



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS DE SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LIZZIANE MARIA BELLOTO DE FRANCISCO

**Obtenção e caracterização de nanopartículas contendo ácido ascórbico
utilizando o subproduto da extração de própolis**

MARINGÁ

2013

LIZZIANE MARIA BELLOTO DE FRANCISCO

**Obtenção e caracterização de nanopartículas contendo ácido ascórbico
utilizando o subproduto da extração de própolis**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi

MARINGÁ

2013

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

F278o	<p>De Francisco, Lizziane Maria Belloto</p> <p>Obtenção e caracterização de nanopartículas contendo ácido ascórbico utilizando o subproduto da extração de própolis / Lizziane Maria Belloto de Francisco. -- Maringá, 2013.</p> <p>129 f. : il. algumas color.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.</p> <p>1. Própolis - Subproduto. 2. Ácido ascórbico. 3. Nanoencapsulação. 4. Nanopartículas. I. Bruschi, Marcos Luciano, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.</p> <p>CDD 22.ed.615.4</p>
-------	---

Lizziane Maria Belloto de Francisco

Obtenção e caracterização de nanopartículas contendo ácido ascórbico utilizando o subproduto da extração de própolis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi

Aprovada em: 26 /08/ 2013

Banca Examinadora:

Prof.º Dr. : **Marcos Luciano Bruschi**

Instituição: Universidade Estadual de Maringá

Assinatura: _____

Prof.^a Dra. : **Ruth Meri Lucinda da Silva**

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí

Assinatura: _____

Prof.^a Dra. : **Adriana Lenita Meyer Albiero**

Instituição: Universidade Estadual de Maringá

Assinatura: _____

*Aos meus pais, meus maiores e melhores
amigos, que sempre me apoiaram e
nunca saíram do meu lado.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por Sua infinita graça e porque me ajudou até aqui.

Aos meus pais, José Roberto e Maria Aparecida, por todo amor, apoio e carinho e por sempre acreditarem na minha capacidade.

À minha irmã Larianne pelo amor, amizade, sinceridade e companheirismo.

Ao Gabriel pelo carinho, amizade, companheirismo e compreensão integral.

À minha família (avó Maria, avô José, avó Alibertina, Madrinha Fatima, Padrinho Sebastião, Camila, Gustavo, Tia Célia, Tio Marcos, Tia Rosangela, Tio Valdecir) pelo apoio e carinho.

Ao meu orientador professor Dr. Marcos Luciano Bruschi pela sua sabedoria, gentileza e exemplo de grande pesquisador. Pelas horas de conversas, ensinamentos e aprendizado, pela sua dedicação e apoio ao meu trabalho. Muito obrigada.

As professoras Dra. Selma Lucy Franco, Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso, pelo carinho, estímulo e bem querer.

Aos meus amigos do LABSLIF que sempre me ajudaram muito e contribuíram para a alegria mesmo nos momentos mais difíceis, Mariana, Sabrina, Lucas, Marise, Yeda, Maíra, Jeane, Helen, Talita e em especial a Raphaela e a Mônica pelo carinho.

Ao Cláudio, por me ajudar diversas vezes com os equipamentos do laboratório e pelas conversas, ensinamentos.

Aos técnicos e funcionários do DFA (UEM), Helena pelo apoio e atenção, e em especial a Rose pelo constante carinho.

As minhas lindas amigas, Maria Angélica, Caren, Patrícia, Renata, Edilainy, Franciele, Ana Caroline e Priscila, fiéis companheiras para todas as horas até as mais difíceis, que eu tive a felicidade e alegria de conhecer e que irei levar para toda minha vida!

As minhas eternas amigas Tatiane, Beatriz, pelo apoio incondicional. Amo vocês!

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PPG) e ao Departamento de Farmácia (DFA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) pelo apoio.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), CAPES, FINEP e CNPq pelo suporte financeiro.

Que os vossos esforços desafiem as possibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

(Charles Chaplin).

RESUMO

DE FRANCISCO, L. M. B. **Obtenção e caracterização de nanopartículas de subproduto da extração de própolis contendo ácido ascórbico**. 2013. 129f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, 2013.

Entre as pesquisas realizadas no campo farmacêutico, os sistemas de liberação particulados, sobretudo as micro/nanopartículas, têm despertado grande interesse nas últimas décadas, pois permitem a administração de fármacos pelas diferentes vias. Esses sistemas tem permitido um aumento da eficácia terapêutica, redução da incidência de efeitos colaterais, um suprimento adequado de fármaco por um longo período de tempo, com reduzidas frequências de administração que tem facilitado a adesão dos pacientes ao tratamento. Assim, diversos polímeros com as mais diferentes origens têm sido estudados e utilizados no processo de micro/nanoencapsulação. A própolis é uma substância fortemente adesiva, muito utilizada pela população. Durante a obtenção do seu extrato, há a formação de resíduo gomo-resinoso, o qual tem apresentado a capacidade de formar partículas. Nesse sentido, para avaliar a cinética de liberação a partir das nanopartículas (NP), utilizou-se o ácido ascórbico (AA), como fármaco modelo, um cofator de numerosas reações fisiológicas, que apresenta uma ação antioxidante. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção e caracterização de nanopartículas de subproduto (SP) da extração da própolis contendo AA. A quantificação da vitamina C foi realizada por cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foi realizado o controle de qualidade da própolis e do extrato 30% (p/p). O SP obtido teve suas características avaliadas quanto a sua capacidade de estruturação. As nanopartículas foram obtidas *spray drying*. A atividade antioxidante do AA foi determinada pelos métodos DPPH e ABTS. O método de quantificação do AA por CLAE mostrou-se válido. Tanto a própolis quanto o extrato e o ácido ascórbico atenderam os padrões de qualidade. O SP apresentou-se apropriado para o desenvolvimento de estruturas particuladas. As nanopartículas apresentaram-se esféricas, porém com variação morfológica e de tamanho, algumas aglomerações e diâmetro médio entre 110,93 e 298,53 nm e índice de polidispersão variando de 0,444 a 0,797. A tecnologia de micro/nanoencapsulação possibilitou uma boa eficiência de encapsulação, com uma liberação lenta, não governada por difusão Fickiana. A atividade antioxidante das NP avaliada pelo método ABTS, demonstrou uma potencialização da capacidade antioxidante do AA. Dessa forma, demonstrou-se ser possível a utilização do

subproduto da extração de própolis para o desenvolvimento de nanopartículas, as quais puderam proporcionar a liberação modificada da vitamina C.

Palavras-chave: própolis, subproduto, ácido ascórbico, nanoencapsulação, nanopartículas.

ABSTRACT

DE FRANCISCO, L. M. B. Preparation and characterization of nanoparticles byproduct of the extraction of propolis containing ascorbic acid. 2013. 129 f. Qualification (Master) - Department of Pharmacy, Health Sciences Center, State University of Maringa, 2013.

Among the research conducted in the pharmaceutical field, the particulate delivery systems, especially micro/nanoparticles, have attracted great interest in recent decades; they allow the administration of drugs by different routes. These systems have permitted an increase in therapeutic efficacy, reduction in the incidence of side effects, an adequate supply of the drug for a long period, with reduced frequency of doses that has facilitated patients' adherence to treatment. Thus, various polymers having the most different origins have been studied and used in the process of micro/nanoencapsulation. Propolis is a strongly adhesive substance, widely used by the population. During the pursuit of his statement, there is the formation of bud-resinous residue, which has shown the ability to form particles. Accordingly, to evaluate the kinetics of release from nanoparticles (NP), was used ascorbic acid (AA), as a model drug, a cofactor of numerous physiological reactions, which has an antioxidant action. Therefore, this study aimed to obtain and characterize nanoparticles by-product (SP) extraction of propolis containing AA. Quantification of vitamin C was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). We carried out a quality control of the propolis extract and 30% (w / w). The BP had obtained their characteristics evaluated for their ability to structure. The nanoparticles were obtained from spray drying. The antioxidant activity of AA was determined by DPPH and ABTS. The method of quantification of AA by HPLC was shown to be valid. Both as propolis extract and ascorbic acid met the quality standards. The BP has been considered appropriate to develop particulate structures. The spherical nanoparticles showed up, but with morphological variation and size, some agglomerations and average diameter between 110.93 and 298.53 nm and polydispersity index ranging from 0.444 to 0.797. The technology of micro/nanoencapsulation enabled a good encapsulation efficiency, with a slow release, not governed by Fickian diffusion. The antioxidant activity of NP evaluated by ABTS method showed an enhancement of antioxidant capacity of AA. Thus, it has been shown to be possible to use the by-product of the extraction of propolis for the development of nanoparticles, which could provide modified release of Vitamin C.

Keywords: propolis, by-product, ascorbic acid, nanoencapsulation, nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo esquemático dos diferentes tipos de micropartículas.....	26
Figura 2 -	Aspecto macroscópico da própolis <i>in natura</i> e triturada.....	29
Figura 3 -	Estrutura química do L-ascórbico 2,3-enediol-L-gulônico-g-lactona.....	38
Figura 4 -	Via da degradação do ácido ascórbico em soluções aquosas.....	40
Figura 5 -	Célula de difusão de Franz modificada: 1) compartimento contendo o meio de liberação; 2) abertura de coleta de amostras; 3) banho termostaticado; seta vermelha: barra magnética para manter o sistema sob agitação.....	59
Figura 6 -	Espectro de absorção da vitamina C nos comprimentos de onda de 190 a 390 nm.....	68
Figura 7 -	Cromatograma obtido para a fase móvel solução aquosa de 0,2% de ácido ortofosfórico/metanol/acetonitrila (90:8:2, V/V/V).....	68
Figura 8 -	Cromatograma obtido para a vitamina C na concentração de 8µg/mL.....	69
Figura 9 -	Curva de regressão linear obtida da média das oito curvas de calibração (n=5).....	70
Figura 10 -	Cromatogramas obtidos para a vitamina C, no cromatógrafo líquido (a) da Shimadzu® e (b) da Waters®.....	75
Figura 11 -	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da vitamina C (tamanho original x40).....	76
Figura 12 -	Estabilização do radical DPPH por um antioxidante.....	78
Figura 13 -	Curva de regressão linear obtida da média das sete curvas de calibração autênticas da avaliação da atividade antioxidante da vitamina C (n=7).....	79
Figura 14 -	Curva de regressão linear obtida da média das sete curvas de calibração autênticas da avaliação da atividade antioxidante do Trolox (n=7).....	80
Figura 15 -	Curva de regressão linear obtida da média das seis curvas de análise autênticas da avaliação da atividade antioxidante do Trolox (n=6).....	82
Figura 16 -	Curva de regressão linear obtida da média das seis curvas de calibração autênticas da avaliação da atividade antioxidante da vitamina C (n=6).....	83
Figura 17 -	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nanopartículas de subproduto 50% (p/p) e gelatina, mostrando topografia exterior, partículas brancas: 1% SP: 0,8% gelatina. Tamanho original 200x (a); 1500x (b), 2000x (c).....	86

Figura 18 -	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nanopartículas de subproduto 50% (p/p) e gelatina, mostrando topografia exterior, partículas brancas: 1% SP: 0,67% gelatina. Tamanho original 200x (a); 2000x (b), 3000x (c).....	87
Figura 19 -	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nanopartículas de 1% subproduto 50% (p/p) e 0,8% gelatina, mostrando topografia exterior, contendo vitamina C. Tamanho original 200x (a); 500x (b); 2000x (c).....	89
Figura 20 -	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nanopartículas de 1% subproduto 50% (p/p) e 0,67% gelatina, mostrando topografia exterior, contendo vitamina C. Tamanho original 40x (a); 200x (b); 500x (c).....	90
Figura 21 -	Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,8% gelatina + 1% SP sem vitamina C: (a) histograma dos intervalos de classe (colunas) e representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas (linha). O intervalo de tamanho de classe é de 240 nm. (b) gráfico da distribuição de tamanho das partículas obtido por <i>light scattering</i>	92
Figura 22 -	Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,67% gelatina + 1% SP sem vitamina C: (a) histograma dos intervalos de classe (colunas) e representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas (linha). O intervalo de tamanho de classe é de 40 nm. (b) gráfico da distribuição de tamanho das partículas obtido por <i>light scattering</i>	94
Figura 23 -	Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,67% gelatina + 1% SP contendo vitamina C: (a) histograma dos intervalos de classe (colunas) e representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas (linha). O intervalo de tamanho de classe é de 120 nm. (b) gráfico da distribuição de tamanho das partículas obtido por <i>light scattering</i>	95
Figura 24 -	Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,67% gelatina + 1% SP contendo vitamina C: (a) histograma dos intervalos de classe (colunas) e representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas (linha). O intervalo de tamanho de classe é de 200 nm. (b) gráfico da distribuição de tamanho das partículas obtido por <i>light scattering</i>	97
Figura 25 -	Estabilização do radical ABTS por um antioxidante, após a obtenção do	

	mesmo pela reação do ABTS com o persulfato de potássio.....	101
Figura 26 -	Curva de regressão linear obtida da média das cinco curvas de análise autênticas das nanopartículas 0,67% gelatina +1SP contendo vitamina C (n=3).....	102
Figura 27 -	Curva de regressão linear obtida da média das cinco curvas de análise autênticas das nanopartículas 0,8% gelatina +1SP contendo vitamina C (n=3).....	103
Figura 28 -	Curva de regressão linear obtida da média das cinco curvas de análise autênticas das nanopartículas 0,67% gelatina +1SP sem vitamina C (n=3)	105
Figura 29 -	Curva de regressão linear obtida da média das cinco curvas de análise autênticas das nanopartículas 0,8% gelatina +1SP sem vitamina C (n=3)	106
Figura 30 -	Perfil de liberação <i>in vitro</i> da vitamina C a partir das nanopartículas preparadas pelo processo de <i>spray drying</i> (n = 3).....	108

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Origem botânica da própolis.....	31
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados das análises físico-químicas realizadas com a amostra de própolis (n=3).....	61
Tabela 2 -	Resultados das análises físico-químicas realizadas com a amostra do extrato de Própolis a 30% p/p (n=3).....	64
Tabela 3 -	Resultados obtidos na determinação do resíduo seco dos extratos do subproduto 10% (p/p) em diferentes solventes (n=3).....	66
Tabela 4 -	Resultados da ANOVA para a regressão linear do método de validação para a quantificação do ácido ascórbico ($\alpha < 0,05$).....	71
Tabela 5 -	Resultados da ANOVA para análise da falta de ajuste no método de validação para a quantificação do ácido ascórbico ($\alpha < 0,05$).....	71
Tabela 6 -	Dados de concentração da vitamina C para a análise da exatidão pelo método cromatográfico (n = 3, média \pm s).....	72
Tabela 7 -	Precisão do método de validação para a quantificação do ácido ascórbico (n=3).....	73
Tabela 8 -	Robustez para o método de quantificação da vitamina C (n = 3).....	74
Tabela 9 -	Resultados da ANOVA para a análise de resíduos e da falta de ajuste da avaliação da atividade antioxidante da vitamina C (n = 7).....	79
Tabela 10 -	Resultados da ANOVA para a análise de resíduos e da falta de ajuste da avaliação da atividade antioxidante do Trolox (n = 7).....	81
Tabela 11 -	Resultados da ANOVA para a análise de resíduos e da falta de ajuste da avaliação da atividade antioxidante do Trolox (n = 6).....	82
Tabela 12 -	Resultados da ANOVA para a análise de resíduos e da falta de ajuste da avaliação da atividade antioxidante da vitamina C (n = 6).....	84
Tabela 13 -	Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,8% gelatina + 1% SP sem vitamina C.....	92
Tabela 14 -	Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,67% gelatina + 1% SP sem vitamina C.....	93
Tabela 15 -	Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,67% gelatina + 1% SP contendo vitamina C.....	95
Tabela 16 -	Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,67% gelatina + 1% SP contendo vitamina C.....	96

Tabela 17 -	Valores de índice de polidispersão das nanopartículas obtidas a partir do subproduto de própolis (n =3, média ± s).....	98
Tabela 18 -	Valores de potencial zeta das nanopartículas obtidas a partir do subproduto de própolis (n =3, média ± s).....	99
Tabela 19 -	Teor e eficiência de encapsulação (EE) das nanopartículas contendo vitamina C preparadas pela técnica de <i>spray drying</i> (n = 3, média ± s)....	100
Tabela 20 -	Resultados da ANOVA para a análise de resíduos e da falta de ajuste da avaliação da atividade antioxidante das nanopartículas 0,67% gelatina +1SP contendo vitamina C (n = 3).....	102
Tabela 21 -	Resultados da ANOVA para a análise de resíduos e da falta de ajuste da avaliação da atividade antioxidante das nanopartículas 0,8% gelatina +1SP contendo vitamina C (n = 3).....	104
Tabela 22 -	Resultados da análise dos modelos obtidos com o ensaio de liberação <i>in vitro</i> da vitamina C a partir das nanopartículas (MP) (n = 3, média ± s).....	109
Tabela 23 -	Resultados da análise dos dados obtidos com o ensaio de liberação <i>in vitro</i> da vitamina C a partir das nanopartículas (MP) (n = 3, média ± s).....	109

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	45
Equação 2	46
Equação 3	52
Equação 4	52
Equação 5	53
Equação 6	55
Equação 7	55
Equação 8	57
Equação 9	58
Equação 10	59
Equação 11	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico)
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazil
AA	Ácido ascórbico
ANOVA	Análise de variância
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
gl	Graus de liberdade
MQ	Média quadrática
MP	Micropartículas
pH	Potencial Hidrogeniônico
RS	Resíduo seco
Sm	Solução mãe
SM	Soma quadrática
SP	Subproduto de própolis
TG	Termogravimetria
UV	Ultra Violeta
VIS	Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

Abs _s	Absorbância da solução
Abs _{cn}	Absorbância do controle negativo
AA%	Atividade antiradicalar
R	Coefficiente de correlação
r ²	Coefficiente de determinação
cv	Coefficiente de variação
Λ	Comprimento de onda
s	Desvio padrão
Σ	Erro padrão
N	Expoente indicador do mecanismo de liberação
FD	Fator de diluição
G	grama
°C	grau Celsius
°GL	grau Gay Lussac
H	horas
+/-	mais ou menos
®	marca registrada
μg	micrograma
μg	microgramas
mL	milimitros
min	minutos
nm	nanometros
A	Nível de significância
P	Peso
%	por cento
rpm	rotações por minuto
T	Tempo de liberação
TE	Teor de extrativos
V	volume
IC ₅₀	Concentração inibitória máxima que inibe 50% do radical

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Sistemas de liberação modificada de fármacos	22
1.1.1 Micro/nanoencapsulação	24
1.1.2 Métodos de micro/nanoencapsulação	25
1.1.3 Materiais utilizados	27
1.2 Própolis	29
1.2.1 Origem botânica	30
1.2.2 Composição química	32
1.2.3 Atividade biológica	34
1.2.4 Formas de utilização de própolis	35
1.2.5 Subproduto de própolis.....	37
1.3 Vitamina C	38
2 OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo geral.....	41
2.2 Objetivos específicos	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Material	42
3.1.1 Reagentes, solventes, soluções e matérias-primas	42
3.1.2 Equipamentos e acessórios	43
3.2 Métodos	44
3.2.1 Coleta e avaliação da qualidade da própolis	44
3.2.1.1 Determinação da perda por dessecação	44
3.2.1.2 Determinação do teor de ceras	44
3.2.1.3 Determinação do teor de cinzas	45
3.2.1.4 Determinação do teor de extrativos em água	45
3.2.1.5 Determinação da fração solúvel em etanol 96 °GL	46
3.2.2 Preparação e avaliação do extrato de própolis	46
3.2.2.1 Determinação do pH	46
3.2.2.2 Determinação da densidade relativa	47
3.2.2.3 Determinação do resíduo seco	47
3.2.2.4 Determinação do teor alcoólico	47
3.2.2.5 Determinação dos polifenóis totais	47

3.2.3 Obtenção e caracterização do subproduto	48
3.2.3.1 Determinação do teor de ceras.....	48
3.2.3.2 Determinação da fração solúvel em diferentes solventes	48
3.2.4 Preparação e caracterização do extrato etanólico do subproduto.....	49
3.2.4.1 Determinação do resíduo seco do extrato do subproduto da própolis.....	49
3.2.4.2 Determinação do pH do extrato do subproduto da própolis.....	50
3.2.4.3 Determinação do teor de polifenóis totais do extrato do SP.....	50
3.2.5 Metodologia analítica avaliação cromatográfica da vitamina C	50
3.2.5.1 Condições cromatográficas	50
3.2.5.2 Preparação da amostra	51
3.2.5.3 Validação analítica	51
3.2.5.3.1 Especificidade.....	51
3.2.5.3.2 Linearidade.....	52
3.2.5.3.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	52
3.2.5.3.4 Intervalo.....	52
3.2.5.3.5 Exatidão (acurácia).....	52
3.2.5.3.6 Precisão.....	53
3.2.5.3.6.1 Repetibilidade.....	53
3.2.5.3.6.2 Precisão intermediária.....	53
3.2.5.3.7 Robustez.....	53
3.2.6 Vitamina C.....	54
3.2.6.1 Avaliação das características organolépticas e de solubilidade	54
3.2.6.2 Avaliação morfológica	54
3.2.6.3 Avaliação da atividade antioxidante.....	54
3.2.6.3.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH.....	54
3.2.6.3.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS.....	55
3.2.7 Preparação e caracterização de sistemas micro/nanoparticulados.....	56
3.2.7.1 Preparação.....	56
3.2.7.2 Caracterização físico-química das estruturas obtidas.....	56
3.2.7.2.1 Análise morfológica.....	56
3.2.7.2.2 Análise granulométrica e determinação do potencial zeta.....	56
3.2.7.2.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação	57
3.2.7.2.4 Avaliação da atividade antioxidante.....	57

3.2.7.2.5 Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> da vitamina C a partir das estruturas obtidas.....	58
3.2.8 Análise estatística.....	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 Avaliação da qualidade de própolis.....	61
4.2 Preparação e controle de qualidade de extrato 30% (p/p).....	63
4.3 Caracterização do subproduto, obtenção e avaliação do extrato de subproduto de própolis 50% (p/p).....	65
4.4 Validação da metodologia analítica da vitamina C.....	67
4.5 Avaliação da qualidade da vitamina C.....	75
4.5.1 Avaliação da atividade antioxidante.....	76
4.5.1.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH.....	77
4.5.1.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS.....	81
4.6 Caracterização das nanopartículas.....	84
4.6.1 Análise morfológica.....	84
4.6.2 Análise granulométrica.....	91
4.6.3 Potencial zeta.....	98
4.6.4 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação.....	99
4.6.5 Avaliação da atividade antioxidante das nanopartículas.....	100
4.6.6 Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> da vitamina C.....	106
5 CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS	112

1 INTRODUÇÃO

Natureza é uma fonte muito rica de substâncias e compostos essenciais à vida dos seres vivos, incluindo a esses seres os humanos. Conceitualmente, como preparação farmacêutica, a composição de um medicamento é dependente de insumos farmacêuticos, os quais podem apresentar origem natural ou sintética. Assim, para a obtenção desses insumos diferentes processos como: processos extrativos, de transformação e/ou de síntese se fazem necessários, gerando, muitas vezes, produtos que normalmente não são de interesse, os subprodutos (TOLEDO, 2013).

No entanto, os recursos naturais não são advindos de fontes inesgotáveis, tornando extremamente necessária a utilização desses subprodutos. Vários grupos tem direcionado suas pesquisas para a utilização desses materiais descartados para as mais diferentes finalidades (RÊGO et al., 2010a, b; SU et al.; 2013; TOLEDO, 2013).

Muitos desses subprodutos poderiam ser investigados quanto à sua utilização como insumos farmacêuticos para a produção de medicamentos cada vez mais eficazes e seguros (TOLEDO, 2013). Nesse sentido, tem se buscado a aplicação destes materiais em novas estratégias, assim como sistemas de liberação modificada de fármacos, que permitam uma melhora dos efeitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos (MIZUSHIMA, 1996; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; CORTESI et al., 2002; SILVA et al., 2003), como também promover efeitos farmacotécnicos como a proteção do fármaco ao ambiente externo e mascaramento de propriedades organolépticas (JYOTHI et al., 2010).

1.1 Sistemas de liberação modificada de fármacos

Um aspecto importante no desenvolvimento de medicamentos e obtenção de uma intervenção farmacoterapêutica bem sucedida é a capacidade do fármaco de alcançar uma concentração terapêutica e não tóxica no sítio de ação, e de mantê-la constante durante todo o período de tratamento (COLLETT; MORETON, 2005; KULKARNI; KESHAVAYYA; KULKARNI, 2007).

Nas formas farmacêuticas convencionais, o fármaco é liberado prontamente após a administração aumentando rapidamente sua concentração plasmática (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007). Porém, até que a próxima dose seja administrada, a concentração do

fármaco cai exponencialmente resultando em um padrão de concentração flutuante, com altas concentrações, podendo chegar a níveis tóxicos que resultam em reações adversas, alternando-se com baixas concentrações ou concentrações subterapêuticas as quais não permitem uma ação eficiente do fármaco contra a doença (AÏNAOUI; VERGNAUD, 1998; AÏNAOUI et al., 2001; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Dessa forma, devido à duração transitória dentro dos níveis terapêuticos, administrações frequentes do medicamento são necessárias, que podem levar a erros de posologia ou de horários ou, até mesmo, a não adesão dos pacientes (AÏNAOUI; VERGNAUD, 2000; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007). Diante dessas limitações, estudos para desenvolver sistemas que objetivam a modificação da liberação de fármacos e que possam reduzir ou eliminar os picos plasmáticos, cresceram consideravelmente nos últimos anos (MATSUMOTO et al., 1997; COLLETT; MORETON, 2005; LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Nesse sentido, nas últimas décadas, uma maior atenção tem sido voltada para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e/ou prolongada de agentes biologicamente ativos, os quais são caracterizados pela liberação gradual do fármaco, mantendo a concentração plasmática do mesmo em níveis terapêuticos por um período de tempo desejado (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007). Permitindo um aumento da eficácia terapêutica, redução ou desaparecimento de efeitos colaterais, e garantindo o suprimento adequado de fármaco por um longo período de tempo, redução dos esquemas posológicos e aumentando a adesão dos pacientes (MATSUMOTO et al., 1997; COLLETT; MORETON, 2005; CHENG et al., 2009; VENKATESAN; MANAVALAN; VALLIAPPAN, 2009; NG et al., 2010; PEREIRA, 2011).

Assim, para permitir uma modulação da velocidade de saída dos fármacos, esses sistemas fazem uso de uma “barreira” física ou química, as quais podem ser obtidas por diversas técnicas como: pelo uso de revestimentos, incorporação do fármaco em uma matriz polimérica, microencapsulação, ligação química a resinas de troca iônica, incorporação em uma bomba osmótica, dentre outras (COLLETT; MORETON, 2005; RAVIKUMARA et al., 2009). No entanto, a seleção do método mais adequado depende de fatores como custo, perfil de liberação desejado, propriedades do fármaco, entre outros (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; CHENG et al., 2009).

Dessa forma, nas pesquisas realizadas na área farmacêutica os sistemas de liberação particulados, sobretudo as mi/nanocropartículas, têm despertado grande interesse, visto que, podem ser administrados por diferentes vias, incluindo parenteral, oral, pulmonar e tópica

para exercerem ação local ou sistêmica (BRUSCHI et al., 2003; FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005; KILPELÄINEN et al., 2009 JYOTHI et al., 2010). Esses sistemas permitem, ainda, alterar as propriedades organolépticas, a obtenção de formas sólidas de óleos, o controle de odor e sabor, a proteção de fármacos frente à umidade, luz, calor e oxidação, a alteração da solubilidade, a diminuição da volatilidade, a prevenção de incompatibilidades, a manipulação de materiais tóxicos, a melhora das características de fluxo e a possibilidade de uma liberação controlada e a vetorização de fármacos, entre outras (LUZZI; PALMIERI, 1985; DONBROW, 1992; BRUSCHI et al., 2003; JYOTHI et al., 2010; DE FRANCISCO; CERQUETANI; BRUSCHI, 2012).

1.1.1 Micro/nanoencapsulação

O processo de micro/nanoencapsulação foi inicialmente utilizado, nos anos 30, pela *National Cash Register Company* (NCR) na produção do papel de cópia sem carbono (*No Carbon Required*). Nesse processo, dois compostos separados por um filme argiloso, quando juntos, reagem entre si originando cor, sendo a mistura destes causada pelo rompimento do filme no ato de escrever (DONBROW, 1992; BRUSCHI, 2002). O sucesso no processo de microencapsulação levou cientistas, de outras áreas, a aplicar a técnica de microencapsulação, sendo utilizada atualmente nas áreas farmacêutica, gráfica, agrícola, na indústria de alimentos, produtos cosméticos (LUZZI, PALMIERI, 1985), e na indústria têxtil (NELSON, 2002). A primeira pesquisa que levou ao desenvolvimento da microencapsulação na área farmacêutica foi publicada por Bungen Burg de Jong e Kan, em 1931, na qual esferas de gelatina foram obtidas pelo processo de coacervação (VENKATESAN; MANAVALAN; VALLIAPPAN, 2009).

Atualmente, a encapsulação de substâncias em pequenas partículas tornou-se uma técnica de compartimentalização bem estabelecida, permitindo que fármacos não entrem em contato com o meio externo ao das partículas até o momento em que sua ação seja necessária e possibilite de maneira racional e efetiva a eficácia terapêutica de substâncias já correntemente utilizadas para o tratamento de uma grande variedade de doenças (DONBROW, 1992; BRUSCHI, 2002).

O termo microencapsulação descreve uma categoria de tecnologias utilizadas para encapsular sólidos, líquidos ou gases dentro de um revestimento ou de uma matriz polimérica

formando partículas com diâmetro de 1 a 1000 μm (JONES; PEARCE, 1995; SILVA et al., 2003; JYOTHI et al., 2010; BIN CHOY, 2011).

As partículas produzidas pelo processo de microencapsulação são denominadas genericamente de micropartículas que se dividem em dois tipos: micro/nanoesferas e micro/nanocápsulas em relação à morfologia e à estrutura interna (BRUSCHI, 2002). As esferas são sistemas em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso na matriz polimérica onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Já as cápsulas constituem sistemas reservatórios em que é possível identificar um núcleo diferenciado que contém a substância ativa sólida, líquida ou gasosa, envolvido por uma membrana polimérica, isolando o núcleo do meio externo (ANDREO FILHO, OLIVEIRA, 1999; SILVA et al., 2003).

Essas estruturas constituem formas de depósito nas quais a liberação do fármaco depende de alguns fatores, como a natureza do polímero, propriedades físico-químicas do fármaco e/ou fatores da formulação (BRUSCHI, 2002; HASSAN et al., 2009; CHENG et al., 2009). Assim, a remoção do fármaco da forma farmacêutica passa a ser um passo limitante do processo de absorção e pode ser controlada a partir da escolha adequada dos materiais (principalmente do polímero), métodos e processos de obtenção das micropartículas (BRUSCHI, 2002; HASSAN et al., 2009).

1.1.2 Métodos de micro/nanoencapsulação

Vários métodos para a micro/nanoencapsulação de fármacos são descritos na literatura, sendo muitos desses métodos modificações das três técnicas básicas: evaporação do solvente, coacervação e *spray-drying* (FREITAS, MERKLE, GANDER, 2005). Entre as técnicas utilizadas muitas delas são baseadas em fenômenos físicos, alguns utilizam reações químicas e outros combinam fenômenos físicos e químicos (BRUSCHI, 2002; JYOTHI et al., 2010; BOCK et al., 2011).

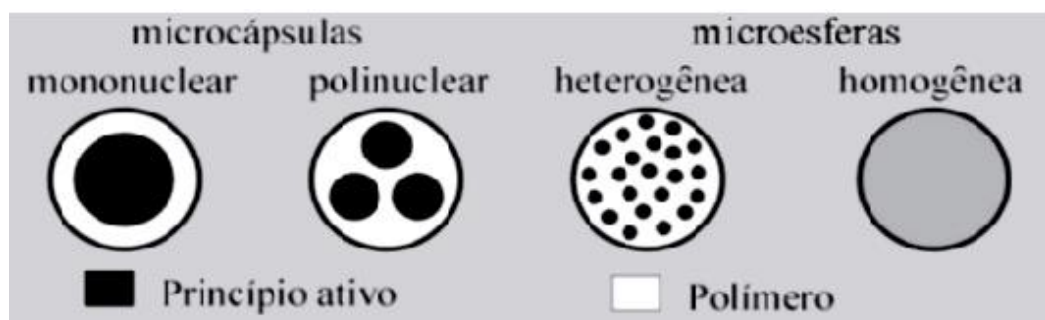
Os métodos físico são amplamente utilizados durante o processo de micro/nanoencapsulação, e os mais encontrados na literatura são: *spray-drying*, *spray congealing* e leito fluidizado. E entre os métodos químicos podem-se destacar: a polimerização interfacial e a polimerização *in situ*. Nos métodos físico-químicos estão a coacervação, a emulsificação e evaporação do solvente, a pulverização em agente formador de reticulação e o envolvimento lipossômico (SILVA, et al., 2003; CHENG et al., 2009; JYOTHI et al., 2010). Mesmo assim, diversas outras técnicas também tem permitido a

obtenção de partículas, entre elas podem ser destacadas o *eletrospray*, no qual gotículas carregadas são pulverizadas em um campo com diferença de potencial elétrico e com a perda de solvente e a instabilidade das cargas superficiais as gotículas acabam rompendo (STEWART, 1999; RYANA; SMITHB; STARKA, 2012). A nanoprecipitação é um método baseado na emulsificação espontânea da fase interna orgânica contendo o polímero dissolvido na fase externa aquosa (SILVA et al., 2003; BILATI; ALLEMANN; DOELKER, 2005).

Para a escolha adequada do método a ser utilizado deve-se levar em consideração as propriedades do polímero, assim como as propriedades do composto que se pretende encapsular, mais especificamente a solubilidade do fármaco (PÉREZ et al., 2000; SILVA et al., 2003; LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). Neste sentido, as micropartículas constituem formas de depósito nas quais a liberação do fármaco depende de alguns fatores, que incluem a natureza do polímero, propriedades físico-químicas do fármaco e/ou fatores da formulação. A remoção do fármaco da forma farmacêutica passa a ser um passo limitante do processo de absorção e pode ser controlada a partir da escolha adequada dos materiais (principalmente do polímero), métodos e processos de obtenção das micropartículas (BRUSCHI, 2002; HASSAN et al., 2009).

