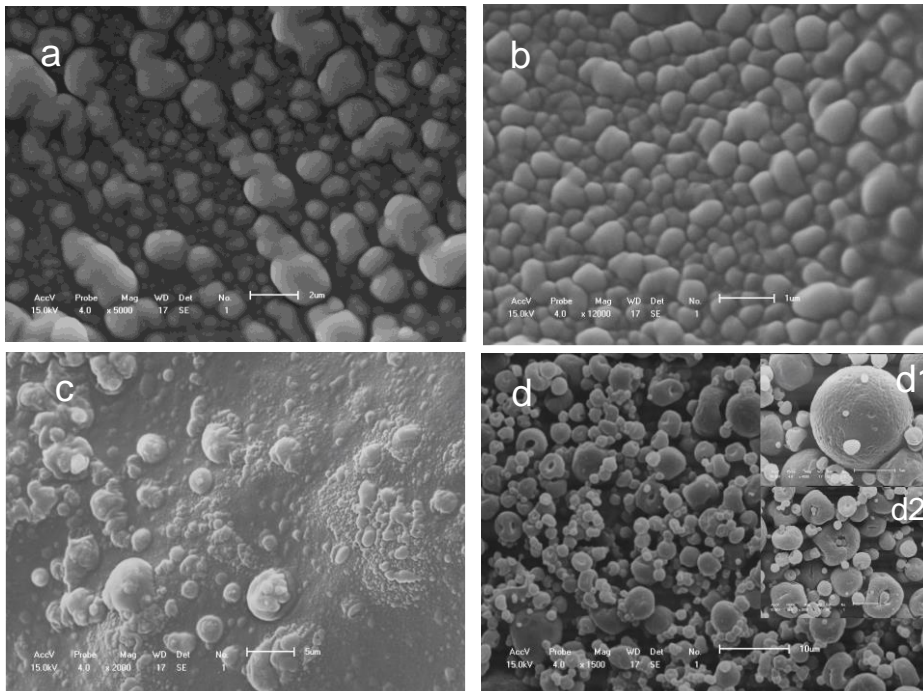
5., uma vez que o pico referente ao Carbono acetilado era também praticamente inexistente (região em torno de 25 ppm), de acordo com Varum et al, (1991b). O que diferenciou o comportamento da associação do teste 4 (associação alginato/quitosana baixo peso molecular) provavelmente foi o peso molecular da quitosana e sua melhor interação com o alginato.



**Fig. 5.** RMN  $^{13}\text{C}$  (100,25 MHz) - A) Quitosana de Peso Molecular Médio e B) Quitosana  $\geq 75\%$  desacetilada

A quitosana é um polissacarídeo catiônico linear composto essencialmente de  $\beta(1\rightarrow4)$  unidades de glucosamina ligadas juntas com alguma proporção de unidades de N-acetilglucosamina. Ocorre raramente na natureza. É geralmente obtida por extensa desacetilação da quitina, um homopolímero de  $\beta(1\rightarrow4)$  N-acetil-D-glucosamina ligada, presente nas carapaças de crustáceos, moluscos, as paredes celulares de fungos, e da cutícula dos insetos. Deve ser salientado que a microestrutura da quitosana depende do fato de a reação de desacetilação ter sido realizada em condições homogêneas ou heterogêneas. A formação de complexos polieletrólitos com poliânions tem sido usada frequentemente para obter coberturas utilizando quitosana (Peniche et al, 2003). Um exemplo disso, é a complexação com o alginato utilizada neste trabalho.

### 3.3. Análise morfologia e granulométrica

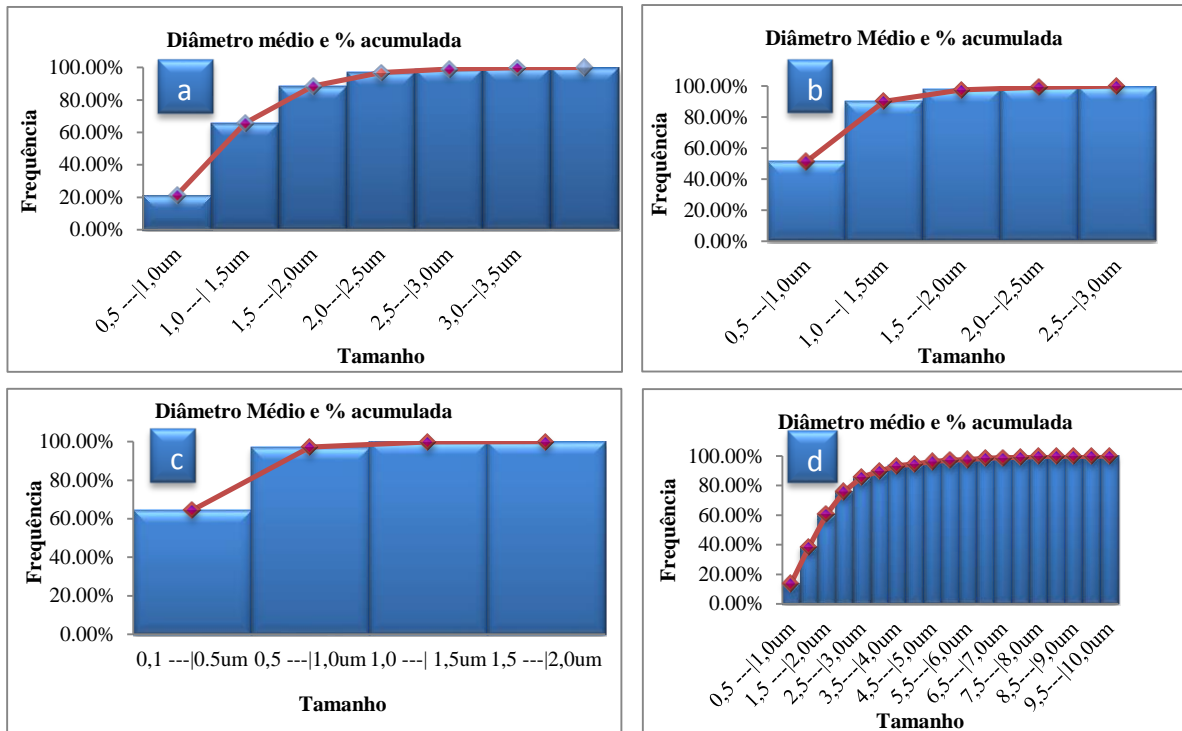


**Fig. 6.** Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas obtidas a partir das associações poliméricas: a) Alginato/Quitosana peso molecular médio (aumento de 5000x); b) Alginato/Quitosana  $\geq 75\%$  desacetilada (aumento de 12000x); c) Alginato/Quitosana baixo peso molecular (aumento de 2000x); d) Alginato por *spray dryer* (aumento de 1500x); d<sub>1</sub>) (aumento de 4500x); d<sub>2</sub>) (aumento de 3000x).

De acordo com a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) verificamos que as microcápsulas produzidas por coacervação apresentam formato esférico, lisas e aglomeradas. Essa aglomeração é devido principalmente às interações eletrostáticas entre as cadeias do alginato e quitosana como pode ser observado nas Figs 6 a,b,c.

As microcápsulas obtidas por secagem em *spray dryer* (Fig. 7d) apresentaram superfície porosa e rugosa, uma característica do polímero utilizado, o alginato. Na figura 6d<sub>1</sub> observa-se em detalhes a superfície porosa e rugosa da microcápsula de alginato pelo método de *spray dryer*. Na figura 6d<sub>2</sub> pode-se observar partículas achatadas e em forma de disco. Resultados semelhantes foram encontrados por Mladenovska et al. (2007), ao analisar as micrografias das partículas de alginato-quitosana de ácido-5-aminosalicílico.

