

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

Faculdade de Ciências da Saúde

**Micropartículas de quitosana contendo extrato de *Doliocarpus dentatus*: validação  
de método analítico para determinação de marcador no extrato e desenvolvimento  
das microestruturas**

Orientanda: Maíra de Miranda Gomes – 13/0123722

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-orientadora: MSc. Paula Martins de Oliveira

Brasília - DF

2018

MAÍRA DE MIRANDA GOMES

Micropartículas de quitosana contendo extrato de *Doliocarpus dentatus*:  
validação de método analítico para determinação de marcador no extrato e  
desenvolvimento das microestruturas

Monografia apresentada ao curso de graduação em  
Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito  
parcial de obtenção do Título de Bacharel em  
Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-orientadora: MSc. Paula Martins de Oliveira

Brasília - DF

2018

Dedico aos meus pais, Maria Goreth e Ricardo; à  
minha madrasta, Valéria; ao meu irmão Miguel e  
aos meus avós, Raimunda; Arlete e Aureliano e  
Corinto, *in memorium*.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Maíra de Miranda Gomes

**Micropartículas de quitosana contendo extrato de *Doliocarpus dentatus*: validação de método analítico para determinação de marcador no extrato e desenvolvimento das microestruturas**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico.

---

Msc. Ricardo Ferreira Nunes  
Universidade de Brasília – UnB

---

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso  
Universidade de Brasília – UnB

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me confortar e acalmar nos momentos de tribulações e à Nossa Senhora por toda intercessão.

Aos meus pais e melhores amigos, Maria Goreth e Ricardo, por todo amor, apoio, suporte, paciência e incentivo que sempre me deram, por sempre priorizarem minha educação e por serem os modelos que sempre irei me espelhar. À minha madrasta, Valeria e meu irmão Miguel, pela sua paciência e apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Gelfuso (meu “paizinho acadêmico”), que sempre me incentivou, apoiou, esteve presente me orientando de maneira sabia e paciente e se colocando à disposição e acreditando em mim mesmo quando eu queria desistir.

A minha amiga, e co-orientadora, MsC. Paula Martins de Oliveira, por todo o incentivo, pelas correções, auxílio e apoio incondicional durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus familiares, por todo apoio durante essa etapa. As minhas madrinhas Margaret Gomes e Tereza Cristina Reis de Sá, e meu tio Carlos Alberto Reis de Sá por serem exemplos na minha vida, aos meus primos, em especial Nathalia, Ana Paula e Raphael Reis e Luana e Amanda Miranda pelos momentos de descontração e por todo o carinho, incentivo e apoio em todos os momentos.

Aos meus colegas de curso, que me acompanharam durante essa caminhada, em especial a Stephania Graziani, Carina Freitas, Everaldo Lima, Sarah Emídio, Bárbara Guedes, Maria Luisa Baroboskin que estiveram comigo em todos os momentos, bons e ruins, alegres e tristes, e sempre foram meu apoio. Às minhas amigas, Marcela Oliveira, Ana Verônica Sá, Priscila Duda, Gabriela Sodré e Alana Andrade pelo carinho, por todo incentivo desde o início dessa jornada e por me mostrar que juntas somos melhores.

Aos colegas de laboratório, pela ajuda nos experimentos e, principalmente, a Maíra Nunes, Ricardo Ferreira e Breno Noronha por todo o seu apoio, conhecimento compartilhado e ajuda no projeto.

Aos meus prezados professores do curso, que acompanharam minha jornada e contribuíram para o meu crescimento profissional, vocês foram fundamentais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo incentivo de milhares de estudantes à iniciação científica em todo país.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha caminhada, que me acompanharam, choraram, riram, aconselharam, dividiram as suas companhias, as suas palavras e mesmo as suas ausências foram muito importantes na minha vida. Como disse Isaac Newton: Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.

Tudo o que damos ao mundo  
retorna e ressoa.  
O mundo é um lugar que faz eco.

OSHO, 1990

## RESUMO

GOMES, M. M. Micropartículas de quitosana contendo extrato de *Doliocarpus dentatus*: validação de método analítico para determinação de marcador no extrato e desenvolvimento das microestruturas. Brasília, 2018. Monografia (Bacharelado em Farmácia). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

A “*Doliocarpus dentatus*” é uma espécie de planta medicinal pertencente à família Dilleneaceae, popularmente conhecida como cipó-caboclo-vermelho e é comumente encontrada nas regiões de floresta tropical e algumas áreas de cerrado. Estudos anteriores do grupo de pesquisa determinaram que um dos principais compostos presentes no extrato etanólico de folhas de *D. dentatus* são compostos fenólicos e, dentre os principais, o ácido betulínico. Esse composto isolado destaca-se pela suas atividades biológicas e farmacológicas tais como antimalárica, anti-inflamatória e antineoplásica. Para que o extrato dessa espécie dê origem à um medicamento, é necessário desenvolver uma formulação que seja eficaz e segura, garantindo que o marcador esteja disponível no local de ação. Nesse sentido, foram desenvolvidas micropartículas do polímero quitosana contendo o extrato etanólico das folhas de *D. dentatus* pelo método de secagem por *spray dryer*. A morfologia das partículas foi observada utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura. O tamanho das partículas foi medido por técnica de espalhamento de luz. As micropartículas obtidas possuem forma esférica e superfície irregular. Apresentaram uma distribuição de tamanho entre 8,7 e 8,9  $\mu\text{m}$  com alto índice de polidispersividade sugere que a distribuição do tamanho de partícula não é homogênea. Também neste trabalho, um método por cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado para a análise do marcador do extrato, o ácido betulínico. O marcador foi analisado utilizando-se uma coluna  $\text{C}_{18}$  (300mm x 3,9mm x 10 $\mu\text{m}$ ). A fase móvel foi composta por acetonitrila e água (95:5 v/v) a um fluxo de 0,5 mL/min. O comprimento de onda de detecção foi de 210 nm à temperatura de 30°C. Linearidade foi obtida para uma faixa de 2,5 a 40  $\mu\text{g/mL}$  ( $r^2$  0.992). Para os ensaios intra e inter dia o coeficiente de variação foi menor que 5%. Este método utilizado para a validação do marcador apresentou seletividade e sensibilidade, apresentando-se como um método vantajoso e confiável para a realização dos estudos propostos. O método de encapsulação mostrou-se adequado para a preparação de micropartículas de quitosana contendo o extrato, mesmo apresentando baixos rendimento e eficiência de encapsulação.