Assim, dependendo do processo de micro/nanoencapsulação escolhido, as partículas obtidas podem ser denominadas genericamente de micropartículas que, em relação à morfologia e à estrutura interna, se dividem em dois tipos: microesferas e microcápsulas (Figura 1). Essas micropartículas podem apresentar um tamanho que varia de 1 a 1000 μm , enquanto as estruturas inferiores a 1 μm são chamadas de nanopartículas (ARSHADY, 1991; SILVA et al, 2003).

Figura 1. Modelo esquemático dos diferentes tipos de micropartículas.



Fonte: Silva et al., 2003 adaptado de Aftabrouhad, Doelker, 1992.

1.1.3 Materiais utilizados

Os polímeros podem apresentar uma origem natural, ou apresentarem um precursor da natureza, ou, ainda, podem ser obtidos através de síntese, sendo empregados como excipientes farmacêuticos para a formulação de cosméticos e medicamentos de liberação convencional e de liberação modificada (CAHN, 2001; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; HASIRCI et al., 2011). Os polímeros sintéticos podem ser obtidos por condensação ou adição polimérica, e apresentarem diferentes pesos moleculares, formas estruturais, e organizações monoméricas. Eles são utilizados em diversos setores da indústria, como o têxtil, automotiva, em bens de uso doméstico, dispositivos médicos e farmacêuticos. Como existe uma diversidade nas aplicações desses materiais é preciso uma grande variedade de polímeros, os quais podem ser classificados de diversas formas: quanto a sua origem, processo de polimerização, forma estrutural das cadeias, composição dessas cadeias (homopolímeros e heteropolímeros), estrutura, peso molecular, comportamento térmico, disposição dos monômeros, assim como pelas ligações entre as unidades de repetições (HASIRCI et al., 2011).

Neste sentido, para o desenvolvimento de micro/nanopartículas para uso oral, parenteral, pulmonar ou tópica, uma gama desses materiais poliméricos pode ser utilizada. E, de acordo com a solubilidade em água, tais polímeros podem ser divididos em polímeros hidrofílicos e polímeros hidrofóbicos ou inertes (COLLETT; MORETON, 2005).

Os polímeros hidrofílicos mais utilizados são os derivados da celulose, como a metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose sódica; polímeros não-celulósicos como alginato de sódio, quitosana, goma xantana; os copolímeros do ácido acrílico e a gelatina (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Com o uso desses polímeros, a liberação do fármaco ocorre pela absorção de água, intumescimento da matriz e posterior difusão do fármaco pela camada de gel e/ou pela erosão dessa camada (HARDY et al., 2007; ESCUDERO; FERRERO; JIMÉNEZ-CASTELLANOS, 2008).

Assim, a gelatina é um polímero hidrofílico natural, composta por uma mistura de frações proteicas, com massa molecular entre 20000 e 200000 Da, com característica biodegradável e não tóxica (BRUSCHI et al., 2003). Esta substância pode ser obtida por duas vias: pela hidrólise ácida parcial (gelatina tipo A) e/ou pela hidrólise básica parcial (gelatina tipo B) de tecidos animais ricos em colágeno. A gelatina é amplamente utilizada como doadora de viscosidade, agente de revestimento, agente suspensor e formadora de filmes,

devido principalmente ao polímero ter cadeia longa e linear (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Em relação aos polímeros insolúveis ou inertes, os compostos mais empregados são: etilcelulose, acetato de etilcelulose, cloreto de polivinila, polietileno e algumas ceras, como a cera de carnaúba, cera de abelha, palmitato de cetila (KATIKANENI et al., 1995; DASHORA; SARAF; SARAF, 2006; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007; AVANÇO; BRUSCHI, 2008; MUSCHERT et al., 2009; MILANOVIC et al., 2010; ZANG et al., 2012).

Ambos os tipos de polímeros podem apresentar propriedades bio/mucoadesivas, as quais são utilizadas com o propósito de melhor liberação de fármacos, assim como a eficiência terapêutica dos mesmos. Para isso é importante que eles apresentem uma rápida adesão à camada de muco, sem que qualquer propriedade física seja alterada interferindo, dessa forma, o mínimo possível na liberação do fármaco, ser biodegradável, porém sem produzir compostos tóxicos, e apresentarem um custo reduzido (SERRA; DOMÉNECH; PEPPAS, 2009; ROY, 2009; CARVALHO et al., 2010; BIN CHOY, 2011).

Em geral, vários biopolímeros apresentam propriedades bioadesivas e podem ser utilizados para diversos fins terapêuticos. O Carbopol® 934, a pectina, polivinilpirrolidona, goma de guar e as resinas de anidrido maleico de etileno, são alguns exemplos de polímeros que apresentam características adesivas (BALOGLU et al., 2002). Esses materiais podem ser amplamente classificados em dois grupos, nomeados como específicos e não específicos. Os polímeros bioadesivos específicos (p.e. lecitina, fimbrias) tem a habilidade de aderirem a estruturas químicas específicas dentro de moléculas biológicas enquanto os polímeros bioadesivos não específicos (p.e. ácido poliacrílico, cianoacrilatos) têm a habilidade de se ligar as células superficiais do corpo e a camada mucosa (DUCHEN, PONCHEL, 1997; SMART, 2005; ROY, 2009; CARVALHO et al., 2010; CHANDRAKALA, 2011).

Dessa forma, os polímeros bio/mucoadesivos possuem uma grande aplicação farmacêutica, e ao atingirem um contato íntimo com a mucosa, permitem que os ativos administrados exerçam sua ação local ou sistêmica, com utilização de baixas concentrações e com uma menor frequência de doses. Além, da redução do metabolismo hepático de primeira passagem dos fármacos, são algumas das vantagens da utilização desses materiais (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009).

1.2 Própolis

O termo própolis é derivado do grego, significando em defesa (*pro*) da cidade (*polis*) (GHISALBERTI, 1979). Ela é empregada para defesa da colmeia, a cidade das abelhas (MOREIRA, 1986; BURDOCK, 1998; BRUSCHI, 2002). As abelhas, a partir de coleta de material resinoso, gomoso ou balsâmico de botões de flores, sépalas e pétalas, folhas, caules e cascas de árvores, produzem esse material. Essa resina fortemente adesiva sofre ação de enzimas salivares da própria abelha, principalmente a enzima 13-glicosidase, formando a própolis e o material, parcialmente digerido, é misturado com cera e usado na colmeia para tampar frestas e proteger da entrada de intrusos (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; BRUSCHI et al., 2002). Sua cor varia de amarelo-esverdeado a marrom-escuro (Figura 2), dependendo da sua origem e idade, com odor característico e picante (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998; BRUSCHI, 2006).

A própolis é difícil de ser removida da pele humana, uma vez que ela interage fortemente com os óleos e proteínas da pele. É dura e quebradiça quando fria, mas macia e maleável quando aquecida (GHISALBERTI, 1979). Normalmente a própolis *in natura* é processada e o extrato obtido é utilizado como forma farmacêutica final ou intermediária (BRUSCHI, 2006).

Figura 2. Aspecto macroscópico da própolis *in natura* e triturada.



A utilização de própolis já era descrita pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. Era conhecida e utilizada pelos sacerdotes do Egito (1700 a.C.) como auxiliar na mumificação de cadáveres (propriedades anti-putrefativas). Os gregos são os responsáveis pelo seu nome e, entre os quais Hipócrates, a adotou como cicatrizante (GHISALBERTI,

1979; BRUSCHI, 2006; DE FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007). Aristóteles a cita em *História dos Animais* como “remédio para os males da pele, chagas e supurações”. No Século II, Galeno também cita a resina nos seus tratados. Nas Américas, os Incas a utilizavam no tratamento de infecções febris. São encontrados a partir do Século XII relatos de uso nos livros de medicina da Geórgia. Na idade moderna, o uso da própolis chegou a seu auge, como desinfetante e cicatrizante, na guerra dos Bôeres na África do Sul e também no começo do Século XIX no tratamento da doença de Chagas na França (PAMPLONA, 1997; DE FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007).

Ao longo dos tempos, essa resina vem sendo utilizada pelo homem por sua versatilidade farmacêutica (PEREIRA, 2011). Dentre elas podem-se destacar a atividade fungicida, antiúlcera, antiviral e imunoestimulante, hipotensiva, antioxidante, inflamatório, e atividade citostática as mais descritas, podendo ser citadas também a sua ação regeneradora tissular e cicatrizante nas úlceras e ação anestésica (BURDOCK, 1998; BRUSCHI, et al., 2003).

1.2.1 Origem botânica

A própolis é coletada na colmeia pelos apicultores, que raspam as paredes com uma ferramenta, normalmente um formão. Esta coleta é feita entre o outono e o inverno, depois que o mel é extraído (BRUSCHI, 2006).

Os constituintes da própolis refletem a sua origem botânica e, com o advento de análises químicas mais sofisticadas, pode-se identificar espécies de árvores que podem ser utilizadas como fonte de material para a produção de própolis pelas abelhas, como apresentado no quadro 1 (BURDOCK, 1998). Por exemplo, a própolis encontrada em algumas regiões do Mediterrâneo tem como componentes principais ácidos diterpênicos (TRUSHEVA et al., 2003; SFORCIN; BANKOVA, 2011), enquanto no Brasil, onde a própolis verde é descrita a ocorrência desses compostos é muito mais restrito (PARK et al., 2002; SFORCIN; BANKOVA, 2011).

Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, a principal fonte de própolis é o exsudato de brotos de choupo (*Populus* sp.). Menos comumente, em outras partes do mundo, outros gêneros, como *Bétula* sp. bastante comum na Rússia (SFORCIN; BANKOVA, 2011), *Pinus* sp. e *Acacia* sp. são utilizados como fonte para as abelhas produzirem própolis

(KÖNIG, 1985). Na Nova Zelândia, a própolis origina-se também de espécies do gênero *Populus* (BANKOVA et al., 2000).

Quadro 1 - Origem botânica da própolis

Tipo de Própolis	Origem Geográfica	Gênero e espécie principais	Referencias
Choupo (“ <i>poplar</i> ”)	Europa, América do Norte, Nova Zelândia, Regiões não tropicais da Ásia	<i>Populus</i> spp	BANKOVA et al., 1994; MARCUCCI, 1995; ;POPOVA et al., 2004; SFORCIN; BANKOVA, 2011
Verde (alecrim)	Brasil	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	BRUSCHI et al., 2002; DE FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007; SFORCIN; BANKOVA, 2011
Betula (“ <i>Birch</i> ”)	Rússia, Polônia	<i>Betula</i> sp.	MARCUCCI, 1995
Vermelha	Cuba, Brasil, México	<i>Dalbergia</i> spp. <i>Clusia</i> spp.	BANKOVA, 2005; SFORCIN; BANKOVA, 2011
Mediterrânea	Sicília, Grécia, Creta, Malta	Cupressaceae	TRUSHEVA et al., 2003; SFORCIN; BANKOVA, 2011
“Clusia”	Cuba, Venezuela	<i>Clusia</i> spp.	SFORCIN; BANKOVA, 2011
“Pacífica”	Região do Pacífico	<i>Macaranga tanarius</i>	SFORCIN; BANKOVA, 2011

Na América do Sul a espécie vegetal do gênero *Populus* não é nativa, existindo uma grande diversidade vegetal para a retirada de resina, o que dificulta a correlação da própolis como fonte produtora (KÖNIG, 1995; GREENAWAY et al., 1990). No Brasil existem diversas espécies de plantas visitadas pelas abelhas para a retirada de resina, estas plantas ainda não foram todas identificadas, mas destacam-se o alecrim do campo ou vassourinha (*Baccharis dracunculifolia*), pinheiros (*Pinus* sp.), aroeira (*Schinus terebenthifolius*) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (PAMPLONA, 1997; ABELHAS, 2002; BRUSCHI et al., 2002).

Na região Sul do Brasil apresenta uma grande diversidade vegetal, para a retirada de resinas pelas abelhas, possibilitando a ocorrência de diversos grupos distintos de própolis de

grande frequência, como apresentado no quadro acima, mesmo assim as amostras dessa região são quimicamente parecidas com a própolis choupo (PARK et al., 2000). Porém, na região sudoeste foi reportado a própolis verde cuja a principal origem botânica é a *Baccharis dracunculifolia*, esse tipo é bastante rico em ácidos fenólicos (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000; FUNARI; FERRO, 2006).

1.2.2 Composição química

A composição química da própolis é muito complexa e está diretamente relacionada com a flora existente ao redor do apiário, a qual pode variar de região para região em um mesmo território (BURDOCK, 1998; BRUSCHI et al., 2003; POPOVA et al., 2004).

A própolis, em geral, é constituída de aproximadamente 50% de compostos resinosos principalmente polifenóis (flavonoides e ácidos fenólicos), outros compostos são: 30% de cera, 10% de óleos voláteis e ácidos aromáticos, 5% de bálsamos e pólen e 5% de várias outras substâncias, como as impurezas (BURDOCK, 1998; BRUSCHI et al., 2003; IMHOF et al., 2005; CVEK et al., 2007; MIGUEL et al., 2010; PEREIRA, 2011). Mais de 300 constituintes já foram isolados (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; MIGUEL et al., 2010), principalmente polifenóis (flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres), terpenoides, esteroides e aminoácidos (MIGUEL et al., 2010).

Na Europa, América do Norte e Ásia a fonte de exsudado para as abelhas é a *Populus* sp., indicando que somente um tipo de própolis é encontrada nessas regiões (KÖNIG, 1985). Entretanto, na América do sul, onde a espécie *Populus* sp não é nativa, existe uma flora bastante diversificada para retirada da resina. Assim, por causa da diferença geográfica, amostras de própolis da Europa, América do Sul e Ásia têm composições químicas diferentes e, conseqüentemente, diversas atividades biológicas (BANSKOTA et al, 2001; KUMASAWA et al., 2004; MIGUEL et al., 2010).

No Brasil a fonte botânica predominante para coleta de material para produção da própolis é o alecrim do campo, *Baccharis* sp, na qual estudo tem demonstrado uma predominância de polifenóis (MARCUCCI, 1995; DE FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007; PEREIRA, 2011).

Os polifenóis são um dos mais importantes grupos de compostos que ocorrem em plantas. Em geral, os polifenóis são divididos em pelo menos 10 grupos dependendo da sua estrutura básica. Flavonoides e ácidos fenólicos constituem a mais importante classe de

polifenóis e conseqüentemente a mais importante classe compostos farmacologicamente ativos (DE FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007; MIGUEL et al, 2010; SULAIMAN et al., 2011). Esses flavonoides biossintetizados são obtidos a partir da via dos fenilpropanóides, e estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais (ZUANAZZI, 2000; BRUSCHI, 2006; MIGUEL et al, 2010).

Os flavonoides são protetores contra doenças causadas por micro-organismos em plantas. Eles podem servir como alimento dissuasivo contra insetos e animais herbívoros. Alguns destes podem reagir com enzimas e, como consequência, interferir em processos biológicos, possuindo atividade farmacológica potencial (BRUSCHI, 2002; ZUANAZZI, 2000), são capazes de eliminar os radicais livres protegendo lipídios ou compostos como a vitamina C (SULAIMAN et al., 2011).

A composição fenólica da maioria das amostras de própolis investigadas parece ser similar e isso pode ser explicado pela origem mais ou menos comum dos exsudatos (BANKOVA et al., 1994; BRUSCHI, 2006). Os constituintes fenólicos presentes na própolis podem ser distribuídos nos seguintes compostos: chalconas e di-hidrochalconas, flavanonas, flavonas e flavonóis, di-hidroflavonois e isoflavonas (BRUSCHI, 2006).

Flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos diterpênicos, e compostos fenólicos aparecem como os principais componentes responsáveis por suas atividades biológicas (MIGUEL et al., 2010). Neste sentido, diversos estudos tem demonstrado uma certa semelhança nos resultados da atividade antibacteriana, encontrada nas própolis de locais distintos. Mesmo apresentando origens diferentes, e conseqüentemente diferentes composições, a própolis possui efeitos antimicrobianos similares (SILICI; KOC, 2006; PEREIRA, 2011). Esses resultados, indicam que a sua composição varia qualitativa e quantitativamente com a origem geográfica e botânica. Por causa da diferença geográfica, amostras de própolis da Europa, América do Sul e Ásia têm composições químicas diferentes e, conseqüentemente, diversas atividades biológicas (BANSKOTA et al, 2001; KUMASAWA et al, 2004; MIGUEL et al, 2010).

Alguns ácidos aromáticos e alifáticos foram encontrados em extratos etanólicos de própolis, provavelmente em consequência da progressiva reação de outros ácidos presentes na própolis com o etanol durante o armazenamento desses extratos (BRUSCHI, 2006). Existe uma tendência a formação de etil éster, principalmente a partir de ácidos graxos (MARKHAM et al., 1996; BRUSCHI, 2006).

Diferentes compostos foram isolados e identificados na própolis, como alguns ésteres (di-hidrocinamato de metila, di-hidrocinamato de etila e fenilacetato de etila), derivados do ácido cinâmico e ácido p-cumárico, hidroquinona, assim como, derivados do canferol e dos

flavonoides prenilados (BANKOVA et al, 1995; BRUSCHI, 2006). Amostras de própolis brasileira tem apresentados derivados do ácido cafeoilquínico e do ácido quínico (MATSUI et al.; 2004; MISHIMA et al.; 2005a; BRUSCHI, 2006).

Bankova et al. (1994) observaram substanciais diferenças na composição de voláteis em própolis de diferentes locais, indicando que a composição destes na própolis varia de acordo com a origem dos exsudatos dos brotos de diferentes árvores. Mais de 30 constituintes foram identificados, sendo principalmente terpenóides, predominando os álcoois sesquiterpenóides e hidrocarbonetos sesquiterpenóides, acompanhados por alguns álcoois monoterpenos. Uma outra parte dos compostos voláteis é composta por alguns monoterpenos, principalmente aromáticos, fenóis, aldeídos, cetonas e ésteres que compõem o maior grupo junto com os terpenóides. A classe dos alcanos também foi encontrada, acompanhada por benzenos alquilados, por naftaleno e ésteres vinílicos (BANKOVA et al.; 1994; BRUSCHI, 2006).

A presença dos terpenos β -bisabolol e α -acetoxibetulenol foi observada, assim como os terpenoides α -terpineol, farnesol, β -cariofileno, δ -candineno, além dos mono e sesquiterpenos (BANKOVA et al.; 1995; FRANCO, 2001).

Dentre os carboidratos encontrados destacam-se as pentoses, hexoses e dissacarídeos, sendo a manose, o composto principal, a glicose, frutose e sacarose também foram identificadas em quantidade significativas. Alguns poliálcoois, como o xilitol e o mio-inositol, também foram encontradas (BRUSCHI, 2006).

As abelhas podem incorporar mais cera à própolis durante períodos nos quais as resinas se encontram escassas ou de difícil coleta (BURDOCK, 1998). Amostras de ceras coletadas a partir da própolis e dos alvéolos dos favos de *Apis mellifera*, observando-se a presença de 70 a 72% de ésteres, 14 a 15% de ácidos céricos livres, 12% de hidrocarbonetos (principalmente saturados) e 1% de álcoois e hidrocarbonetos (BRUSCHI, 2006; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

1.2.3 Atividade biológica

As atividades biológicas da própolis têm sido estudadas extensivamente nos países do leste da Europa (BURDOCK, 1998), no Brasil (BRUSCHI, 2006), na Argentina (MORENO et al., 2000) e no Japão (MATSUI et al., 2004; BRUSCHI, 2006).

Os extratos de própolis tem sido utilizados no tratamento de infecções, em problemas de pele, como antivirais e antiulceras, como fortalecedores do sistema imunológico, como cicatrizantes em escaras de decúbito, como antimicrobianos, adstringentes e anti-inflamatórios (SFORCIN et al, 2000, BRUSCHI, 2006; PEREIRA et al., 2011).

Existe um grande número de constituintes na própolis e em seus extratos que são comuns em vegetais, alguns dos quais são bem conhecidos pelas suas atividades biológicas. No entanto, dessas substâncias a mais contribui para os efeitos observados são em grande parte aos polifenóis, destacando-se os flavonoides e seus derivados, ácidos aromáticos, ácidos diterpênicos, e compostos fenólicos (FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007; BRUSCHI, 2006; MIGUEL et al, 2010). Os compostos fenólicos e seus derivados ocorrem naturalmente nas plantas e possuem uma grande variedade de efeitos bioquímicos, como atividade anti-inflamatória, citotóxica, aumento na imunidade inativa (ORSATTI et al., 2010; SFORCIN; BANKOVA, 2011) e capacidade de inibir enzimas dentre outras atividades biológicas benéficas para a saúde humana (MOREIRA, 1986; BANKOVA et al., 1999; BURDOCK, 1998; BRUSCHI et al., 2003; IMHOF et al., 2005; MARQUELE et al., 2005; BRUSCHI, 2006; CVEK et al., 2007; MIGUEL et al., 2010; FABRI et al 2011; PEREIRA, 2011; FERREIRA et al., 2013; TOLEDO, 2013). Apresentando, ainda, toxicidade contra células cancerígenas, ação hepatoprotetora (BANSKOTA et al., 2001).

O progresso das pesquisas farmacológicas com própolis tem comprovado cientificamente os seus efeitos hepatoprotetor, gastroprotetor, neuroprotetor e antiulcerogênico, assim como as suas atividades analgésica, antitumoral, antioxidante pela remoção de radicais livres em excesso de nosso organismo, anti-hipertensiva, antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antiviral (MORENO et al., 2000; MARQUELE et al., 2005; BANSKOTA et al., 2001; BARROS et al., 2008; SFORCIN; BANKOVA, 2011; FABRI et al 2011; PEREIRA, 2011; FERREIRA et al., 2013; TOLEDO, 2013).

1.2.4 Formas farmacêuticas com própolis

Em consequência dos efeitos benéficos a saúde humana, a própolis é bastante difundida na terapia e na prevenção de doenças. O extrato etanólico de própolis pode ser utilizado isoladamente, como forma farmacêutica final, ou ser incorporado a medicamentos, alimentos, bebidas ou cosméticos (BURDOCK, 1998; AVANÇO, BRUSCHI, 2008; PEREIRA, 2011). Porém, o extrato etanólico apresenta algumas desvantagens como o forte e

desagradável odor, sabor aromático e a concentração de etanol elevado. E estas características podem causar problemas durante o transporte, na embalagem e na adesão do paciente ao tratamento (BRUSCHI et al., 2003; AVANÇO; BRUSCHI, 2008).

As aplicações incluem uma infinidade de itens dermatológicos e cosméticos, tais como cremes faciais, pomadas, loções e soluções. Para a melhora da saúde, os produtos à base de própolis são utilizados na prevenção de doenças inflamatórias, cardíacas, diabetes e do câncer, principalmente pela atividade antioxidante (PEREIRA, 2011; SULAIMAN et al., 2011). Além disso, os produtos à base de própolis têm sido utilizados no tratamento de reumatismo, na odontologia, a própolis é utilizada em cremes e em enxaguatórios bucais para o tratamento de gengivites, queilites, estomatites, periodontite e na endodontite (AVANÇO, BRUSCHI, 2008; PEREIRA, 2011). E os extratos podem, ainda, ser comercializados em comprimidos, pó e goma de mascar (BURDOCK, 1998).

Neste sentido, Bruschi et al. (2003) demonstraram ser possível a preparação de micropartículas de gelatina contendo própolis pelo método de secagem por pulverização, o qual apresentou-se como um método viável e barato, no qual possível a transformação de uma dose líquida dos extratos de própolis em uma forma sólida sem o gosto forte, odor aromático e a alta concentração de etanol. As micropartículas melhoraram a manipulação e o armazenamento da própolis, além de permitirem uma taxa de liberação mais lenta (BRUSCHI et al., 2004).

As micropartículas contendo os extratos de própolis, também, podem ser obtidas pelo método de emulsificação e evaporação de solvente utilizando, para a estruturação das mesmo um polímero hidrofóbico, a etilcelulose (AVANÇO; BRUSCHI, 2008). Ferreira et al. (2013) mostraram que esse sistema de microestrutura possuiu uma liberação mais lenta. A aplicação de micropartículas pode melhorar e aumentar a efeito terapêutico a partir de materiais biomédicos ou de fármacos, assim, considerando que a mistura de própolis e metronidazol apresentou atividade antimicrobiana. As estruturas obtidas surgem ser um possível agente para o tratamento da doenças, nas quais as micropartículas podem ser incorporadas em algumas formas de dosagem, tais como em sistemas semissólidos, e ser administradas com mais facilidade e segurança.

Neste contexto, a própolis, uma goma resina fortemente adesiva que tem sido utilizado na endodontia pelas seguintes propriedades farmacêuticas: antimicrobiana (KOO et al., 2000; SANTOS et al, 2002), anti-inflamatória e atividade antioxidante (BRUSCHI et al.; 2003; MARQUELE et al., 2005; FABRI et al 2011; PEREIRA, 2011) e o citrato de sildenafil, que ao aumentar a concentração de óxido nítrico, reduz o processo inflamatório

melhorando a condição da polpa, podem ser usados no tratamento da conservação da polpa dentária. Assim, o desenvolvimento de sistemas semissólidos contendo extrato de própolis (BRUSCHI et al., 2006) e o citrato de sildenafila para aplicação endodôntica demonstrou propriedades mecânicas e bioadesivas benéficas tanto para inserção das formulações para o espaço endodôntico quanto para a retenção subsequente das mesmas. O perfil de liberação dos sistemas semissólidos apresentou uma liberação por um período de tempo prolongado para o extrato de própolis, enquanto a liberação de sildenafila sistema bioadesivo foi mais rápida. Estas propriedades indicam um potencial para o tratamento de proteção pulpar (FABRI et al, 2011).

Os sistemas mucoadesivos termossensíveis contendo micropartículas de própolis, também foram avaliados para tratamento de candidíase vulvovaginal. Esses sistemas foram formados por um polímero termossensível, poloxamer 407, e por um polímero mucoadesivo, Carbopol 934P®, possibilitou a preparação de micropartículas de própolis *in situ*. Os mesmos apresentaram temperatura de gelificação, comportamento reológico e mecânico, de mucoadesão e atividade antifúngica *in vitro* com perfil de liberação prolongado (PEREIRA et al., 2011).

1.2.5 Subproduto de própolis

No processo de extração pelo etanol dos constituintes da própolis, uma parte da mesma (menor quantidade) é levada pelo líquido extrator. Enquanto, a outra parte (maior parte) fica por ser dissolvida, constituindo, assim, o resíduo (SP). O extrato é separado do subproduto pelo processo de filtração (FRANCO et al., 2000; BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006; TOLEDO, 2013).

Desta forma, a utilização do subproduto da extração de própolis, anteriormente descartado, pode ser avaliada, pois pode apresentar polifenóis, os grandes responsáveis pelas atividades terapêuticas dessa própolis (FRANCO et al., 2000; BRUSCHI, 2006; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; PAGAR et al., 2011; HASIRCI et al., 2011; SULAIMAN et al., 2011). Outras substâncias que estão presentes no SP podem-se destacar as resinas e gomas.

Muitos desses sistemas são estruturados pela organização espontânea ou não de polímeros naturais, semissintéticos e/ou sintéticos, biodegradáveis ou não. Dessa forma, para a formação dessas estruturas e para que as mesmas desempenhem a função desejada, misturas

complexas de diferentes polímeros podem ser requeridas (MAINARDES; EVANGELISTA, 2005; TOLEDO, 2013).

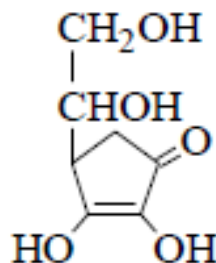
Assim, em virtude da presença destas classes de substâncias o subproduto obtido da extração de própolis pode servir como matéria-prima na estruturação de sistemas de liberação de fármacos (TOLEDO, 2013).

1.3 Vitamina C

A vitamina C ou ácido L-ascórbico (AA) pode ser obtido pela extração a partir das roseiras, das frutas cítricas, dos frutos maduros de *Capsicum annuum* L., ou pode ser preparada sinteticamente, a partir de uma dextrose (C₆H₁₂O₆) que é convertida em L-ácido ascórbico (C₆H₈O₆) por reação de oxidação onde quatro átomos de hidrogênio são removidos para formar duas moléculas de água (PEREIRA, 2008; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

O ácido ascórbico (Figura 3) é um importante cofator de diversas reação fisiológicas e processos bioquímicos centrais, incluindo a hidroxilação de pós-translacional de prolina e lisina em colágeno e outras proteínas do tecido conjuntivo; expressão do gene do colágeno, síntese de norepinefrina e hormônios adrenais; ativação de muitos hormônios peptídicos e síntese de carnitina. Além dessas funções, o AA atua como um excelente antioxidante, facilita a absorção intestinal ferro e a manutenção deste nutriente no plasma na forma reduzida (PHILLIPS et al., 2010).

Figura 3. Estrutura química da vitamina C.



Fonte: PEZZUTO; PARK, 2002

Por ser um importante antioxidante solúvel em água, o mesmo atua tanto na captura do oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-os,

consequentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autooxidação, quanto na regeneração de antioxidantes primários (PEREIRA, 2008). Diante deste contexto, a vitamina C foi escolhida como o fármaco modelo para avaliar a capacidade de encapsulação e proteção das nanopartículas obtidas pelo subproduto da própolis e gelatina.

Assim, por ser um composto que protege a pele por eliminação e destruição de radicais livres e derivados reativos de oxigênio, como os radicais hidroxilas peroxilas, anions superóxidos e de nitrogênio, dióxido de carbono bem como espécies não radicalares como hipocloroso ácido, ozônio, oxigênio singlete, espécies nitrosantes (N_2O_3/N_2O_4), nitróxido e peroxinitrito Além da eliminação de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, o ácido ascórbico pode regenerar outras moléculas antioxidantes, tais como a glutationa (GSH) o betacaroteno e o α -tocoferol (CARR; FREI, 1999).

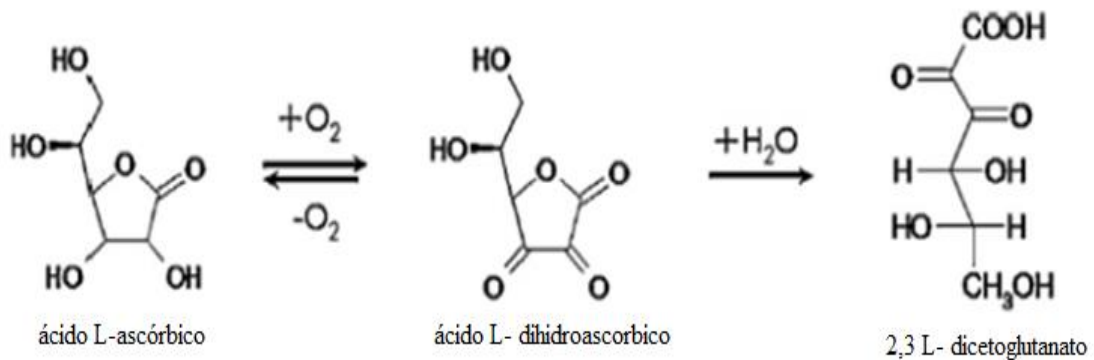
Neste sentido, o AA pode ser utilizado topicamente devido à sua atividade despigmentante da pele, pela sua capacidade de reduzir as rugas por promover a síntese de colágeno, assim, por seus efeitos favoráveis a vitamina C tem sido muito utilizada em preparações farmacêuticas e cosméticas (PHILLIPS et al., 2010; PIÃO et al., 2011; WANG et al., 2011). Além da sua grande aplicação nos cuidados com a pele, inúmeros ensaios *in vitro* e experiências *in vivo* tem sido realizadas com a finalidade de avaliar a capacidade do ácido ascórbico em reduzir o risco alguns tipos de cânceres, como o câncer colo-retal (LOGUE; FROMMER, 1980), assim como possibilidade de evitar efeitos adversos, aumentar os efeitos, e diminuir resistência aos agentes quimioterápicos, por exemplo, que o co-tratamento de vitamina C com doxorrubicina, gerou uma redução da toxicidade da doxorrubicina, tanto em ratos e em cobaias (ESPOSITO et al., 2002; VANISREE; SHYAMALADEVI, 2006).

No entanto, a luz, pH, temperatura, exposição ao oxigênio, a presença de metais oxidante, e as enzimas oxidantes podem ser controlados durante os ensaios em si, mas esses parâmetros também devem ser controlados durante a preparação das amostras para a análise. A maceração especialmente se os procedimentos envolvem a ruptura das células que libertam enzimas oxidantes, podem induzir a falha durante a avaliação da estabilidade da vitamina C, tanto no produto bruto quanto no processamento da amostra. Resultando em grandes erros nos resultados analíticos (VANISREE; SHYAMALADEVI, 2006; VERRAX; CALDERON, 2008; PHILLIPS et al., 2010).

A rápida degradação da vitamina C em soluções aquosas ainda é uma grande desvantagem para a concepção de uma variedade de formulações tópicas de AA, o que tem limitado o seu uso (PIÃO et al., 2011). A via de degradação mais provável para a AA em soluções aquosas é a oxidação (Figura 4) do AA em ácido L-dehidroascorbico (DHA),

seguido por hidrólises irreversíveis a 2,3-L dicetogulonato (2,3-KDG), um composto inativo primário. De acordo com esta via de degradação, muitos autores relataram que o AA ou ascorbil-palmitato podem ser protegidos quando incorporados em formulações que contenham sistemas emulsionados, ou sistemas veiculares coloidais em que as interfaces atuam como uma barreira contra o oxigênio (VANISREE; SHYAMALADEVI, 2006; PIÃO et al., 2011).

Figura 4. Via da degradação do ácido ascórbico em soluções aquosas.



Fonte: PIÃO et. al., 2011

Dessa forma, o presente trabalho, teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de subproduto da extração da própolis, utilizando a gelatina como reforçador de estrutura. Além disso, a vitamina C foi incorporado as partículas como fármaco modelo, no sentido de investigar as características físico-químicas desse sistema e sua potencial aplicação como uma plataforma de liberação modificada do ativo.