### Distribuição granulométrica das microcápsulas



**Fig. 7.** Distribuição granulométrica das microcápsulas de a) Alginato/Quitosana peso molecular médio; b) Alginato/Quitosana  $\geq 75\%$  desacetilada; c) Alginato/Quitosana baixo peso molecular; d) Alginato por *spray dryer*. (■) histograma de intervalos de classe e (◆) representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas.

Na análise do diâmetro médio das microcápsulas, observamos que as microcápsulas obtidas pelo sistema polimérico Alginato/Quitosana peso molecular médio apresentou o diâmetro médio de 0,9033  $\mu\text{m}$ ; Alginato/Quitosana  $\geq 75\%$  desacetilada obteve 0,4679  $\mu\text{m}$  e Alginato/Quitosana baixo peso molecular obteve 0,5885  $\mu\text{m}$ , enquanto as microcápsulas de Alginato por *spray dryer* obtiveram diâmetro médio de 2,0725  $\mu\text{m}$ . Ao analisarmos a distribuição granulométrica verificamos que a melhor distribuição (mais homogênea) foi obtida pelas microcápsulas obtidas pela associação alginato-quitosana baixo peso molecular.

#### 3.4. Rendimento de encapsulação e conteúdo de FHPp

Na tabela 4 está apresentado o rendimento de encapsulação da FHPp por *spray dryer* teste 1 (alginato 3% p/v) e por coacervação teste 2 (alginato 2,5% p/v, quitosana de baixo peso molecular 0.10% p/v em solução de cloreto de cálcio 2% p/v), teste 3 (alginato 2,5% p/v, quitosana grau técnico  $\geq 75\%$  desacetilada 0.10% p/v em solução de cloreto de cálcio 2%



p/v) e teste 4 (alginato 2,5% p/v, quitosana baixo peso molecular 0.10% p/v em solução de cloreto de cálcio 2% p/v)

**Tabela 3.**

Rendimento de encapsulação e conteúdo da FHPp (FHPp%)

	<b>Rendimento (%p/p)</b> (média ± s)	<b>Teor (%p/p)</b> (média ± s)
<b>Teste 1</b>	46,04±0,24	13,36±0,12
<b>Teste 2</b>	66,43 ± 3,26	47,07±2,01
<b>Teste 3</b>	78,30 ± 0,83	57,17±1,63
<b>Teste 4</b>	71,37 ± 1,38	61,01±2,00

s: desvio padrão

Ao analisarmos os resultados de rendimento de encapsulação, podemos observar que a associação que obteve o melhor rendimento foi o teste 3 e o segundo melhor rendimento foi obtido pelo teste 4. Em relação ao conteúdo da FHPp, verificamos que a melhor associação foi o teste 4, fato confirmado pela eficiência de encapsulação. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Peniche et al. (2004) ao encapsular óleo de fígado de tubarão em cápsulas de alginato-quitosana onde observou-se que aumentando a concentração de alginato melhora-se o conteúdo de óleo na cápsula. Entretanto, no presente trabalho, os testes foram limitados pela capacidade de atomização da bomba peristáltica do *spray drier* que não conseguia atomizar concentrações maiores do que 3% (p/v) onde poderíamos encontrar melhores resultados de microencapsulação segundo o trabalho desenvolvido por Peniche et al, 2004.

### 3.5. Eficiência de encapsulação

Na tabela 5 está apresentado a eficiência de encapsulação da FHPp por *spray dryer* teste 1(alginato 3% p/v) e por coacervação teste 2 (alginato 2,5% p/v, quitosana de baixo peso molecular 0.10% p/v em solução de cloreto de cálcio 2% p/v), teste 3 (alginato 2,5% p/v, quitosana grau técnico  $\geq 75\%$  desacetilada 0.10% p/v em solução de cloreto de cálcio 2% p/v) e teste 4 (alginato 2,5% p/v, quitosana baixo peso molecular 0.10% p/v em solução de cloreto de cálcio 2% p/v)

**Tabela 4.**  
Eficiência de encapsulação dos vouacapanos.

Vouacapanos	Teste 1			Teste 3		
	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub> e V <sub>4</sub>	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub> e V <sub>4</sub>
<b>Concentração (µg/mL) ± d.p.</b>	2,26±0,38	13,31±1,03 <sup>*</sup>	22,13±0,38	1,69±0,57 <sup>b</sup>	12,85±1,10 <sup>b*</sup>	24,37±1,39 <sup>b</sup>
<b>Eficiência (%)</b>	34,60±1,83	71,45±2,59	75,00±2,84	28,25±2,32	69,23±1,41	83,50±1,47
Vouacapanos	Teste 2			Teste 4		
	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub> e V <sub>4</sub>	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub> e V <sub>4</sub>
<b>Concentração (µg/mL) ± d.p.</b>	0,28±0,13 <sup>a</sup>	9,76±0,33 <sup>a</sup>	19,32±0,72 <sup>a</sup>	3,04±0,28 <sup>c</sup>	15,94±1,20 <sup>c</sup>	28,90±1,75 <sup>c</sup>
<b>Eficiência (%)</b>	4,04±1,78	52,90±3,02	65,37±2,64	44,38±1,59	86,95±3,93	99,49±2,80

a,b,c – Teste de Tukey – método de coacervação – as amostras diferem a nível  $p < 0,05$

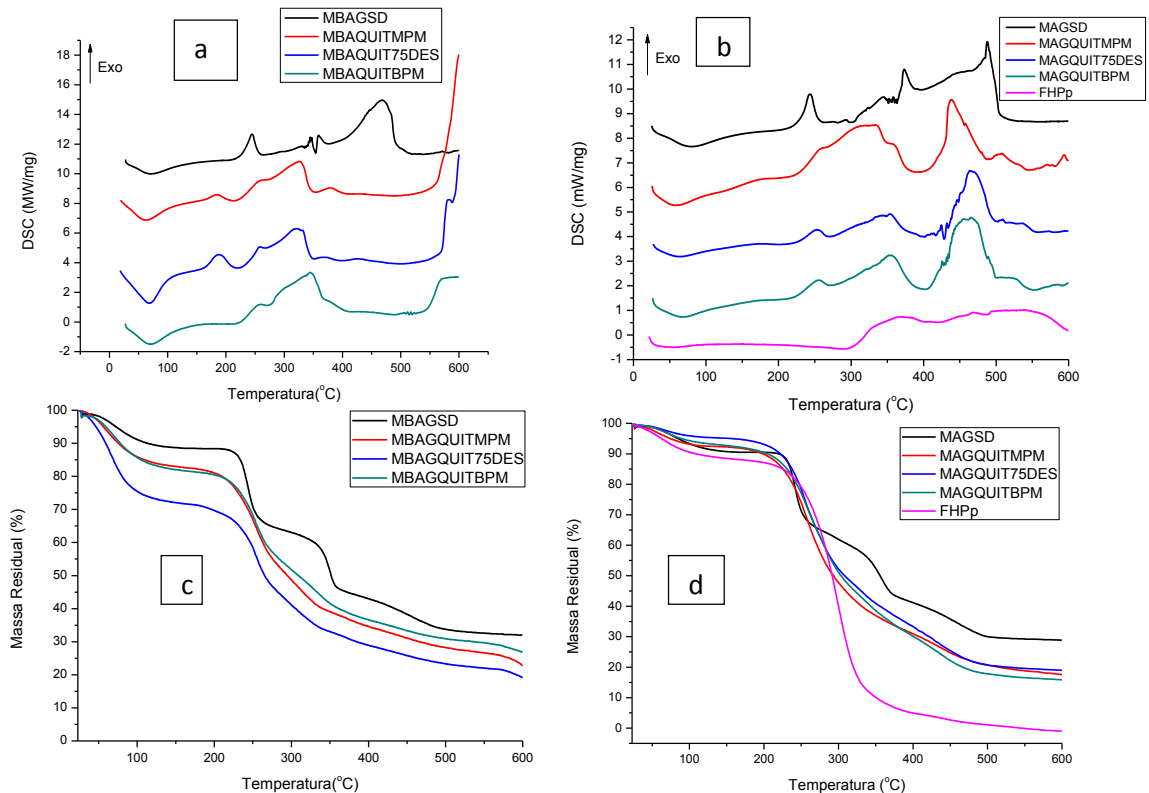
\*amostras semelhantes pelo teste t-Student – comparação entre os métodos de coacervação e spray drying - não significativo ( $p > 0,05$ )