**Palavras-chave:** *Doliocarpus dentatus*, Ácido betulínico, validação analítica, micropartículas, quitosana.

## ABSTRACT

GOMES, M. M. Chitosan microparticles containing *Doliocarpus dentatus* extract: validation of analytical method for determination of marker in extract and development of microstructures. Brasília, 2018. Monograph (Bachelor of Pharmacy). Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, 2018.

The "*Doliocarpus dentatus*" is a medicinal plant belonging to the family Dilleneaceae, popularly known as red cabbage-cipó and is commonly found in tropical forest regions and some cerrado areas. Previous studies of the research group have determined that one of the main compounds present in the ethanolic extract of leaves of *D. dentatus* are phenolic compounds and among the main ones betulinic acid. This isolated compound stands out for its biological and pharmacological activities such as antimalarial, anti-inflammatory and antineoplastic. For the extract of this species to give rise to a drug, it is necessary to develop a formulation that is effective and safe, ensuring that the marker is available at the site of action. In this way, microparticles of the chitosan polymer containing the extract of the leaves of *D. dentatus* were developed by the spray dryer drying method. Particle morphology was observed using a Scanning Electron Microscope. Particle size was measured by light scattering technique. The obtained particles have spherical shape and irregular surface. They presented a size distribution between 8.7 and 8.9  $\mu\text{m}$  with high polydispersity index suggesting that the particle size distribution is not homogeneous. The process yield and encapsulation efficiency were from 24.37% to 60.26%. Also in this work a high performance liquid chromatography method was used for the analysis of the betulinic acid marker. The marker was analyzed using an Allcrom C<sub>18</sub> column (300mm x 3.9mm x 10 $\mu\text{m}$ ). The mobile phase was composed of acetonitrile and water (95: 5 v/v) at a flow rate of 0.5 mL/min. The detection wavelength was 210 nm at a temperature of 30° C. Linearity was obtained for a range of 2.5 and 40  $\mu\text{g/mL}$  ( $r^2$  0.992). For intra and inter-day tests the coefficient of variation was less than 5%. This method used for the validation of the marker presented selectivity and sensitivity, presenting itself as an advantageous and reliable method for carrying out the proposed studies. The encapsulation method proved to be suitable for the preparation of chitosan microparticles containing the extract, even though it had low yield and encapsulation efficiency.

**Key words:** *Doliocarpus dentatus*, Betulinic acid, analytical validation, microparticles, chitosan.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas de <i>D. dentatus</i> (A) Folhas de <i>D. dentatus</i> (B) (imagens disponíveis em: <a href="https://herbariovaa.org/collections/individual/index.php?occid=2772783">https://herbariovaa.org/collections/individual/index.php?occid=2772783</a> , acesso em 01/10/2018).....	3
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do ácido betulínico (imagem disponível em: <a href="https://www.sigmaaldrich.com">https://www.sigmaaldrich.com</a> , acesso em 01/10/2018).....	5
<b>Figura 3.</b> O tamanho da partícula ser determinante com local de deposição no trato respiratório. Adaptada de Manca (2009). .....	1
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da quitosana (imagem disponível em: <a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a> , acesso em 01/10/2018). .....	2
<b>Figura 5.</b> Reação colorimétrica de fenóis com Folin-ciocalteau com a intensidade da cor variando de acordo com a concentração dos analitos.....	5
<b>Figura 6.</b> Célula de difusão do tipo Franz modificada montada para realização dos estudos <i>in vitro</i> de liberação. ....	12
<b>Figura 7.</b> Curva do padrão de ácido gálico.....	13
<b>Figura 8.</b> Cromatograma referente a solução metanólica do padrão de ácido betulínico na concentração de 100,0 µg/mL. ....	14
<b>Figura 9.</b> Sobreposição dos cromatogramas referentes a uma solução metanólica de ácido betulínico a 100,0 µg/mL e de uma solução metanólica de quitosana a 100 µg/mL. ....	15
<b>Figura 10.</b> Representação gráfica da curva analítica obtida por CLAE-UV/vis para soluções metanólicas de ácido betulínico na faixa de concentração entre 2,5 e 40,0 µg/mL. Equação da reta: $y = 5619x - 2694$ , $r^2 = 0,992$ .....	16
<b>Figura 11.</b> Fotomicrografias obtidas por MEV para as micropartículas de quitosana. (A) MP QS 0; (B) MP QS 5; (C) MP QS 10. Aumento de 5000 a 10000 vezes. ....	21

**Figura 12.** Perfis de liberação *in vitro* do extrato, em tampão fosfato pH 7,4, a partir das micropartículas de quitosana com extrato encapsulado e liberação do extrato diretamente do compartimento doador..... 23

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Métodos cromatográficos utilizados para quantificação de ácido betulínico ..	0
<b>Tabela 2.</b> Quantidade de extrato ( <i>D. dentatus</i> ) e polímero (quitosana) para 400 mL de cada uma das soluções (formulações) secas no <i>Spray dryer</i> .....	9
<b>Tabela 3.</b> Valores de precisão e exatidão do método analítico para quantificação de ácido betulínico .....	18
<b>Tabela 4.</b> Resultados para os parâmetros avaliados para caracterização das micropartículas de quitosana obtidas.....	19

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1</b> .....	8
<b>Equação 2</b> .....	8
<b>Equação 3</b> .....	8
<b>Equação 4</b> .....	9
<b>Equação 5</b> .....	10
<b>Equação 6</b> .....	12

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Anti-TB	Anti-Tuberculose
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV%	Coefficiente de Variação
<i>D. dentatus</i>	<i>Doliocarpus dentatus</i>
EE %	Eficiência de encapsulação
E%	Exatidão
g	Gramas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M	Molar
mAU	Mili-absorbance units
MP	Micropartícula
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mL	Microlitro
m <sup>3</sup>	Metro cúbico
min	Minutos
m/ v	Massa/ volume
mV	Milivolts
MEV	Microscopia Eletrônico de Varredura