Dentro deste contexto, a própolis foi avaliada quanto a sua qualidade e, posteriormente, utilizada para obtenção do SP. As características observadas do mesmo levaram ao desenvolvimento de técnicas de preparação das nanopartículas, com o adjuvante polimérico e vitamina C, e a avaliação das mesmas foram caracterizadas por meio de análise morfológica e de características de superfície, análise granulométrica. Por fim, avaliou-se o teor de vitamina C nas partículas, a atividade antioxidante das mesmas e o perfil de liberação *in vitro* do fármaco modelo.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas contendo ácido ascórbico (vitamina C) preparadas a partir do subproduto da extração de própolis.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter e avaliar a qualidade da própolis
- Preparar e avaliar a qualidade do extrato de própolis.
- Obter e caracterizar o subproduto obtido a partir da preparação do extrato de própolis.
- Validar metodologia analítica por CLAE para quantificação da vitamina C
- Avaliar a atividade antioxidante da vitamina C, assim como a sua qualidade
- Obter e caracterizar nanopartículas de subproduto de própolis.
- Obter e caracterizar nanopartículas de subproduto de própolis contendo ácido ascórbico.
- Avaliar a atividade antioxidante das estruturas obtidas.
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* da vitamina C a partir das estruturas obtidas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Reagentes, solventes, soluções e matérias-primas

- ABTS (Sigma-Aldrich®)
- Acetato de etila grau analítico (FMaia®)
- Acetona grau analítico (FMaia®)
- Acetonitrila grau analítico (J.T. Baker®)
- Ácido acético glacial grau PA (Dinâmica®)
- Ácido clorídrico grau analítico (Vetec®)
- Ácido L-ascórbico (Henrifarma®)
- Ácido ortofosfórico 85,0% (Synth®)
- Água purificada
- Carbonato de sódio (Nuclear®)
- DPPH (Sigma-Aldrich®)
- Etanol 96 °GL (CereAlcool®)
- Éter de petróleo (Nuclear®)
- Etilcelulose NF 20 grau analítico (Dow®)
- Gelatina tipo A (Sigma-Aldrich®)
- Metanol grau analítico (J.T. Baker®)
- Padrão ácido L-ascórbico (BioXtra- Sigma-Aldrich®)
- Padrão ácido gálico monohidratado (Sigma-Aldrich®)
- Persulfato de potássio (Sigma-Aldrich®)
- Polissorbato 80 grau analítico (Synth®)
- Reagente fosfomolibdotúngstico R (*Folin-Ciocalteau*)
- Solução de carbonato de sódio 14,06% (p/V)
- Sulfato de sódio grau analítico (Synth®)
- Trolox (Sigma-Aldrich®)

3.1.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador mecânico (Reidolph®)
- Agitador mecânico (RW 20 Digital - Ika®)
- Agitador magnético (Labdisc - Ika®)
- Agitador magnético com aquecimento (Fisatom®)
- Analisador térmico (Nietzsch STA PC/PG®)
- Aparelho medidor de pH (Gehaka®)
- Balança analítica (Shimatzu®)
- Balança semi-analítica (Gehaka®)
- Banho-maria (Fisatom®)
- Células de difusão de Franz modificadas
- Centrifuga (206BL-Fanen®)
- Coluna cromatográfica líquida de alta eficiência RP-18 (Varian®- Chromsep® 5 µm), com dimensões de 250 x 4,6 mm e pré-coluna embutida.
- Cubetas de quartzo para espectrofotometria com 3,0 mL de capacidade volumétrica e caminho óptico de 1,0 cm
- Equipamento de CLAE (LC20AT, Shimadzu®)
- Equipamento de CLAE (Waters®)
- Estufa digital microprocessada para esterilização e secagem (SPLabor®)
- Espectrofotômetro UV-VIS (UV 1650 PC - Shimadzu®)
- Forno Mufla (Quimis®)
- Manta aquecedora termostatzada (Fisatom®)
- Membrana de acetato de celulose PM 12400 (Sigma-Aldrich®)
- Micropipeta 100-1000 µL (Eppendorf®)
- Micropipeta 20-100 µL (Gilson®)
- Microscópio óptico (KozoOptics®)
- Microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu® SS550)
- Sistema purificador de água por osmose reversa (OS 20 LX - Gehaka®)
- Turboextrator (Mallory®)

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta e avaliação da qualidade da própolis

Própolis, provenientes de colmeias de abelhas *Apis mellifera* L., foram adquiridas da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente à Universidade Estadual de Maringá (UEM), na cidade de Maringá, PR, coletadas nos anos de 1997, 2002, 2003. Após a coleta, estas amostras foram submetidas à refrigeração por 24 horas. Depois deste tempo, foram trituradas em liquidificador industrial, misturadas e acondicionada em saco plástico e armazenada em freezer (-18 °C).

3.2.1.1 Determinação da perda por dessecação

A perda por dessecação foi determinada por método gravimétrico, empregando-se balança analítica com sistema de secagem por infravermelho. Amostras de aproximadamente 3 g da droga triturada foram exatamente pesadas, em bandejas de alumínio taradas, e dessecadas, à temperatura de 110 °C, até peso constante (FARMACOPÉIA, 2010). O resultado foi calculado em relação a 100 g de droga, representando a média de seis determinações.

3.2.1.2 Determinação do teor de ceras

Aproximadamente 1 g de própolis triturada, pesado em balança analítica, foi colocado em frasco de vidro, acrescido de 10 mL de éter de petróleo e submetido à agitação. Em seguida o frasco com o material foi submetido a aquecimento até ebulição do éter de petróleo por 5 minutos. Foram, então, acrescentados mais 10 mL de éter de petróleo e submetidos a aquecimento (ebulição) por mais 5 minutos. Repetiu o processo por mais uma vez. A fração etérea foi desprezada e a amostra de própolis remanescente foi seca em dessecador sendo, posteriormente, submetida à nova pesagem após arrefecimento (BRUSCHI et al., 2002). O resultado foi expresso em porcentagem (% p/p) representando a média de três determinações.

3.2.1.3 Determinação do teor de cinzas totais

O cadinho de porcelana foi previamente calcinado em mufla a 450 °C por 30 minutos e, após ser resfriado em dessecador, o seu peso (tara) foi determinado em balança analítica. Neste, foram adicionados cerca de 3,0 g da própolis triturada, pesados em balança analítica, os quais foram incinerados e, posteriormente, submetidos à calcinação em mufla à temperatura de 450 °C por duas horas. Em seguida, foram colocados em dessecador para arrefecimento e pesagem posterior. Repetiu-se a técnica até peso constante (FARMACOPÉIA, 2010). O resultado foi expresso em porcentagem em peso de cinzas na droga (% , p/p) e representa a média de seis determinações.

3.2.1.4 Determinação do teor de extrativos

Cerca de 1,0 g da droga triturada foi pesado em balança analítica e submetido à decocção com 100,0 g de água, durante 10 minutos. Após resfriamento, o volume foi completado para 100,0 mL. Filtrou-se a solução resultante em papel de filtro, desprezando-se os primeiros 20 mL. Do restante do filtrado, foram pesados exatamente cerca de 20 g, em pesa-filtro tarado e evaporado até secura em banho-maria, sob agitação ocasional. O resíduo foi dessecado em balança analítica com sistema de secagem por infravermelho à temperatura de 110 °C até peso constante (DEUTSCHES, 1994). O resultado foi obtido em massa percentual segundo a equação 1:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m} \quad (1)$$

onde:

TE = teor de extrativos (% , p/p);

g = massa de resíduo seco (g);

m = massa da amostra (g);

FD = fator de diluição (5).

O resultado que foi representado através da média de três determinações.

3.2.1.5 Determinação da fração extraível em etanol 96 °GL

Em pesa-filtro previamente tarado, foram pesados em balança analítica cerca de 20 g de extrato etanólico de própolis a 1% (p/p), preparado sob refluxo. A amostra foi evaporada até secura em banho-maria, sob agitação ocasional. O resíduo foi dessecado em balança analítica com sistema de secagem por infravermelho à temperatura de 110 °C até peso constante (FRANCO, 2001). O resultado foi obtido em massa percentual segundo a equação 2:

$$TE = \frac{g \cdot 100}{m} \quad (2)$$

onde:

TE = teor de extrativos (% p/p);

g = massa de resíduo seco (g);

m = massa da droga.

O resultado foi representado pela média de três determinações.

3.2.2 Preparação e avaliação do extrato de própolis

Foi preparado extrato contendo 30% (p/p) de própolis em etanol 96 °GL. Foram pesados 300,0 g de própolis os quais foram completados para 1000,0 g com álcool, no copo do turboextrator, permanecendo em repouso durante 24 horas, sob refrigeração (8 °C). Após, o peso foi completado com álcool e o material foi submetido à turbo extração durante 15 minutos, com dois intervalos de repouso de 5 minutos. O extrato foi submetido à refrigeração por 1 hora sendo, em seguida, filtrado sob vácuo e acondicionado em frasco de vidro âmbar com batoque interno de vedação e tampa rosca (BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006). O subproduto (SP) foi coletado a partir do papel de filtro, acondicionado em saco plástico e armazenado sob refrigeração.

3.2.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada utilizando-se aparelho medidor de pH calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 6,86 (FARMACOPÉIA, 2010). Foram realizadas três determinações para cada amostra.

3.2.2.2 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa do extrato foi determinada utilizando-se picnômetro calibrado a 20 °C, em ambiente com temperatura controlada (20 °C). Em balança analítica, o picnômetro foi previamente tarado e foram determinados os pesos do picnômetro contendo água e contendo extrato. A densidade foi calculada pelo quociente relativo à massa do extrato e a massa de água, após subtração da massa do picnômetro (FARMACOPÉIA, 2010). Foram realizadas três determinações para cada amostra.

3.2.2.3 Determinação do resíduo seco

Foram exatamente pesados 3 g de extrato em recipientes de alumínio previamente tarado. O excesso de solventes foi evaporado em chapa de aquecimento durante aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, os recipientes contendo os extratos foram levados para estufa (40 °C) por 45 minutos. Depois de decorrido esse tempo, foi pesado e levado novamente à estufa (110 °C) por mais 10 minutos, sendo pesado para verificar o peso constante (FARMACOPÉIA, 2010). Foram ser realizadas três determinações.

3.2.2.4 Determinação do teor alcoólico

Uma alíquota de 25,0 mL da solução extrativa foi colocada em balão de fundo redondo, acrescida de 100,0 mL de água purificada e submetida à destilação simples. Aproximadamente 90 mL de destilado foram recolhidos em balão volumétrico de 100,0 mL e resfriados à temperatura ambiente. O volume foi completado com água purificada. A densidade do destilado foi determinada por areômetro e o teor de etanol, expresso em porcentagem (V/V) e a partir da densidade, o teor alcoólico foi determinado. (FARMACOPÉIA, 2010). Foram ser realizadas três determinações.

3.2.2.5 Determinação do teor de polifenóis totais

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se curva de análise previamente validada no laboratório. Na qual, a linearidade do método de quantificação do teor de polifenóis totais do extrato etanólico de própolis foi realizada a partir de diluições da

solução-mãe de ácido gálico. A curva analítica foi determinada investigando-se o ácido gálico em seis níveis de concentração linear (0,0125 - 0,1125 µg/mL) (PEREIRA et al., 2013).

Em balões volumétricos de 25 mL, foram acrescentados 10 mL de água purificada e adicionou-se 2,0 µL de extrato. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL do reagente fosfomolibdotúngstico R (*Folin-Ciocalteu*) e o volume foi completado com solução aquosa de carbonato de sódio a 14,06% (p/V). Na obtenção das soluções compensatórias foram utilizadas duas soluções, uma contendo água e outra contendo extrato, e ambas tiveram o volume completado com a solução aquosa de carbonato de sódio. As soluções foram deixadas em repouso ao abrigo da luz, após 15 minutos, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 760$ nm) (FARMACOPÉIA, 2010). Os ensaios foram representados pela média de seis determinações e o resultado de cada determinação.

3.2.3 Obtenção e caracterização do subproduto

O subproduto (SP) foi obtido durante a preparação do extrato etanólico de própolis 30% (p/p), como previamente descrito no item 3.2.2.

3.2.3.1 Determinação do teor de ceras

Aproximadamente 1 g de SP foi pesado em balança analítica, foi colocado em frasco de vidro, acrescido de 10 mL de éter de petróleo e submetido à agitação. Em seguida, o frasco com o material foi submetido a aquecimento até ebulição do éter de petróleo por 5 minutos. Foram, então, acrescentados mais 10 mL de éter de petróleo e submetidos a aquecimento (ebulição) por mais 5 minutos. Repetir o processo por mais uma vez. A fração etérea foi desprezada e a amostra de SP remanescente foi seca, sendo posteriormente submetida à nova pesagem após arrefecimento (BRUSCHI, et al., 2002). O resultado foi expresso em porcentagem (% , p/p) representando a média de três determinações.

3.2.3.2 Determinação da fração solúvel do subproduto em diferentes solventes

Foram utilizados como solvente a água purificada, etanol 60 °GL, 77 °GL ou 96 °GL. A quantidade de 10 g de SP com 90 g de cada solvente foram colocadas em contato, agitadas manualmente e armazenadas em recipiente adequado pelo período de 24 horas, sem nova

agitação. Posteriormente, cada preparação, foi filtrada através de papel de filtro e para cada solução extrativa obtida foi realizada a determinação de resíduo seco. Dessa forma, foi pesado em balança analítica, aproximadamente 5 g de cada extrato, em recipientes de alumínio, previamente tarados. Esses recipientes foram levados à chapa de aquecimento para evaporação do excesso de solvente. As amostras foram colocadas em estufa com ar circulante (110 °C) por um tempo de quarenta e cinco minutos. Após resfriamento, foram pesados e retornaram para estufa por mais 10 minutos, o procedimento foi repetido até peso constante. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra.

3.2.4 Preparação e caracterização de extratos etanólicos de subproduto

Foram preparados extratos contendo 30% (p/p) e 50% (p/p) de SP em etanol 96 °GL. O SP foi adicionado à quantidade de álcool, no copo do turboextrator, permanecendo em repouso por 24 horas. O peso foi completado com álcool e o material foi submetido à turboextração durante 15 minutos, com dois intervalos de repouso de cinco minutos. O extrato foi submetido à refrigeração (8 °C) por 1 hora sendo, em seguida, filtrado sob vácuo e acondicionado em frasco de vidro âmbar com batoque interno de vedação e tampa de rosca, e mantidos sob refrigeração.

Para a avaliação dos extratos, uma quantidade de 5,0 mL foi gotejada em água purificada, a 20 °C e sob agitação magnética constante. As dispersões obtidas foram avaliadas por microscopia óptica para avaliar a capacidade de formação de partículas, assim, como a quantidade das estruturas.

3.2.4.1 Determinação do resíduo seco do extrato do subproduto da própolis

Foram pesados 3 g de extrato em recipientes de alumínio previamente tarados, sendo que todo o processo de pesagem foi executado em balança analítica, o excesso dos solventes foi evaporado em chapa de aquecimento durante aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, os recipientes contendo os extratos foram levados para estufa (110 °C) por 45 minutos. Depois de decorrido esse tempo, foram pesados e levados novamente à estufa (110 °C) por mais 10 minutos, sendo pesados para verificar o peso constante.

3.2.4.2 Determinação do pH do extrato do subproduto da própolis

A determinação do pH foi realizada utilizando-se aparelho medidor de pH calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 6,86 (FARMACOPÉIA, 2010). Foram realizadas três determinações para cada amostra.

3.2.4.3 Determinação do teor de polifenóis totais do extrato do SP

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se curva de análise previamente validada no laboratório. Na qual, a linearidade do método de quantificação do teor de polifenóis totais do extrato etanólico de própolis foi realizada a partir de diluições da solução-mãe de ácido gálico. A curva analítica foi determinada investigando-se o ácido gálico em seis níveis de concentração linear (0,0125 - 0,1125 µg/mL) (PEREIRA et al., 2013).

Em balões volumétricos de 25 mL, foram acrescentados 10 mL de água purificada e adicionou-se 2,0 µL de extrato do subproduto de própolis. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL do reagente fosfomolibdotúngstico R (*Folin-Ciocalteu*) e o volume foi completado com solução aquosa de carbonato de sódio a 14,06% (p/V). Na obtenção das soluções compensatórias foram utilizadas duas soluções, uma contendo água e outra contendo extrato do subproduto de própolis, e ambas tiveram o volume completado com a solução aquosa de carbonato de sódio. As soluções foram deixadas em repouso ao abrigo da luz, após 15 minutos, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 760$ nm) (FARMACOPÉIA, 2010). Os ensaios foram representados pela média de três determinações e o resultado de cada determinação.

3.2.5 Metodologia analítica e avaliação cromatográfica da vitamina C

3.2.5.1 Condições cromatográficas

A análise foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, modelo LC20AT, com detecção no ultravioleta em 254 nm. Foi utilizada como fase estacionária coluna Varian®, Hipersil ODS 5 µm, 250 mm X 4,6 mm e pré-coluna. O software utilizado para a realização das análises foi o LC Solution. O sistema eluente foi composto por solução

aquosa de 0,2% de ácido ortofosfórico/metanol/acetonitrila (90:8:2, V/V/V), com pH de 2,08 com uma eluição de 1 mL/min em um sistema isocrático (MAIA et al., 2007).

3.2.5.2 Preparo da amostra

Foi preparada uma solução-mãe (SM) de ácido ascórbico (padrão primário) em fase móvel na concentração de 500 µg/mL. Em seguida, foram obtidas as diluições: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0 µg/mL, as mesmas foram filtradas em membrana de 0,45 µm. Uma alíquota de 20 µL das soluções padrões e as amostras foi analisada pelo método cromatográfico a temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C (KARPIŃSKA; SMYK; WOŁYNIĘC, 2005; MAIA et al., 2007).

3.2.5.3 Validação analítica

O método proposto para a quantificação da vitamina C foi validado de acordo com o guia da *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) e com a resolução brasileira RE Nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Os seguintes parâmetros foram determinados: especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez. Todas as análises foram realizadas em triplicata, e determinou-se a análise de resíduos e da falta de ajuste pelo teste de Fisher, com nível de confiança de 95%.

3.2.5.3.1 Especificidade

A avaliação da especificidade do método foi determinada pela injeção apenas da fase móvel e, em um segundo momento, pela injeção da solução padrão de vitamina C.

3.2.5.3.2 Linearidade

A linearidade do método foi determinada por meio da obtenção da curva de análise da vitamina C padrão. A curva analítica obtida pelas determinações foi utilizada para o cálculo da regressão linear e obtenção da equação da reta (curva de análise), coeficiente de correlação, inclinação da reta, intercepto do eixo y, análise de resíduos e análise da falta de ajuste.

3.2.5.3.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) foi calculado de acordo com a equação 3

$$LOD = \frac{\sigma \cdot 3}{S} \quad (3)$$

Onde, σ = erro padrão do intercepto (coeficiente linear); S = coeficiente angular.

O limite de quantificação (LOQ) foi calculado de acordo com a equação 4:

$$LOQ = \frac{\sigma \cdot 10}{S} \quad (4)$$

Onde, σ = erro padrão do intercepto (coeficiente linear); S = coeficiente angular.

3.2.5.3.4 Intervalo

Para a determinação do intervalo foi utilizada a faixa linear entre os limites superior e inferior, considerando o limite de quantificação.

3.2.5.3.5 Exatidão (acurácia)

A exatidão foi realizada pela análise da diferença entre o valor médio encontrado e o valor teórico de soluções de vitamina C, nas concentrações conhecidas de 2,0; 6,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Assim, cada solução de ácido ascórbico foi avaliada em triplicata (MAIA et al., 2007; LOPES; BRUSCHI; MELLO, 2009) e as porcentagens de recuperação foram calculadas de acordo com a equação 5:

$$Acuracia = \frac{C_{exp}}{C_{teorica}} \times 100 \quad (5)$$

Onde, C_{exp} = concentração experimental média, $C_{teorico}$ = concentração teórica.

3.2.5.3.6 Precisão

A precisão do procedimento analítico foi expressa como sendo o desvio padrão (s) e o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) de uma série de medições, e esta foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária.

3.2.5.3.6.1 Repetibilidade

Preparou-se uma SM da vitamina C (500 $\mu\text{g/mL}$) a qual foi diluída a três níveis de concentrações: 2,0, 6,0 e 8,0 $\mu\text{g/mL}$. A repetibilidade foi avaliada em relação a concentração de ácido ascórbico obtida em cada nível. As análises foram realizadas no mesmo dia, em triplicata, e os resultados foram reportados em desvio padrão relativo (CV%).

3.2.5.3.6.2 Precisão intermediária

Para a precisão intermediária, preparou-se SM da vitamina C (500 $\mu\text{g/mL}$), a qual foi diluída nas mesmas condições descritas para a repetibilidade, no entanto, foi realizada em outro dia, em triplicata e pelo mesmo analista. Os resultados foram reportados em desvio padrão relativo (CV%).

3.2.5.3.7 Robustez

A robustez do método foi determinada pela injeção de uma concentração conhecida (2,0 $\mu\text{g/mL}$) no cromatógrafo líquido da Waters®.

3.2.6 Vitamina C

3.2.6.1 Avaliação das características organolépticas e de solubilidade

O ácido ascórbico foi avaliado quanto às características macroscópicas de acordo com a FARMACOPEIA (2010).

3.2.6.2 Análise morfológica

Foi realizada a análise morfológica do ácido ascórbico por meio de fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu[®], Japão). O material foi colocado sobre uma fita dupla-face aderida a um suporte de metal e revestidas, sob atmosfera de argônio, com ouro coloidal (BRUSCHI, 2002; DOTA et al., 2010; FERREIRA et al., 2012).

3.2.6.3 Avaliação da atividade antioxidante

3.2.6.3.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH

Uma solução 0,3 mM de DPPH foi preparada dissolvendo 5,9 mg de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila em 50 mL de metanol e transferida para um frasco protegido da luz. Para a determinação da atividade antioxidante da vitamina C preparou-se uma solução mãe na concentração de 1 mg/mL. A partir desta SM, foram obtidas cinco soluções de concentrações definidas (4, 5, 6, 7 e 10 µg/mL). Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 2 mL de cada diluição do ácido ascórbico para tubos de ensaio com 1 mL da solução do radical DPPH. Os tubos foram homogeneizados e mantidos na ausência de luz por 30 minutos. Para solução controle negativo foram utilizados 2 mL de metanol e 1 mL do radical DPPH e tratados nas mesmas condições das amostras. O ensaio também foi realizado para controle positivo Trolox nas concentrações de 2, 4, 6, 7 e 10 µg/mL. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e as absorbâncias foram medidas no comprimento de onda (λ) de 515 nm, em espectrofotômetro. Utilizou-se como branco uma mistura de 1 mL metanol e 2 mL de solução amostra. Na presença de sequestradores (*scavengers*) deste radical, a intensidade da absorbância em 515 nm diminui e a porcentagem de inibição (% atividade antirradicalar) pode ser calculada de acordo com a equação 6 (CUENDET et al., 1997; RUFINO et al., 2007):

$$AA\% = \left(1 - \frac{Abs_s}{Abs_{cn}}\right) \times 100 \quad (6)$$

Onde, AA% = atividade antirradicalar; Abs_s= absorvância da solução; Abs_{cn}= absorvância media do controle negativo.

3.2.6.3.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do ABTS

Uma solução estoque de ABTS (7 mM) foi preparada dissolvendo 192 mg de ABTS em água destilada e o volume foi completado para 50 mL em um balão volumétrico. A solução de persulfato de potássio (140 mM) foi obtida dissolvendo 378,4 mg de persulfato de potássio em água destilada e o volume foi completado para 10 mL em um balão volumétrico. As soluções foram homogeneizadas e transferidas para frascos de vidro âmbar, devidamente identificadas e armazenadas.

Uma solução do radical ABTS foi preparada a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida protegida da luz, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida foi diluído 1 mL desta mistura em etanol até obter uma absorvância de 0,650 - 0,750 nm (RUFINO et al., 2007).

Posteriormente, preparou-se uma SM na concentração de 5 mg/mL de vitamina C e, a partir desta, foram obtidas diferentes concentrações de vitamina C (0,075, 0,095, 0,125, 0,195 e 0,250 mg/mL). Assim, alíquotas de 30 µL dessas diferentes concentrações foram submetidas à avaliação da atividade antioxidante com a adição à 3 mL da solução de ABTS. O desaparecimento/diminuição da absorvância do radical foi determinado em $\lambda = 734$ nm, em espectrofotômetro exatamente seis minutos após o início da reação. O ensaio também foi realizado para controle positivo (Trolox) nas concentrações de 0,025; 0,125; 0,250 e 0,375 mg/mL. Para solução controle negativo foram utilizados 3 mL da solução de ABTS e 30 µL de etanol. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração capaz de inibir 50% do radical pelas amostras foi calculada utilizando-se a equação 7 (EREL, 2004; KARAKAYA; YLMAZ, 2007, RUFINO et al., 2007; OLIVEIRA, 2011).

$$I_{50}\% = \left(1 - \frac{Abs_s}{Abs_{cn}}\right) \times 100 \quad (7)$$

Onde, $I_{50\%}$ = inibição de 50% do radical; Abs_s = absorvância da solução; Abs_{cn} = absorvância media do controle negativo.

3.2.7 Preparação e caracterização de sistemas nanoparticulados

3.2.7.1 Preparação

A concentração de 0,67% ou 0,8 % (p/p) de gelatina, em relação a 1% (p/p) de resíduo seco de extrato de SP 50% (p/p), foi paulatinamente adicionada em água purificada, sob temperatura de 50-55 °C e agitação mecânica. Após a dispersão da gelatina, a temperatura foi diminuída até 40 °C, a quantidade de extrato de SP foi adicionada e o sistema foi agitado por mais 30 minutos. Após esse tempo, a preparação obtida foi gotejada em aproximadamente 50 mL de água purificada gelada (5-10 °C) sob agitação mecânica (Ultra-turrax, Marconi®) durante 15 minutos. Posteriormente, a dispersão final foi seca em mini *spray dryer*, nas seguintes condições: temperatura de entrada de 120 °C, temperatura de saída de 100 ± 5 °C, aspiração da bomba de 1 mL/min e pressão de 3 bars.

Para a preparação das estruturas contendo vitamina C, uma quantidade de 33,33% do ativo foi incorporada à primeira dispersão (gelatina com extrato de SP) antes do gotejamento.

3.2.7.2 Caracterização físico-química das estruturas obtidas

3.2.7.2.1 Análise morfológica

A análise morfológica foi realizada por meio de fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu®, Japão). O material seco foi colocado sobre uma fita dupla-face aderida a um suporte de metal e revestidas, sob atmosfera de argônio, com ouro coloidal (BRUSCHI, 2002; DOTA et al., 2010; FERREIRA et al., 2012).

3.2.7.2.2 Análise granulométrica e determinação do potencial zeta

A análise granulométrica e a determinação do potencial zeta foram realizadas utilizando um analisador Zetasizer®, Nano series - ZS (Malvern Instruments, England), empregando uma fonte de laser vermelho ($\lambda=633$ nm) e temperatura de 25 °C. A quantidade

de 1,5 mg de partículas foi dispersa em 50 mL vaselina (índice de refração de 1,48). As amostras foram analisadas em triplicata.

3.2.7.2.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação

A quantidade de 0,0025 g de partículas contendo vitamina C foi colocada em um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com uma solução aquosa de 0,2% de ácido ortofosfórico/metanol/acetonitrila (90:8:2, V/V/V). Em seguida, a solução resultante foi filtrada e, posteriormente, 20 µL foram injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência. O teor de vitamina C das micro/nanopartículas foi calculado utilizando-se a curva de análise e levando-se em consideração as diluições que foram efetuadas, equação 8:

$$TF- = [(FD \cdot [vit C]) / m] \cdot 100 \quad (8)$$

Onde,

TF- = Teor de vitamina C das nanopartículas (% , p/p)

FD = Fator de diluição

[vit C] = Concentração de vitamina C

m = massa de nanopartículas analisada (g)

A eficiência de encapsulação foi determinada dividindo o teor de ácido ascórbico total determinado nas estruturas pelo teor de ácido ascórbico total teórico, multiplicando o resultado por 100. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3.2.7.2.4 Avaliação da atividade antioxidante

As soluções estoque de ABTS (7 mM) e de persulfato de potássio (140 mM), assim, como a solução do radical ABTS foram obtidas de acordo com o item 3.2.6.3.2. Preparou-se uma solução mãe de nanopartículas contendo a concentração de 5 mg/mL de vitamina C e, a partir desta, foram obtidas diferentes concentrações teóricas: 0,025, 0,075, 0,050, 0,095, 0,0100 e 0,125 mg/mL. Aliquotas de 30 µL dessas diferentes concentrações foram submetidas à avaliação da atividade antioxidante, foram adicionados a 3 mL da solução de ABTS e o desaparecimento da absorbância do radical foi determinado em $\lambda = 734$ nm, exatamente 6

minutos após o início da reação. Como controle negativo utilizou-se 30 µL de etanol, o ensaio foi realizado em triplicata. Foi realizada a leitura da absorbância e calculada a concentração de inibição de 50% do radical pelas amostras utilizando-se a equação 9.

Para as nanopartículas sem vitamina C, preparou-se uma solução mãe nas concentrações teóricas: 0,125, 0,375, 0,500, 0,625 e 0,700 mg/mL. Para a avaliação da atividade antioxidante dessas partículas procedeu-se a análise acima.

$$I_{50} \% = \left(1 - \frac{Abs_s}{Abs_{cn}}\right) \times 100 \quad (9)$$

Onde, $I_{50}\%$ = inibição de 50% do radical; Abs_s = absorbância da solução; Abs_{cn} = absorbância média do controle negativo.

3.2.7.2.5 Estudo do perfil de liberação *in vitro* da vitamina C a partir das estruturas obtidas

O perfil de liberação *in vitro* da vitamina C a partir das NP foi avaliado em um equipamento baseado nas células de difusão de Franz (Figura 5), pela quantificação da vitamina C liberada nos intervalos de tempo de 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h e 24 h (n = 3). Pesou-se 0,0025 g de nanopartículas, as quais foram adicionados sob a membrana filtrante de acetato de celulose (previamente hidratada por, no mínimo, 12 h). Em seguida, foram acrescentados 3,0 mL de água purificada. O sistema foi mantido sob agitação magnética constante e a temperatura do meio de liberação, 50 mL de água purificada, foi mantida a 37 °C, por meio de um banho de água termostaticado. Nos intervalos de tempo determinados, coletou-se 1,0 mL do meio de liberação, que imediatamente teve seu volume repostado com 1,0 mL de água purificada, e filtrou-se em membrana e injetou-se 20 µL no cromatógrafo líquido para quantificação da vitamina C.

Figura 5. Célula de difusão de Franz modificada: 1) compartimento contendo o meio de liberação; 2) abertura de coleta de amostras; 3) banho termostaticado; seta vermelha: barra magnética para manter o sistema sob agitação.



Para investigar o mecanismo de liberação da vitamina C a partir das nanopartículas, os dados foram analisados por meio da equação geral que descreve a liberação de fármaco a partir de sistemas poliméricos matriciais, utilizando transformações logarítmicas e análise dos mínimos quadrados (regressão linear) conforme descrito abaixo (HIGUCHI, 1963; RITGER; PEPPAS, 1987):

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = K.t^n \quad (10)$$

$$\log \frac{Mt}{M_{\infty}} = \log K + n.\log t \quad (11)$$

Onde: Mt/M_{∞} 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 (JONES et al., 2000; BRUSCHI, 2006).

3.2.8 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados, no mínimo em triplicata e os dados foram comparados por meio da análise de variância de um fator (ANOVA) e nas comparações *post hoc* das médias dos grupos individuais foram realizadas utilizando o teste da Diferença Honestamente Significante de Tukey, utilizando-se o programa Statistica 8[®] (StatSoft, EUA). Em todos os casos, um nível de $\alpha < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da qualidade da Própolis

A própolis vem sendo utilizada pela humanidade desde os tempos remotos, graças as suas propriedades terapêuticas, as quais tem sido responsáveis pela proliferação de preparações com própolis produzidas tanto pela indústria farmacêutica quanto pela alimentícia (GHISALBERTI, 1979; BURDOCK, 1998; SFORCIN et al., 2000; MIGUEL et al., 2010; PEREIRA, 2011).

Sua composição química é bastante variável, sendo dependente da flora existente ao redor do apiário (BRUSCHI et al., 2003; POPOVA et al., 2004). Além da localidade, outros fatores contribuem para essa variabilidade, como a época e forma de coleta, situação e manejo das colmeias, linhagem das abelhas e densidade populacional das colmeias. Todos estes fatores estão intimamente relacionados com a qualidade da própolis (FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000; BRUSCHI, 2006).

As amostras de própolis utilizadas foram coletadas em uma região de vegetação variada, com predomínio de pinheiros (*Pinus* sp. e *Araucaria heterophylla*) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.), além de espécies do cerrado como o alecrim do campo ou vassourinha (*Bacharis dracunculifolia*). Dessa forma, a mistura obtida apresentou um odor aromático e sabor picante, com aspecto de goma-resina ligante de coloração amarelo-esverdeada, características marcantes da própolis produzida na região norte e nordeste do estado do Paraná, São Paulo e Minas Gerais (PAMPLONA, 1997; BRUSCHI, 2006; PEREIRA, 2011). Assim, na avaliação da droga foram utilizados métodos analíticos físico-químicos, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Resultados das análises físico-químicas realizadas com a amostra de própolis (n=3)

Análises	Média ± s	CV(%)
Perda por dessecação (% , p/p)	7,41 ± 0,23	3,08
Teor de ceras (% , p/p)	29,33 ± 0,34	1,17
Teor de cinzas (% , p/p)	3,09 ± 0,14	4,45
Teor de extrativos (% , p/p)	8,34 ± 0,11	1,33
Fração solúvel em etanol (% , p/p)	48,33 ± 2,40	4,97

s = Desvio padrão; CV= Coeficiente de variação

A determinação da perda por dessecação tem como finalidade avaliar o grau de umidade da droga analisada, embora seja conhecido que o aquecimento pode promover a liberação de substâncias voláteis presentes tanto nas plantas como também na própolis (BRUSCHI, 2006, PEREIRA, 2011). A perda por dessecação nas amostras de própolis pode variar de acordo com a estação do ano e com os locais da colmeia, mas sempre dentro do limite máximo admitido de 15%, sendo permitida uma faixa de 4,4 a 13,3% (FRANCO et al., 2000). Assim, amostras coletadas no inverno e das partes mais externas da colmeia apresentam uma maior perda por dessecação (FRANCO et al., 2000; BRUSCHI, 2006; PEREIRA, 2011). O valor obtido (7,41%) indica que as amostras de própolis que originaram a mistura foram provavelmente coletadas dos locais mais internos da colmeia (caixilho, por exemplo) e bem acondicionadas (BRUSCHI, 2006; PEREIRA, 2011).