Ao realizar as análises de eficiência de encapsulação podemos observar que, uma vez que, o tipo de rede polimérica criada pela associação alginato/quitosana e a baixa concentração do vouacapano 1 propiciaram um baixo valor para sua eficiência de encapsulação. Contudo, pode-se notar que os vouacapanos 2, 3 e 4 apresentaram melhores resultados. Podemos observar, que os resultados foram satisfatórios, com elevada recuperação dos vouacapanos 2,3 e 4 e a melhor formulação obtida foi o teste 4, com recuperações de 86,95 % para o vouacapano 2 e de 99,49% para os vouacapanos 3 e 4.

Com relação ao método de coacervação foi verificado se as médias dos vouacapanos eram iguais em relação ao tipo de associação polimérica e constatou-se que todos os vouacapanos apresentaram  $p < 0,05$ , indicando que as médias dos vouacapanos apresentaram diferença significativa em relação ao tipo de associação polimérica. Esses resultados foram confirmados pelo teste de Tukey, onde as formulações feitas por coacervação diferem-se uma das outras apresentados na tabela de eficiência de encapsulação.

A única comparação que não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste t-student (comparação entre os métodos) foi em relação ao vouacapano 2 entre os testes 1 e 3, que demonstraram semelhança, os demais foram significativamente diferentes, resultados também apresentados na tabela 3.

### 3.6. Análise térmica das microcápsulas.

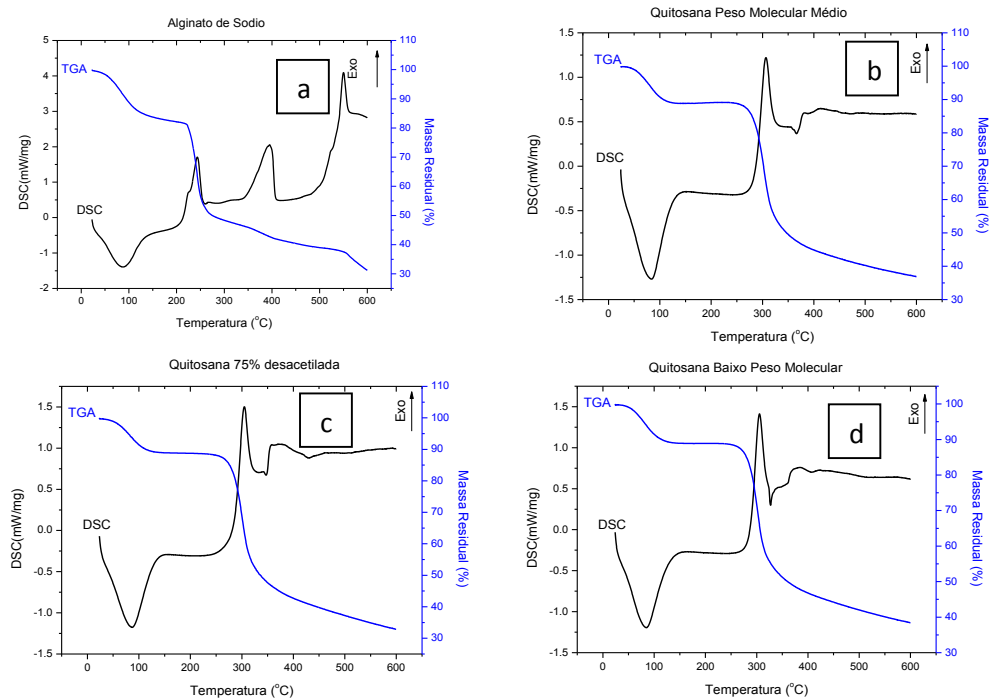


**Fig. 8.** DSC microcápsulas brancas a); DSC microcápsulas com FHPp b); TG microcápsulas brancas c); TG microcápsulas com FHPp d). Onde: MB seriam microcápsulas Brancas ; M –microcápsulas cheias; AG- alginato; AGQUITMPM-alginato/quitosana peso molecular médio; AGQUIT75DES-alginato/quitosana  $\geq 75\%$  desacetilada; AGQUITBPM – alginato/quitosana baixo peso molecular.

Na Fig. 8 a,b estão demonstrados as curvas de DSC para as microcápsulas brancas e com FHPp respectivamente. Ao comparar as microcápsulas brancas com as carregadas com FHPp foi possível observar a presença da degradação da FHPp através do pico exotérmico em 467 °C. Com isso podemos comprovar o seu encapsulamento.

As curvas de TG para as microcápsulas brancas e com FHPp estão apresentadas na Fig. 8 c,d. Ao comparar as microcápsulas brancas com as carregadas com FHPp foi possível observar que a microencapsulação da FHPp proporcionou aumento no conteúdo de água. A microcápsula de alginato-quitosana grau técnico  $\geq 75\%$  desacetilada, apresentou uma massa residual de 73% a 127 °C na ausência da FHPp e uma massa residual de 95% a 127 °C na sua presença, confirmando que a FHPp apresentou maior quantidade de água quando microencapsulada. Comportamento térmico semelhante foi observado para as demais microcápsulas.

Ao analisarmos o termograma da TG das microcápsulas carregadas com FHPp quando comparadas com FHPp isolada, observamos que as microcápsulas apresentaram maior conteúdo em água. Podemos verificar que a FHPp apresenta massa residual de 0.11% a 550 °C e que quando encapsulada com alginato por *spray drier* apresentou massa residual de 29.11% a 550 °C demonstrando dessa maneira que a cápsula retém maior quantidade de umidade. Comportamento térmico semelhante foi observado para as demais microcápsulas.



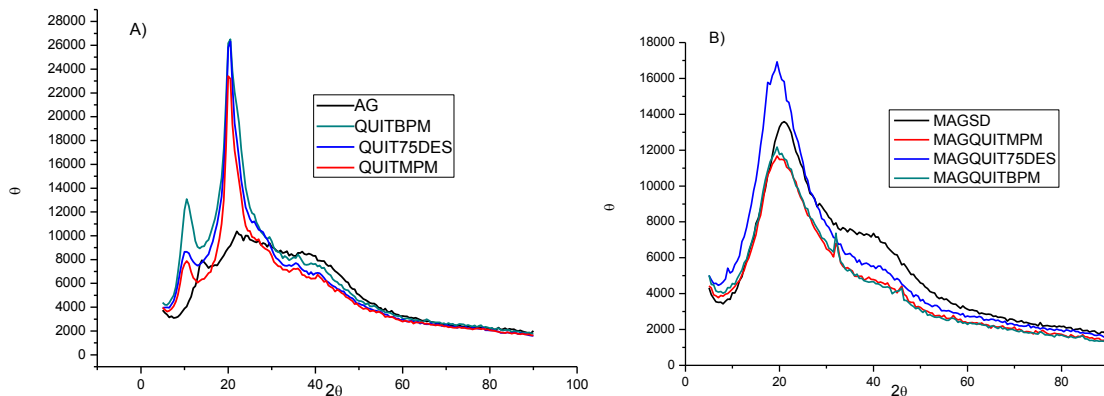
**Fig. 9.** DSC e TGA dos polímeros puros a) alginato de sódio, b) quitosana peso molecular médio, c) quitosana grau médio  $\geq 75\%$  desacetilada e d) quitosana de baixo peso molecular.