MRC	Materiais de Referência Certificada
$\mu\text{g}$	Microgramas
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Padrão Analítico
pH	Potencial hidrogeniônico
QS	Quitosana
Qi	Quantidade inicial
Qf	Quantidade final
$r^2$	Coefficiente de determinação
$s$	Desvio padrão
$S$	Coefficiente angular da curva de calibração
v/ v	Volume/ volume
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>2</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	2
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	2
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
3.1. <i>DOLIOCARPUS DENTATUS</i> .....	3
3.2. ÁCIDO BETULÍNICO .....	4
3.3. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO BETULÍNICO .....	5
3.4. MICROPARTÍCULAS .....	1
3.5. METODOLOGIA ANALÍTICA .....	3
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>4</b>
4.1. MATERIAL.....	4
4.2. DOSAGEM DE FENÓLICOS TOTAIS .....	4
4.3. METODOLOGIA ANALÍTICA .....	5
4.3.1. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES ESTOQUE .....	5
4.3.2. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	5
4.3.3. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....	6
4.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	6
4.4.1. SELETIVIDADE .....	6
4.4.2. LINEARIDADE .....	7
4.4.3. PRECISÃO.....	7
4.4.4. EXATIDÃO .....	8
4.4.5. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	
8	
4.5. OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO EXTRATO DE <i>D. DENTATUS</i> .....	9
4.6.1. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	10
4.6.2. RENDIMENTO.....	10
4.6.3. ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DAS MICROPARTÍCULAS.....	10

4.6.4.	POTENCIAL ZETA.....	11
4.6.5.	MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA (MEV).....	11
4.6.6.	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	11
4.7.	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO.....	12
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>13</b>
5.1.	DOSAGEM DE FENÓLICOS TOTAIS .....	13
5.2.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO.....	14
5.2.1.	SELETIVIDADE .....	15
5.2.2.	LINEARIDADE.....	16
5.2.3.	PRECISÃO E EXATIDÃO.....	17
5.2.4.	LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .....	19
5.3.	DESENVOLVIMENTO DAS MICROPARTÍCULAS .....	19
5.4.	RENDIMENTO .....	19
5.5.	ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DAS MICROPARTÍCULAS .....	20
5.6.	POTENCIAL ZETA .....	20
5.7.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	21
5.8.	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	22
5.9.	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	22
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>23</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>24</b>



## 1. INTRODUÇÃO

*Doliocarpus dentatus* é uma espécie de planta que pertence à família *Dilleneaceae*. Popularmente conhecida como cipó-caboclo-vermelho, e comumente é encontrada nas regiões de floresta tropical como por exemplo a Amazônia e algumas áreas de cerrado. Na etnofarmacologia destaca-se a utilização de infusão de ramos jovens e raízes da *D. dentatus* como diurético, laxante e no combate a cistites (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Além disso, a planta possui também atividade no frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose em humanos (APONTE, et al. 2008).

Estudos anteriores, realizados por um grupo de pesquisa parceiro, determinaram que os principais compostos presentes no extrato etanólico de folhas de *D. dentatus* são compostos fenólicos tais como: flavonoides e taninos, e dentre as principais substâncias isoladas estão o ácido betulínico, o betulin e a flavona (ISHIKAWA et al., 2017). Esses compostos foram objeto de diversos estudos biológicos e apresentaram atividade imunomodulatória, anti-hipertensiva, diurética, anticoagulante, mostrando um grande potencial para desenvolvimento de novos fármacos (JAGESSAR, et al. 2013).

O ácido betulínico é um triterpeno pentacíclico amplamente distribuído no reino vegetal. Suas fontes tradicionais são espécies europeias do gênero *Betula*, que produzem seu álcool precursor, a betulina (FRIGHETTO et al., 2005). De acordo com a literatura, o ácido betulínico é conhecido como um ativo de importante valor e um dos principais compostos encontrado no extrato etanólico das folhas de *D. dentatus* (SAUVAIN et al., 1996; JAGESSAR et al., 2013). Esse triterpeno apresenta uma variedade de atividades biológicas e farmacológicas, dentre elas pode-se citar as atividades antimalárica, anti-inflamatória e antineoplásica (YOGEERSWARI; SRIRAM, 2005).

Para que o extrato desta espécie possa compor novos medicamentos, é importante o desenvolvimento de um método analítico seletivo, sensível e confiável para determinação do seu componente majoritário, que é o ácido betulínico mesmo na presença de todos os componentes do extrato e interferentes que estarão na formulação, como a quitosana. O sistema de cromatografia nas condições em que é usado, promove a obtenção de resultados com a qualidade exigida e de modo que, a dosagem do analito presente na amostra seja mais facilmente alcançado por seletividade (SARGAÇO, 2013; GONZALES, HERRADOR, 2007).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar micropartículas de quitosana encapsulando o extrato etanólico das folhas de *D. dentatus*. Para dar suporte ao desenvolvimento, o trabalho também teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico por CLAE-UV capaz de quantificar o ácido betulínico no extrato de *D. dentatus* e no sistema microparticulado.