As abelhas podem incorporar mais cera à própolis durante períodos de inverno, quando a vedação precisa ser maior, ou quando as resinas encontram-se mais escassas ou de difícil coleta (BURDOCK, 1998; BRUSCHI et al., 2002). O aspecto mais amarelado em algumas amostras de própolis é explicado pela fonte vegetal presente na região e pela maior quantidade de ceras (FRANCO, 2001). Mesmo assim, é de grande importância que a análise do teor de ceras da própolis seja feita para a amostra como parte do controle de qualidade obrigatório, pois existe a possibilidade da diminuição do teor de substâncias ativas (BRUSCHI et al., 2002; PEREIRA, 2011). A faixa normalmente encontrada para o teor de ceras é de 10 a 35% (BRUSCHI et al., 2002). Dessa forma, o resultado da determinação do teor de ceras na amostra apresentou valor médio (29,33%), encontrando-se dentro da faixa preconizada.

O teor de cinzas totais evidencia o grau de substâncias residuais não voláteis presentes na amostra em análise. O valor de referência normalmente estabelecido para drogas sintéticas é de 1% e de até 3% para drogas de origem vegetal (FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000). Entretanto, esse valor não pode ser considerado para a própolis, pois nesta, por conter um alto valor de goma-resina e outros materiais, o valor de cinzas totais pode apresentar-se elevado (BRUSCHI et al., 2002). Constituindo-se, portanto de um parâmetro muito importante para verificação de possíveis adulterações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988a; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988b; BRUSCHI et al., 2002). O teor de cinzas totais obtido (3,09%) está de acordo com o perfil especificado, na faixa de 2,45 a 3,63% (p/p) (FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000).

A determinação do teor de extrativos permite avaliar a capacidade da água em retirar substâncias presentes na droga. Trata-se de um importante parâmetro na otimização do

processo de extração. Como a própolis é um material resinoso, sua solubilidade em água é limitada (PEREIRA, 2011). Além disso, foi avaliada a fração solúvel em etanol 96 °GL, para a avaliação das características do material (BRUSCHI, 2006; PEREIRA, 2011). Os resultados da determinação para a amostra utilizando etanol 96 °GL foi 48,33%, enquanto que para a água o teor de extrativos foi de 8,34%. Esta diferença de aproximadamente 40% é normalmente encontrada e indica que no preparo de extrato de própolis, a utilização de etanol como líquido extrator favorece a extração, característica importante no controle de qualidade da própolis (BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006; PEREIRA, 2011).

4.2 Preparação e controle de qualidade do extrato de própolis 30% (p/p)

A própolis apresenta uma ampla aplicação na medicina, na indústria de cosméticos e de alimentos, devido, principalmente, às suas atividades biológicas versáteis (BRUSCHI et al., 2003). Franco e Bueno (1999) demonstraram a eficiência da turboextração na obtenção de soluções extrativas de própolis. Sendo assim, para uma segura utilização da mesma, tem surgido uma grande necessidade pelo controle de qualidade e padronização dos extratos de própolis (BRUSCHI et al., 2003; PEREIRA, 2011). Os resultados encontrados na análise dos extratos de própolis estão descritos na tabela 2.

O pH de uma solução extrativa está diretamente relacionado com o pH do líquido extrator e com o pH das substâncias nela presentes. Dessa forma, o pH do extrato de própolis é dependente do pH do etanol, das substâncias fenólicas, dos derivados do álcool cinâmico, de substâncias nitrogenadas como os aminoácidos, entre outras substâncias extraídas da própolis (BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006; FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000). O valor encontrado foi de 5,17; o qual se apresentou dentro dos valores normalmente obtidos de 5,10 – 5,31 e compatível com o pH dos fluidos corporais, permitindo a utilização clínica do mesmo e (BRUSCHI, 2006).

A maior quantidade de própolis na preparação do extrato ocasiona um aumento da densidade relativa, o qual pode modificar a capacidade de dissolução do solvente e, conseqüentemente, diminuir o coeficiente de solubilidade dos flavonóides (FRANCO, 2001; BRUSCHI et al., 2002; PEREIRA, 2011). Esse aumento está relacionado provavelmente, a dissolução de uma quantidade maior de resina e de cera. Essa determinação da densidade pode ser realizada por diversos métodos, sendo os mais usuais, os obtidos utilizando densímetros (areômetros) ou picnômetros. Assim, o valor obtido para a determinação da

densidade relativa (0,88 g/mL) está de acordo com os valores normalmente obtidos de 0,875 – 0,88 g/mL (BRUSCHI, 2006).

Tabela 2- Resultados das análises físico-químicas realizadas com a amostra do extrato de Própolis a 30% p/p (n=3)

Análises	Média ± s	CV(%)
Resíduo seco (% , p/p)	22,04 ± 0,62	2,81
Densidade relativa (g/mL)	0,88 ± 0,00	0,10
Teor alcoólico (% , V/V)	82,80 ± 3,46	4,18
pH	5,17 ± 0,01	0,11
Polifenóis totais (% , p/V)	3,22 ± 0,11	3,56

s = Desvio padrão; CV= Coeficiente de variação

A determinação do resíduo seco fornece informações como relação à quantidade real de própolis na solução extrativa e a escolha do método de extração. O valor encontrado 22,04% demonstrou-se de acordo com os valores normalmente obtidos na literatura (BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006). Embora, o teor de resíduo seco não seja considerado como um padrão de melhor ou pior qualidade, sendo apenas considerado como mais uma característica do extrato de própolis.

Outro parâmetro avaliado no extrato é a determinação do teor alcoólico. Segundo a Farmacopéia Brasileira (1959) esta determinação pode ser realizada por meio da determinação da densidade ou pelo teor de água existente no extrato. A destilação, preconizada no método de determinação do teor alcoólico da Farmacopéia Brasileira (2010), elimina a possibilidade de interferência na leitura da densidade em consequência da presença de substâncias extraídas no extrato. Dessa forma, evita-se que ocorram determinações errôneas dos valores de densidade e, por conseguinte, dos teores alcoólicos. O teor alcoólico no extrato (82,80 %) foi inferior ao do líquido extrator utilizado, resultado da presença de umidade residual da droga e perda de solvente durante o processo extrativo devido à evaporação, mesmo com os cuidados tomados com temperatura e vedação dos recipientes (PEREIRA, 2011).

No Brasil a fonte botânica predominante para coleta de material para produção da própolis é o alecrim do campo (*Baccharis* sp), nesse tipo de própolis estudos tem demonstrado uma predominância de polifenóis (DE FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007). Os polifenóis são um dos mais importantes grupos de compostos que ocorrem em plantas. Em geral, os polifenóis são divididos em pelo menos 10 grupos dependendo da sua estrutura

básica. Dentre os cerca de 300 compostos isolados na própolis, a grande maioria são polifenóis (MIGUEL et al., 2010). As análises foram realizadas em cinco replicatas de extrato de própolis para cada concentração (0,0125 - 0,1125 µg/ mL).

A equação linear representativa foi $y = 6,9283x + 0,0845$. O coeficiente de correlação linear (r) foi de 0,9962, com isso pode-se afirmar a existência de correlação linear entre as absorvâncias e as concentrações do ácido gálico. Este valor concorda com a Resolução Brasileira RE nº 899 e a ICH, que estabelecem um $r \geq 0,99$ como critério de aceitação do método proposto (BRASIL, 2003; ICH, 2005; PEREIRA, 2011; PEREIRA et al., 2013). Além disso, a curva obtida apresentou regressão altamente significativa, sem falta de ajuste (PEREIRA et al., 2013).

Assim, para a quantificação da própolis, o resultado obtido para o teor de polifenóis foi de 3,22%; valor próximo ao encontrado por Pereira et al. (2013), que foi de 4,07% de polifenóis. Enquanto, outros autores encontraram valores de $7,28 \pm 0,12\%$ (DOTA et al., 2010) e $6,27 \pm 0,19\%$ (MIGUEL et al., 2010). Demonstrando que o valor de polifenóis encontrado dentro dos valores normalmente obtidos de 1-7,28%.

Assim, o extrato de própolis apresentou características de qualidade, estando os parâmetros dentro do normalmente obtido, podendo o SP de sua preparação ser utilizado.

4.3 Caracterização do subproduto, obtenção e avaliação do extrato do subproduto de própolis 50% (p/p)

Os resíduos provenientes do processo industrial, que são muitas vezes descartados constituem inúmeras toneladas, que muitas vezes representam riscos ambientais. Assim, com o propósito de minimizar os impactos gerados por materiais, é de interesse econômico, científico e tecnológico a busca de alternativas para o aproveitamento dos mesmos (LENARDÃO et al., 2003; ALESSIL; RAUPP; GARDINGO, 2003).

Durante o processo de obtenção do extrato de própolis 30% (p/p) há a formação do subproduto que, normalmente, é descartado. Neste trabalho, o mesmo foi avaliado para determinar sua capacidade de ser aproveitado na estruturação de sistemas de liberação de fármacos. Dessa forma, para avaliar as características do subproduto obtido, determinou-se o teor de ceras, que foi de $61,49 \pm 0,58\%$ (p/p), o qual apresentou um valor superior ao encontrado normalmente na própolis, de 20–30% (BRUSCHI et al., 2002; SFORCIN; BANKOVA, 2011). Isso pode ser explicado por ser um material já submetido a uma primeira

extração com etanol, diminuindo o teor de resinas e aumentando o de ceras. Assim, quanto mais elevado esse teor de ceras, mais maleável e mais apolar o SP se apresenta (FUNARI; FERRO, 2006).

Posteriormente, o SP foi submetido à extração com diferentes solventes com a finalidade de se determinar o melhor líquido extrator. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 3. Pode-se observar que os solventes hidroalcoólicos possibilitaram uma maior extração de substâncias do SP. Entre as concentrações de etanol testadas, a de 96 °GL apresentou um resíduo menor. No entanto, esses resultados não foram estatisticamente diferentes.

Tabela 3 - Resultados obtidos na determinação do resíduo seco dos extratos do subproduto 10% (p/p) em diferentes solventes (n=3)

Solvente	Solubilidade (% p/p)
Água purificada	2,512 ± 0,308
Etanol 60 °GL	3,592 ± 0,073
Etanol 77 °GL	3,668 ± 0,042
Etanol 96 °GL	3,635 ± 0,764

s = desvio padrão

Considerando que a estruturação do extrato de própolis em água é devida principalmente à presença de substâncias insolúveis nesta, destacando-se as resinas (BRUSCHI et al., 2003), o etanol 96 °GL foi selecionado para a preparação de extratos com o subproduto, pois apresentou resultados positivos para o desenvolvimento de sistemas micro/nanoparticulados, em consequência da extração de uma maior quantidade de resina e ceras. Além disso, foi observado que o extrato de SP 50% (p/p) produziu maior quantidade de partículas, quando gotejado em água fria, comparado ao de 30% (p/p). Dessa maneira, este foi escolhido para a continuação do trabalho.

Em seguida, para os extratos de SP 50% (p/p), determinou-se o resíduo seco o qual apresentou um valor $6,93 \pm 0,13\%$ (p/p), inferior ao encontrado para os extratos de própolis 30% (p/p), uma vez que parte dos constituintes solúveis no etanol 96 °GL já haviam sido retirados durante a primeira extração. Determinou-se, ainda, o pH desse extrato, que apresentou o valor de 5,44. Esse pH está diretamente relacionado com o pH do líquido extrator e com o pH das substâncias presentes no mesmo, o qual demonstrou-se muito próximo do obtido para o extrato de própolis 30% (p/p). Outro parâmetro avaliado para esses

extratos foi a determinação do teor de polifenóis totais, que apresentou um valor de 0,54% (p/V). Assim, como observado para o resíduo seco o valor encontrado foi inferior ao encontrado para os extratos de própolis 30% (p/p), pois parte dos constituintes solúveis no etanol 96 °GL já haviam sido retirados durante a primeira extração. Esses compostos apresentam atividade antioxidante, principalmente devido às suas propriedades redutoras e estrutura química, que agem na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição (ISLA et al., 2001; SOUSA et al., 2007; OLIVEIRA, 2011).

4.4 Validação da metodologia analítica da vitamina C

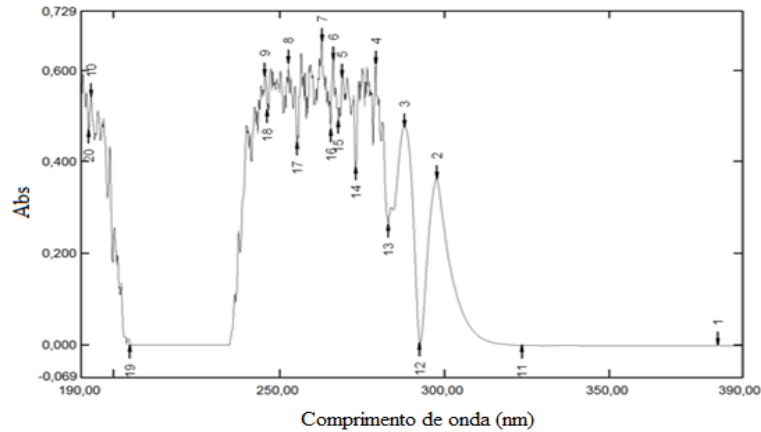
A validação de um método é de essencial importância a fim de se obter documentação e análise dos dados que descrevam detalhadamente o método e que permitam identificar e controlar os fatores de variação para assegurar a confiabilidade dos resultados quando o mesmo for utilizado (ICH, 2005; BRUSCHI, 2006, VILLA NOVA, 2012).

Neste sentido, uma variedade de métodos tem sido descrita para a quantificação do ácido ascórbico, entre estes se destacam o titulométrico, espectrofotométrico, eletroquímico, fluorimétrico, enzimático e cromatográfico. Porém, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pode ser considerada um método mais sensível e seletivo, que visa à determinação de substâncias ativas, assim como, ensaios de estabilidade em indústrias farmacêuticas e de cosméticos (MARSHALL; TRENNERY; THOMPSON, 1995; BAKSHI; SINGH, 2002; MAIA et al., 2007). Dessa forma, no presente trabalho a análise do ácido ascórbico aconteceu pelo método de CLAE (BALL, 1994; ARYA; MAHAJAN; JAIN, 2000; MAIA et al., 2007).

Essa metodologia apresenta rapidez, conveniência e a capacidade de separar substâncias quantitativamente. Para alcançar essas características, a metodologia por CLAE deve ser validada de acordo com os parâmetros analíticos estabelecidos pelos compêndios oficiais, literatura científica e Farmacopeias, obtendo-se experimentalmente a linearidade, especificidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação, e robustez (ICH, 2005; MAIA et al., 2007).

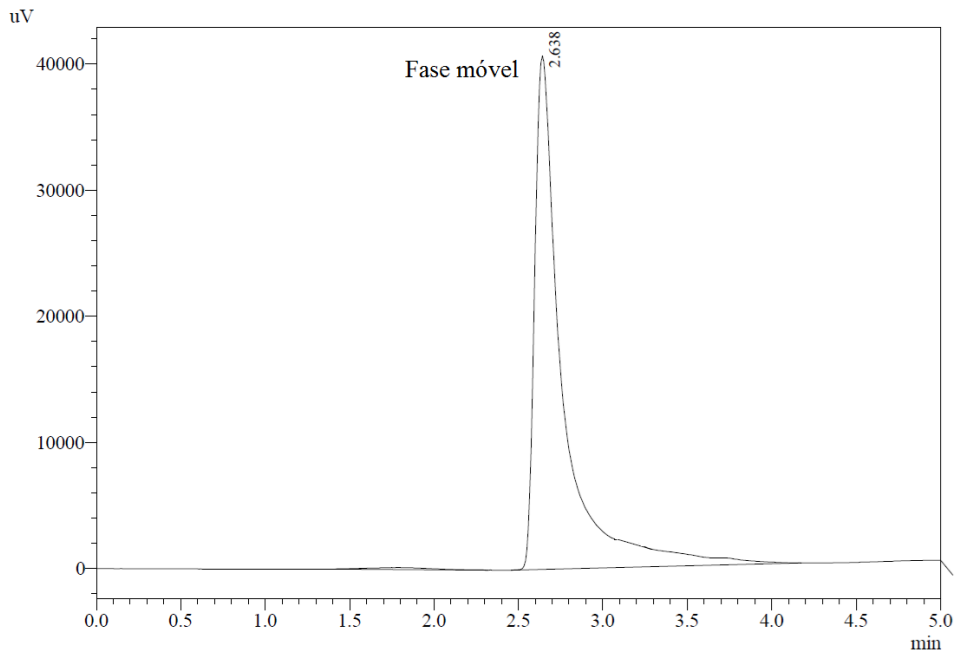
A vitamina C apresenta absorção na região do UV e, por isso, torna-se possível a leitura de uma solução aquosa em espectrofotômetro. A Figura 6 apresenta o espectro de absorção do ácido ascórbico, onde pode ser observado uma maior absorção na faixa do 250 – 270 nm. A escolha do comprimento de onda específico de 254 nm para as análises foi feita com base na literatura (MAIA et al., 2007).

Figura 6. Espectro de absorção da vitamina C nos comprimentos de onda de 190 a 390 nm.



A especificidade é definida como sendo a capacidade que o método possui de medir de forma inequívoca o analito na presença de outros componentes. Tipicamente, estes compostos podem incluir impurezas, produtos de degradação, componentes da matriz (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Dessa forma, para a determinação da especificidade realizou-se a injeção da fase móvel (Figura 7) e da solução de vitamina C (Figura 8).

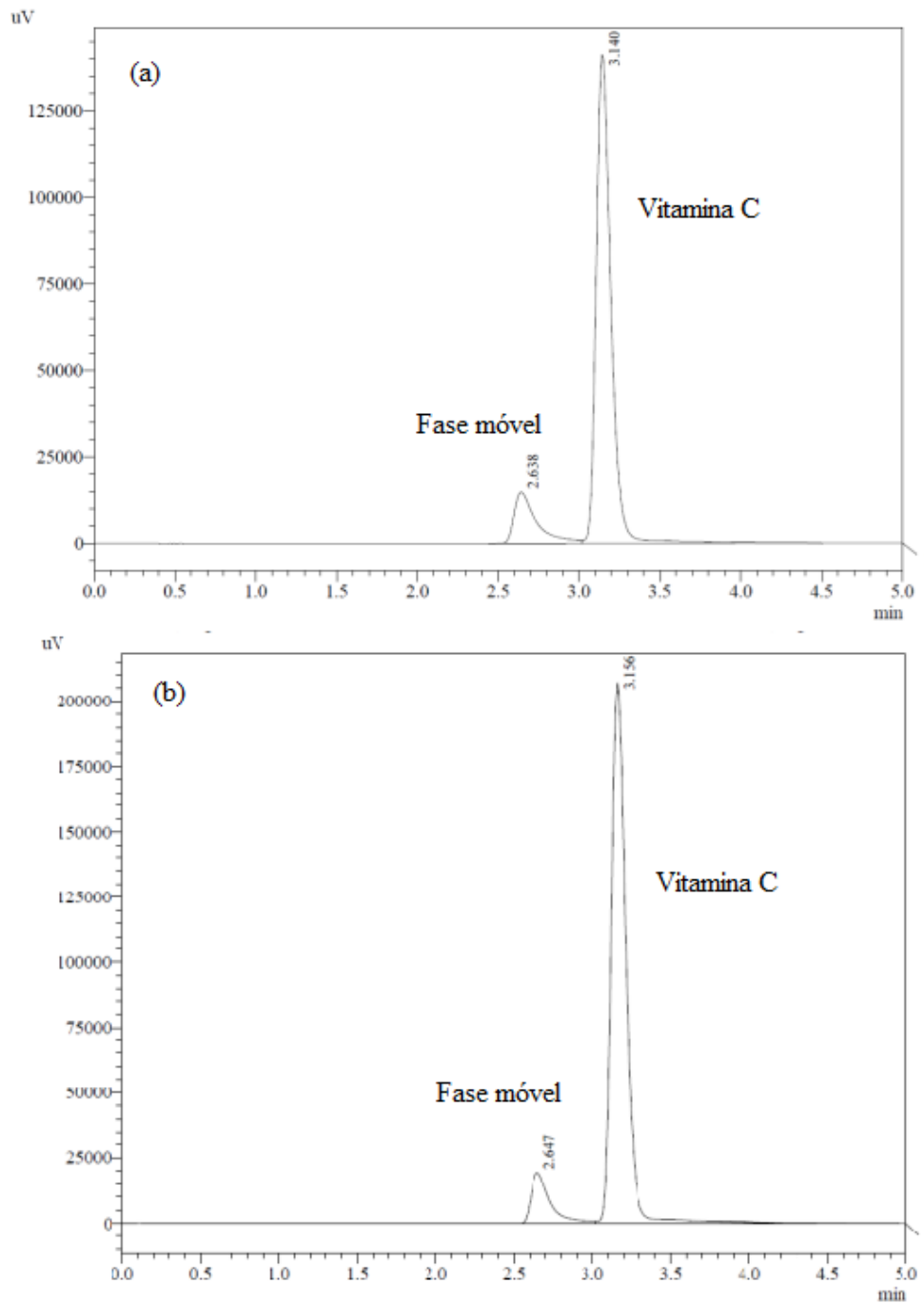
Figura 7. Cromatograma obtido para a fase móvel solução aquosa de 0,2% de ácido ortofosfórico/metanol/acetonitrila (90:8:2, V/V/V), em 254 nm.



Os cromatogramas obtidos apresentaram uma boa resolução dos picos indicando que o primeiro pico é representado pelos solventes presentes fase móvel, enquanto o segundo pico é

formando pelo ácido ascórbico. Nesse sentido, os resultados demonstraram que o método utilizado na quantificação da vitamina C pode ser utilizado nos testes seguintes.

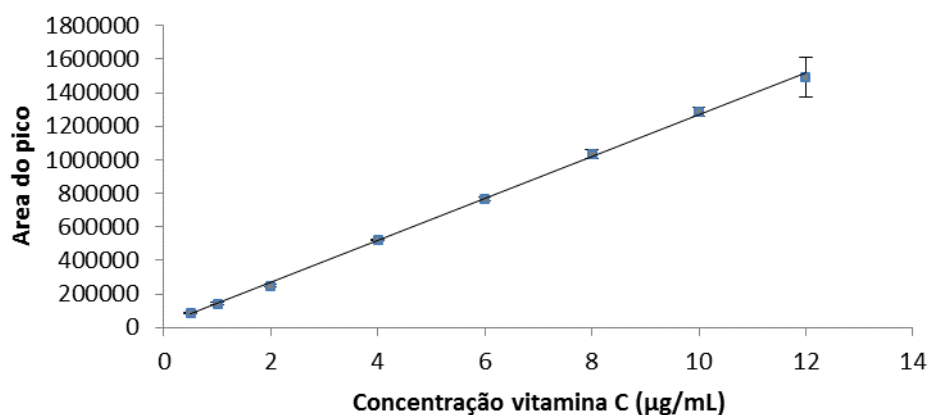
Figura 8 – Cromatograma obtido para o padrão de vitamina C (a) e para a vitamina C obtida a partir das nanopartículas (b) na concentração de 8µg/mL, em 254 nm. Fase móvel solução aquosa de 0,2% de ácido ortofosfórico/metanol/acetonitrila (90:8:2, V/V/V).



A linearidade refere-se à capacidade de determinado método em gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada (BRITO et al., 2003; ICH, 2005). Neste sentido, esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico, que não deve ser estatisticamente diferente de 1. Assim, é necessário obter coeficiente de correlação igual a um e coeficiente angular diferente de zero (STUBBERUD; ASTROM, 1998; AMARANTE et al., 2001; BRITO et al., 2003).

Para a determinação da linearidade, o equipamento de CLAE foi calibrado pela obtenção de uma curva de análise, utilizando oito soluções padrão de concentrações conhecidas (0,5 – 12,0 µg/mL). As análises foram realizadas em cinco replicatas para cada concentração. Os resultados obtidos foram utilizados para obtenção da equação da reta, para o cálculo da regressão linear e do coeficiente de correlação (ICH, 2005). Além disso, foram feitas as análises de resíduos e da falta de ajuste. Os resultados apresentados estão ilustrados na Figura 9, a qual representa a curva de análise da vitamina C, que mostrou linearidade na faixa de concentrações testadas (n = 8).

Figura 9. Curva de regressão linear obtida da média das oito concentrações de calibração (n=8).



Assim, a equação linear representativa foi $y = 1,2496 \cdot 10^5 X + 18046,262$; o coeficiente de correlação (r) de 0,9966 e o coeficiente de determinação (r^2) de 0,9932, sugerindo que 99,32% dos valores são explicados em torno da média, sendo minimizados os resíduos. Portanto, pode dizer que existe uma correlação linear entre a concentração da vitamina C (x) e a área do pico (y).

Posteriormente, foi realizada a regressão linear dos dados por meio do teste de Fisher, com nível de confiança de 95%. Nesta análise o valor de F , calculado pela razão da média

quadrática da regressão pela média quadrática dos resíduos ($F_{\text{calculado}} = \text{MRQ} / \text{MQE}$) que foi comparado com o valor de $F_{\text{crítico}}$ tabelado. Assim, quando $F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{crítico}}$ ($5560,81 \geq 4,09$), se aceita, com 5% de significância, que a regressão é bastante significativa para os dados apresentados. Os resultados da regressão linear para o ácido ascórbico encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 – Resultados da ANOVA para a regressão linear do método de validação para a quantificação do ácido ascórbico ($\alpha < 0,05$)

Fontes	SQ	g.l.	MQ	Fcal	Fcrítico	p-valor
Regressão	$1,00. 10^{13}$	1	$1,00.10^{13}$	5560,81	4,09	0,00
Resíduo	$6,86. 10^{10}$	38	$1,80. 10^9$			
Total		39				

SQ = Soma Quadrática; gl = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

A análise da falta de ajuste foi realizada pelo teste de Fisher, com intervalo de confiança de 95%. Ela é realizada comparando-se o valor de $F_{\text{calculado}}$ (determinado pela razão das médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro) com o valor de $F_{\text{crítico}}$ tabelado. Como o $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{crítico}}$ ($0,72 \leq 2,39$) com 5% de significância, modelo de regressão linear não apresenta falta de ajuste, indicando que a inclinação da reta é diferente de zero (não nula) e que a falta de ajuste não foi significativa. Os valores da análise da falta de ajuste estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados da ANOVA para análise da falta de ajuste no método de validação para a quantificação do ácido ascórbico ($\alpha < 0,05$)

Fontes	SQ	g.l.	MQ	Fcal	Fcrítico	p-valor
Falta de ajuste	$8,08. 10^9$	6	$1,35. 10^9$	0,72	2,39	0,64
Erro puro	$6,06. 10^{10}$	32	$2,38. 10^9$			0,00

SQ = Soma Quadrática; gl = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

O intervalo especificado de um procedimento analítico é a faixa entre os limites superior e inferior, considerando o de quantificação do analito na amostra (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Dessa forma, o limite de detecção (LOD) de um procedimento analítico é a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente

quantificado como um valor exato, sob as condições do experimento. Enquanto, o limite de quantificação (LOQ) de um procedimento analítico é a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com adequada precisão. O limite de quantificação é um parâmetro de ensaios quantitativos para baixos níveis de compostos em matrizes de amostra, e pode ser usado para a determinação de impurezas e/ou produtos de degradação (ICH, 2005). Assim, o limite de detecção e o limite de quantificação avaliam a sensibilidade do método, e foram calculados baseando-se no desvio padrão (s) e na inclinação (S) da curva de análise (ICH, 2005; BRASIL, 2003). O LOD foi de 0,27 $\mu\text{g/mL}$ e o LOQ foi de 1,73 $\mu\text{g/mL}$. Assim, a curva de análise da vitamina C pelo método do CLAE, apresentou linearidade no intervalo de 1,73 a 12,0 $\mu\text{g/mL}$.

Nos ensaios uniformidade de conteúdo, o mínimo aceito é de 70 a 130 % da concentração testada. Enquanto, que para ensaios de dissolução aceita um intervalo de $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo.

A acurácia de um procedimento analítico expressa o grau de concordância entre o valor de referência e o valor encontrado (ICH, 2005). Assim, a determinação da exatidão foi realizada pela análise da diferença entre o valor médio encontrado e o valor teórico de soluções de vitamina C de concentrações conhecidas: 2,0; 6,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$, em triplicatas, representado na Tabela 6 (MAIA et al., 2007; LOPES; BRUSCHI; MELLO, 2009). O método foi capaz de recuperar uma média de $100,24 \pm 1,78\%$ da vitamina C nas concentrações analisadas, apresentando-se dentro dos limites estabelecidos pela ICH que é de 80 – 120% (ICH, 2005).

Tabela 6 –Dados de concentração da vitamina C para a análise da exatidão pelo método cromatográfico ($n = 3$, média $\pm s$)

Concentração teórica vitamina C ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração vitamina C encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (% $\pm s$)	Recuperação média (% $\pm s$)
2,00	$1,96 \pm 0,04$	$98,22 \pm 2,25$	
6,00	$6,05 \pm 0,05$	$100,88 \pm 0,92$	$100,24 \pm 1,78$
10,00	$10,16 \pm 0,14$	$101,62 \pm 1,40$	

A precisão de um procedimento analítico define-se com a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

A precisão foi determinada em dois diferentes níveis, intra-dia e inter-dia (tabela 7). Para o teste da precisão intermediária (precisão inter-dia) foi realizada utilizando três concentrações distintas, as quais foram analisadas em triplicatas. A análise da precisão intra-dia do método foi determinada após a injeção de três amostras em três dias consecutivos, também, em triplicatas (MAIA et al., 2007; LOPES; BRUSCHI; MELLO, 2009).

Tabela 7 – Precisão do método de validação para a quantificação do ácido ascórbico (n=3)

Ácido ascórbico (µg/mL)	Dias	Precisão intra-dia Media ± S	CV%	Precisão inter-dia Media ± S	CV%
2,0	1	1,86 ± 0,06	3,25	1,92 ± 0,03	1,58
	2	1,98 ± 0,03	1,59		
	3	1,93 ± 0,09	4,77		
6,0	1	5,92 ± 0,17	2,92	5,88 ± 0,09	1,47
	2	5,84 ± 0,26	4,40		
	3	5,89 ± 1,42	1,42		
8,0	1	7,70 ± 0,52	6,72	7,65 ± 0,21	2,79
	2	7,17 ± 0,09	1,28		
	3	8,07 ± 0,31	3,89		

Os resultados foram expressos em relação ao desvio padrão (s) em relação a concentração do ácido ascórbico. Os valores percentuais de CV evidenciaram uma precisão apropriada, indicando que o método apresentou uma pequena variabilidade, pois de acordo com a AOAC (2002) para concentrações baixas de analito, em ppm, permite-se um CV% de até 11%.

A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento e depende do tipo de procedimento em estudo. Deve mostrar a confiabilidade de uma análise em relação a variações deliberadas dos parâmetros do método (ICH, 2005). Se as medições são suscetíveis a variações nas condições analíticas, as condições devem ser adequadamente controladas durante o procedimento.

Uma consequência da avaliação da robustez é que uma série de parâmetros de adequação do sistema é estabelecida para assegurar que a validade do processo analítico é

mantida sempre utilizada. As variações típicas na CLAE são: variações de equipamento, comprimento de onda, pH da fase móvel, na composição da fase móvel, da temperatura e da taxa de fluxo (ICH, 2005).

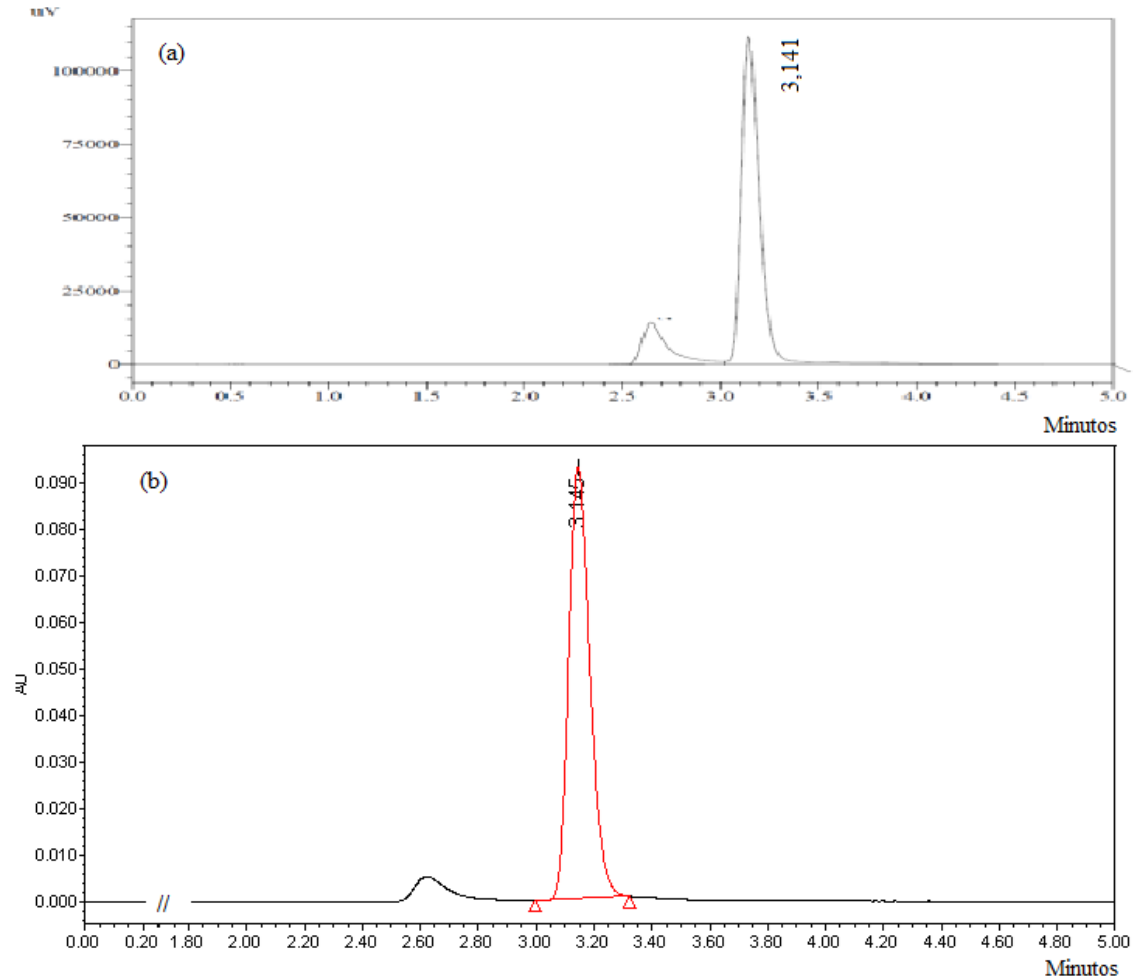
A robustez foi definida como a capacidade de um procedimento analítico de permanecer inalterado diante de pequenas mudanças nos parâmetros do método (LOPES, BRUSCHI, MELLO, 2009). Para garantir que o método por CLAE não fosse sensível a pequenas alterações nas condições experimentais, a concentração de 2,00 µg/mL foi analisada em dois diferentes cromatógrafos, Shimadzu® e Waters®. Foram mantidos o mesmo comprimento de onda de 254 nm, fase móvel, assim como a mesma velocidade de eluição e coluna. A Tabela 8 e Figura 10 apresentam os resultados obtidos.