O comportamento térmico dos polímeros puros está demonstrado na Fig. 9. Observando os dados dos polímeros separadamente temos que, ambos os polissacarídeos, alginato e quitosana apresentam um largo pico endotérmico entre 25 e 100 °C referente ao processo de desidratação dos polímeros, seguido pela decomposição dos mesmos. Segundo Czubenko et al, (2009) para cada polímero estudado, com o aumento do conteúdo em água, um largo pico endotérmico aparece. Este pico move-se para temperaturas mais altas com o aumento do conteúdo de água.

O alginato apresentou dois picos exotérmicos entre 200 e 340°C que representa sua temperatura de degradação. Resultados semelhantes foram observados por Mladenovska et al. (2007), ao analisar o comportamento térmico do alginato e quitosana.

### 3.7. Difração de Raios-X (DRX)

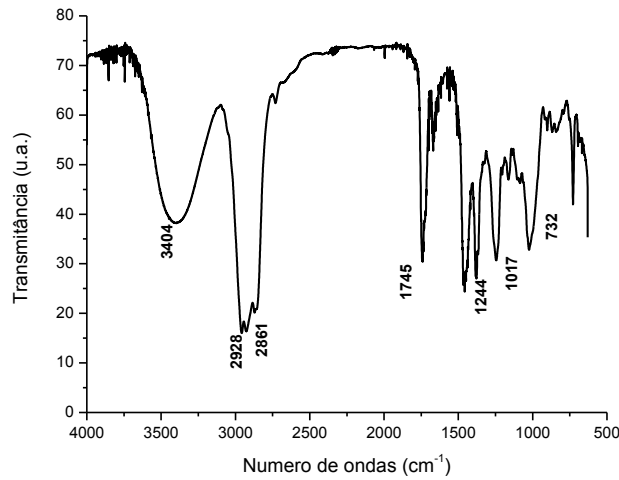
Os padrões de difração de raios X das amostras são apresentadas na Fig. 10a., conforme Li et al, (2009), também apresentou na discussão de seu trabalho, as quitosanas mostraram dois picos em cerca de  $10^\circ$  e  $20^\circ$  relacionados com os cristais hidratados e anidro, respectivamente. Após complexação, os picos típicos da quitosana desapareceram (Fig. 10b) e as amostras de microcápsulas mostraram-se amorfas semelhantes ao alginato. Isto sugeriu que a introdução de alginato na quitosana interrompeu a estrutura cristalina da quitosana, impedindo a formação de pontes de hidrogênio entre os grupos amino e os grupos hidroxila da mesma. (Li et al, 2009)



**Fig. 10.** Difração de Raios X dos polímeros (A)- AG – Alginato ; QUITBPM – quitosana de baixo peso molecular; QUIT75DES - quitosana grau técnico  $\geq 75\%$  desacetilada ;QUITMPM – quitosana de peso molecular médio; e das amostras de microcápsulas de FHPp (B) - MAGSD- Microcápsulas de alginato; MAGQUITMPM- Microcápsulas de alginato/quitosana Peso Molecular Médio ; MAGQUIT75DES -Microcápsulas de alginato/quitosana  $\geq 75\%$  desacetilada ; MAGQUITBPM - Microcápsulas de alginato/quitosana Baixo Peso Molecular

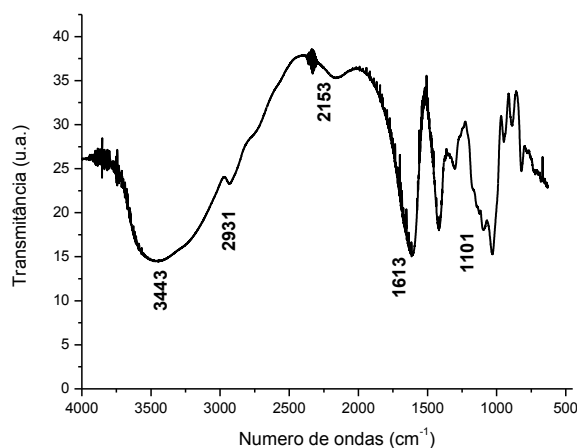
### 3.8. Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro de absorção na região do infravermelho da FHPp está apresentado na Fig. 11, onde observou-se bandas de absorção em  $1745\text{ cm}^{-1}$  a qual foi atribuída ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$  dos acetatos; em  $1244\text{ cm}^{-1}$  obteve-se estiramento assimétrico  $\text{C}-\text{O}$  do acetato e  $1017\text{ cm}^{-1}$  estiramento assimétrico  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  de éster e  $732\text{ cm}^{-1}$  referente aos anéis de furano . Essa característica também foi encontrada por Spindola et al. (2009) ao analisar o  $6\alpha$ -acetoxi, $7\beta$ -hidroxi-vouacapano.



**Fig. 11.** FT-IR da Fração Hexânica de *Pterodon pubescens* (FHPp)

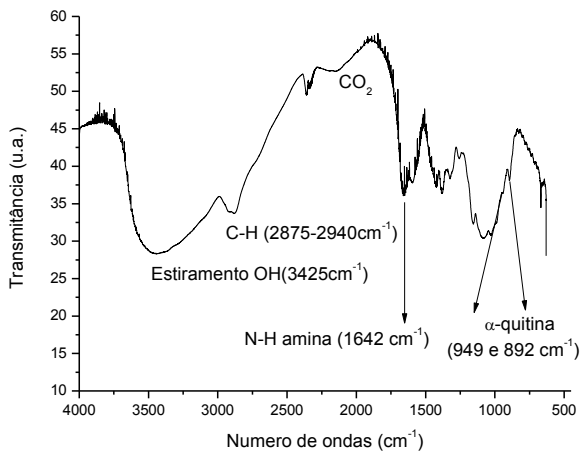
Na Fig. 12 está apresentado o espectro de absorção na região do infravermelho do alginato de sódio. Onde demonstrou bandas de absorção em  $1613\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento  $-\text{COO}$ , em  $1101\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento  $-\text{C-O-C}-$ ; e  $3443\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento do grupamento hidroxila ligados por pontes de hidrogênio. Resultados semelhantes foram observados por Pasparakis et al. (2006) e Lawrie et al. (2007). Segundo Czubenko et al, (2009) as vibrações em  $2931\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento de C-H alifáticos.