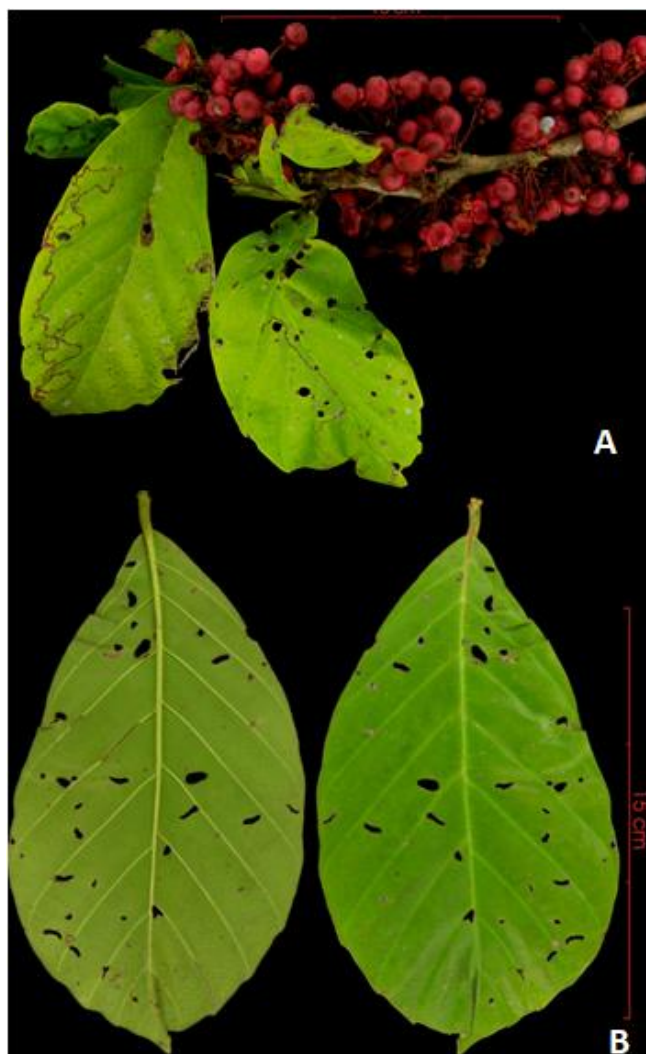
### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Dosar os compostos fenólicos no extrato etanólico das folhas de *D. dentatus*;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação de ácido betulínico;
- Obter micropartículas de quitosana encapsulando o extrato de *D. dentatus*;
- Caracterizar as micropartículas obtidas quanto ao rendimento de obtenção, tamanho, potencial zeta (mV), morfologia (Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV) e eficiência de encapsulação (EE);
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do ácido betulínico a partir das micropartículas.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. *DOLIOCARPUS DENTATUS*

*Doliocarpus dentatus* é uma espécie pertencente à família *Dilleneaceae*, popularmente conhecida como “cipó-caboclo-vermelho” ou “cipó de fogo”, e é comumente encontrada nas regiões de florestas tropicais como por exemplo a do México, Peru, Bolívia e no Brasil, na Amazônica. Também pode ser encontrada em algumas regiões de cerrado e em ecossistemas como a Mata Atlântica (APONTE et al., 2008; BIANKI FILHO et al., 2015). Na etnofarmacologia destaca-se a utilização de infusão de ramos jovens e raízes da *D. Dentatus*, sendo indicado como diurético, laxantes e no combate a cistites (RODRIGUES, 2007; CARVALHO, 2001).



**Figura 1.** Estruturas de *D. dentatus* (A) Folhas de *D. dentatus* (B) (imagens disponíveis em: <https://herbariovaa.org/collections/individual/index.php?occid=2772783>, acesso em 01/10/2018).

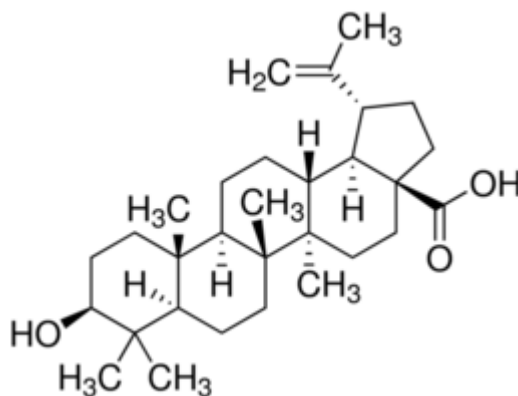
Um grupo de pesquisa parceiro, realizou um estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *D. Dentatus* e constatou a presença de compostos fenólicos (204,04 mg/g) – flavonóides (89,17 mg/g) e taninos (12,05 mg/g) – bem como de sitosterol-3-O-D-glucopiranosídeo, kaempferol 3-O-L-aminopiranosídeo, ácido betulínico e betulin no extrato etanólico das folhas de *D. dentatus* (EEDd) (ISHIKAWA et al., 2017).

Estudos fitoquímicos com diferentes extratos etanólicos do caule da planta isolaram vários compostos químicos como fenóis e flavonóides que foram objetos de diversos estudos biológicos apresentando resultados como atividades imunomodulatória, anti-hipertensiva, diuréticos, anticoagulantes e redução do risco cardiovascular, mostrando um grande potencial para desenvolvimento de novos fármacos (JAGESSAR, et al. 2013). Além disso, foram apresentadas atividades citotóxicas contra diversas células tumorais humanas e antimicrobiana frente à *Mycobacterium tuberculosis*, microrganismo de grande relevância clínica e responsável pela tuberculose (APONTE, et al. 2008).

Estudos *in vitro* sobre a atividade biológica de *D. dentatus* demonstraram ação anti-Leishmania (SAUVAIN et al., 1996), antimicrobiana frente à cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (JAGESSAR e PERSID, 2014; ISHIKAWA et al., 2017), anti-inflamatória (ISHIKAWA et al., 2017) e citotóxica em células leucêmicas da linhagem K562 (APONTE et al., 2008). Além disso, demonstrou-se recentemente que o EEDd não causa danos genômicos e cromossômicos, o que sugere segurança no uso (ISHIKAWA et al., 2017).

### 3.2. ÁCIDO BETULÍNICO

O ácido betulínico, ou ácido 3 $\beta$ -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico (Figura 2) é um triterpeno pentacíclico do tipo lupano amplamente distribuído no reino vegetal. Suas fontes tradicionais são espécies europeias do gênero *Betula* (*Betula* sp., Betulaceae), que produzem seu álcool precursor, a betulina (FRIGHETTO et al., 2005). Também foi encontrado em espécies dos gêneros *Ziziphus* (sp., Rhamnaceae), *Syzygium* (sp., Myrtaceae), *Diospyros* (sp., Ebenaceae) e *Paeonia* (sp., Paeoniaceae). O composto está presente na espécie *D. dentatus* como derivados glicosilados (MOGHADDAM et al., 2012) e a purificação do composto pode ser realizada através de uma combinação de diferentes métodos cromatográficos.