Tabela 8 – Robustez para o método de quantificação da vitamina C utilizando diferentes cromatógrafos (n =3)

Vitamina C (µg/mL)	Cromatógrafo (λ = 254nm)	Vitamina C (µg/mL)	Media ± S	CV%
		Media ± S		
2,00	Shimadzu	1,83 ± 0,02	1,74 ± 0,13	7,31%
	Waters	1,65 ± 0,02		

Como pode ser observado na tabela acima, a mudança de cromatógrafo líquido não causou uma alteração significativa no método de quantificação da vitamina C, pois os CV% foram inferiores a 11% (AOAC, 2002). Pode-se observar que em ambos os cromatogramas o pico da vitamina C continuou apresentando boa resolução, com tempos de saída bastante próximos, o mesmo foi observado para o pico da fase móvel o qual continuou aparecendo próximo ao pico do ácido ascórbico.

Figura 10. Cromatogramas obtidos para a vitamina C, em cromatógrafo líquido (a) da Shimadzu® e (b) da Waters®, em 254 nm. Fase móvel solução aquosa de 0,2% de ácido ortofosfórico/metanol/acetonitrila (90:8:2, V/V/V).



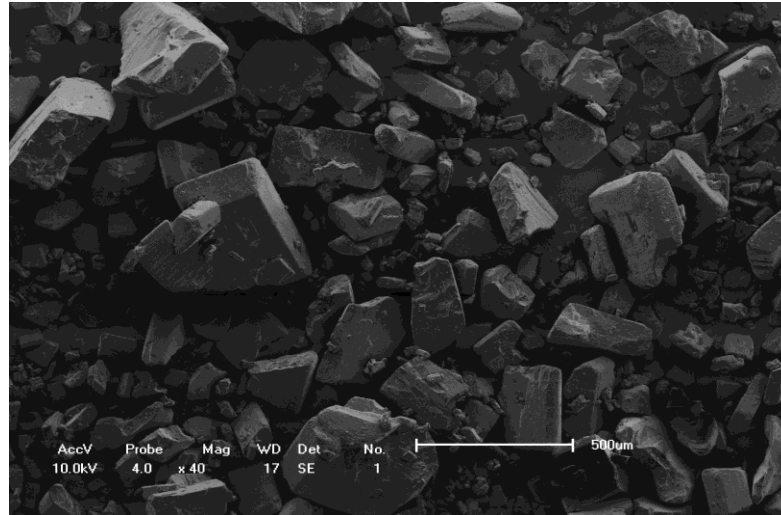
4.5 Avaliação da qualidade da vitamina C

O ácido ascórbico apresentou-se como um pó fino, cristalino branco, inodoro e com gosto ácido. Facilmente solúvel em água originando uma solução límpida, porém o mesmo foi pouco solúvel em etanol e acetona, e insolúvel em solventes como éter etílico, clorofórmio, éter de petróleo e benzeno (DALCIN; SCHAFFAZICH; GUTERRIES, 2003; ROWE, SHESKEY, QUINN; 2009; FARMACOPÉIA, 2010).

A análise morfológica da vitamina C foi realizada por meio de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura. O ácido ascórbico apresentou-se em sua maioria na

forma de cristais de diversos tamanhos e com a superfície lisa (Figura 11), concordando com a literatura (ROWE; SHESKEY; QUINN; 2009).

Figura 11. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da vitamina C (tamanho original x40).



4.5.1 Avaliação da atividade antioxidante

Os radicais livres são espécies reativas, produzidas durante o metabolismo celular ou são gerados por alguma disfunção biológica, são reconhecidas por desempenharem efeitos prejudiciais ou benéficos aos componentes celulares. Esses compostos possuem elétrons livres na camada de valência, podem ser derivadas de oxigênio (espécies reativas de oxigênio - ROS) ou derivadas do nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio - RNS) (BADARINATH et al., 2010; NUR ALAM et al., 2013).

Em condições fisiológicas normais, os radicais livres são rapidamente eliminados pelos sistemas celulares enzimáticos e não enzimáticos, como a glutatona reduzida, o superóxido dismutase, a catalase, a glutatona peroxidase e a vitamina E, as quais atuam antes que a lesão se forme, por outro lado compostos como o ácido ascórbico, a glutatona redutase e a glutatona peroxidase agem após a lesão ter se formado. Esses compostos de baixo peso molecular, denominados como antioxidantes, atuam sobre esses radicais por vários mecanismos, evitando assim as alterações celulares. Entretanto, com o envelhecimento, essa capacidade de defesa das células pode encontrar-se diminuída (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; DALCIN et al., 2003; BARREIROS; DAVID, 2006; PATEL et al., 2011).

Nesse sentido, os antioxidantes são moléculas que protegem o sistema biológico contra os efeitos nocivos da oxidação excessiva (PEZZUTO; PARK, 2002; RUFINO et al., 2007). Os antioxidantes naturais são agentes encontrando na natureza, principalmente de origem vegetal, que podem apresentar em sua estrutura molecular um anel aromático. Esses compostos são classificados em hidrofílicos, quando atuam na fase aquosa, ou lipossolúveis, quando atuam nas membranas celulares (PEZZUTO; PARK, 2002).

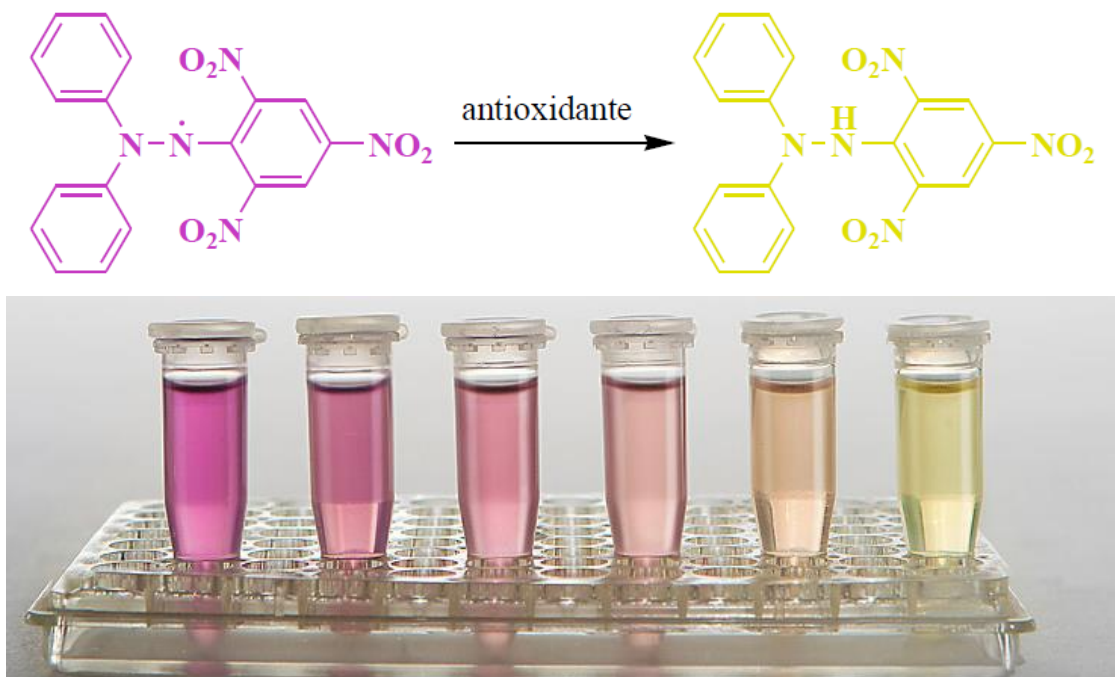
Assim, a determinação da atividade antioxidante não deve ser concluída com base em um único teste antioxidante. Vários procedimentos de ensaio *in vitro* são realizados para avaliar a atividade antioxidante nas amostras de interesse. Diversos métodos são utilizados para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, dentre estes, a avaliação da atividade antioxidante pelo DPPH é um procedimento relativamente simples, uma vez que necessita de poucas etapas e reagentes. Enquanto, o ensaio do ABTS é aplicável para ambos os antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos (BADARINATH et al., 2010; NUR ALAM et al., 2013).

4.5.1.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH

O método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), foi descrito pela primeira vez por Blois em 1958, e modificado por inúmeros pesquisadores. No entanto, a avaliação da atividade antioxidante da vitamina C padrão foi realizada pelo método do sequestro do radical estável DPPH ou em termos de doação de hidrogênio, de acordo com Silva et al (2005a) com algumas modificações.

O DPPH é um radical livre que reage com compostos doadores de um átomo de hidrogênio (Figura 12). Assim, o teste está baseado na eliminação do mesmo através da adição de uma espécie ou um radical antioxidante que causa a descoloração da solução DPPH e, conseqüentemente, a diminuição da absorção (RUFINO et al., 2007; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011, ARAB; ALEMZADEH; MAGHSOUDI, 2011).

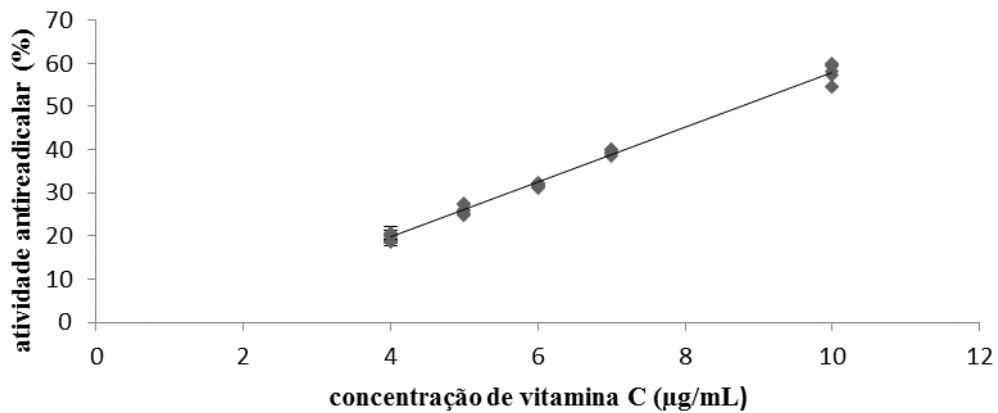
Figura 12. Estabilização do radical DPPH por um antioxidante.



Fonte: RUFINO et al., 2007

No presente trabalho o método do DPPH foi utilizado com a finalidade de garantir um controle de qualidade da vitamina C, quanto a sua capacidade antioxidante. Assim, os resultados apresentados encontram-se ilustrados na Figura 13 e demonstraram que o método foi linear na faixa de concentração testada (4 – 10 µg/mL), tendo regressão linear estatística significativa, com equação da reta: $Y = 6,3387X - 5,6046$, e o coeficiente de determinação (r^2) de 0,9914, sugerindo que 99,14% dos valores são explicados em torno da média, sendo minimizados os resíduos. Portanto, pode dizer que existe uma correlação linear entre a concentração da vitamina C (x) e atividade antirradicalar % (y).

Figura 13. Curva de regressão linear obtida da média das sete curvas de calibração autênticas da avaliação da atividade antioxidante da vitamina C (n=7).



Após a obtenção dos dados da regressão foi feita a análise de resíduos, pela qual se investiga a diferença entre os valores de y obtidos e os valores de y estimados pelo modelo de regressão, e a análise da falta de ajuste. A Tabela 9 mostra os resultados da análise de variância (ANOVA) para a análise de resíduos e da falta de ajuste.

Tabela 9 – Resultados da ANOVA para a análise de resíduos e da falta de ajuste da avaliação da atividade antioxidante da vitamina C (n = 7)

Fonte	SQ	g.l.	MQ	F cal	F crítico	p-valor
Regressão	5962,63	1	5962,63	3813,25	4,14	0,00
Residual	51,60	33	1,56			
Falta de ajuste	7,76	3	2,57	1,75	2,92	0,17
Erro puro	43,89	30	1,46			
Total		34				

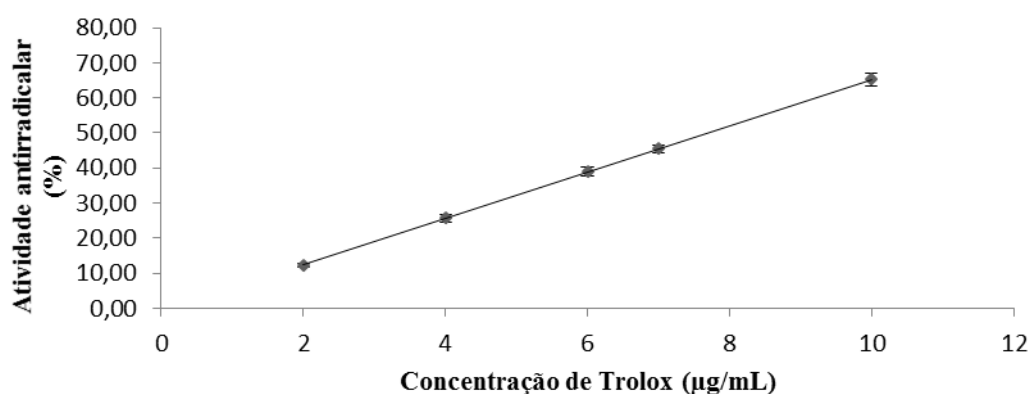
SQ = Soma Quadrática; gl = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

Na análise de resíduos, quando F calculado $\geq F$ crítico, se aceita, com 95% de confiança, que a inclinação da reta é diferente de zero (" a " $\neq 0$) e, com isso, conclui-se que a regressão é significativa. Assim, pode se observar, na Tabela 9, que o F calculado foi muito maior do que o F crítico ($3813,25 > 4,14$) e, por isso, a regressão foi altamente significativa. Na análise da falta de ajuste, quando o F calculado $\leq F$ crítico, o modelo não apresenta falta de ajuste. Pode ser observado que o valor do F calculado foi menor do que o F tabelado ($1,75 < 2,92$) e, assim, conclui-se que o modelo linear apresentou-se adequado.

Neste sentido, para a determinação da concentração de vitamina C necessária para reduzir 50% do radical DPPH disponível, utilizou-se a equação da reta ($Y = 6,3387X - 5,6046$), obtendo-se IC_{50} 8,77 $\mu\text{g/mL}$. Nas condições determinadas para a determinação da atividade antioxidante pelo método descrito, o ácido ascórbico apresentou um IC_{50} próximo aos valores encontrados na literatura, de 2,08 $\mu\text{g/mL}$ (GOVINDARAJAN et al., 2003; SHARMA, BHAT, 2009; OLIVEIRA, 2011), 8,27 $\mu\text{g/mL}$ (LUIS et al., 2006) a aproximadamente 10,00 $\mu\text{g/mL}$ (KANO et al., 2005). Assim, pode-se concluir que a vitamina C escolhida possui uma boa atividade antioxidante.

Posteriormente, determinou-se a equação da reta e avaliou-se a regressão e falta de ajuste para o controle positivo, Trolox. Os resultados apresentados na Figura 14, demonstraram que o método foi linear na faixa de concentração testada (2 – 10 $\mu\text{g/mL}$), tendo regressão linear estatística significativa, com equação da reta: $Y = 6,6221X - 0,8896$, e o coeficiente de determinação (r^2) de 0,9959, sugerindo que 99,59% dos valores são explicados em torno da média, sendo minimizados os resíduos.

Figura 14. Curva de regressão linear obtida da média das sete curvas de calibração autênticas da avaliação da atividade antioxidante do Trolox (n=7).



Após a obtenção dos dados da regressão foi feita a análise de resíduos, pela qual se investiga a diferença entre os valores de y obtidos e os valores de y estimados pelo modelo de regressão, e a análise da falta de ajuste. A Tabela 10 mostra os resultados da análise de variância (ANOVA) para a análise de resíduos e da falta de ajuste.

Tabela 10 – Resultados da ANOVA para a análise de resíduos e da falta de ajuste da avaliação da atividade antioxidante do Trolox (n = 7)

Fonte	SQ	g.l.	MQ	F cal	F crítico	p-valor
Regressão	11296,27	1	11296,27	8052,04	4,14	0,00
Residual	46,30	33	0,15			
Falta de ajuste	0,45	3	0,15	0,098	2,92	0,17
Erro puro	43,89	30	1,46			
Total		34				

SQ = Soma Quadrática; gl = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

Na análise de resíduos, quando F calculado $\geq F$ crítico, se aceita, com 95% de confiança, que a inclinação da reta é diferente de zero (" a " $\neq 0$) e, com isso, conclui-se que a regressão é significativa. Assim, pode se observar, na Tabela 9, que o F calculado foi muito maior do que o F tabelado ($8052,04 > 4,14$) e, por isso, a regressão foi altamente significativa. Na análise da falta de ajuste, quando o F calculado $\leq F$ crítico, o modelo não apresenta falta de ajuste. Como o valor do F calculado foi menor do que o F tabelado ($0,098 < 2,92$) conclui-se que o modelo linear apresentou-se adequado.

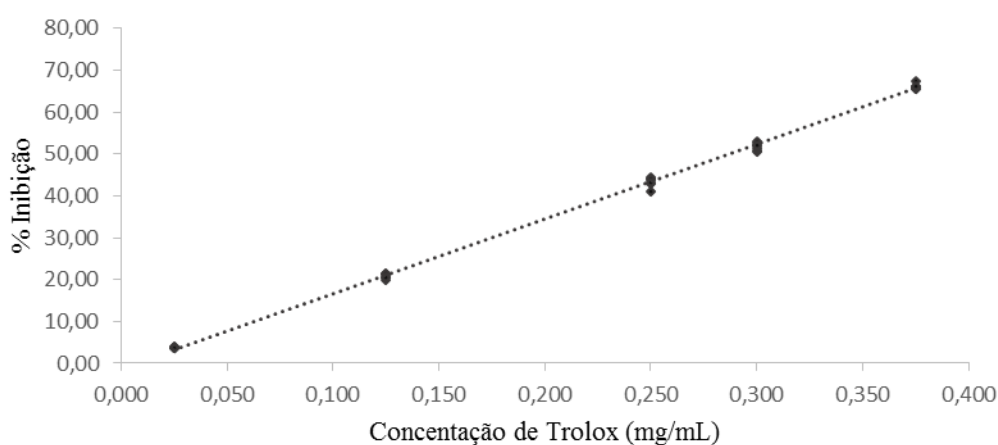
E para a determinação da concentração de Trolox necessária para reduzir 50% do radical DPPH disponível, utilizou-se a equação da reta anteriormente obtida ($Y = 6,6221X - 0,8896$), obtendo-se IC_{50} 7,68 $\mu\text{g/mL}$.

4.5.1.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método do ABTS

Outro método bastante utilizado para medir a atividade antioxidante é pela captura do radical ABTS, que foi desenvolvido por Rice-Evans e Miller em 1994. Com o decorrer dos tempos, diversos pesquisadores o modificaram (ARAB; ALEMZADEH; MAGHSOUDI, 2011). Esse radical pode ser gerado por uma reação química, eletroquímica ou enzimática, formado a partir de seu precursor, o ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6- sulfônico), o qual é gerado pela oxidação deste com persulfato de potássio, e a redução do ABTS radicalar acontece na presença de hidrogênios doados pelo antioxidante, causando a descoloração da solução (RUFINO et al., 2007; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011). Com essa metodologia, é possível medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 15 e demonstraram que o método foi linear na faixa de concentração testada (0,025– 0,375 mg/mL), para o controle positivo, Trolox. O método foi linear na faixa de concentração testada tendo regressão linear estatística significativa, com equação da reta: $Y = 6,6221X - 0,8896$, e o coeficiente de determinação (r^2) de 0,9959, sugerindo que 99,59% dos valores são explicados em torno da média, sendo minimizados os resíduos.

Figura 15. Curva de regressão linear obtida da média das seis curvas de análise autênticas da avaliação da atividade antioxidante do Trolox (n=6).



Após a obtenção dos dados da regressão foi feita a análise de resíduos, pela qual se investiga a diferença entre os valores de y obtidos e os valores de y estimados pelo modelo de regressão, e a análise da falta de ajuste. A Tabela 11 mostra os resultados da análise de variância (ANOVA) para a análise de resíduos e da falta de ajuste.

Tabela 11 – Resultados da ANOVA para a análise de resíduos e da falta de ajuste da avaliação da atividade antioxidante do Trolox (n = 6)

Fonte	SQ	g.l.	MQ	F cal	F crítico	p-valor
Regressão	14857,12	1	14857,12	20547,06	4,14	0,00
Residual	20,24	28	0,72			
Falta de ajuste	4,98	3	1,66	2,72	2,92	0,06
Erro puro	15,26	25	0,61			
Total		29				

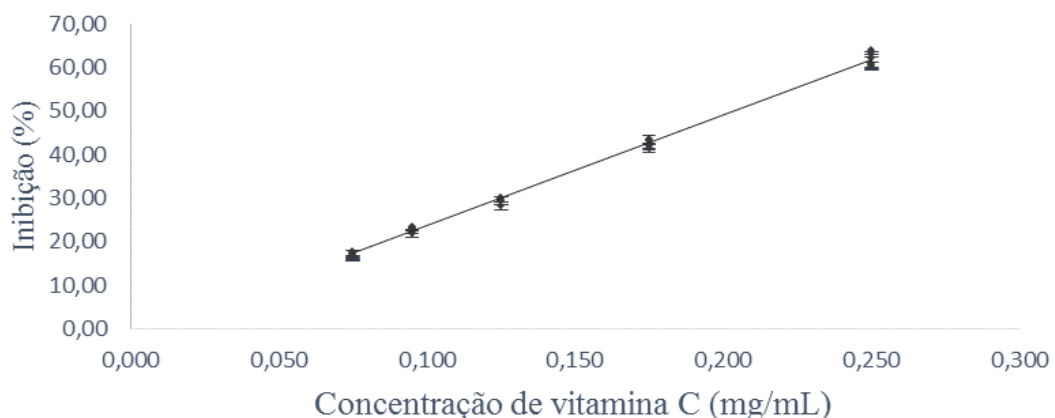
SQ = Soma Quadrática; gl = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

Na análise de resíduos, quando F calculado $\geq F$ crítico, se aceita, com 95% de confiança, que a inclinação da reta é diferente de zero (" a " $\neq 0$) e, com isso, conclui-se que a regressão é significativa. Assim, pode se observar, na Tabela 11, que o F calculado foi muito maior do que o F tabelado ($20547,06 > 4,14$) e, por isso, a regressão foi altamente significativa. Na análise da falta de ajuste, quando o F calculado $\leq F$ crítico, o modelo não apresenta falta de ajuste. Pode ser observado que o valor do F calculado foi menor do que o F tabelado ($2,72 < 2,92$) e, assim, conclui-se que o modelo linear apresentou-se adequado.

E para a determinação da concentração de Trolox necessária para reduzir 50% do radical ABTS disponível, utilizou-se a equação da reta ($Y = 6,6221X - 0,8896$), obtendo-se IC_{50} 0,29 mg/mL.

Posteriormente, determinou-se a equação da reta e avaliou-se a regressão e falta de ajuste para a vitamina C. Os resultados, apresentados na Figura 16, demonstraram que o método foi linear na faixa de concentração testada (0,075 – 0,250 mg/mL), tendo regressão linear estatística significativa, com equação da reta: $Y = 255,06 X - 1,8835$, e o coeficiente de determinação (r^2) de 0,9971, sugerindo que 99,71% dos valores são explicados em torno da média, sendo minimizados os resíduos. Portanto, pode dizer que existe uma correlação linear entre a concentração da vitamina C (x) e inibição % (y).

Figura 16. Curva de regressão linear obtida da média das seis curvas de calibração autênticas da avaliação da atividade antioxidante da vitamina C ($n=6$).



Após a obtenção dos dados da regressão foi feita a análise de resíduos, pela qual se investiga a diferença entre os valores de y obtidos e os valores de y estimados pelo modelo de

regressão, e a análise da falta de ajuste. A Tabela 12 mostra os resultados da análise de variância (ANOVA) para a análise de resíduos e da falta de ajuste.

Tabela 12 – Resultados da ANOVA para a análise de resíduos e da falta de ajuste da avaliação da atividade antioxidante da vitamina C (n = 6)

Fonte	SQ	g.l.	MQ	F cal	F crítico	p-valor
Regressão	7697,24	1	7697,24	9487,55	4,19	0,00
Residual	22,72	28	0,81			
Falta de ajuste	2,98	3	0,99	1,26	2,99	0,30
Erro puro	19,73	25	0,79			
Total		29				

SQ = Soma Quadrática; gl = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

Na análise de resíduos, quando F calculado $\geq F$ crítico, se aceita, com 95% de confiança, que a inclinação da reta é diferente de zero (“a” $\neq 0$) e, com isso, conclui-se que a regressão é significativa. Assim, pode se observar, na Tabela 12, que o F calculado foi muito maior do que o F tabelado ($9487,55 > 4,19$) e, por isso, a regressão foi altamente significativa. Na análise da falta de ajuste, quando o F calculado $\leq F$ crítico, o modelo não apresenta falta de ajuste. Pode ser observado que o valor do F calculado foi menor do que o F tabelado ($1,26 < 2,99$) e, assim, conclui-se que o modelo linear apresentou-se adequado.

E para a determinação da concentração de vitamina C necessária para reduzir 50% do radical ABTS disponível, utilizou-se a equação da reta ($Y = 6,6221X - 0,8896$), obtendo-se IC_{50} 0,20 mg/mL. Esse valor foi menor que o obtido para o Trolox, indicando, mais uma vez, a alta capacidade antioxidante da vitamina C utilizada.

4.6 Caracterização das nanopartículas

4.6.1 Análise morfológica

As nanopartículas foram preparados pela dispersão de diferentes quantidades de material polimérico, gelatina, em água purificada, nas proporções gelatina:RS do Subproduto de 1:1; 0,8:1; 0,75:1; 0,67:1; 0,6:1; 0,5:1 . Posteriormente, adicionou-se o SP à dispersão.

Após 30 min sob agitação, a mistura foi (TOLEDO, 2013). Gotejada em água purificada gelada (10 °C) mantida sob agitação, o sistema formado foi analisado em microscópio óptico.

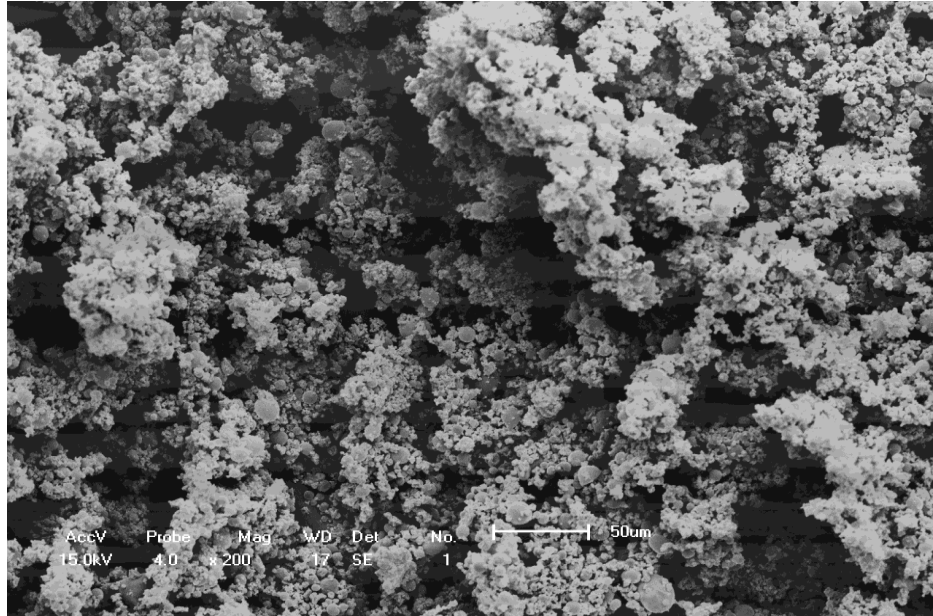
As NP a partir de menores concentrações (0,60:1; 0,50:1; 0,75:1) apresentaram grande quantidade de artefatos, e alta quantidade de aglomerados. Por outro lado, as NP nas proporções de 0,67:1 e 0,8:1 (gelatina:RS) foram escolhidos por apresentarem as menores quantidades de polímero em que foi possível obter a maior capacidade de formação de partículas, assim, como a quantidade das estruturas. Dessa forma, essas proporções foram as secas pela técnica de *spray drying* e utilizadas nas análises posteriores.

A técnica por *spray drying* é um método que possui grandes vantagens, como ser uma técnica simples e rápida; baixo custo do processo; dispensa as etapas de lavagens necessárias em outras técnicas de preparo para isolar as nanopartículas ou eliminar os resíduos de solventes. Permite uma boa eficiência de encapsulação; sem a utilização de agentes reticulantes, que podem levar a efeitos colaterais tóxicos (resíduo) ou reações não desejadas com o fármaco (BROADHEAD et al., 1992; ESPOSITO et al., 1996; PALMIERI et al., 1994; ZHANG et al., 2000; VENUGOPAL; SINGH, 2001; MOHAMED et al., 2011). A transposição para a escala industrial é mais fácil; alta qualidade das partículas produzidas; processo de etapa única; reprodutibilidade; permitir o controle do tamanho das partículas; permitir uma produção contínua e ótima estabilidade do produto final (SILVA et al., 2003; SANTOS et al., 2005; SU et al., 2008; OLIVEIRA e FATIBELLO-FILHO, 2009; MOHAMED et al., 2011). Entretanto as desvantagens encontram-se no custo elevado do equipamento (SILVA et al., 2003; OLIVEIRA; FATIBELLO-FILHO, 2009).

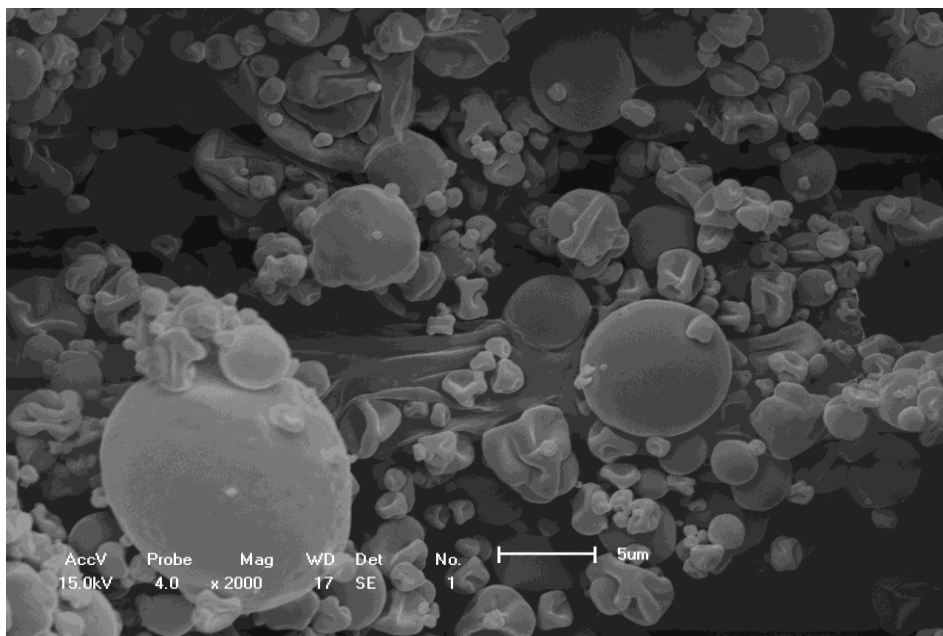
A encapsulação por *spray drying* é uma técnica útil para a micro/nanoencapsulação de substâncias sensíveis ao calor, pois mesmo utilizando temperaturas elevadas apresenta um processo de secagem bastante rápido, tornando possível o preparo tanto de microcápsulas como de microesferas, dependendo se a substância ativa está dissolvida ou dispersa na solução polimérica (SILVA et al., 2003).

Dessa forma, a análise morfológica das NP brancas e das NP contendo vitamina C foi realizada por meio de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura. As nanopartículas brancas apresentaram-se esféricas, com uniformidade de superfície (ZHANG et al., 2000), em sua maioria, e com variação morfológica e de tamanho. Observou-se um grande número de nanopartículas com depressões na superfície (Figura 17 e 18).

Figura 17. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nanopartículas de subproduto 50% (p/p) e gelatina, mostrando topografia exterior, partículas brancas: 1% SP: 0,8% gelatina. Tamanho original 200x (a); 2000x (b).