**Fig. 12.** FT-IR do Alginato de sódio

Na Fig. 13 está apresentado o espectro de absorção para quitosana de baixo peso molecular. O espectro de absorção da quitosana, apresentou bandas de absorção em  $3425\text{ cm}^{-1}$

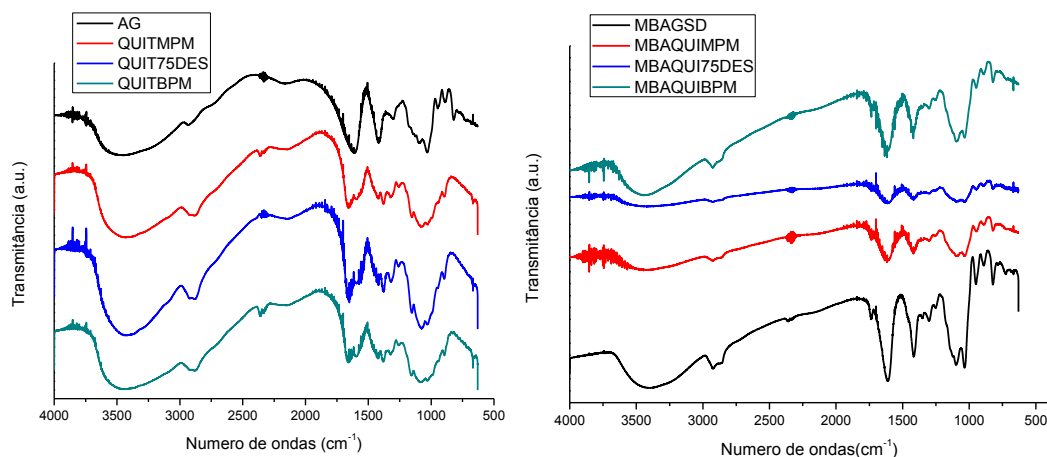
devido ao estiramento do grupo hidroxila (OH). Na região que está entre  $2875\text{-}2940\text{cm}^{-1}$  observam-se as bandas de absorção para o estiramento C-H. A banda que absorve na região de  $1642\text{ cm}^{-1}$ , se deve a predominância dos grupamentos amino (N-H). Resultados semelhantes foram encontrados por Paulino (2008) ao analisar os espectros de infravermelho da quitosana.



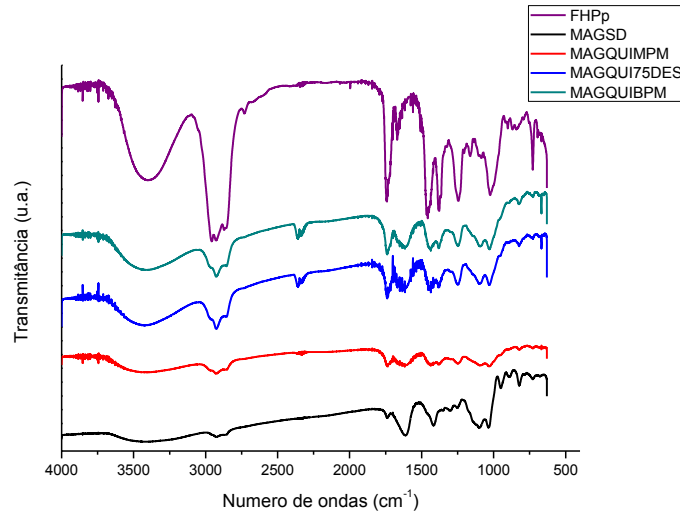
**Fig. 13.** FT-IR da quitosana de baixo peso molecular

Os espectros das microcápsulas com FHPp e Fração Hexânica de *Pterodon pubescens* (FHPp) estão apresentados na Fig. 14. Ao analisarmos as amostras referentes às microcápsulas de alginato/quitosana pelo método de coacervação e as microcápsulas de alginato por spray drier, verificamos que as bandas de absorção em  $3404\text{ cm}^{-1}$  e entre  $2928$  e  $2861\text{ cm}^{-1}$  referentes a FHPp estão presentes nas microcápsulas em diferentes intensidades o que sugere a diferente quantidade de óleo microencapsulada.

As bandas de absorção para as regiões abaixo de  $1740\text{ cm}^{-1}$  estão sobrepostas, o que dificulta a análise individual dos grupamentos químicos.



**Fig. 14.** FT-IR dos excipientes e microcápsulas Brancas

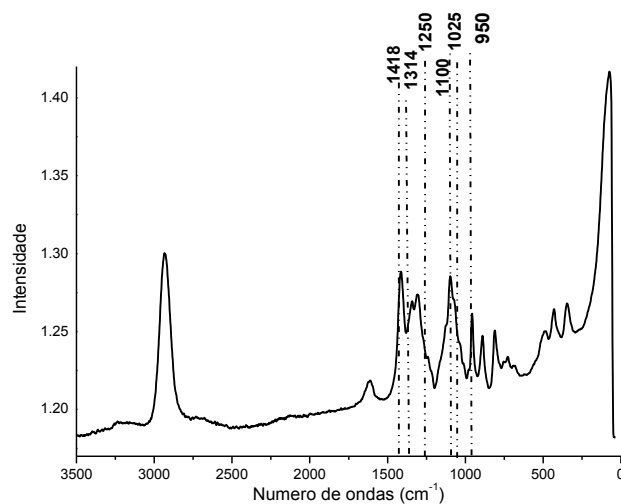


**Fig. 15.** FT-IR das Microcápsulas com FHPp e Fração Hexânica de *Pterodon pubescens* (FHPp)

### 3.9. Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman)

O que caracteriza os diferentes tipos de alginato é a presença de diferentes proporções de ácido gulurônico e unidades manurônicas. A presença destes ácidos pode ser identificada a partir das suas bandas características: enquanto que as unidades de ácido gulurônico originam uma banda a cerca de  $1025\text{ cm}^{-1}$ , o manurônico origina-se em uma banda em aproximadamente  $1100\text{ cm}^{-1}$  como pode ser observado na Fig. 16.

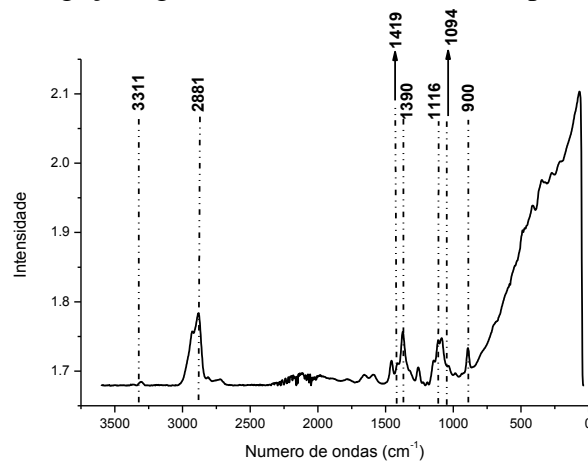
Assim, a proporção da concentração gulurônico / manurônico pode ser determinada pela intensidade relativa. Essas bandas também foram utilizadas por Pereira et al. (2003) para caracterização do alginato.



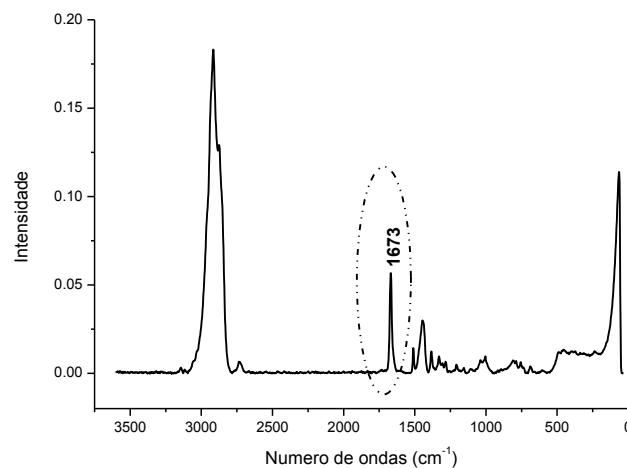
**Fig. 16.** FT-Raman do alginato de sódio.