**Figura 2.** Estrutura química do ácido betulínico (imagem disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com>, acesso em 01/10/2018).

De acordo com a literatura, o ácido betulínico é conhecido como um ativo importante encontrado em diversas plantas, além de ser um dos principais compostos encontrado no EEDd (SAUVAIN et al., 1996; JAGESSAR et al., 2013). Esse triterpeno apresenta uma ampla variedade de atividades biológicas e farmacológicas, dentre elas pode-se citar as atividades antimalárica, anti-inflamatória e antineoplásica (YOGEERSWARI; SRIRAM, 2005). A atividade anticâncer do ácido betulínico se destaca visto que, apesar de seu potencial citotóxico contra as células tumorais, ele parece não ser ativo nas células normais (FULDA; KROEMER, 2009).

### 3.3. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO BETULÍNICO

Na literatura, diferentes métodos que descrevem a determinação das concentrações de ácido betulínico em espécies vegetais, são relatados. A cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC é uma das técnicas mais utilizadas. Conforme a Tabela 1, pode-se observar que o ácido betulínico é alvo de estudos para diversas vertentes de pesquisas justificando o alto interesse acadêmico por suas atividades biológicas (ŞOICA et al., 2012).

**Tabela 1.** Métodos cromatográficos utilizados para quantificação de ácido betulínico

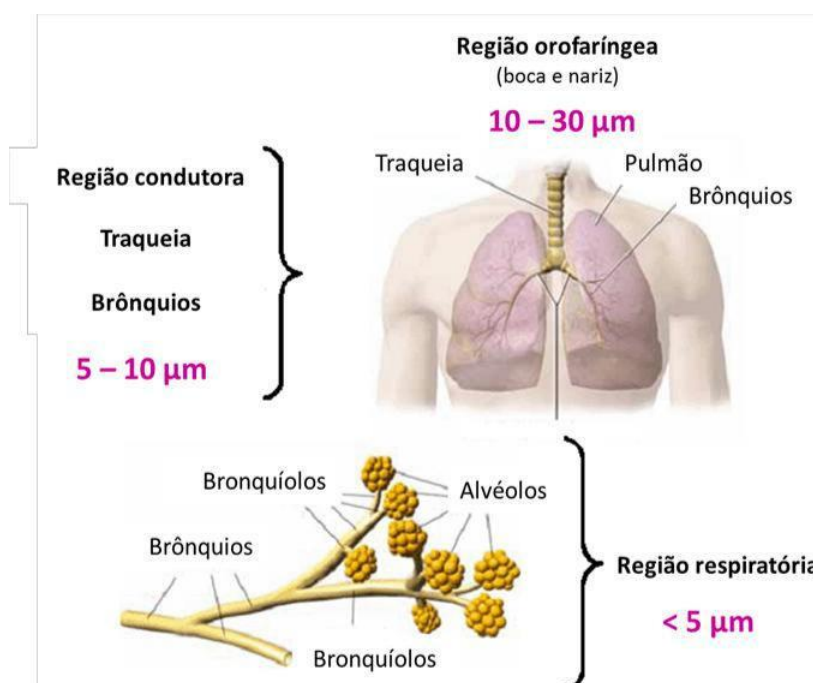
<b>Autor</b>	<b>Coluna</b>	<b>Fase móvel (volume/volume)</b>	<b>Solvente</b>	<b>Fluxo (mL/min)</b>	<b>Aplicação</b>
HOLONEC et al., (2012)	LC 18 (250 4.6 mm × 5 µm)	Acetonitrila : água (9:1) (v/v)	Metanol / HCl (95:1)	1,00	Avaliar o teor em cascas de bétula nas florestas da Romênia.
OLIVEIRA; SANTOS; ESPÍNDOLA ( 2002)	C18 (250 4.6 mm x 5 µm)	Acetonitrila : água (9:1) (v/v)	Hexano / clorofórmio (9:1)	1,00	Demonstrar que a casca de <i>D. schottianus</i> é uma importante fonte de ácido betulínico.
ŞOICA et al., (2012)	SB-C18 (100 3.0 mm x 3.5 mm)	Solução de Ác. Fórmico 0.4%: metanol 15/85 (v/v)	Metanol / água (50:50)	-*	Analisar o teor em extrato de casca de bétula, bem como sua atividade citotóxica.
ZHAO; YAN; CAO, (2007)	C18 (250 4.6 mm x 5 µm)	Acetonitrila : água (86:14) (v/v).	Metanol / água (95:5)	1,00	Determinação simultânea de betulina e ácido betulínico na casca de bétula branca.
HAJATI et al., (2018)	C18 (150 4.6 mm x 5 mm)	Acetonitrila : água (86:14) (v/v)	Metanol	1,00	Produção de grandes quantidades de Betulin e ác. betulínico para drogas anticâncer e HIV.

\*Não foi possível identificar o fluxo no artigo referência

### 3.4. MICROPARTÍCULAS

Os sistemas de administração de fármacos micro e nano particulados têm demonstrado vantagens no aumento de estabilidade de biomoléculas, possibilidade de se obter uma liberação direcionada (vetorização) ao seu alvo de ação, possibilidade de controle/sustentação da liberação dessas moléculas, de modo a reduzir os efeitos adversos causados nas terapias, entre outras (OLIVEIRA et al, 2017).

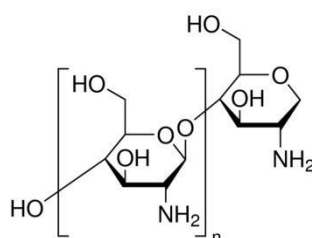
As micropartículas poliméricas apresentam-se como estruturas sólidas e esféricas, que contêm o fármaco disperso em uma matriz polimérica maciça, em que o fármaco poderá estar retido em sua superfície e/ou distribuído uniformemente dentro da micropartícula (SILVA et al., 2003; STORPIRTIS et al., 2009). Geralmente são feitas com polímeros que podem ou não ser biodegradáveis (GELFUSO, 2011) e possui versatilidade de aplicação, podendo ser dirigidas para as mais diversas vias de administração. Por exemplo, quando dirigidas para liberação pulmonar, as micropartículas precisam estar em uma faixa ideal de tamanho compreendida entre 1  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$ , tamanho viável para atingirem os alvéolos pulmonares após inalação (OLIVEIRA, 2017), conforme pode ser observado no esquema apresentado na Figura 3.