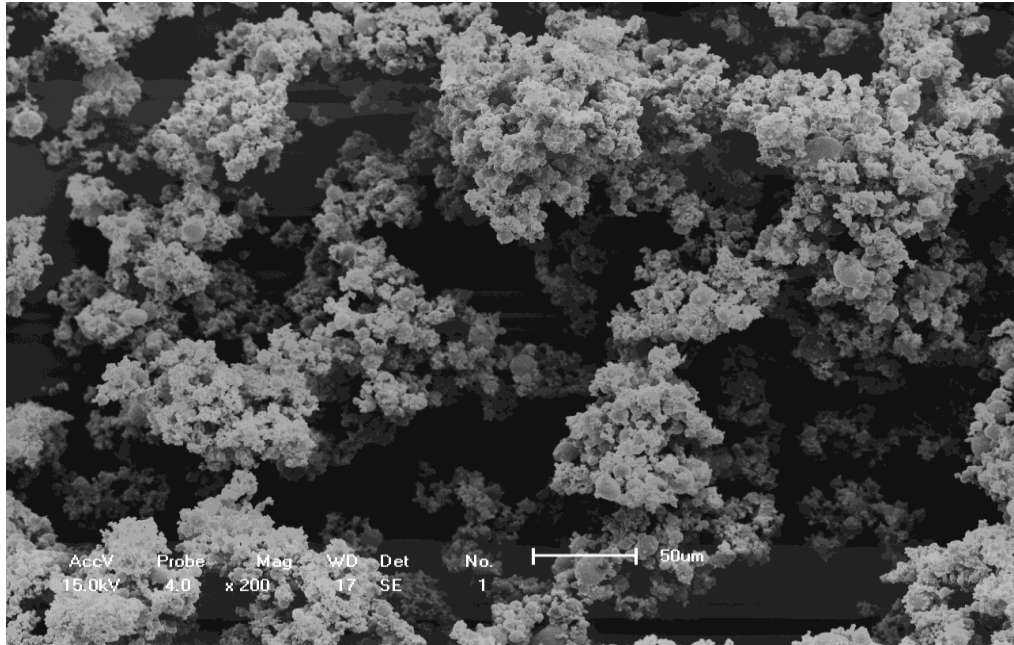


(a)

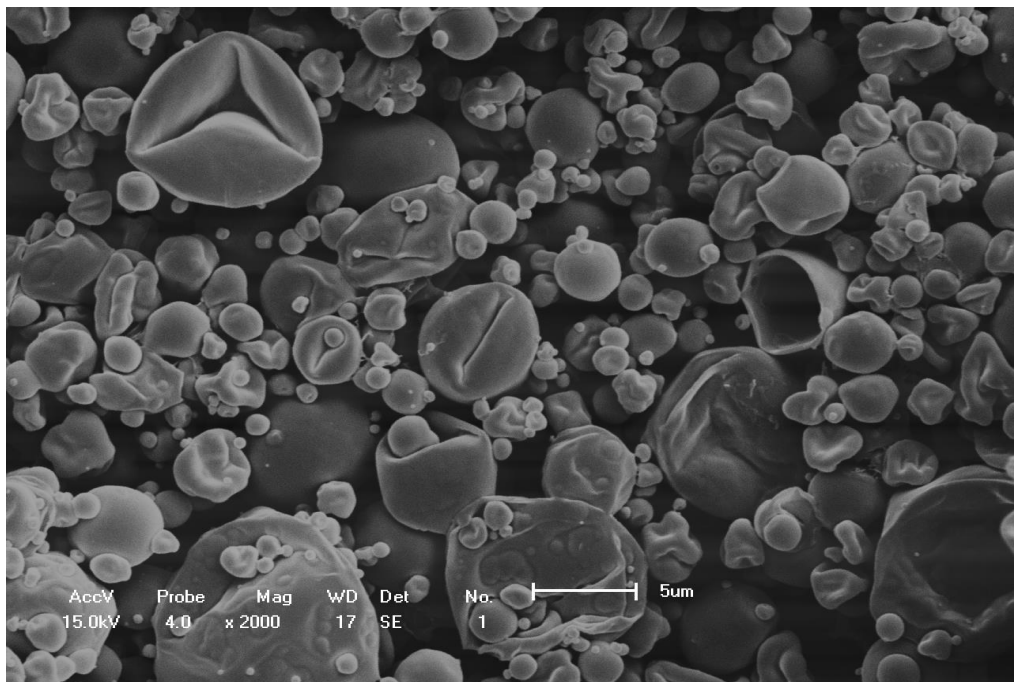


(b)

Figura 18. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nanopartículas de subproduto 50% (p/p) e gelatina, mostrando topografia exterior, partículas brancas: 1% SP: 0,67% gelatina. Tamanho original 200x (a); 2000x (b).



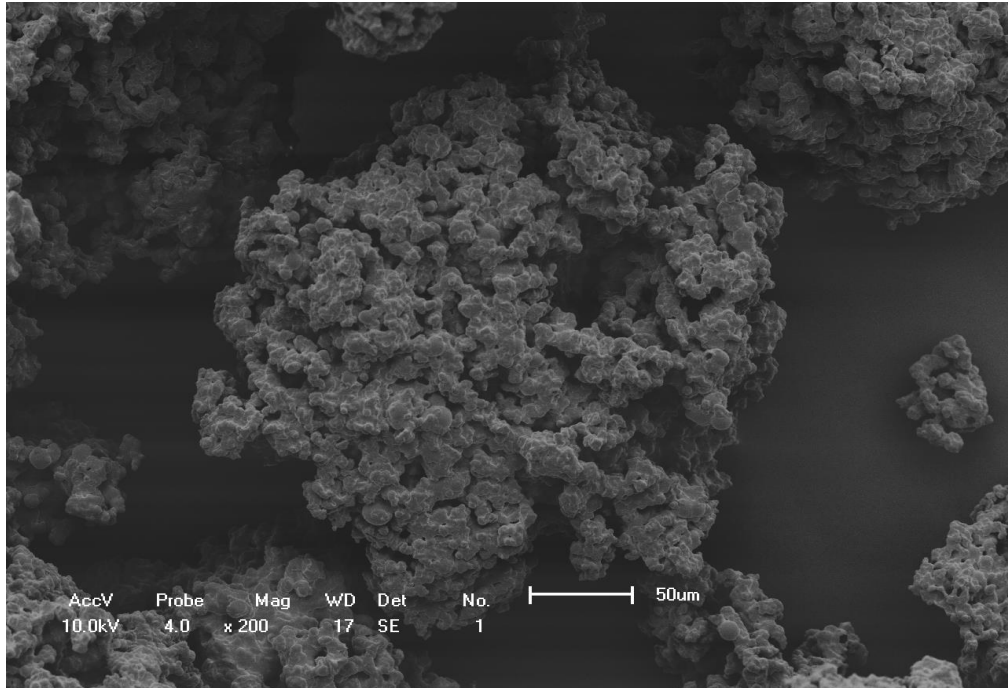
(a)



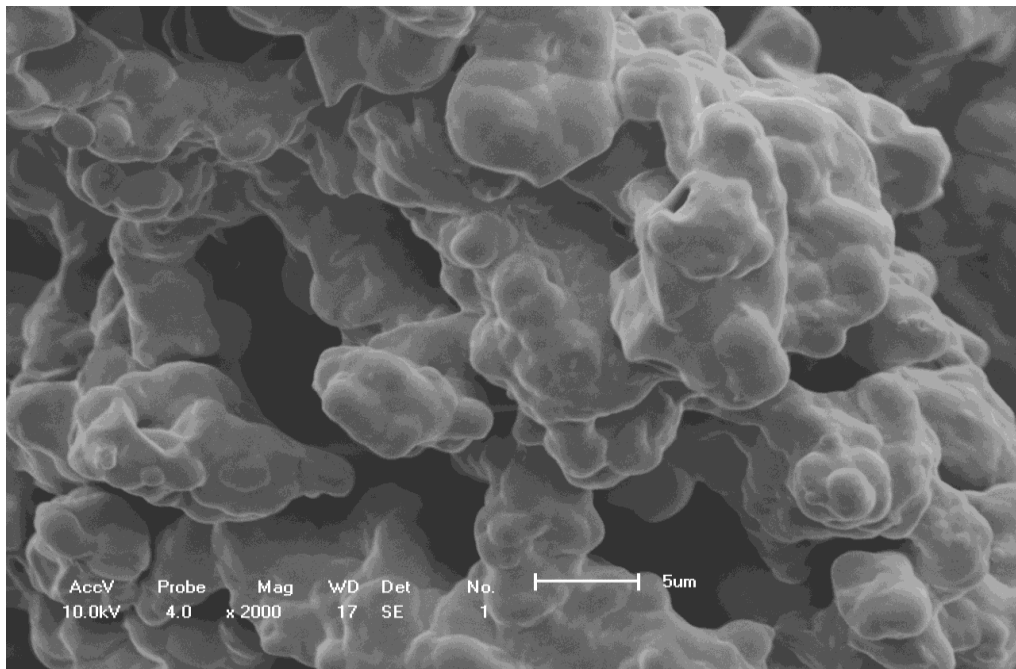
(b)

As nanopartículas contendo ácido ascórbico (Figuras 19 e 20) também mostraram-se esféricas, porém com uma maior aglomeração. Pode-se observar que as NP contendo ácido ascórbico possivelmente sofreram influência de uma possível interação entre os formadores das partículas (SP e a gelatina) com a vitamina C, a qual dificultou a separação das estruturas obtidas. Considerando a presença de vitamina C, as NP que possuem uma maior concentração de gelatina (0,8%) apresentaram uma melhor estruturação.

Figura 19. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nanopartículas de 1% subproduto 50% (p/p) e 0,8% gelatina, mostrando topografia exterior, contendo vitamina C. Tamanho original 200x (a); 2000x (b).

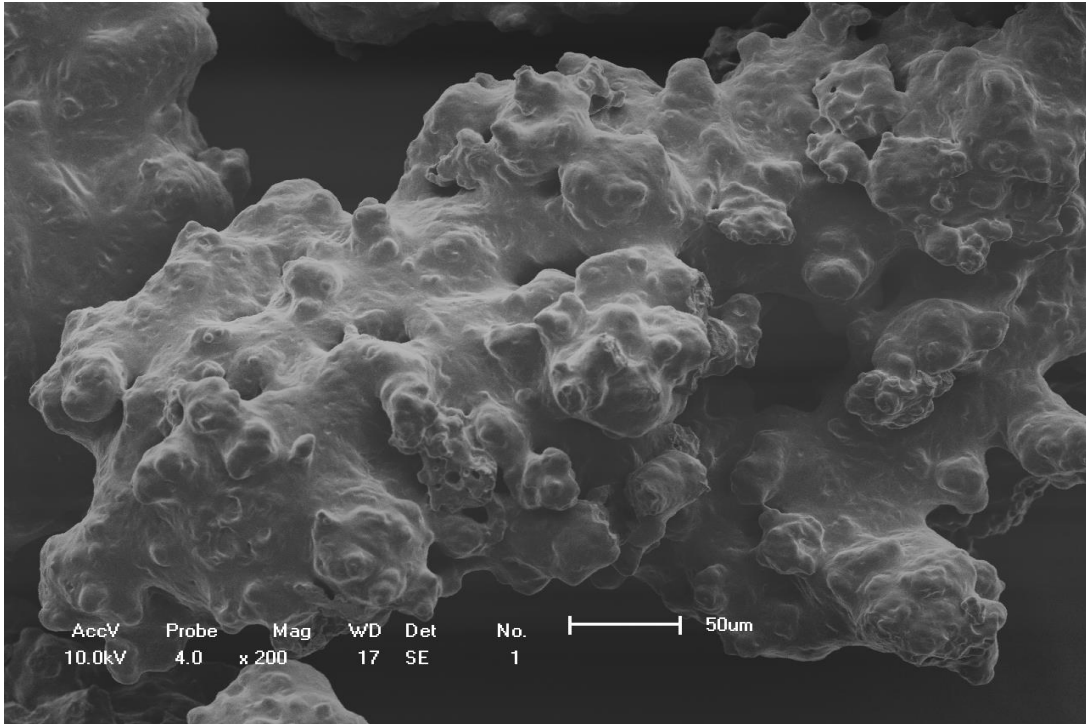


(a)

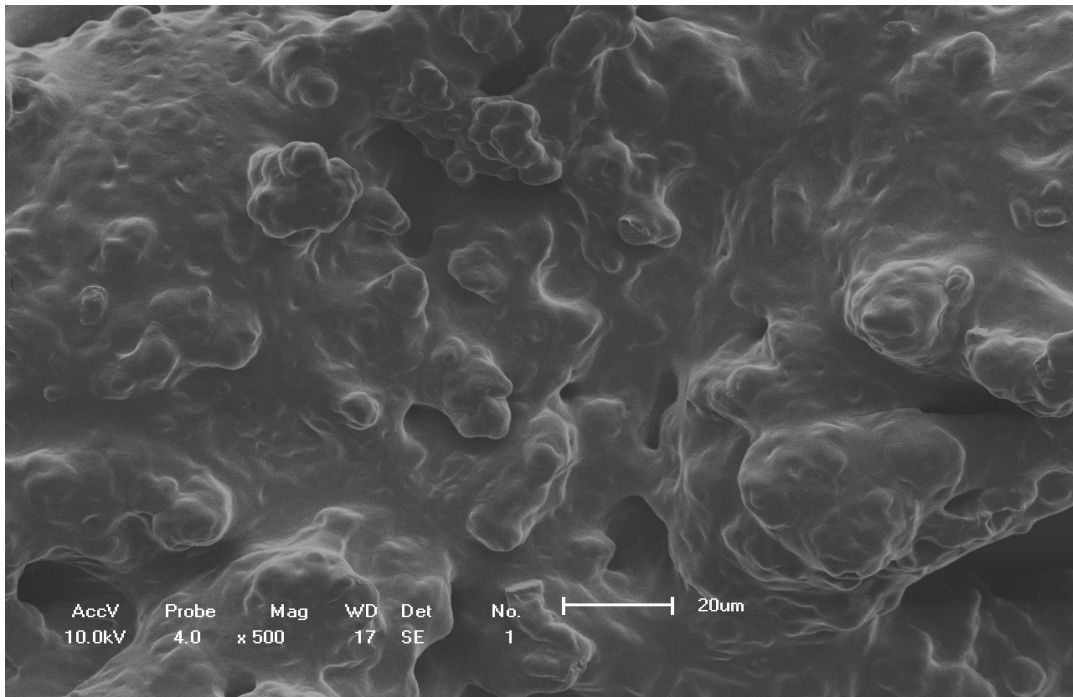


(b)

Figura 20. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nanopartículas de 1% subproduto 50% (p/p) e 0,67% gelatina, mostrando topografia exterior, contendo vitamina C. Tamanho original: 200x (a); 500x (b).



(a)



(b)

Para avaliar essas interações, a análise calorimetria exploratória diferencial (DSC) combinado com outras técnicas, como a termogravimetria, podem fornecer informações sobre as possíveis interações entre extrato-polímero, bem como a estabilidade física dos materiais após os processos tecnológicos (SANSONE et al., 2011a). Por meio dessas análises térmicas, foi demonstrado que filmes formados pelo SP e pela gelatina apresentaram interações e foram capazes de proteger o metronidazol. Essas interações foram comprovadas por análise de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (TOLEDO, 2013). Assim, a presença de vitamina C pode ter intensificado essas interações, no sentido de produzir partículas com uma maior agregação. Além disso, a vitamina C pode estar sendo protegida. Análises futuras deverão ser realizadas para investigar melhor essa interação.

4.6.2 Análise granulométrica

Além da avaliação morfológica das partículas, o conhecimento da distribuição de tamanho é muito importante na Tecnologia Farmacêutica. A classificação dos sistemas de acordo com a análise granulométrica tem grande importância devido ao fato de o tamanho das partículas poder afetar a sua performance em termos de taxa de liberação do fármaco, pois partículas maiores possuem uma taxa de liberação mais lenta do que as partículas menores; a eficiência de encapsulação e a captação das mesmas por células fagocíticas (FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005; NG et al., 2010).

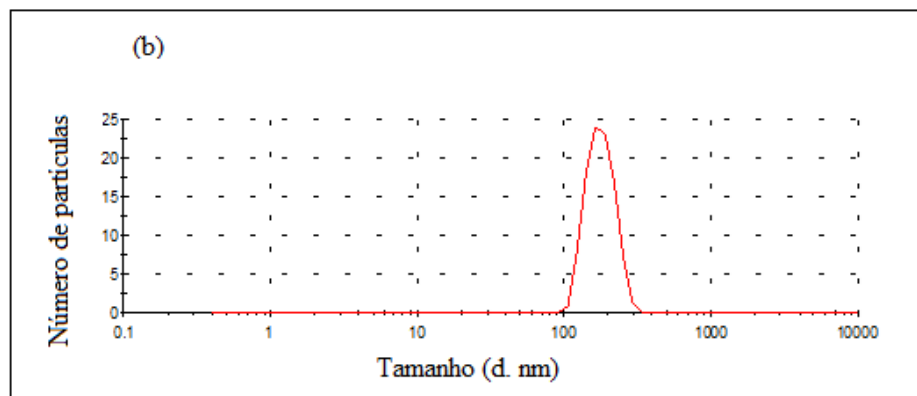
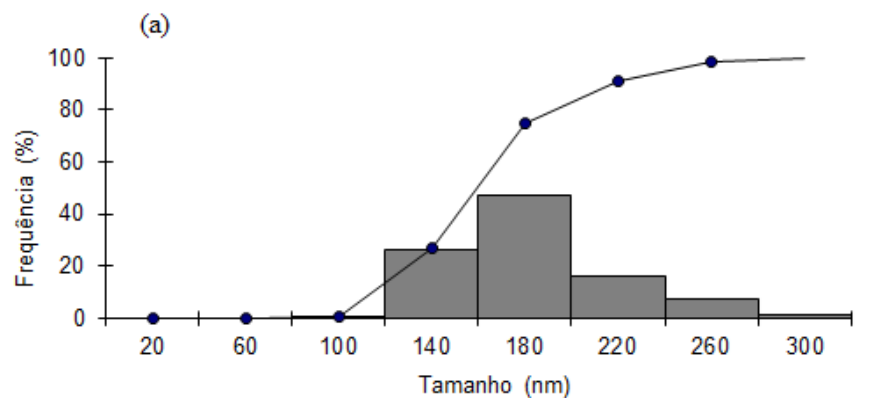
Dependendo do tamanho da partícula, a análise de distribuição de tamanho pode ser realizada por tamisação a seco ou a úmido, por microscopia óptica e eletrônica, por espalhamento de luz, por difração de laser, por elutriação, por sedimentação centrífuga e por permeabilidade e absorção em gás (BARBER, 1993). A determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica das partículas foi realizada por meio da espectroscopia de correlação de fótons (HASSAN, et al., 2009).

O diâmetro médio das estruturas contendo 0,8% gelatina + 1% SP foi de 186,84 nm, apresentando uma pequena variação de tamanho em que o diâmetro mínimo foi de 105,71 nm e o máximo de 295,31 nm. A Tabela 13 e a figura 21 mostram os resultados de tamanho das partículas. Observou-se que aproximadamente 50% das mesmas apresentaram um diâmetro entre 160,0 e 200,0 nm.

Tabela 13 – Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,8% gelatina + 1% SP sem vitamina C

Classe (nm)	Ponto Médio	Frequência Relativa (%)	Frequência cumulativa (%)
$0,0 < X \leq 40,0$	20	0,00	0,00
$40,0 < X \leq 80,0$	60	0,00	0,00
$80,0 < X \leq 120,0$	100	0,97	0,97
$120,0 < X \leq 160,0$	140	26,41	27,37
$160,0 < X \leq 200,0$	180	47,33	74,70
$200,0 < X \leq 240,0$	220	16,48	91,18
$240,0 < X \leq 280,0$	260	7,56	98,74
$280,0 < X \leq 320,0$	300	1,26	100,00
		100,00	

Figura 21. Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,8% gelatina + 1% SP sem vitamina C: (a) histograma dos intervalos de classe (colunas) e representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas (linha). O intervalo de tamanho de classe é de 240 nm. (b) gráfico da distribuição de tamanho das partículas obtido por *light scattering*.

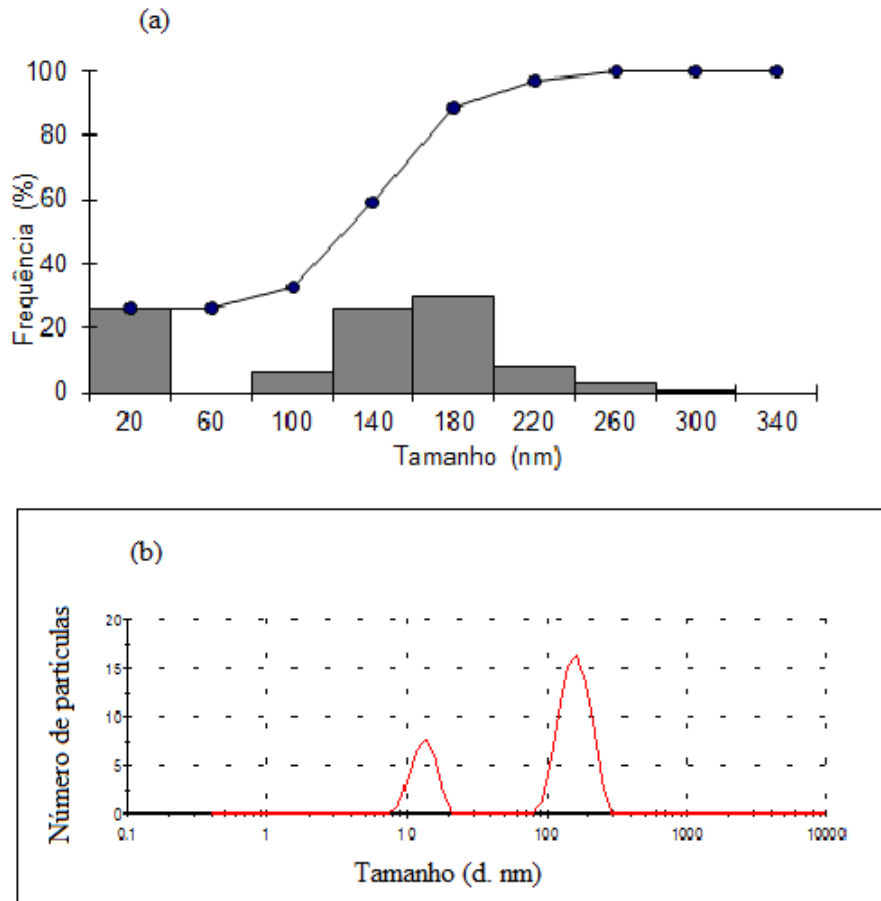


O diâmetro médio das partículas 0,67% gelatina + 1% SP foi de 110,93 nm, apresentando uma grande variação de tamanho em que o diâmetro mínimo foi de 8,72 nm e o máximo foi de 1106,43 nm. A Tabela 14 e a figura 22 demonstram os resultados da análise das partículas. Observou-se que cerca 88,71% das estruturas apresentaram um diâmetro menor que 200 nm, e que na classe de 160 a 200 nm há a maior frequência (aproximadamente 30%). Foi possível observar duas populações distintas de tamanho. Uma de menor intensidade, com tamanho entre 5 e 20 nm, e outra, de maior intensidade, com tamanho acima de 80 nm. Esse resultado pode ser devido ao menor teor de gelatina e, conseqüentemente, a formação de pequenas estruturas constituídas principalmente de SP.

Tabela 14 – Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,67% gelatina + 1% SP sem vitamina C

Classe (nm)	Ponto Médio	Frequência Relativa (%)	Frequência cumulativa (%)
$0,0 < X \leq 40,0$	20	26,42	26,42
$40,0 < X \leq 80,0$	60	0,00	26,42
$80,0 < X \leq 120,0$	100	6,52	32,94
$120,0 < X \leq 160,0$	140	26,20	59,13
$160,0 < X \leq 200,0$	180	29,58	88,71
$200,0 < X \leq 240,0$	220	8,23	96,94
$240,0 < X \leq 280,0$	260	3,01	99,95
$280,0 < X \leq 320,0$	300	0,05	100,00
$320,0 < X \leq 360,0$	340	0,00	100,00
		100,00	

Figura 22. Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,67% gelatina + 1% SP sem vitamina C: (a) histograma dos intervalos de classe (colunas) e representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas (linha). O intervalo de tamanho de classe é de 40 nm. (b) gráfico da distribuição de tamanho das partículas obtido por *light scattering*.

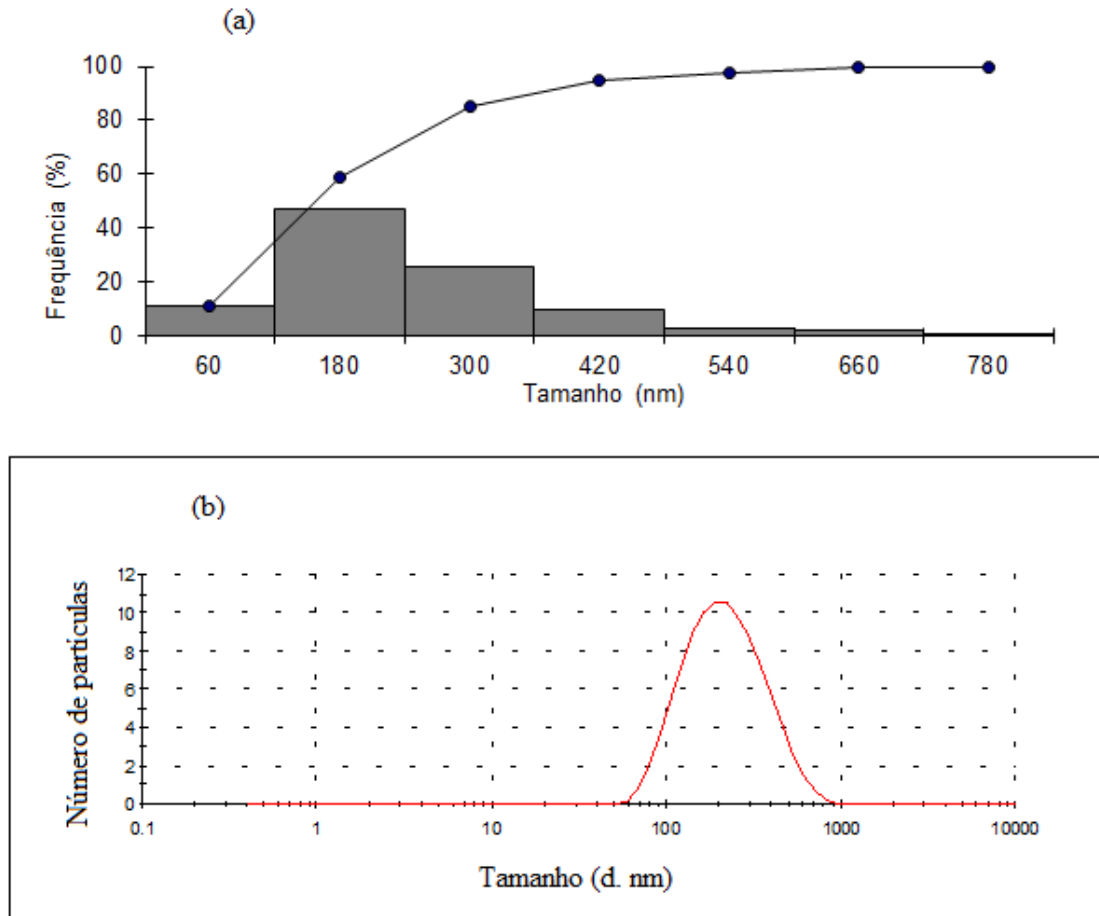


O diâmetro médio das partículas contendo 0,8% gelatina + 1% SP contendo vitamina C foi de 298,53 nm, apresentando uma grande variação de tamanho, em que o diâmetro mínimo foi de 58,77 nm e o máximo foi de 615,14 nm. A Tabela 15 e a figura 23 mostram os resultados da análise das partículas. Observou-se que cerca 47,42% das mesmas apresentaram um diâmetro menor que 220,19 nm, e que na classe de 120 a 240 nm há a maior frequência (aproximadamente 60%).

Tabela 15 – Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,8% gelatina + 1% SP contendo vitamina C

Classe (nm)	Ponto Médio	Frequência Relativa (%)	Frequência cumulativa (%)
$0,0 < X \leq 120,0$	60	11,60	11,6
$120,0 < X \leq 240,0$	180	47,42	59,02
$240,0 < X \leq 360,0$	300	26,06	85,07
$360,0 < X \leq 480,0$	420	9,92	94,99
$480,0 < X \leq 600,0$	540	2,69	97,69
$600,0 < X \leq 720,0$	660	2,14	99,83
$720,0 < X \leq 840,0$	780	0,17	100
		100	

Figura 23. Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,8% gelatina + 1% SP contendo vitamina C: (a) histograma dos intervalos de classe (colunas) e representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas (linha). O intervalo de tamanho de classe é de 120 nm. (b) gráfico da distribuição de tamanho das partículas obtido por *light scattering*.

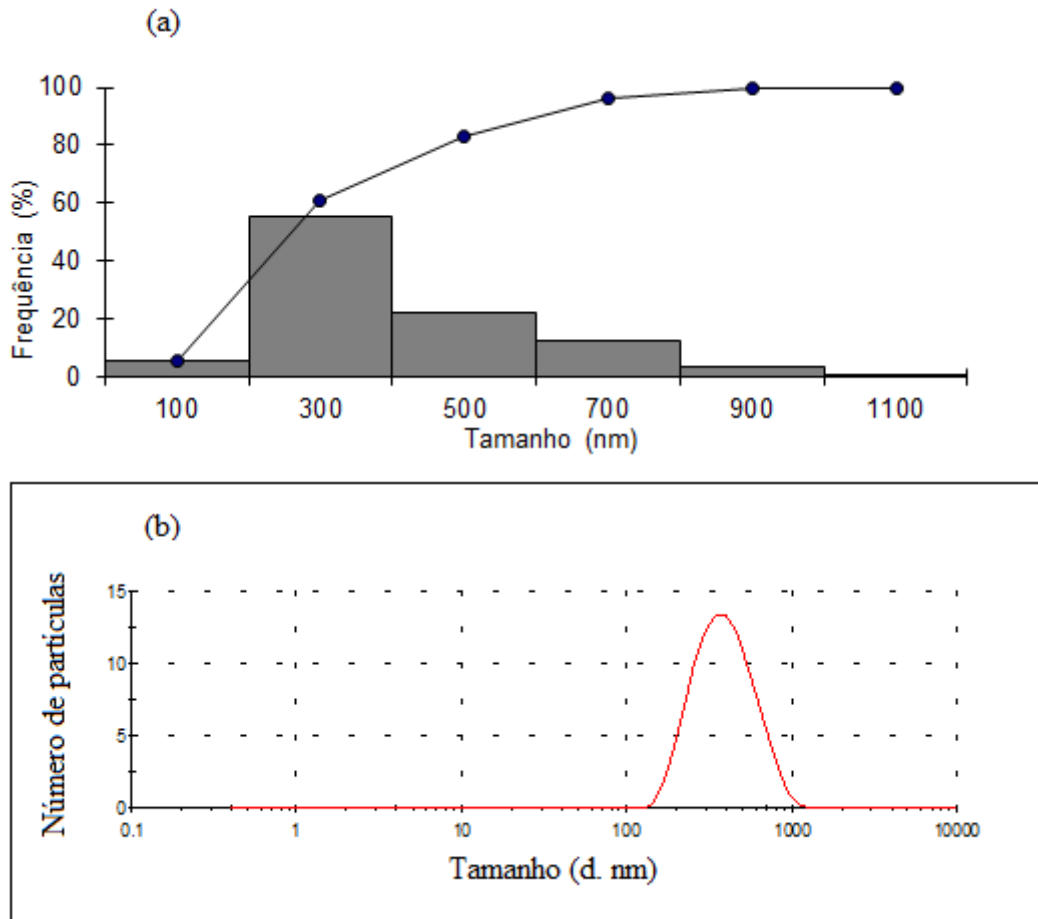


O diâmetro médio das partículas contendo 0,67% gelatina + 1% SP e vitamina C foi de 480,59 nm, apresentando uma grande variação de tamanho em que o diâmetro mínimo foi de 141,77 nm e o máximo foi de 1106,43 nm. A Tabela 16 e a Figura 24 mostram os resultados da distribuição de tamanho das partículas. Observou-se que cerca 61,19% das mesmas apresentaram um diâmetro menor que 400 nm, e que na classe de 200 a 400 nm há a maior frequência, com 55,42%.

Tabela 16 – Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,67% gelatina + 1% SP contendo vitamina C

Classe (nm)	Ponto Médio	Frequência Relativa (%)	Frequência cumulativa (%)
$0,0 < X \leq 200,0$	100	5,77	5,77
$200,0 < X \leq 400,0$	300	55,42	61,19
$400,0 < X \leq 600,0$	500	22,22	83,41
$600,0 < X \leq 800,0$	700	12,57	95,97
$800,0 < X \leq 1000,0$	900	3,80	99,78
$1000,0 < X \leq 1200,0$	1100	0,22	100
		100,00	

Figura 24. Distribuição de tamanho das nanopartículas de 0,67% gelatina + 1% SP contendo vitamina C: (a) histograma dos intervalos de classe (colunas) e representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas (linha). O intervalo de tamanho de classe é de 200 nm. (b) gráfico da distribuição de tamanho das partículas obtido por *light scattering*.



A polidispersão é um parâmetro que analisa a função de autocorrelação em medidas de espalhamento dinâmico de luz. Nesta análise, assume-se que as partículas possuem um único tamanho e um ajuste exponencial simples é aplicado à função de autocorrelação. Sabe-se que índices de polidispersão inferiores a 0,30 indicam que a distribuição de tamanho de partículas é homogênea (TRIERWEILER, 2009; MALVERN, 2013).

Tabela 17– Valores de índice de polidispersão das nanopartículas obtidas a partir do subproduto de própolis (n =3, média ± s)

Tipos de NP	Índice de polidispersão
NP 0,67% gelatina + 1% SP	0,758 ± 0,205
NP 0,8% gelatina + 1% SP	0,729 ± 0,167
NP 0,67% gelatina + 1% SP com vit C	0,444 ± 0,220
NP 0,8% gelatina + 1% SP com vit C	0,797 ± 0,287

Assim, a tabela 17 mostra valores obtidos para o índice de polidispersão das NP, pode-se observar que as quatro amostras apresentaram índices superiores a 0,30; demonstrando que as preparações apresentaram uma grande variação no tamanho das partículas. A distribuição de tamanho das NP 0,67% gelatina + 1% SP com AA apresentaram um índice de polidispersão mais próximo a 0,30; indicando que as mesmas tendem a uma melhor homogeneidade. Além disso, nas nanopartículas de 0,67% gelatina + 1% SP sem vitamina C, apesar das duas populações granulométricas distintas, não apresentaram índice de polidispersão tão diferente das outras preparações.

4.6.3 Potencial zeta

A maioria das partículas dispersas em um sistema aquoso adquirem carga na superfície, principalmente por ionização de grupos ou adsorção de espécies carregadas. As cargas da superfície modificam a distribuição dos íons na interface, resultado em uma camada ao redor da partícula diferente da solução. O Potencial zeta (cargas de superfície) é uma das principais forças que mediam as interações interpartículas. As partículas com alto potencial zeta e mesmo sinal de carga, seja positivo ($> +30$ mV) ou negativo (< -30 mV), irão se repelir. Para moléculas e partículas pequenas e com densidade baixa o suficiente para permanecerem em suspensão, um alto potencial confere estabilidade, ou seja, em uma suspensão ou dispersão existirá uma menor tendência a agregação das mesmas que mediam as interações (TRIERWEILER, 2009; MALVERN, 2013). Os resultados estão apresentados na Tabela 18.