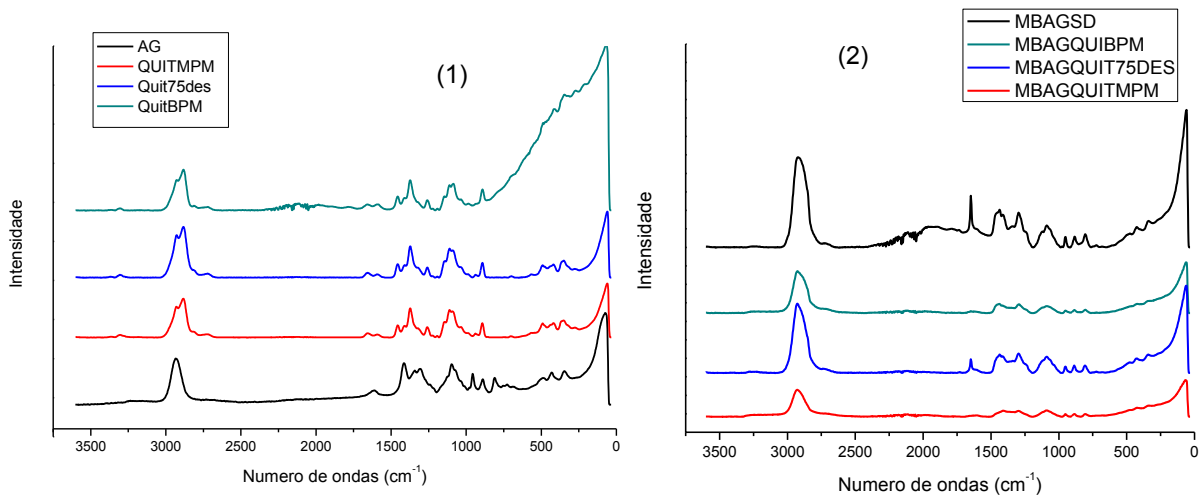
Na Fig. 17. está apresentada o espectro da quitosana baixo peso molecular. Foi possível observar no intervalo de  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ , os sinais são normalmente derivados de vibrações de estiramento de CH ou grupos  $\text{CH}_2$ . Resultados semelhantes foram obtidos por Zhang et al. (2011). Logo, o sinal em  $2881\text{ cm}^{-1}$ , pode ser atribuído a essas vibrações. As bandas em  $1419$ ,  $1116$  e  $1094\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas as vibrações das espinhas dorsais de polissacarídeos conhecidos a partir do espectro Raman da celulose. Resultados semelhantes foram observados por Zhang et al. (2011). As bandas a  $1116\text{ cm}^{-1}$  e  $1094\text{ cm}^{-1}$  podem ser derivadas a partir das vibrações simétricas de ligações glicosídicas, como mostrado para a celulose.



**Fig. 17.** FT-Raman quitosana baixo peso molecular

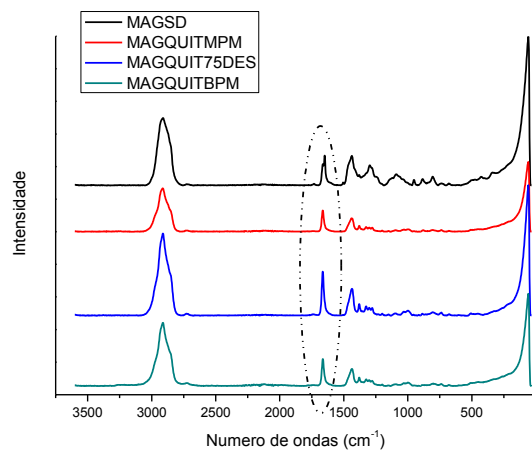


**Fig. 18.** FT – Raman da FHPp



**Fig.19.** FT-Raman dos polímeros (1) e microcápsulas brancas (2)

Ao avaliarmos as figs. 19 e 20 verificamos que dos espectros referentes aos excipientes, comparados as microcápsulas vazias, houve pouca alteração, uma vez que ambos os polissacarídeos utilizados são formados por unidades glicosídicas.

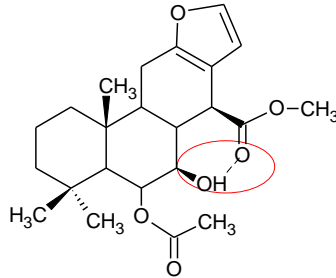


**Fig. 20.** FT-Raman das microcápsulas com FHPp

Os espectros das microcápsulas com FHPp estão demonstrados na Fig. 20. Analisando os espectros referentes às microcápsulas e comparando com a análise da FHPp (Fig.18.) verificamos que o pico em 1673 cm<sup>-1</sup> é característico da FHPp e está presente em todas as amostras de microcápsulas indicando que o óleo foi microencapsulado.

Em geral, para ésteres de ácidos dicarboxílicos saturados, a banda da C=O ocorre aproximadamente na mesma faixa 1760-1735 cm<sup>-1</sup>. Para monoésteres a mesma coisa é observada. Com β-cetoésteres, o tautomerismo é possível. (Socrates, G., 2001). No caso de tautômeros, uma forte banda é observada em 1650 cm<sup>-1</sup>. O pico em 1673 cm<sup>-1</sup> é referente ao agrupamento éster, ou seja, aos vouacapanos presentes na FHPp, onde ocorre o efeito da ligação de hidrogênio. Quando uma ligação intramolecular (interna) de hidrogênio está presente, o C=O é movido para uma frequência mais baixa, conforme observado na fig. 21. As

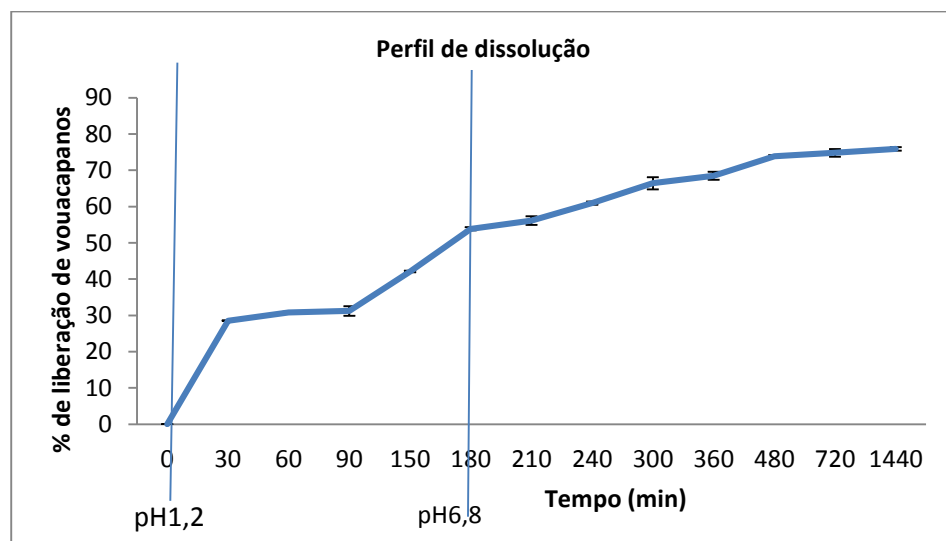
duas características mais marcantes no espectro de um éster normal são a banda C=O forte, que aparece entre 1750 e 1735  $\text{cm}^{-1}$ , e as bandas de estiramento C-O, que aparecem entre 1300 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ . (Pavia et al, 2010)



**Fig. 21.** Metil 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxivouacapan-17 $\beta$ -oato (1673  $\text{cm}^{-1}$ )

### 3.10. Estudo de perfil de liberação *in vitro* da FHPp

O perfil de liberação de vouacapanos das microcápsulas de FHPp obtidas pela associação alginato/quitosana de baixo peso molecular pelo método de coacervação está demonstrado na Fig.22. O meio simulado de liberação é realizado em pH 1,2 e 6,8. Observa-se que no tempo de 3 horas (pH 1,2) tem-se a liberação de  $53,85 \pm 0,44\%$  dos vouacapanos, o que sugere que a FHPp pode estar em sua maioria na interface alginato/quitosana, fato possibilitado pelo relaxamento da malha polimérica exercida pela quitosana. Por outro lado, em pH 6,8, no tempo de 24 horas observa-se a liberação de  $75,88\% \pm 0,45\%$  dos vouacapanos.