**Figura 3.** O tamanho da partícula ser determinante com local de deposição no trato respiratório. Adaptada de Manca (2009).

Algumas das vantagens das micropartículas poliméricas como sistemas de liberação de fármacos, incluem-se o direcionamento do fármaco para o seu sítio de ação (MARTINAC et al., 2005) além da possibilidade de sustentar, controlar e modificar a forma de liberação do fármaco (MORAIS, 2011). As características dos polímeros como a possibilidade de incorporação de outros ligantes em sua superfície conferem propriedades especiais às micropartículas (OLIVEIRA, 2017).

A quitosana (Figura 4) é um polímero natural que se apresenta como uma alternativa de uso na obtenção das micropartículas. Ela é biocompatível, biodegradável, tem baixo custo e tem se mostrado capaz de abrir as *tight junctions* celulares, funcionando como um promotor de absorção de fármacos através de membranas confere mucoadesividade ao sistema (ISLAM et al., 2012).



**Figura 4.** Estrutura química da quitosana (imagem disponível em: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), acesso em 01/10/2018).

O controle da liberação de fármacos encapsulados nas micropartículas alia-se ao efeito mucoadesivo da quitosana que é benéfico para sustentar o tempo de contato das partículas na área das mucosas para um efeito terapêutico controlado (ISLAM et al., 2012) e agregando a esse tipo de partícula um sistema atraente e não tóxica, além de contribuir com excelentes propriedades de melhoramento da permeação dos materiais de entrega à superfície da célula, especialmente na mucosa (ISLAM et al., 2012).

Dentre os métodos disponíveis para preparação de nano e micropartículas, são descritos na literatura métodos físicos de revestimento, extrusão e secagem por *spray drying*, métodos químicos de polimerização interfacial e polimerização *in situ*, métodos físico-químicos de coacervação, emulsificação e evaporação do solvente (GERT et al., 2016).

Devido as características das partículas e também a atividade do extrato das folhas de *D. dentatus* sobre o *M. tuberculosis*, uma possível aplicação para o sistema seria o tratamento da tuberculose e dessa forma torna-se interessante uma liberação direta do



medicamento dentro dos pulmões, podendo resultar na redução dos níveis de toxicidade e de efeitos adversos, liberação prolongada da droga, estabilidade e adesão do paciente a administração, além de as micropartículas de quitosana terem, também, como vantagem, a eficiência do encapsulamento e doses menores contribuindo com a eficácia (PHAM; FATTAL; TSAPIS, 2015).

### 3.5. METODOLOGIA ANALÍTICA

A validação de um método analítico é fundamental para implementar um sistema de controle de qualidade, bem como gerar dados confiáveis. Resultados analíticos não confiáveis podem comprometer decisões importantes e causar prejuízos inclusive financeiros. A validação do método é feita para garantir que a metodologia analítica seja exata, reproduzível e segura sobre uma faixa específica na qual uma substância será analisada (OLIVEIRA et al, 2017). Bem como em outros países, no Brasil faz-se necessário à validação da metodologia analítica para o registro de novos produtos, para análises qualitativa e quantitativa de métodos oficiais, rastreabilidade dos resultados, entre outros. Um processo de validação bem definido assegura a conformidade com as exigências legais e garante que o método seja adequado para o uso desejado (SKOOG et al., 2008; RIBANI et al., 2004).

A definição de validação depende do órgão e do autor, entretanto a maioria segue a mesma linha descrita em compêndios oficiais e guias técnicos regulatórios, sendo fornecidas diretrizes que abrangem a validação de um modo geral e estabelecem padrões mínimos para a indústria farmacêutica. Para a ANVISA (2017), a validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos. Outra variação seria que a validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, por ser um processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer.

Segundo a *World Health Organization* (WHO, 1992), a validação é a “avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado”. No Brasil, duas agências disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, a ANVISA pela RDC Nº 166, 24/07/2017 - Guia para validação de métodos analíticos - e o documento do Instituto nacional de metrologia, qualidade e tecnologia (INMETRO) DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de

métodos de ensaio químico (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Para a validação de metodologia analítica são normalmente avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

Neste contexto, a validação de um método analítico, bem como os estudos rigorosos da segurança e qualidade são imprescindíveis para o registro de novos produtos (RIBANI et al., 2004; ROUSSEAU & SCHACHTER, 2003).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