Tabela18 – Valores de potencial zeta das nanopartículas obtidas a partir do subproduto de própolis (n =3, média \pm s)

Tipos de NP	Potencial zeta (mV)
NP 0,67% gelatina + 1% SP	0,854 \pm 0,108
NP 0,8% gelatina + 1% SP	0,544 \pm 0,191
NP 0,67% gelatina + 1% SP com vit C	-3,847 \pm 0,275
NP 0,8% gelatina + 1% SP com vit C	0,228 \pm 0,056

Pôde-se observar que as nanopartículas apresentaram valores do potencial zeta com cargas bem baixas, demonstrando uma baixa repulsão entre as partículas o que tende a agregação das mesmas. As NP com a menor concentração de gelatina (0.67%) apresentaram um potencial zeta mais positivo, demonstrando a característica mais positiva do SP. A presença de vitamina C influenciou no potencial zeta das preparações, diminuindo o mesmo. Além disso, NP 0,67% gelatina + 1% SP com vit C foi a amostra que apresentou a menor agregação das partículas, uma consequência do maior valor de potencial zeta (mesmo que negativo).

4.6.4 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação

O teor e a eficiência de encapsulação são importantes para se verificar a quantidade de vitamina C nas nanopartículas e se o método utilizado foi satisfatório, em termos de capacidade de aprisionamento (HERMANN; BODMEIER, 1998). Assim, o teor de ácido ascórbico das nanopartículas foi calculado utilizando-se a curva de análise e levando-se em consideração as diluições efetuadas. A eficiência de encapsulação foi determinada dividindo o teor de vitamina C das nanopartículas pelo teor de vitamina C teórico das mesmas, multiplicando o resultado por 100, ambos os parâmetros foram avaliados pelo método cromatográfico e os resultados estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Teor e eficiência de encapsulação (EE) das nanopartículas contendo vitamina C preparadas pela técnica de *spray drying* (n = 3, média ± s)

Nanopartículas	Teor de vitamina C (%, p/p)	EE(%)
1% SP + 0,67% gelatina	8,17 ± 0,00	35,46 ± 0,08
1% SP + 0,8% gelatina	7,88 ± 0,29	36,24 ± 1,42

EE(%) = eficiência de encapsulação

As NP apresentaram uma eficiência de encapsulação não muito alta, com valores próximos a 25% (BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI et al., 2003; BRUSCHI et al., 2004; FERREIRA et al., 2012; IRA et al., 2013). A eficiência de encapsulação de nanopartículas pode ser afetada por diversos fatores, a baixa concentração dos polímeros assim, como as altas temperatura podem influenciar negativamente essa eficiência (BRUSCHI et al., 2003; JYOTHI et al., 2010).

Para verificar se houve diferença estatística entre as eficiências de encapsulação e os teores de vitamina C das duas nanopartículas produzidas, aplicou-se ANOVA de um fator, seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas, os resultados demonstram que não houve diferença estatística entre as eficiências de encapsulação e os teores de ácido ascórbico das NP (1% SP + 0,67% gelatina) e NP (1% SP + 0,8% gelatina) ($p = 0,39$ e $0,101 > 0,05$, respectivamente).

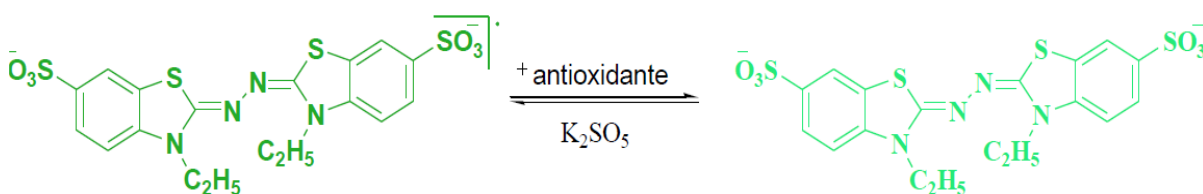
4.6.5 Avaliação da atividade antioxidante das nanopartículas

Os compostos fenólicos são potentes antioxidantes naturais obtidos de fontes naturais, podendo agir como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (ISLA et al., 2001; BARREIROS et al., 2006). Os antioxidantes naturais são promissores na prevenção do câncer de pele, pois muitos já mostraram efeitos anticarcinogênico e antimutagênico, que possuem baixa toxicidade (OLIVEIRA, 2011). Nesse caso, o SP pode ainda apresentar atividade antioxidante o que vai ser adicional a atividade da vitamina C.

Nesse sentido, para a avaliação da capacidade antioxidante nas nanopartículas com e sem vitamina C utilizou-se o radical ABTS, um composto cromóforo quimicamente estável, com alta solubilidade em água que pode ser utilizado para a quantificação da atividade

antioxidante tanto de amostras hidrossolúveis como lipossolúveis, o que lhe confere vantagem em relação a outros métodos. (MILLER et al., 1993; RUFINO, et al., 2007; OLIVEIRA, 2011). A geração do radical ABTS aconteceu a partir da oxidação do sal pelo persulfato de potássio, cuja reação ocorre na ausência de luz, durante 12 a 16 horas. A energia de ativação requerida é muito baixa e a reação começa imediatamente, mas não alcança um máximo de absorbância até o transcurso de 6 horas. O ABTS reage estequiometricamente pela relação 1:0,05 com o persulfato de potássio (Figura 25) (RE et al., 1999; ARTS et al., 2001; PANNALA et al., 2001; HENRIQUES et al., 2002).

Figura 25. Estabilização do radical ABTS por um antioxidante, após a obtenção do mesmo pela reação do ABTS com o persulfato de potássio.

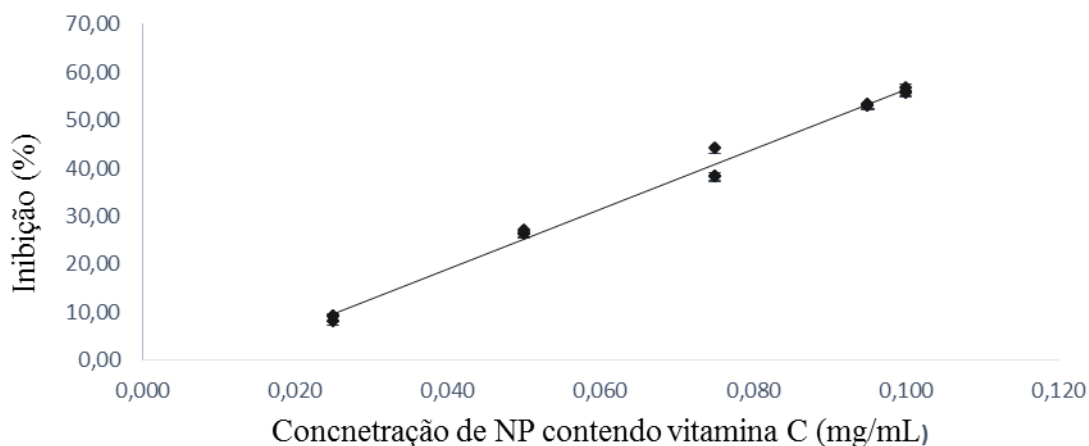


Fonte: OLIVEIRA, 2011

Primeiramente determinou-se a atividade antioxidante das nanopartículas contendo vitamina C. Para essa avaliação, determinou-se a equação da reta e avaliou-se a regressão e a falta de ajuste. Os resultados dessa avaliação para as NP 0,67% gelatina +1SP contendo vitamina C (Figura 26) demonstraram que o método foi linear na faixa de concentração testada (0,025 – 0,100 mg/mL), tendo regressão linear estatística significativa, com equação da reta: $Y = 624,6 X - 6,013$, com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9929 e coeficiente de correlação (r) de 0,9964. O r^2 sugeriu que 99,29% dos valores são explicados em torno da

média, sendo minimizados os resíduos. Portanto, pode dizer que existe uma correlação linear entre a concentração da vitamina C (x) e inibição % (y).

Figura 26. Curva de regressão linear obtida da média das cinco curvas de análise autênticas das nanopartículas 0,67% gelatina +1SP contendo vitamina C (n=3).



Após a obtenção dos dados da regressão foi feita a análise de resíduos, pela qual se investiga a diferença entre os valores de y obtidos e os valores de y estimados pelo modelo de regressão, e a análise da falta de ajuste. A Tabela 20 mostra os resultados da análise de variância (ANOVA) para a análise de resíduos e da falta de ajuste.

Tabela 20– Resultados da ANOVA para a análise de resíduos e da falta de ajuste da avaliação da atividade antioxidante das nanopartículas 0,67% gelatina +1SP contendo vitamina C (n = 3)

Fonte	SQ	g.l.	MQ	F cal	F crítico	p-valor
Regressão	4646,33	1	4646,33	818,57	4,66	0,00
Residual	33,21	13	2,55			
Falta de ajuste	9,39	3	3,13	1,31	3,71	0,32
Erro puro	23,81	10	2,38			
Total		29				

SQ = Soma Quadrática; gl = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

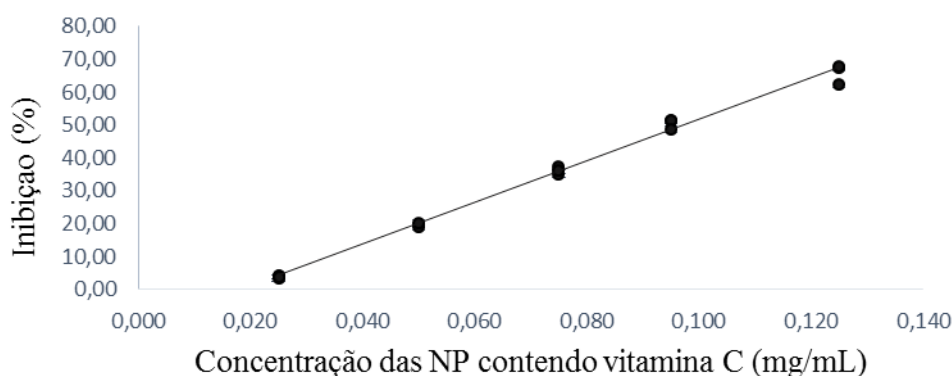
Na análise de resíduos, quando F calculado \geq F crítico, se aceita, com 95% de confiança, que a inclinação da reta é diferente de zero ($"a" \neq 0$) e, com isso, conclui-se que a regressão é significativa. Assim, pode se observar, na Tabela 20, que o F calculado foi muito maior do que o F tabelado ($818,57 > 4,66$) e, por isso, a regressão foi altamente significativa.

Na análise da falta de ajuste, quando o F calculado \leq F crítico, o modelo não apresenta falta de ajuste. Pode ser observado que o valor do F calculado foi menor do que o F tabelado ($1,31 < 3,71$) e, assim, conclui-se que o modelo linear apresentou-se adequado.

E para a determinação da concentração de nanopartículas contendo vitamina C necessária para reduzir 50% do radical ABTS disponível (RUFINO, et al., 2007), utilizou-se a equação da reta ($Y = 624,6 X - 6,013$), obtendo-se $IC_{50} 0,089$ mg/mL.

Posteriormente, foi avaliada a atividade antioxidante das nanopartículas 0,8% gelatina + 1% SP contendo vitamina C. A Figura 27 demonstra que o método foi linear na faixa de concentração testada (0,025 – 0,125 mg/mL), tendo regressão linear estatística significativa, com equação da reta: $Y = 635,75 X - 11,61$, com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9941 e coeficiente de correlação (r) de 0,9970. O r^2 sugeriu que 99,41% dos valores são explicados em torno da média, sendo minimizados os resíduos. Portanto, pode dizer que existe uma correlação linear entre a concentração da vitamina C (x) e inibição % (y).

Figura 27. Curva de regressão linear obtida da média das cinco curvas de análise autênticas das nanopartículas 0,8% gelatina +1SP contendo vitamina C (n=3).



Após a obtenção dos dados da regressão foi feita a análise de resíduos, pela qual se investiga a diferença entre os valores de y obtidos e os valores de y estimados pelo modelo de regressão, e a análise da falta de ajuste. A Tabela 21 mostra os resultados da análise de variância (ANOVA) para a análise de resíduos e da falta de ajuste.

Tabela 21– Resultados da ANOVA para a análise de resíduos e da falta de ajuste da avaliação da atividade antioxidante das nanopartículas 0,8% gelatina +1SP contendo vitamina C (n = 3)

Fonte	SQ	g.l.	MQ	F cal	F crítico	p-valor
Regressão	8131,99	1	8131,99	2340,26	4,66	0,00
Residual	48,65	13	3,47			
Falta de ajuste	21,91	3	7,30	3,00	3,59	0,07
Erro puro	26,74	11	2,43			
Total		14				

SQ = Soma Quadrática; gl = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

Na análise de resíduos, quando F calculado $\geq F$ crítico, se aceita, com 95% de confiança, que a inclinação da reta é diferente de zero (“a” $\neq 0$) e, com isso, conclui-se que a regressão é significativa. Assim, pode se observar, na Tabela 21, que o F calculado foi muito maior do que o F tabelado ($2340,26 > 4,66$) e, por isso, a regressão foi altamente significativa. Na análise da falta de ajuste, quando o F calculado $\leq F$ crítico, o modelo não apresenta falta de ajuste. Pode ser observado que o valor do F calculado foi menor do que o F tabelado ($3,00 < 3,59$) e, assim, conclui-se que o modelo linear apresentou-se adequado.

E para a determinação da concentração de vitamina C necessária para reduzir 50% do radical ABTS disponível (RUFINO, et al., 2007), utilizou-se a equação da reta ($Y = 635,75 X - 11,61$), obtendo-se IC_{50} 0,061 mg/mL.

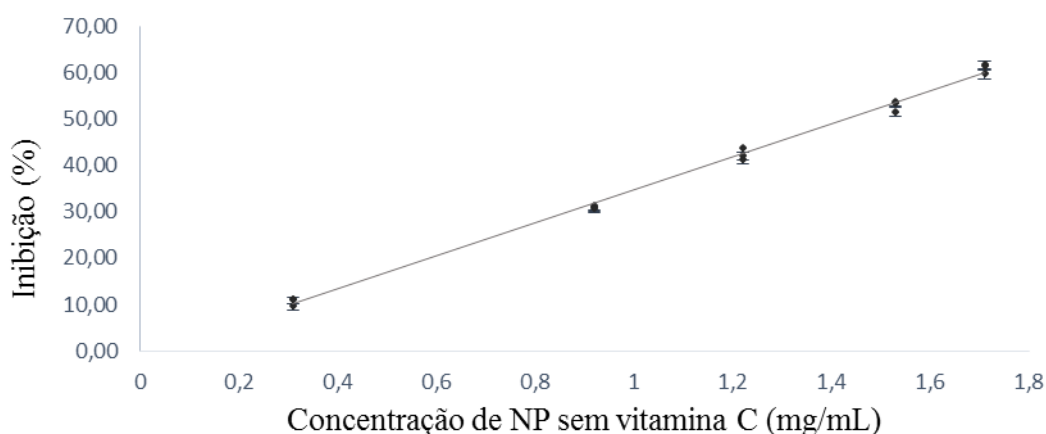
Para verificar se houve diferença estatística entre as atividades antioxidantes das NP que não continham vitamina C, aplicou-se ANOVA de um fator, seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas, os resultados demonstram que houve diferença estatística entre atividades ($p = 0,0022 < 0,05$), indicando que os IC_{50} demonstraram que as NP 0,67% gelatina +1SP apresentaram uma capacidade antioxidante superior as NP 0,8% gelatina +1SP. Esse característica pode ser atribuída a maior quantidade de gelatina, que em meio aquoso, ao intumescer permitiu o relaxamento das cadeias poliméricas facilitando a saída da vitamina C, como demonstrado posteriormente no item 4.6.6.

Na avaliação da atividade antioxidante da vitamina C livre e incorporada as nanopartículas, pode ser observado que o ácido ascórbico presente nas NP teve sua capacidade antioxidante aumentada em aproximadamente 10 vezes. Essa potencialização foi provavelmente possível tanto pela presença de compostos antioxidantes no SP, como os polifenóis, quanto pelo reduzido tamanho das partículas (FREITAS; MERKLE; GANDER,

2005; NG et al., 2010), que melhorou a performance de liberação do AA, além de sua eficiência de encapsulação.

Na avaliação das nanopartículas sem vitamina C, primeiramente determinou-se a atividade antioxidante daquelas contendo 0,67% gelatina +1SP. Os resultados (Figura 28) demonstraram que o método foi linear na faixa de concentração testada (0,31 – 1,71 mg/mL), apresentando regressão linear estatisticamente significativa, com equação da reta: $Y = 35,609X - 0,8959$, com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9964 e coeficiente de correlação (r) de 0,9982. O r^2 sugeriu que 99,64% dos valores são explicados em torno da média, sendo minimizados os resíduos. Portanto, pode dizer que existe uma correlação linear entre a concentração da vitamina C (x) e inibição % (y).

Figura 28. Curva de regressão linear obtida da média das cinco curvas de análise autênticas das nanopartículas 0,67% gelatina +1SP sem vitamina C (n=3).

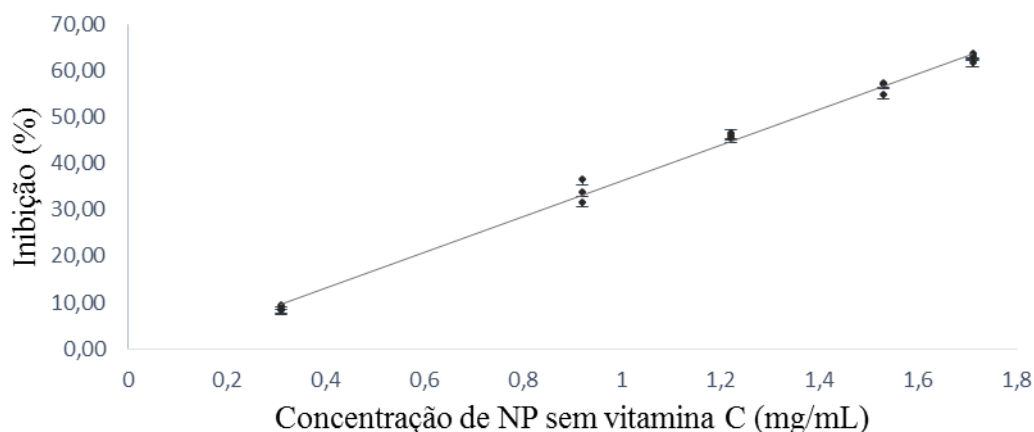


E para a determinação da concentração de NP sem vitamina C necessária para reduzir 50% do radical ABTS disponível (RUFINO, et al., 2007), utilizou-se a equação da reta ($Y = 35,609X - 0,8959$), obtendo-se IC_{50} 1,43 mg/mL.

Posteriormente, determinou-se a atividade antioxidante das nanopartículas NP 0,8% gelatina +1SP sem vitamina C. Os resultados (Figura 29) demonstraram que o método foi linear na faixa de concentração testada (0,31 – 1,71 mg/mL), tendo regressão linear estatística significativa, com equação da reta: $Y = 38,593X - 2,296$, com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9949 e coeficiente de correlação (r) de 0,9974. O r^2 sugeriu que 99,48% dos valores são explicados em torno da média, sendo minimizados os resíduos. Portanto, pode dizer que existe uma correlação linear entre a concentração da vitamina C (x) e inibição % (y).

E para a determinação da concentração de NP sem vitamina C necessária para reduzir 50% do radical ABTS disponível (RUFINO, et al., 2007), utilizou-se a equação da reta ($Y=38,593X - 2,296$), obtendo-se IC_{50} 1,35 mg/mL.

Figura 29. Curva de regressão linear obtida da média das cinco curvas de análise autênticas das nanopartículas 0,8% gelatina +1SP sem vitamina C (n=3).



Para verificar se houve diferença estatística entre as atividades antioxidantes das NP que não continham vitamina C, aplicou-se ANOVA de um fator, seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas, os resultados demonstram que houve diferença estatística entre atividades ($p = 0,0015 < 0,05$), isso indica que os IC_{50} das NP 0,67% gelatina +1SP que apresentaram uma capacidade antioxidante superior as NP 0,8% gelatina +1SP, isso foi possível em consequência da maior presença de gelatina, que ao intumescer facilitou o contato do radical ABTS com os compostos antioxidantes presentes no SP, permitindo, dessa forma, que uma menor quantidade de NP 0,8% gelatina + 1SP fossem necessárias para reduzir 50% do radical presente.

4.6.6 Estudo do perfil de liberação *in vitro* da vitamina C

A avaliação *in vitro* do perfil de liberação de um fármaco é uma etapa de grande importância no estudo de formas farmacêuticas. Esse teste apresenta relevância no controle de qualidade e em diferentes estágios de ciclo de vida de um medicamento. Nos primeiros estágios do desenvolvimento farmacotécnico, são úteis para identificar variáveis críticas na

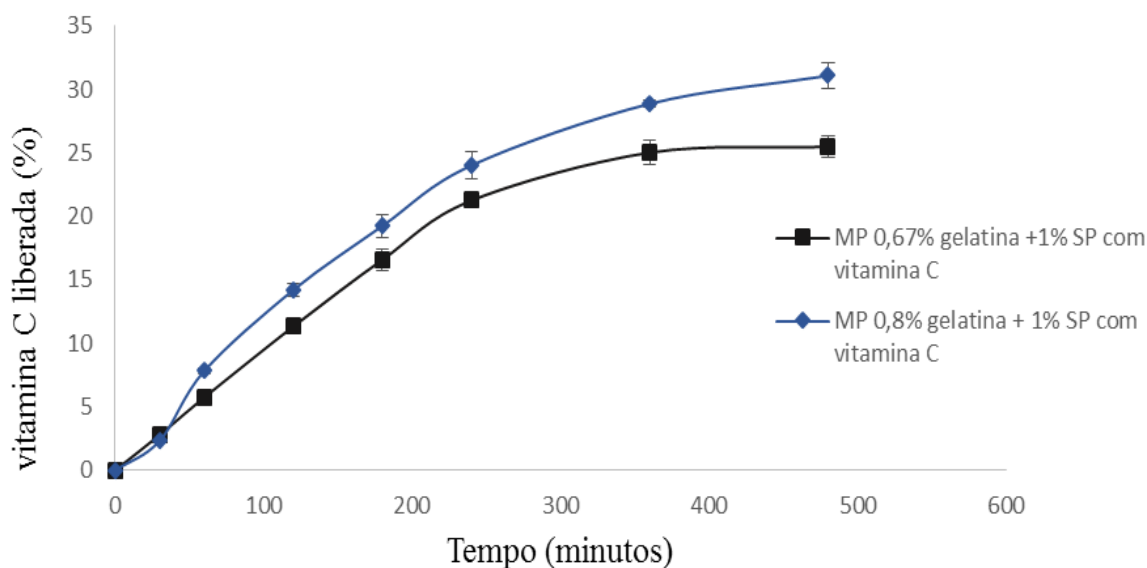
produção, escolher entre diferentes formulações, otimizá-las e fazer avaliações de risco, como no caso de formas farmacêuticas de liberação modificada (PRAÇA, 2010).

As informações obtidas servem para orientar o desenvolvimento e a otimização de formulações/processos, pois podem determinar com precisão os fatores que determinam a cinética de liberação do fármaco durante o desenvolvimento da formulação. Além de prever o comportamento do sistema *in vivo*. Contudo, tais testes não substituem a necessidade de testes pré-clínicos e clínicos (BRUSCHI, 2006; VILLA NOVA, 2012).

Assim, o perfil de liberação da vitamina C foi estudado em um equipamento baseado nas células de difusão de Franz, cujo uso tem sido relatado na literatura para avaliar o perfil de liberação de fármacos (BERTRAM; BODMEIER, 2006; MOEBUS; SIEPMANN; BODMEIER, 2012; VILLA NOVA et al., 2013). O perfil de liberação é obtido pela coleta de amostras de volumes iguais do meio de liberação, em intervalos de tempo determinados, e posterior quantificação da concentração do ativo liberada com o tempo. A relação concentração da substância *versus* tempo é dependente do tipo de solvente, do volume, da temperatura e da velocidade de agitação do meio de liberação e de diferentes fatores: a) da dessorção do fármaco da superfície das partículas; b) da difusão do fármaco através da matriz; c) da difusão através da parede polimérica das cápsulas; d) da erosão da matriz polimérica ou e) da combinação dos processos de difusão e erosão (SCHAFFAZICK, 2003).

Para a análise do perfil de liberação *in vitro* da vitamina C, os experimentos nas células de difusão de Franz foram conduzidos com a utilização da membrana de diálise (acetato de celulose). Todos os experimentos foram realizados em água purificada, sob condições *sink* e com temperatura e agitação controladas. A Figura 30 mostra o perfil de liberação da vitamina C a partir das nanopartículas.

Figura 30. Perfil de liberação *in vitro* da vitamina C a partir das nanopartículas preparadas pelo processo de *spray drying* (n = 3).



O ácido ascórbico puro é exatamente solúvel em água (PEREIRA, 2008; ROWE; SHESKEY QUINN, 2009), e a literatura tem demonstrado que a vitamina C possui uma liberação quase que total nas três primeiras horas de liberação (ESPOSITO et al., 2002; PEREIRA, 2008; ROWE; SHESKEY QUINN, 2009). Assim, as nanopartículas apresentaram liberação lenta da vitamina, podendo ser observado que as partículas que apresentaram uma maior porcentagem de gelatina, NP 0,8% gelatina + 1% SP, em sua composição possuíram uma liberação mais rápida e extensivamente, isto é, uma maior quantidade de vitamina C foi liberada em comparação com aquelas obtidas com menor porcentagem de gelatina (NP 0,67% gelatina + 1% SP). Em consequência, com a maior quantidade de gelatina presente, a mesma ao intumescer permite o relaxamento das cadeias poliméricas que facilitaram a saída da vitamina C. As nanopartículas 0,67% gelatina + 1% SP liberaram, em média, $25,48\% \pm 0,89$, as NP 0,8% gelatina + 1% SP liberaram, em média, $31,08\% \pm 1,03$, respectivamente, em 8 h.

Muitas vezes, a quantidade inicial do fármaco resulta de uma liberação imediata (*burst effect*), motivada ou pela liberação do fármaco existente à superfície do sistema matricial ou por alterações que se verificam na estrutura do sistema com consequente liberação imediata do fármaco seguido de liberação mais lenta. Este modelo é geralmente utilizado para descrever a liberação por vários tipos de formas farmacêuticas de liberação controlada. De maneira ideal, as preparações destinadas a veicular substâncias ativas segundo liberação prolongada apresentam um perfil de liberação de ordem zero, verificando-se que a velocidade

de difusão do fármaco, do interior para o exterior da matriz, é menor que a respectiva velocidade de dissolução, formando uma solução saturada, que permite a cedência constante do fármaco. Esta situação de liberação ideal é muito difícil de obter na prática (LOPES, 2005).

Adicionalmente, Higuchi descreveu o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo. Porém, o uso desta relação em sistemas que intumescem pode tornar-se insuficiente, pois sistemas deste tipo podem ser erodíveis, devendo-se atender ao atributo do relaxamento das cadeias poliméricas para o transporte do fármaco. Assim, a equação de Higuchi apresenta fortes limitações na interpretação dos mecanismos de liberação controlada (LOPES, 2005).

A Tabela 22 apresenta os coeficientes de correlação (r) obtidos para cada modelo de liberação. Pode ser observado que a liberação da vitamina C a partir das estruturas foi de primeira ordem e bastante próxima a Higuchi, para ambas as preparações.

Tabela 22 – Resultados da análise dos modelos obtidos com o ensaio de liberação *in vitro* da vitamina C a partir das nanopartículas (NP) ($n = 3$, média \pm s)

Tipos de nanopartículas	Modelo (r)		
	Ordem zero	1ª ordem	Higuchi
NP 0,67% gelatina + 1% SP	0,9494 \pm 0,015	0,9538 \pm 0,010	0,9835 \pm 0,0026
NP 0,8% gelatina + 1% SP	0,9567 \pm 0,010	0,9686 \pm 0,009	0,9835 \pm 0,0026

Posteriormente, mecanismo de liberação foi investigado por meio da equação geral que descreve a liberação do fármaco a partir de sistemas poliméricos matriciais, utilizando transformações logarítmicas e análise dos quadrados. A Tabela 23 mostra os resultados dessa análise.

Tabela 23 – Resultados da análise dos dados obtidos com o ensaio de liberação *in vitro* da vitamina C a partir das nanopartículas (NP) ($n = 3$, média \pm s)

Tipos de nanopartículas	Parâmetros		
	n	K (min^{-1})	r
NP 0,67% gelatina + 1% SP	0,8350 \pm 0,010	0,0419 \pm 0,010	0,9834 \pm 0,0024
NP 0,8% gelatina + 1% SP	0,8718 \pm 0,582	0,1382 \pm 0,0722	0,9673 \pm 0,4472

Quando $n \leq 0,5$ indica liberação controlada por difusão Fickiana e se $n = 1$ indica uma liberação controlada puramente pelo relaxamento das cadeias poliméricas (transporte Caso II) (HIGUCHI, 1963; BRUSCHI, 2006). Os valores intermediários entre 0,5 e 1, indicam um comportamento anômalo (cinética não Fickiana correspondente aos fenômenos de difusão e de relaxamento das cadeias poliméricas) (RITGER; PEPPAS, 1987; BRUSCHI, 2006).

Como pôde ser observado na Tabela 23, as nanopartículas 0,67% gelatina + 1% SP e as 0,8% gelatina + 1% SP apresentaram um valor de n de 0,8350 e 0,8718, respectivamente e, portanto, a cinética de liberação vitamina C a partir das estruturas é governada por difusão do ácido ascórbico através do sistema e pelo relaxamento das cadeias poliméricas da gelatina.

As nanopartículas 0,8% gelatina + 1% SP apresentaram valor de “ n ” maior, em consequência da maior quantidade de gelatina, tendo maior influência do relaxamento das cadeias. Além disso, por ser um agente emulsivo fraco, a gelatina pode auxiliar na dispersão da vitamina C, resultando em um valor mais alto da constante da velocidade de liberação ($K=0,1382 \text{ min}^{-1}$). Já as nanopartículas 0,67% gelatina + 1% SP apresentaram uma velocidade de liberação menor, isso porque as mesmas possuem uma menor quantidade de gelatina, e por isso a liberação foi modulada principalmente por difusão em consequência da composição do SP que possui substâncias insolúveis em água.

5. CONCLUSÕES

- A amostra de própolis apresentou boa qualidade, com características semelhantes às de outras coletadas na mesma região.
- O extrato de própolis 30 % (p/p) produzido apresentou qualidade.
- O desenvolvimento e a padronização da metodologia de preparação do subproduto, assim como de suas características foram importantes para a obtenção das nanopartículas.
- O método de análise da vitamina C por CLAE demonstrou ser válido.
- Foi possível determinar da atividade antioxidante da vitamina C pelos métodos DPPH e ABTS, ambos os métodos apresentaram linearidade nas concentrações testadas, com boa regressão dos dados e sem falta de ajuste, indicando que o modelo linear é adequado e o método pode ser utilizado. Além disso, juntamente com os outros testes físico-químicos foi possível avaliar a qualidade da amostra de vitamina C.
- Foi possível obter nanopartículas de SP contendo vitamina C, utilizando o método de *spray drying* e gelatina como reforçador de estrutura.
- As nanopartículas sem vitamina C apresentaram menor variação morfológica e de tamanho, comparadas com aquelas contendo a vitamina, as quais apresentaram maior aglomeração.
- A metodologia utilizada não permitiu uma alta eficiência de encapsulação, mas proporcionou atividade antioxidante das nanopartículas e a liberação lenta da vitamina C.

REFERÊNCIAS*

ABELHAS. Minas Gerais: Revista Minas Faz Ciências n.9, Fapemig, Minas Gerais. Disponível em: <<http://revista.fapemig.br/9/popolis.html>> Acesso em 07 junho 2013.

AFTABROUCHAD, C.; DOELKER, E. Preparation methods for biodegradable microparticles loaded with water-soluble drugs. **STP Pharma Sci.**, Paris, v. 2, p. 365- 380, 1992.

ALAN, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQYZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2012, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>.

ALHALAWEH, A.; ANDERSSON, S.; VELAGA, S. P. Preparation of zolmitriptan-chitosan microparticles by spray drying for nasal delivery. **Eur J Pharm Sci.**, v. 38, p. 206-214, 2009.

AL-SAIDI, G. S.; AL-ALAWI, A.; RAHMAN, M. S.; GUIZANI, N. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of extracted gelatin from shaari (*Lithrinus microdon*) skin: effects of extraction conditions. **Int. Food Res. J.** v. 19, p. 1167-1173, 2012.

ALESSIN, M. O.; RAUPP, D. S.; GARDINGO, J. R. **Caracterização do processamento da farinha de milho biju para o aproveitamento dos subprodutos**. Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng., Ponta Grossa. v.9 (2), p. 31-39, 2003.

AÏNAOUI, A.; VERGNAUD, J.M. Modelling the plasma drug level with oral controlled release dosage forms with lipidic Gelucire. **Int. J. Pharm.**, v. 169, p. 155-162, 1998.

AÏNAOUI, A.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R.; VERGNAUD, J.M. Calculation of the dimensions of dosage forms with release controlled by diffusion for in vivo use. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 51, p. 17-24, 2001.

AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, v. 12, p. 116-131, 2001.

ANDRÉO FILHO, N.; OLIVEIRA, A. G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. **Infarma**, v. 09, p. 18-21, 1999.

ANDREWS, G. P., LAVERTY, T.P., JONES, D.S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.71, p. 505–518, 2009.

AOAC - Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Method for Dietary Supplements and Botanicals, 2002.

ARAB, F.; ALEMZADEH, I.; MAGHSOUDI, V. Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract. **Scientia Iranica C** . v. 18 (6), p. 1402–1406, 2011.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: Informações e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. *Lizziane Maria Belletto de Francisco*

ARTS,M.J.T.J.;HAENEN, G.R.M.M.; VOSS,H.P.; BAST, A.Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, p. 787–791, 2001.

ARSHADY, R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules. Part 2. Polyactides and related polyesters. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v. 17, p. 1- 21, 1991.

AVANÇO, G. B.; BRUSCHI, M. L. Preparation and characterization of ethyl cellulose microparticles containing própolis. **Rev. Ciênc. Farm.Básica Apl.**, v. 29, n. 2, p. 129-135, 2008.