**Fig. 22.** Perfil de liberação *in vitro* de vouacapanos da associação alginato/quitosana baixo peso molecular

Segundo Ribeiro et al, (2005), há falta de conhecimento sobre o comportamento das microesferas de alginato sob fluídos simulados gástrico e intestinal, porém a estabilidade do complexo alginato-quitosana pode ser influenciada por parâmetros do meio, como pH e força iônica. Duas horas sob condições gástricas simuladas podem levar a dissociação da matriz de alginato (Shu et al., 2001) o que pode evidenciar que talvez não tenha sido este o fator limitante para a completa liberação dos vouacapanos. Segundo Mi et al, (2002), a habilidade de entumescimento das microcápsulas de alginato/quitosana depende do valor do pH, quanto menor o pH, maior é o entumescimento, e em pH maior do que 6,0, o grau de entumescimento é menor. O aumento do entumescimento em pH menor do que 2 é devido a protonação no interior da quitosana, enquanto o leve aumento do entumescimento em pH maior do que 5 é atribuído a ionização do grupo carboxílico do alginato no interior do complexo alginato-quitosana. O maior e o menor grau de entumescimento influencia o processo de difusão. Sendo maior entumescimento, maior taxa de difusão e menor entumescimento, menor taxa de difusão.

Segundo Liu et al, (2004), relata que as microcápsulas obtidas com quitosana de baixo peso molecular comparada a quitosanas de pesos moleculares maiores apresentou menor grau de entumescimento quando aplicada em sistemas de liberação, o que influencia o processo de difusão, diminuindo-o.

Rajendran et al, 2009 obtiveram resultados muito próximos aos encontrados neste trabalho para a liberação de nimodipino de esferas de alginato recobertas com quitosana (~70%).

González-Rodríguez et al, 2002 (~60%), Anal et al, 2005 (~70%) e Yu et al, 2008 (~60%) também obtiveram resultados semelhantes, em porcentagem de liberação, aos encontrados neste trabalho o que demonstra que o revestimento com quitosana diminui a liberação do fármaco das microcápsulas.

Posteriormente, foi testada a cinética de liberação para verificar qual modelo melhor se adequava, na qual foi analisada se era de primeira-ordem, segunda-ordem, ou seguia o modelo proposto por Higushi, verificou-se que o melhor resultado obtido foi pelo modelo de Higushi onde  $R^2 = 0,7714 \pm 0,0238$  e o  $R = 0,8782 \pm 0,0136$ .

Seguindo a lei de Fick,  $M_t / M_\infty = k \cdot t^n$  e  $\log M_t / M_\infty = \log k + n \log t$  foram obtidos os valores da constante difusional  $n = 1,6084$ , ou seja,  $n > 1$ ,  $r = 0,9525$  e  $k = 1,55441$ . Analisando o valor de  $n$ , ( $n > 1$ ) indica que o mecanismo de liberação é do tipo super caso II de transporte, no qual ocorre a contribuição simultânea de processos como difusão, entumescimento, relaxamento e erosão da matriz polimérica, ou seja, não obedecem a um

modelo de difusão fickiana. No processo de difusão não fickiano as cadeias poliméricas não apresentam mobilidade suficiente para permitir uma rápida penetração do solvente para o interior da matriz polimérica.

#### 4. Conclusão

Foi possível microencapsular os vouacapanos presentes na fração hexânica de *Pterodon pubescens* Benth. uma vez que os resultados de rendimento de microencapsulação e eficiência de microencapsulação foram satisfatórios, assim como os resultados de caracterização das microcápsulas.

**Agradecimentos:** CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos e CNPQ – Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico – Brazil

## Referências

- Anal, A.K., Stevens, W.F., 2005. Chitosan–alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *Int. J. Pharm.* 290, 45-54.
- Barber, T.A., 1993. *Pharmaceutical particulate matter: analysis and control*. Buffalo Grove: Interfarma. pp. 266-303.
- Bruschi, M.L., Lara, E.H.G., Martins, C.H.G., Vinholis, A.H.C., Casemiro, L.A., Panzeri, H., Gremião, M.P.D., 2006. Preparation and antimicrobial activity of gelatin microparticles containing propolis against oral pathogens. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 32, 229-38.
- Bruschi, M.L., Lopes, R.S., Franco, S.L., Gremião, M.P.D., 2004. In vitro release of propolis from gelatin microparticles prepared by spray-drying technique. *Rev. Ciênc. Farm.* 25, 79-84.
- Carvalho, J.C.T., Sertie, J.A.A., Barbosa, M.V.J., Patrcio, K.C.M., Caputo, L.R.G., Sarti S.J., Ferreira L.P., Bastos, J.K., 1999. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *J. Ethnopharmacol.* 64, 127-133.
- Coelho, L.P., Reis, P.A., Castro, F.L., Gayer, C.R.M., Lopes, C.S., Silva, M.C.C., Sabino, K.C.C., Todeschini, A.R., Coelho, M.G.P., 2005. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. *J. Ethnofarmacol.* 98,109-116.
- Czubenko, J.O., Druzynska, M.G., 2009. Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes. *Carbohydr. Polym.* 77, 590-598.
- De Alvarenga., E.S., De Oliveira., C.P., Bellato., C.R., 2010. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydr. Polym.* 80, 1155-1160.
- Farmacopéia Brasileira, 5ª Edição, 2010. Volume 1, 86-87. Brasília, DF, Brazil.
- Fenoradosoa, T.A., Ali, G., Delattre, C., Laroche, C., Petit, E., Wadouachi, A., Michaud, P., 2010. Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioides* Grunow . *J Appl Phycol* 22, 131–137

- Gazori, T., Khoshayand, M.R., Azizi, E., Yazdizade, P., Nomani, A., Haririan, I., 2009. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. *Carbohydr. Polym.* 77, 599-606.
- González-Rodríguez, M.L., Holgado, M.A., Sánchez-Lafuente, C., Rabasco, A.M., Fini, A., 2002. Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. *Int. J. Pharm.* 232, 225-234.
- Grasdalen, H., Larsen, B., Smidsrod, O., 1979. A P.M.R. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. *Carbohydr Res*, 68, 23-31
- Hoscheid, J., 2011. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de compostos presentes na fração hexânica do extrato alcoólico de *Pterodon pubescens* Benth. Por CG/MS. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, pp. 80.
- Hoscheid, J., Reinas, A., Cortez, D.A.G., Costa, W.F., Cardoso, M.L.C., 2012. Determination by CG-MS-SIM of furanoditerpenes in *Pterodon pubescens* Benth.: Development and validation. *Talanta*. 100, 372-376.
- Jones, D.S., Woolfson, A.D., Brown, A.F., Coulter, W.A., McClelland, C., Irwin, C.R., 2000. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. *J. Control Release*. 67, 357-368.
- Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N.A., 1983. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 15, 25-35.
- Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., Grøndah, L., 2007. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*. 8, 2533-2541.