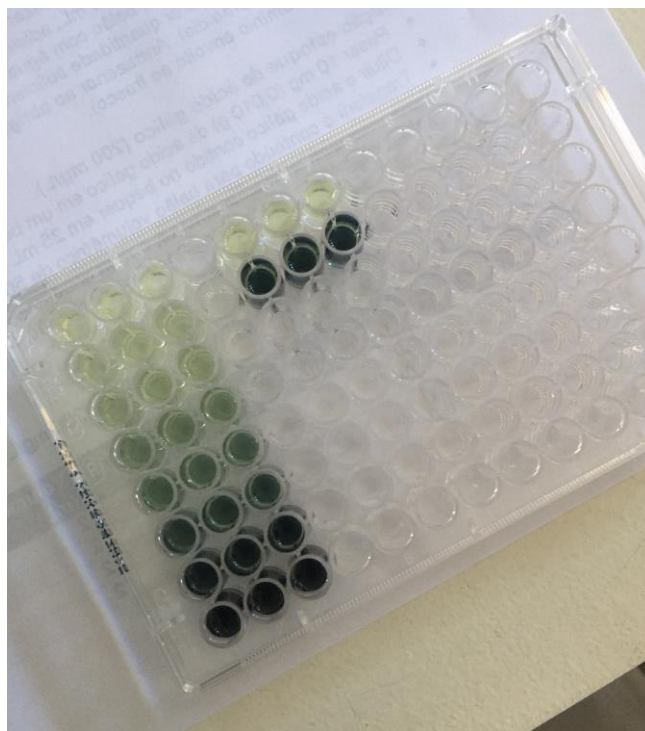
### **4.1. MATERIAL**

O EEDd foi cedido pela Universidade Federal de Grande Dourados que é parceira no projeto. O padrão de ácido betulínico (pureza >99%) foi obtido da Sigma-Aldrich (Alemanha). O ácido acético (99%) e a quitosana (de baixo peso molecular, 75-85% desacetilação e com alto grau de pureza) utilizados para o preparo das micropartículas foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O etanol usado nos estudos de caracterização das partículas foi obtido da Dinâmica (Diadema, São Paulo, Brasil). Para preparação do tampão fosfato foram utilizados fosfato de sódio nas formas monobásica e dibásica (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio (Serva, Rio de Janeiro, Brasil). A membrana de acetato de celulose (PM 12000 a 4000 Da) usada nos testes *in vitro* de liberação eram da Fisherbrand (Leicestershire, UK). No doseamento dos fenólicos foram utilizados a solução de carbonato de sódio (7,5%), o Folin Ciocateau diluído em água ultrapura (1:9), ácido gálico (200 mg/L) da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O metanol e a acetonitrila de grau HPLC foram obtidos da J.T. Baker (Philisburg, USA). Todas as análises foram realizadas com água ultrapura do tipo Milli-Q (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

### **4.2. DOSAGEM DE FENÓLICOS TOTAIS**

A quantificação de compostos fenólicos por espectrometria pode ser realizada por variadas técnicas sendo a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu uma das mais utilizadas

(VALKO et al., 2004). Nesse método o reagente de Folin, quando em meio de reação alcalino, forma o azul de molibdênio e o azul de tungstênio (IKAWA et al., 2003) e após a reação a solução de cor azul foi analisada utilizando-se um espectrofotômetro (Spectramax M2).



**Figura 5.** Reação colorimétrica de fenóis com Folin-ciocalteau com a intensidade da cor variando de acordo com a concentração dos analítos.

### **4.3. METODOLOGIA ANALÍTICA**

#### **4.3.1. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES ESTOQUE**

As soluções estoque de ácido betulínico e extrato das folhas de *D. dentatus* foram preparadas em metanol na concentração de 100 µg/ mL. Essas soluções estoque foram armazenadas em geladeira em uma faixa de temperatura de 2 a 8° C.

#### **4.3.2. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA**

O espectro de varredura de comprimento de onda para o ácido betulínico foi determinado a partir de sua solução estoque utilizando um espectrofotômetro (Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800). Para a varredura, foi utilizada uma célula de quartzo de 10 mm de comprimento óptico. A seleção do comprimento de onda foi baseada na absorção máxima no UV/Vis para o padrão de ácido betulínico.

O método desenvolvido baseou-se no trabalho de Hussain et al. (2011), e foram realizadas modificações nas proporções e na vazão da fase móvel, no volume de injeção e na temperatura do forno.

#### **4.3.3. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS**

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (modelo LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um forno (modelo CTO-20AS), um detector DAD espectrofotométrico (SPD-M20A) e um injetor automático de amostras (modelo 9SIL-20AD). A aquisição de dados, análise e relatórios foram realizados usando o software Shimadzu LC. Como fase estacionária, utilizou-se uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (300 mm x 3,9 mm x 10µm - Phenomenex, Allcrom). A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila e água (95:5 v/v), com vazão fixada em 0,5 mL/min. O forno foi mantido a 30°C durante todas as análises. Ácido betulínico foi detectado por absorbância à 210 nm e o volume de injeção de cada amostra foi de 20 µL.

#### **4.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

A confiabilidade e o desempenho analítico do método proposto por CLAE foram assegurados por sua validação com relação à seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão de acordo com as diretrizes da RDC Nº 166 de 2017 ANVISA (ANVISA, 2017) e da *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005).

##### **4.4.1. SELETIVIDADE**

A seletividade (ou especificidade) do método analítico foi verificada por meio da análise de ácido betulínico em amostras à 100 µg/mL do extrato comparadas a soluções do polímero quitosana, que é utilizada para o preparo de formulações. O tempo de retenção do padrão foram então comparados aos dos picos resultantes da análise de uma solução de quitosana à 100 µg/mL. Os experimentos foram realizados utilizando seis repetições para cada amostra.

#### **4.4.2. LINEARIDADE**

Três soluções estoque de ácido betulínico na concentração de 100 µg/mL foram preparadas em metanol partindo-se de pesagens independentes do marcador e, a partir de cada uma delas, foram feitas cinco diluições em metanol para se obter amostras nas seguintes concentrações: 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 µg/mL. A curva analítica foi obtida relacionando-se a área do pico gerado pelo equipamento com a respectiva concentração de ácido betulínico.

A análise estatística dos dados foi obtida utilizando-se o método de regressão linear, resultando em uma reta no formato  $y = ax + b$ , em que (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) ao coeficiente linear. As faixas lineares foram calculadas utilizando-se o coeficiente de correlação linear (r), de acordo com o parâmetro mínimo aceitável é de  $r = 0,990$  (ANVISA, 2017).

#### **4.4.3. PRECISÃO**

A precisão do método foi verificada pela análise em triplicata de amostras do ácido betulínico em três concentrações diferentes (baixa, média e alta) da curva analítica (2,5; 10,0 e 40,0 µg/mL). A precisão do método foi avaliada através do estudo da repetibilidade – concordância entre os resultados obtidos em um mesmo dia, com o mesmo analista e mesmo instrumento – e da precisão intermediária – concordância entre os resultados obtidos no mesmo laboratório no mesmo dia, com o mesmo analistas (ANVISA, 2017). Os resultados foram expressos por meio do coeficiente de variação (CV%), calculado através da seguinte fórmula:

$$CV\% = \left( \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média}} \right) \times 100$$

**Equação 1**

em que: CV% corresponde ao coeficiente de variação; Desvio Padrão é a estimativa do desvio padrão da média; e a Concentração Média é a média dos valores obtidos em triplicata para cada concentração analisada (FDA, 2001).