BADARINATH,A.V.; MALLIKARJUNA RAO, K.; MADHU SUDHANA CHETTY, C.; RAMKANTH, S.;RAJAN, T.V.S.; GNANAPRAKASH, K. A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisions, Correlations and Considerations. **Int Jou of PharmTech Research**. v.2 (2), p. 1276-1285, 2010.

BAKAN, J. A. Microencapsulação . In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. 1 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, Cap. 13, Vol. 2. p. 707-735, 2001.

BANKOVA, V.S.; DYULGEROV, A.; POPOV, S. S.; EVSTATIEVA, L.; KULEVA, L.; PUBERB, O.; ZANJANSAN, Z. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. **Apidologie**, Les Ulis, v. 23, p. 79-85, 1992.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Volatile constituents of propolis. **Z. Naturforsch.** v. 49, p. 6-10, 1994.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z Naturforsch C**. v. 50, p. 167-172, 1995.

BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, C.M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **J. Ethopharm.** v.100, p. 114-117, 2005.

BANSKOTA, A, H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K. Hepatoprotective and anti-*Helicobater pylori* activities of constituents from Brazilian própolis. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 8, p. 16-23, 2001.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods - critical review. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v.28, p. 1011–1040, 2002.

BARROS, M.P.; LEMOS, M.; MAISTRO, E.L.; LEITE, M.F.; SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian green propolis. **J Ethnopharmacol.** v. 120, p. 372–377, 2008.

BARREIROS, L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Quim.Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BALOĞLU, E.; OZYAZICI, M.; HIZARCIOĞLU, S. Y.; KARAVANA, H. A. An in vitro investigation for vaginal bioadhesive formulations: bioadhesive properties and swelling states of polymer mixtures. **Farmaco**. v.58(5), p.391-396, 2003.

BERTRAM, U.; BODMEIER, R. In situ gelling, bioadhesive nasal inserts for extended drug delivery: In vitro characterization of a new nasal dosage form. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 27, p. 62-71, 2006.

BILATI, U.; ERIC ALLEMANN, E.; DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**,v. 24, p. 67 - 75, 2005.

BIN CHOY, Y., PATEL, S.R., PARK, J.H., McCAREY, B.E., EDELBAUSER, H.F., PRAUSNITZ, M.R. Mucoadhesivemicroparticles in a rapidly dissolving tablet for sustained drug delivery to the eye. **IVOS**. v. 53(5), p. 2627- 2633, 2011.

BOCK, N., WOODRUFF, M.A., HUTMACHER, D.W., DARGAVILLE, T.R. Electro spraying, a Reproducible Method for Production of Polymeric Microspheres for Biomedical Applications. **Polymers**, v. 3, p. 131-149, 2011.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE n.º 899, de 29 de abril de 2003 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 14/04/2013

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e Discussão. **Pesticidas: R. Ecotox. Meio Ambiente**. v. 13, p. 129 - 146, 2003.

BROADHEAD, J.; ROUAN, S. K. E.; RHODES, C. T. The spray drying of pharmaceuticals. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 8, n. 11&12, p. 1169-1206, 1992.

BRUSCHI, M. L. **Desenvolvimento e Caracterização de micropartículas obtidas a partir do extrato etanólico de própolis**. 2002. xxxf. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2006.

BRUSCHI, M. L.; KLEIN, T.; LOPES, R. S.; FRANCO, S. L.; GREMIÃO, M.P.D. Contribuição ao protocolo de controle de qualidade da própolis e de seus derivados. **Rev. Ciênc. Farm.**; v. 23, p. 289 -306, 2002.

BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L. C.; LUCCHESI, M. B.; GREMIÃO, M. P. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 264, p. 45-55, 2003.

BRUSCHI, M. L.; LOPES, R. S.; FRANCO, S.L.; GREMIÃO, M.P.D. In vitro release of propolis from gelatin microparticles prepared by spray-drying technique. **Rev. Cienc. Farm.**, v.25, p. 79-84, 2004.

BRUSCHI, M.L. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal**. 2006. 318f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

BRUSCHI, M. L.; JONES, D. S.; PANZERII, H.; GREMIÃO M. P. D.; DE FREITAS, O.; LARA, E. H. G. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: in vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken. v. 96, p. 2074-2089, 2007.

BURDOCK, G. A. ; Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis), **Food Chem. Toxicol.**, Richmond, v. 36, p. 347-363, 1998.

CAHN, Robert W. The Polymer Revolution. In:_____. **The Coming of Materials Science**. 2001, cap. 8, p. 3 -571.

CARR, A.; FREI, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? **The FASEB Journal**. v.13, p. 1007 -1024, 1999.

CARVALHO, F.C.; BRUSCHI, M.L.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Mucoadhesive drug delivery systems. . **Rev. Bras. Ciênc.Farm**.v. 46(1), p. 1-18, 2010.

CESCHEL, G.C.; MAFFEI, P.; SFORZINI, A.; LOMBARDI BORGIA, S.; YASIN, A.; RONCHI, C. In vitro permeation through porcine buccal mucosa of caffeic acid phenylester (CAPE) from a topical mucoadesiva gel containing própolis. **Fitoterapia**, v. 73 (1), p.44–52, 2002.

CHANDRAKALA, V. V.; SRINATH, M.S.; MARY, S.A.; UTPAL, K. S. Formulation and Evaluation of Bioadhesive Cyproheptadine Tablets. **Trop. J. Pharm. Res.** v. 10 (4), p. 365-373, 2011.

CHENG, S. Y.; YUEN, M. C. W.; KAN, C. W.; CHEUK, L. K.; CHUI, C. H.; LAM, K. H. Cosmetic textiles with biological benefits: Gelatin microcapsules containing Vitamin C. **Int J Mol Med.**, v. 24, p. 411-419, 2009.

COLLETT, J.; MORETON, C. Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada. In: AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005. Cap. 20, p. 298-313.

CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; LUCA, G.; NASTRUZZI, C. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. **Biomater**. v. 23, p. 2283-94, 2002.

CUENDET, M.; HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. **Helv. Chim. Acta**, v.80, p. 1144–1152, 1997.

CVEK, J.; MEDIĆ-ŠARIĆ, M.; JASPRICA, I.; ZUBČIĆ, S.; VITALI, D.; MORNAR, A.; VEDRINA-DRAGOJEVIĆ, I.; TOMIĆ, S. Optimisation of an extraction procedure and chemical characterisation of croatian propolis tinctures. **Phytochem Anal.** 18, 451-459, 2007.

DALCIN, K.B.; SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRIES, S.S. Vitamina C e seus derivados em produtos dermatológicos: aplicações e estabilidade. *Caderno de Farmácia*. v. 19 (2), p. 69-79, 2003.

DASHORA, K.; SARAF, S.; SARAF, S. Effect of Processing Variables on Micro Particulate System of Nimesulide. **Chin. Pharm. J.**, v. 58, p. 67-74, 2006.

DE FRANACISCO, L. M. B.; CERQUETANI, J. A.; BRUSCHI, M. L. Development and characterization of gelatin and ethylcellulose microparticles designed as platforms to delivery fluoride. **Drug Dev Ind Pharm.** p. 1-7, 2012.

DE FUNARI, C.S.; FERRO, V.O.; MATHOR, M.B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **J. Ethnopharm.** v.111, 206-212, 2007.

DEUTSCHES, Arzneibuch. 10. Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1994.

DINH, S. M.; DENUZZIO, J. D.; COMFORT, A. R. **Intelligent materials for controlled release**. Washington: American Chemical Society, 1999.

DONBROW, M. **Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1992, 360 p.

DOTA, K. F. D.; M. E. L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BRUSCHI, M. L. Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. **eCAM**. p. 1-8, 2010.

DOTA, K. F. D.; CONSOLARO, M. E. L.; SVIDIZINSKI, T. I. E.; BRUSCHI, M. Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. **eCAM**, v. 1, p. 1-8, 2011.

DUBERNET, C.; BENOIT, J. P. La microencapsulation: ses techniques et ses applications en biologie. **L'actualité chimique**, p. 19-27, Dez. 1986.

DUCHEN, D; PONCHEL, G. Bioadhesion of solid oral dosage forms, why and how? **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 44, p. 15-23, 1997.

EREL, O. A novel automated direct measurement for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clin. Biochem.**, v.37, p.277-285, 2004.

ESCUADERO, J.J.; FERRERO, C.; JIMÉNEZ-CASTELLANOS, M. R. Compaction properties, drug release kinetics and fronts movement studies from matrices combining

mixtures of swellable and inert polymers: Effect of HPMC of different viscosity grades. **Int. J. Pharm.**, v. 351, p. 61-73, 2008.

ESPOSITO, E.; CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties. **Biomaterials**, v. 17, p. 2009-2020, 1996.

ESPOSITO, E.; CERVELLATI, F.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C.; CORTESI, R. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. **Int. J. Pharm.**, v. 242, p. 329–334, 2002.

FABRI, F.V., CUPERTINO, R.R., HIDALGO, M.M., OLIVEIRA, R.M.W., BRUSCHI, L.M. Preparation and characterization of bioadhesive systems containing propolis or sildenafil dental pulp protection. **Drug Dev Ind Pharm.** v.1(9), p. 1-9, 2011.

FARMACOPEIA Brasileira. 2 ed., São Paulo: Siqueira, 1959.

FARMACOPEIA Brasileira. 4 ed. Parte I. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPEIA Brasileira. 4 ed. Parte II. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERNANDES, F.F.; DIAS, A.L.T.; RAMOS, C.L.; IKEGAKI, M.; SIQUEIRA, A.M.; FRANCO, M.C. The “*in vitro*” antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Inst. Méd.Trop. S. Paulo**, v. 49(2), p. 93-95, 2007.

FERREIRA, S. B. S.; ASSIS DIAS, B, R, A.; OBREGO, C. S.; GOMES, C. C.; PEREIRA, R. R. A.; GODOY, J. S. R.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BRUSCHI, M. L. Microparticles containing propolis and metronidazole: in vitro characterization, release study and antimicrobial activity against periodontal pathogens. **Pharm Dev Technol.** p. 1-8, 2012.

FINCH, C. A. Microencapsulation. In: ELVERS, B.; HAWKINS, S.; SCHULZ, G. **Olmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. 5th. ed. Weinhein: Verlagsgssellschaft, 1990. Vol. A 16. p. 575-588.

FRANCO, S. L.; BRUSCHI, M. L.; BUENO, J.H.F. Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 9, p. 1-10, 2000.

FRANCO, S.L. **Própolis: Otimização do processo extrativo. Desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade e produção de forma farmacêutica sólida**. 2001. 157f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **J. Control. Release**, v. 102, p. 313-332, 2005.

FUNARI, C. S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.26 (1), p. 171-178, 2006.

- GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. **Bee World**, Cardiff, v.71, p. 107-118, 1990.
- GHISALBERTI, E.L. Própolis: a review. **Bee World**, v. 60, p. 59-80, 1979.
- GOVINDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; VIJAYAKUMAR, M.; SHIKWAIKAR, A.; RAWAT, A. K. S.; MEHROTRA, S.; PUSHUPANGADAN, P. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. **Biol. Pharm. Bull.** v. 26 (10), p. 1424-1427, 2003.
- HARDY, I. J.; WINDBERG-BAARUP, A.; NERI, C.; BYWAY, P. V.; BOOTH, S. W.; FITZPATRICK, S. Modulation of drug release kinetics from hydroxypropyl methyl cellulose matrix tablets using polyvinyl pyrrolidone. **Int. J. Pharm.**, v. 337, p. 246-253, 2007.
- HASSAN, A. S., SAPIN A., LAMPRECHT, A., EMOND E., EL GHAZOUANI, F., MAINCENT, P. Composite microparticles with in vivo reduction of the burst release effect. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 73, p. 337-344, 2009.
- HASIRCI, V.; YILGOR, P.; ENDOGAN, T.; EKE, G.; HASIRCI, N. Polymer Fundamentals: Polymer Synthesis. **Comp. Biomaterials.** v. 1. 2011.
- HENRIQUES, C.; ALIAGA, C. LISI, E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: a comparison of different preparation procedures. **Int. J. Chem. Kinet.**, v.34, n.12, p.659-665, 2002.
- HERRMANN, J.; BODMEIER, R. Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 45, p. 75-82, 1998.
- HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication: Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **J. Pharm. Sci.**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.
- ICH (International Conference on the Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use) - **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**, 2005.
- IMHOF, M.; LIPOVAC, M.; KURZ, CH.; BARTA, J.; VERHOEVEN, H.C.; HUBER, J.C. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. **Int. J. Gyn. Obstet.**, v. 89, p.127-132, 2005.
- ISLA, M.I.; MORENO, M.I.N.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 75, p. 165-170, 2001.
- JOANNA KARPINSKA, J.; SMYK, J.; WOLYNIEC, E. A spectroscopic study on applicability of spectral analysis for simultaneous quantification of l-dopa, benserazide and ascorbic acid in batch and flow systems. **Spectrochim Acta A.** v. 62, p. 213-220, 2005.
- JONES, D. S.; PEARCE, K. J. An investigation of the effects of some process variables on the microencapsulation of propranolol hydrochloride by the solvent evaporation method. **Int. J. Pharm.**, v. 118, p. 199-205, 1995.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F.; COULTER, W. A.; MCCLELLAND, C.; IRWIN, C. R. Design, characterization and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. **J. Control. Release**, v. 67, p. 357-368, 2000.

JYOTHI, N. V. N.; PRASANNA, P. M.; SAKARKAR, S. N.; PRABHA, K. S.; RAMAIAH, P. S.; SRAWAN, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **J. Microencapsul.**, v. 27 (3), p. 187-197, 2010.

KANO, M.; TAKAYANAGI, T.; HARADA, K.; MAKINO, K.; ISHIKAWA, F. Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato *Ipomoea batatas* cultivar Ayamuraski. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 69 (5), p. 979-988, 2005.

KARAKAYA, S.; YILMAZ, N. Lycopene content and antioxidant activity of fresh and processed tomatoes and in vitro bioavailability of lycopene. **J. Sci. Food Agric.**, v. 87, p. 2342-2347, 2007.

KATIKANENI, P. R.; UPADRASHTA, S. M.; NEAU, S. H.; MITRA, A. K. Ethylcellulose matrix controlled release tablets of a water-soluble drug. **Int. J. Pharm.**, v. 123, p. 119-125, 1995.

KEEGAN, G. M., SMART, J., INGRAM, M.J., BARNES, L.M., BURNETT, G.R., REES, G.D. Chitosan microparticles for the controlled delivery of fluoride. **J. Dent.** p. 1-12, 2012.

KILPELÄINEN, M.; RIIKONEN, J.; VLASOVA, M. A.; HUOTARI, A.; LEHTO, V. P.; SALONEN, J.; HERZIG, K. H.; JÄRVINEN, K. In vivo delivery of a peptide, ghrelin antagonist, with mesoporous silicon microparticles. **J. Control. Release**, v. 137, p. 166-170, 2009.

KILPELÄINEN, M.; MÖNKÄRE, J.; VLASOVA, M. A.; RIIKONEN, J.; LEHTO, V-P.; SALONEN, J.; JÄRVINEN, K.; HERZIG, K-H. Nanostructured porous silicon microparticles enable sustained peptide (Melanotan II) delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 77, p. 20-25, 2011.

KÖNIG, B. Plant sources of propolis. **Bee World**, v. 66 (136), p.136-139, 1995.

KOO, H.; GOMES, B. P.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. **Arch Oral Biol**, v.45, p. 141–148, 2000.

KRELL, R. Value – added products from beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin, Rome; Food and Agriculture Organization of the United Nations, n.124,1996

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food Bioprod Process.** v. 89, p. 217–233, 2011.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.U.; BANKOVA, V.; HRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J. Ethnopharmacol.**, v. 64, p. 235–240,1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chem.**, v. 84, 329-339, 2004.

KULKARNI, P. V.; KESHAVAYYA, J.; KULKARNI, V. H. Effect of method of preparation and process variables on controlled release of insoluble drug from chitosan microspheres. **Polym. Adv. Technol.**, v. 18, p. 814-821, 2007.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Cien. Tecnol. Alim.**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C.C. “green chemistry” – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Quim. Nova**, v. 26 (1), p. 123-129, 2003.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **Int. J. Pharm.**, v. 363, p. 26-39, 2008.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Rev. Bras. Ciênc.Farm.**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LOPES, C. G.; MARCOS L. BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. RP-LC-UV Determination of Proanthocyanidins in *Guazuma ulmifolia*. **Chromatographia**. v. 69, p. S175–S181, 2009.

LUIS, J.C.; VALDÉS, F.; R. MARTÍN, R.; CARMONA, A.J.; DIAZ, J.G. DPPH radical scavenging activity of two flavonol glycosides from *Aconitum napellus* sp. *Lusitanicum*. **Fitoterapia**, v. 77, p. 469–471, 2006.

LUZZI, L.; PALMIERI, A. An overview of pharmaceutical applications. In: LIM, F. (Org.). **Biomedical applications of microencapsulation**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1985, cap. 1, 1-18p.

MAIA, A.M.; BABY, A. R.; YASAKA, W. J.; SUENAGA, E.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Validation of HPLC stability-indicating method for Vitamin C in semisolid pharmaceutical/cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants. **Talanta**. v.71, p. 639–643, 2007.

MAINARDES, R. M.; EVANGELISTA, R.C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **Int. J. Pharm.**, v. 290, p. 137-144, 2005.

MALVERN. Zeta potencial. Disponível em:
<http://www.malvern.com/labeng/products/iwtm/zeta_potential.htm> Acesso em: 08.08.2013.

MARCUCCI M.C. Phenolic compounds from brazilian propolis with pharmacological activities. **J. Ethnopharmacol.** v. 74, 105-112, 2001.

MARCUCCI M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutics activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARQUELE, F.D.; DI MAMBRO, V.M.; GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y.M.; Fonseca, M.J. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **J Pharm Biomed Anal**, v.39, n.3/4, p.455-462, 2005.

MARKAHAM, K. R.; MITCHELL, K.A.; WILKINS, A.L.; DALDY, J. A.; LU, Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. **Phytochemistry**, Oxford, v.42, n.1 p. 205 – 211, 1996.

MARSHALL, P.A.; TRENERRY, V. C.; THOMPSON, C. O. The Determination of Total Ascorbic Acid in Beers, Wines, and Fruit Drinks by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. **J Chromatogr Sci**. v.33 (8), p. 426-432, 1995.

MATSUI, T.; EBUCHI, S.; FUJISE T.; ABESUNDARA, K. J.; DOI, S.; YAMADA, H.; MATSUMOTO, K. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid. **Biol Pharm Bull.**, v. 27(11), p. 1797-1803, 2004.

MATSUMOTO, A.; MATSUKAWA, Y.; SUZUKI, T.; YOSHINO, H.; KOBAYASHI, M. The polymer-alloys method as a new preparation method of biodegradable microspheres: principle and application to cisplatinloaded microspheres. **J. Control. Release**, v.48, p. 19-27, 1997.

MIGUEL, M.G.; NUNES, S.; DANDLEN, S.A.; CAVACO, A.M.; ANTUNES, M.D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food Chem. Toxicol.**,v. 48, 3418-3423, 2010.

MILANOVIC, J.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; RAJIC, N.; NEDOVIC, V.; BUGARSKI, B. Microencapsulation of flavors in carnauba wax. **Sensors**. v. 10, p. 901-912, 2010.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A.A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin. Sci.**, v. 84, p.407–412, 1993.

MISHIMA, S.; INOH, Y.; NARITA, Y.; OHTA, S.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; SUZUKI, K. M, AKAO, Y.; NOZAWA, Y. Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. **Bioorg Med Chem**. v.13(20), p. 5814-5818, 2005a.

MIZUSHIMA, Y. Lipid Microspheres (lipid emulsions) as a drug carrier – An overview. **Adv. Drug Del. Rev.** v. 20, p. 113-115, 1996.

MOHAMED, A.; KIDIA, E.; BASIT, A. W. Spray-drying enteric polymers from aqueous solutions: A novel, economic, and environmentally friendly approach to produce pH-responsive microparticles. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, v.79, p. 432-439, 2011.

MOEBUS, K.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R. Novel preparation techniques for alginate-poloxamer microparticles controlling protein release on mucosal surfaces. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 45, p. 358-366, 2012.

MOREIRA, T.F. Composição química da própolis: vitaminas e aminoácidos. **Rev. Bras. Farmacog.** v.1(1), p.9-12, 1986.

MORENO, M.I.N.; ISLA, M.I.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **J Ethnopharmacol**, v.71, p.109-114, 2000.

MUSCHERT, S.; SIEPMANN, F.; LECLERCQ, B.; CARLIN, B.; SIEPMANN, J. Prediction of drug release from ethylcellulose coated pellets. **J. Control. Release**, v. 135, p. 71-79, 2009.

NAGAI, T.; SAKAI, M.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. **Food Chem.**, v.75, p. 237-240, 2001.

NELSON, G. Application of microencapsulation in textiles. **Int. J. Pharm.**, v. 242, p. 55-62, 2002.

NG, S-M.; CHOI, J-Y.; HAN, H-S.; HUH, J-S.; LIM, J. O. Novel microencapsulation of potential drugs with low molecular weight and high hydrophilicity: Hydrogen peroxide as a candidate compound. **Int. J. Pharm.**, v. 384, p. 120-127, 2010.

Nur Alam, Bristi, N.J.; Rafiquzzaman. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; BUENO, J. H. F.; EVANGELISTA, R. C. Micro e nanocápsulas: um eficiente sistema, com dimensões reduzidas, para liberação controlada e direcionamento de fármacos encapsulados. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 14, p. 37-49, 1992.

OLIVEIRA, A.C.P.; SHINOBU, C.S.; LONGHINI, R.; FRANCO, S.L.; SVIDZINSKI, T.I.E. Antifungal activity of propolis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101(5), 493-497, 2006.

OLIVEIRA, I. R. W. Z. de; FATIBELLO-FILHO, O. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por *spray drying* e usadas na construção de biossensores. **Quím. Nova**, v. 32, n. 5, p. 1195-1201, 2009.

OLIVEIRA, J. R. S. **Caracterização de extratos de cajá-manga (*Spondias dulcis* parkinson) potencialmente ativos e seguros para obtenção de fitocosmético antioxidante.** 2011. 212f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

OWENS, T. S. **Development and evaluation of extended release bioadhesive sodium fluoride tablets.**2004. 145f. Tese (Doutorado em Filosofia) – Divisão de Ciências Farmaceuticas, Universidade de Farmácia, 2004.

ORSATTI, C.L.; MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A.C.; BACHIEGA, T.F.; BUFALO, M.C.; ARAUJO JR. J.P.; SFORCIN, J.M. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. **Phytother Res.** v. 24, p. 1141–1146, 2010a

OUESLATI, S.; TRABELSI, N.; BOULAABA, M.; LEGAULT, J.; ABDELLEY, C.; KSOURI, R. Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal *Suaeda* species and related phenolic compounds. **Ind. C. Prod.**, v. 36, p. 513-518, 2012.

PAGAR, H. B.; BARHATE, S. D.; BARI, M. M.; SHINDE, U. P.; JANJALE, M. V.; BORASE, C. B. Development and evaluation of mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate by using tamarind gum and HPMC. **Der Pharm. Sin.** v. 2, n. 6, p. 93-101, 2011.

PAMPLONA, B. Própolis: composição e atividades terapêuticas. **Rev. Racine**, v.7(37), p.49-53, 1997.

PANNALA, A.S.; CHAN, S.T.; O'BRIEN, J.P.; RICE-EVANS, A.C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.282, n.5, p.1161-1168, 2001.

PARK, Y. K; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A.R.P., AGUIAR, C.L. Propolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidencias fitoquimicas de sua origem vegetal. *Cienc. Rur. Santa Maria*, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PATEL, D. K.; KUMAR, R.; PRASAD, S. K.; HEMALATHA, S. *Pedaliium murex* Linn (Pedaliaceae) fruits: a comparative antioxidant activity of its different fractions. **Asian Pac J Trop Biomed**, p. 395-400, 2011.

PEREIRA, R.R.A., BRUSCHI, M.L. Vaginal mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Dev Ind Pharm.** p. 1-10, 2011.

PEREIRA, R.R.A. **Desenvolvimento e caracterização de sistema mucoadesivotermostável contendo micropartículas de própolis para potencial tratamento de candidíase vulvovaginal**, Maringá-PR. UEM, 2011. 172p. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá, 2011.

PEREIRA, R.R.A., BRUSCHI, M.L. Evaluation of Two Spectrophotometric Methods for Analysis of Green Propolis Extract. **Lat Am J Pharm.** v. 32 (5), p. 719-26, 2013.

PEREIRA, V.R. **Ácido Ascórbico – características, mecanismos de atuação e aplicações na indústria de alimentos**, Pelotas-RS. UFPEL, 2008. 40p. Monografia (Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Química de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, 2008.

PÉREZ, M. H.; ZINUTTI, C.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; ASTIER, A.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone)

microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. **J. Control. Release**, v. 65, p. 429-438, 2000.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.

PEZZUTO, J.M.; PARK, E. J. Autoxidation and antioxidants. In: _____. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. Taylor & Francis. 2002. p. 97-113.

PIÃO, H.; KAMIYA, N.; CUIA, F.; GOTO, M. Preparation of a solid-in-oil nanosuspension containing l-ascorbic acid as a novel long-term stable topical formulation. **Int J Pharm.**, v. 420, p. 156-160, 2011.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PHILLIPS, K. M.; TARRAGO-TRANI, M.T.; GEBHARD, S. E.; EXLER, J.; PATTERSON, K. Y.; HAYTOWITZ, D. B.; PEHRSSON, P. R.; HOLDEN, J. M. Stability of vitamin C in frozen raw fruit and vegetable homogenates. **J Food Compost Anal.**, v. 23, p. 253- 259, 2010.

POPOVA, M.; BANKOVA, V.; BUTOVSKA, D.; PETKOV, V.; NIKOLOVA-DAMYANOVA, B.; MARCAZZAN, G.L.; BOGDANOV, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type Propolis. **Phytochem Anal.**, v.15, 235-240, 2004.

RAVIKUMARA, N.R.; MADHUSUDHAN, B.; NAGARAJ, T.S.; HIREMAT, S. R.; RAINA, G. Preparation and Evaluation of Nimesulide-loaded Ethylcellulose and Methylcellulose Nanoparticles and Microparticles for Oral Delivery. **J. Biomater. Appl.**, v. 24, p. 47-64, 2009.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 26, n. 9-10, p 1231-1237, 1999.

RÊGO, M. M. T.; NEIVA, J. N. M.; CAVALCANTE, M. A. B.; CÂNDIDO, M. J. D.; CLEMENTINO, R. H.; RESTLE, JOÃO. Bromatological and fermentative characteristics of elephant grass silages with the addition of annato by-product. **Rev. Bra. Zoo.** v. 39, 2010a.

RÊGO, M. M. T.; NEIVA, J. N. M.; RÊGO, A. C.; CÂNDIDO, M. J. D.; CLEMENTINO, R. H.; RESTLE, JOÃO. Nutritional evaluation of elephant-grass silages with byproduct of annato. **Rev. Bra. Zoo.** v. 39, 2010b.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **J. Control. Release**, v. 5, p. 37-42, 1987.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; LÚCIO FLÁVIO COSTA MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**. v. 27(5), p. 771-780, 2004.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6. ed. Pharmaceutical Press, London . Chicago. 2009.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6. ed. Pharmaceutical Press, London . Chicago. 2009.

ROY, S., ANIS, A., PRAMANIK, K., PRABHAKAR, B. Polymers in mucoadhesive drug delivery system: A brief note. **Desig Mono Pol**. v. 12, p. 483-495, 2009.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M., SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; FULGENCIO, D.S.C. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comunicado técnico 127- EMBRAPA. p. 1-4, 2007.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M., SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; FULGENCIO, D.S.C. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺. Comunicado técnico 128- EMBRAPA. p. 1-4, 2007.

RYANA, C. N.; K.L. SMITHB, K. L.; STARKA, J.P.W. Characterization of multi-jet electrospray systems. **J. Aerosol Sci**. v. 51, p. 35-48, 2012.

SANSONE, F.; MENCHERINI, T.; PICERNO, P.; D' AMORE, M.; AQUINO, R. P. Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. **J Food Eng**, v. 105, p. 468-476, 2011a.

SANTANA, D. P.; FONSECA, S. G. C.; BEDOR, D. C. G.; LEAL, L. B.; SILVA, J. A. Aplicação termoanalítica no desenvolvimento e caracterização de micropartículas de PLGA contendo lapachol. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n.3, p. 261-266, 2008.

SANTOS, A. B. dos; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 2, p. 322-326, 2005.

SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E.S.; BRAGA, F. C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **J Ethnopharmacol**, v. 80, p. 1-7, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Rev. Química Nova*, v 26, p. 726-737, 2003.

SERRA, L., DOMÉNECH, J., PEPPAS, N, A. Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 71, p. 519-528, 2009.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES JR., A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J. Ethnopharmac.**, v 73, 243-249, 2000.

SFORCIN, J. M., BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Jor. Ethnopharm.** v. 133, p. 253-260, 2011.

SHARMA, O.M.;BHAT, T.K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chem.**, v. 113, p. 1202–1205, 2009.

SILICI, S.; KOC, A.N. Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. **Letters Appl. Microbiol.**, v. 43, p. 318-324, 2006.

SILVA, C., RIBEIRO, A., FERREIRA, D., VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** v. 39, p. 1-20, 2003.

SILVA-JUNIOR, A. A.; MATOS, J. R. de; FORMARIZ, T. P.; ROSSANEZI, G.; SCARPA, M. V.; EGITO, E. S. T. do; OLIVEIRA, A. G. de. Thermal behavior and stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone. **Inter. J. Pharm.**, v. 368, p. 45-55, 2009.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.57 (11), p.1556- 1568, 2005.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

STUBBERUD, K. P.; ASTROM, O. Separation of ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities by capillary electrophoresis: II Validation. **J. Chromatogr. A.**, v. 826, p. 95-102, 1998.

STEWART, I. I.; Electrospray mass spectrometry: a tool for elemental speciation. **Spect Acta Part B.** v. 54, p. 1649 – 1695, 1999.

SU, Y. L.; FU, Z. Y.; ZHANG, J. Y.; WANG, W. M.; WANG, H.; WANG, Y. C.; ZHANG, Q. J. Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. **Powder Technology**, v. 184, p. 114-121, 2008.

SU, S. I. T.; YOSHIDA, C. M. P.; COENTRAS-CASTILLO, C. J.; QUIÑONES, E. M.; VENTURINI, A. C. Okara, a soymilk industry by-product, as a non-meat protein source in reduced fat beef burgers. **Ciênc Tecnol Alim.** v. 33, p. 52-56, 2013.

SULAIMAN, G. M., AL SAMMARRAE, K. W., AD'HIAH, A.H., ZUCCHETTI, M., FRAPOLLI, R., BELLO, E., ERBA, E., D'INCALCI, M., BAGNATI, R. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. **Food Chem Toxicol.**, v. 49, p. 2415–2421, 2011.

SOMMEZ, S.; KIRILMAZ, L.; YUCESYOY, M.; YÜCEL, B.; YLMAZ, B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblast. **J. Ethnopharmacol.**, v. 102, p. 371-376, 2005.

TAKEUCHI, H., YAMAMOTO, H., KAWASHIMA, Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide delivery. **Adv Drug Deliv Rev.** v. 47, p. 39-54, 2001.

TARRAGO-TRANI, M. T., PHILLIPS, K., COTTY, M. Matrix-specific method validation for quantitative analysis of vitamin C in diverse foods. **J Food Compost Anal.** v. 26, p. 12–25, 2012.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E. B.; JUNYAPRASERT, V. J.; MÜLLER, R. H. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 – Development, physicochemical characterization and in vitro release studies. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 67, p. 141–148, 2007.

THIES, C. A survey of microencapsulation processes. In: BENITA, S. **Microencapsulation: methods and industrial applications.** 1 ed. New York: Marcel Dekker, 1996. Cap.1. p. 1-20.

TOLEDO, L.A.S. **Obtenção e caracterização de filmes farmacêuticos contendo metronidazol utilizando o subproduto da extração de própolis.** Maringá-PR. UEM, 2012. 98p. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá, 2013.

TRIERWEILER, L.F. **Nanopartículas: como produzi-las em escala industrial.** Porto Alegre- RS. UFRS, 2009. 214 p. Tese (Doutorado em engenharia química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; NAYDENSKY, C.; SABATINI, A. G. A new type of European propolis, containing bioactive labdanes. **Rev. Itali.**, v. 36, p. 3-7, 2003.

VALIDATION of analytical procedures: methodology: ICH harmonised tripartite guideline. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2006.

VANISREE, A. J., SHYAMALADEVI, C. S. The effect of N-acetylcysteine in combination with vitamin C on the activity of ornithine decarboxylase of lung carcinoma cells — *In vitro*. **Life Sciences**, v. 79, p.654–659, 2009.

VENKATESAN, P.; MANAVALAN, R.; VALLIAPPAN, K. Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system. **J. Pharm. Sci. Res.**, v. 1, n. 4, p. 26-35, 2009.

VERRAX, J., CALDERON, P. B. The controversial place of vitamin C in cancer treatment. **Biochemical pharmacology**, v. 76, p. 1644 – 1652, 2008.

VILLA NOVA, M.; GONÇALVES, M.C.P.; NOGUEIRA, A.N.; HERCULANO, L.S.; MEDINA, A.N.; BAZZOTE, R.B.; BRUSCHI, M.L. Formulation and characterization of

ethylcellulose microparticles containing L-alanyl- L-glutamine peptide. **Drug Dev Ind Pharm.** p. 1-10, 2013.

VILLANOVA, J. C.O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 51-64, 2010.

WANG, H., SHI, H.; CHEUNG, A. C.; XIN, J.H. Microencapsulation of vitamin C by interfacial/emulsion reaction: Characterization of release properties of microcapsules. **J. Control. Release**, v. 152, p. e78–e79, 2011.

WESTESEN, K.; BUNJES, H.; KOCH, M.H.J. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. **J. Control. Release**, v. 48, p. 223-236, 1997.

ZHANG, C.; MA, Y.; GUO, K.; ZHAO, X. High-pressure homogenization lowers water vapor permeability of soybean protein isolate-beeswax films. **J Agric Food Chem.** v. 60(9), p.2219-23, 2012.

ZUANAZZI, J.A.D.S. Flavonóides. in: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Ed.), **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2.ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS, p. 489-516, 2000.