- Li, X., Xie, H., Lin, J., Xie, W., Ma, X., 2009. Characterization and biodegradation of chitosan–alginate polyelectrolyte complexes. *Polym Degrad Stabil.* 94, 1-6.
- Liu, X., Xue, W., Liu, Q., Yu, W., Fu, Y., Xiong, X., Ma, X., Yuan, Q., 2004. Swelling behaviour of alginate–chitosan microcapsules prepared by external gelation or internal gelation technology. *Carbohydr. Polym.* 56, 459–464
- Mi, F.L., Sung, H.W., Shyu, S.S., 2002. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydr. Polym.* 48, 61-72.
- Mladenovska, K., Cruaud, O., Richomme, P., Belamie, E., Raicki, R.S., Venier-Julienne, M.C., Popovski, E., Benoit, J.P., Goracinova, K., 2007. 5-ASA loaded chitosan–Ca–alginate microparticles: Preparation and physicochemical characterization. *Int. J. Pharm.* 345, 59-69.
- Mors, W.B., Santos Filho, D., Fascio, M., Monteiro, H., Gilbert, B., Pellegrino, J., 1967. Chemoprophylactic Agent in Schistosomiasis: 14, 15 epoxygeranylgeraniol. *Science.* 157, 950-951.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu V., 2013. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Ind Crop Prod.* 42, 469-479.
- Oliveira, C.P.A., 2004. Produção e caracterização de partículas de hidrogéis para aplicações em cosméticos. Campinas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, pp. 158.
- Pasparakis, G., Bouropoulos, N., 2006. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. *Int. J. Pharm.* 323, 34-42.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Vyvyan, J.R., 2010. Espectroscopia no infravermelho in: Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Vyvyan, J.R., (Eds.) Introdução à espectroscopia. Tradução da 4ª edição norte-americana. Cengage Learning Edições Ltda., Bellingham, pp.64-65.



- Paulino, A.T., 2008. Produção de adsorventes não-convencionais e aplicação na remediação de águas de efluentes industriais. Tese (doutorado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, pp. 152.
- Peng, C., Knebel, A., Morrice, N.A., Li, X., Barringer, K., Li, J., Scott, J., Werneburg, B., Wang, L., 2007. Pim Kinase Substrate Identification and Specificity, *J Biochem* 3, 353-362.
- Peniche, C., Argüeles-Monal, W., Peniche, H., Acosta, N., 2003. Chitosan: An attractive biocompatible polymer for microencapsulation. *Macromol. Biosci.* 3, 511-520.
- Peniche, C., Howland, I., Carrillo, O., Zaldívar, C., Argüelles-Monal, W., 2004. Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. *Food Hydrocolloids.* 18, 865-871.
- Peppas, N.A., 1985. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm Acta Helv* 60, 110–111.
- Pereira, L., Sousa, A., Coelho, H., Amado, A.M., Ribeiro-Claro, P.J.A., 2003. Use of FTIR, FT-Raman and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomol. Eng.* 20, 223-228.
- Prata, S.A., 2006. Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa. Campinas. Dissertação (doutorado em Alimentos e Nutrição-) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, pp. 267
- Rajendran, A., Basu, S.K., 2009. Alginate-Chitosan Particulate System for Sustained Release of Nimodipine. *Trop J Pharm Res.* 8 (5), 433-440.
- Ribeiro, A.J., Silva, C., Ferreira, D., Veiga, F., 2005. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. *Eur J Pharm Sci.* 25, 31–40.

Shi, P., He, P., Teh, T.K.H., Morsi, Y.S., Goh, J.C.H., 2011. Parametric analysis of shape changes of alginate beads. *Adv. Powder Technol.* 210, 60-66.

Shu, X.Z., Zhu, K.J., Song, W., 2001. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. *Int. J. Pharm.* 212, 19-28

Silva, M.C.C., Gayer, C.R.M., Lopes, C.S., Calixto, N.O., Reis, P.A., Passeas, C.P.B., Paes, M.C., Dalmau, S.R., Sabino, K.C.C., Todeschini, A.R., Coelho, M.G.P., 2004. Acute and Topic Antiedematogenic fractions Isolated From The Seeds of *Pterodon pubescens*. *J. Pharm Pharmacol*, 55, 135-141.

Socrates, G., The Carbonyl Group: C=O , 2001 in: Socrates, G., (Eds.) *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies Tables and Charts*, Third Edition Formerly of Brunel, John Wiley & Sons, Ltd., Middlesex. UK, pp. 147-148

Spindola, H.M., Carvalho, J.E., Ruiz, A.L.T.G., Rodrigues, A.F.R., Denny, C., Sousa, I.M.O., Tamashiro, J.Y., Foglio, M.A., 2009. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with selective in vitro anticancer activity for prostate cell line. *J. Braz. Chem. Soc.* 20, 569-575.

Suave, J., Dallagnol, E.C., Pezzin, A.P.T., Silva, D.A.K., Meier, M.M., Soldi, V., 2006. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. *Saúde & Amb. Rev.* 7, 12-20.

Teixeira, D.F., 2003. Estudo químico e avaliação de *Attalea excelsa* Mart. ex Spreng. (Urucuri) e *Pterodon emarginatus* Vog. (Sucupira Branca) em *Aedes aegypti*. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 124.

Torres, M.R., Sousa, A.P.A., Silva Filho, E.A.T., Melo, D.F., Feitosa, J.P.A., de Paula, R.C.M., Lima, M.G.S., 2007. Extraction and characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil. *Carbohydr Res* 342, 2067–2074.

Uddin, M.S., Hawlader, M.N.A., Zhu, H.J., 2001. Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. *J. Microencapsulation.* 18, 199-209.

USP, 2009. United States Pharmacopeia. 32-National Formulary 27, Rockwell, MD, USA

Varum, K. M., Anthonsen, M. W., Grasdalen, H., Smidsrod, O., 1991a. Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r spectroscopy. *Carbohydr Res*, 211, 17–23.

Varum, K. M., Anthonsen, M. W., Grasdalen, H., Smidsrod, O., 1991b. <sup>13</sup>C-N.m.r. studies of the acetylation sequences in partially N-deacetylated chitins (chitosans)\*. *Carbohydr Res*, 217, 19-27.

Vieira, C.R., Marque, M.F., Soares, P.R., Matuda, L., Oliveira, C.M.A., Kato, L., Silva, C.C., Guillo, L.A., 2008. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells. *Phytomedicine*. 15, 528-532.

Venkatraman, S., Davar, N., Chester, A., Kleiner, L., 2000. An Overview of Controlled Release Systems, in: Wise, D.L. (Eds), *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*. Marcel Dekker. New York, pp. 431-463.

Yu, CY., Zhang, XC., Zhou, FZ., Zhang, XZ., Cheng, SX., Zhuo, RX., 2008. Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan-reinforced alginate microparticle drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 357, 15-21.

Zhang, K., Peschel, D., Helm, J., Groth, T., Fischer, S., 2011. FT Raman investigation of novel chitosan sulfates exhibiting osteogenic capacity. *Carbohydr. Polym.* 83, 60-65.

## CAPÍTULO 3

### Sugestões para trabalhos futuros

- Melhorar a proporção de alginato e quitosana utilizada nas formulações, uma vez que a bomba peristáltica que utilizamos não suportava atomizar concentrações maiores de alginato.
- Alginato com melhor proporção de ácido gulurônico.
- Secagem em equipamento de leito fluidizado (melhor granulometria).

ANEXOS

## ANEXO 1 – Normas para publicação no International Journal of Pharmaceutics



### INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS

Impact Factor : 3,350 – A<sub>1</sub>



#### Article structure

##### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

##### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

##### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

##### *Results*

Results should be clear and concise.

##### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## **Essential title page information**

### *Title*

Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

### *Author names and affiliations*

Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

### *Corresponding author*

Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country

and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

#### *Present/permanent address*

If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract must not exceed 200 words.

#### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more, but should be readable on screen at a size of 200 × 500 pixels (at 96 dpi this corresponds to 5 × 13 cm). Bear in mind readability after reduction, especially if using one of the figures from the article itself. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

#### **Keywords**



Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### **Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers oneclick access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### **Math formulae**

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### **References**

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### *Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

### *Reference style*

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.