#### **4.4.4. EXATIDÃO**

A exatidão foi analisada a partir das mesmas amostras utilizadas para análise de precisão. O cálculo da exatidão, no entanto, foi apresentado em função da porcentagem do erro relativo, calculado segundo a seguinte equação:

$$E\% = \left[ \frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração teórica}} \right] \times 100$$

**Equação 2**

Em que: E% corresponde à porcentagem de erro relativo; Concentração obtida corresponde à concentração real obtida após a análise; e Concentração teórica corresponde à concentração que teoricamente está presente na amostra analisada.

#### **4.4.5. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)**

Os valores de LD e de LQ são os menores valores de ácido betulínico que pode ser detectado e quantificado pelo método analítico desenvolvido, respectivamente. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados por meio das equações teóricas (ICH, 2005) abaixo:

$$LD = \left( \frac{3 \times s}{S} \right)$$

**Equação 3**

$$LQ = \left( \frac{10 \times s}{S} \right)$$

#### Equação 4

Em que: LD corresponde ao limite de detecção; LQ corresponde ao limite de quantificação;  $s$  é o desvio padrão dos valores de intercepção do eixo Y das curvas de calibração; e  $S$  corresponde ao coeficiente angular da curva de calibração.

#### 4.5. OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO EXTRATO DE *D. DENTATUS*

As micropartículas foram preparadas pelo método de atomização e secagem em *spray dryer* que representa uma das técnicas mais utilizadas na indústria farmacêutica e de alimentos desde a década de 1940 (PATEL; PATEL; CHAKRABORTY, 2014). Resumidamente, partiu-se do método proposto por Gelfuso et al. (2011), em que foram preparadas 400 mL de soluções aquosas ácidas (1% v/v de ácido acético) com 2% (m/v) de quitosana de baixo peso molecular. Depois de dispersar o polímero na solução e deixar *overnight* sob agitação magnética, diferentes quantidades do extrato foram dissolvidas e as soluções resultantes foram levadas para serem secas no equipamento *Spray dryer* (modelo MSD 1.0, Labmaq, Brasil).

As soluções resultantes foram secas utilizando os seguintes parâmetros: vazão de alimentação com a solução = 6,8 mL/min; diâmetro do bico atomizador = 1,0 mm; vazão do ar de atomização = 30 L/min; vazão do ar de secagem = 4.50 m<sup>3</sup>/min; temperatura de entrada = 130 °C; temperatura de saída = 100 °C. As quantidades de quitosana e extrato em cada uma das soluções que passaram pelo processo de secagem estão descritas na Tabela 2, abaixo.

**Tabela 2.** Quantidade de extrato (*D. dentatus*) e polímero (quitosana) para 400 mL de cada uma das soluções (formulações) secas no *Spray dryer*.

Formulação	Proporção polímero:extrato	Quantidade de quitosana (g)	Quantidade de extrato (g)
------------	-------------------------------	--------------------------------	------------------------------

<b>MP QS 0</b>	1:0	8,0	---
<b>MP QS 5</b>	5:1	8,0	1,6
<b>MP QS 10</b>	10:1	8,0	0,8

#### 4.6.1. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

As micropartículas formadas foram coletadas secas, estocadas em frasco fechado e levadas à caracterização, que foi feita avaliando-se o rendimento do processo de obtenção, a eficiência de encapsulação do fármaco, o potencial zeta, a distribuição do tamanho de partículas e a morfologia.

#### 4.6.2. RENDIMENTO

As micropartículas obtidas foram pesadas e o rendimento foi calculado em função da quantidade de sólidos (extrato + polímero) adicionados na solução inicial a ser seca a partir da equação:

$$R\% = \left( \frac{Q_i}{Q_f} \right) \times 100$$

**Equação 5**

Em que:  $R\%$  é o rendimento do processo;  $Q_i$  é a quantidade de sólidos adicionados no início (na solução a ser seca); e  $Q_f$  é a quantidade de micropartículas formadas ao final do processo de secagem.

#### 4.6.3. ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DAS MICROPARTÍCULAS

A distribuição do tamanho de cada uma das amostras de partículas foi determinada por difração a laser em equipamento Beckman Coulter LS 13 320. Para a análise, foram utilizadas aproximadamente 5 mg das micropartículas suspensas em 2 mL de etanol, sendo esse o meio dispersante. As suspensões preparadas foram levadas para análise no equipamento utilizando o módulo líquido universal (ULM – Universal Liquid Module).



#### 4.6.4. POTENCIAL ZETA

Aproximadamente 5 mg de cada uma das micropartículas foram suspensas em uma solução hidroalcoólica (60% v/v etanol em água) contendo 10 mM de NaCl para garantir a condutividade do meio (GELFUSO et al., 2011). A análise de potencial zeta foi feita por determinação da mobilidade eletroforética das partículas utilizando-se o equipamento *Zetasizer Nano Series* (ZS90, Malvern, Worcestershire, UK).

#### 4.6.5. MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia das micropartículas foi avaliada através de MEV. Amostras de cada formulação foram fixadas em um suporte metálico, recobertas com uma fina camada de ouro em um metalizador Bal-Tec MD 020 (Balzers) e observadas em um microscópio eletrônico (JEOL JMS-7000 IF, Tokio, Brazil). As imagens foram analisadas utilizando-se aumento de 5000 a 10000 vezes.

#### 4.6.6. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Para avaliar a quantidade de marcador que foi encapsulado nas micropartículas de quitosana, foram pesadas alíquotas de 10 mg de cada uma das micropartículas desenvolvidas. Cada uma dessas alíquotas foi dispersa em 5 mL de uma solução aquosa ácida (1% v/v de ácido acético) e deixada *overnight* sob agitação magnética a 500 rpm. Ao final desse período, os sistemas foram colocados em banho de ultrassom por 30 minutos, filtrados e a solução final foi quantificada por pelo método espectrofotométrico para dosagem de fenólicos, que é o marcador. A quantidade de fenólicos presentes no extrato encapsulada nas micropartículas foi calculada a partir da equação a seguir:

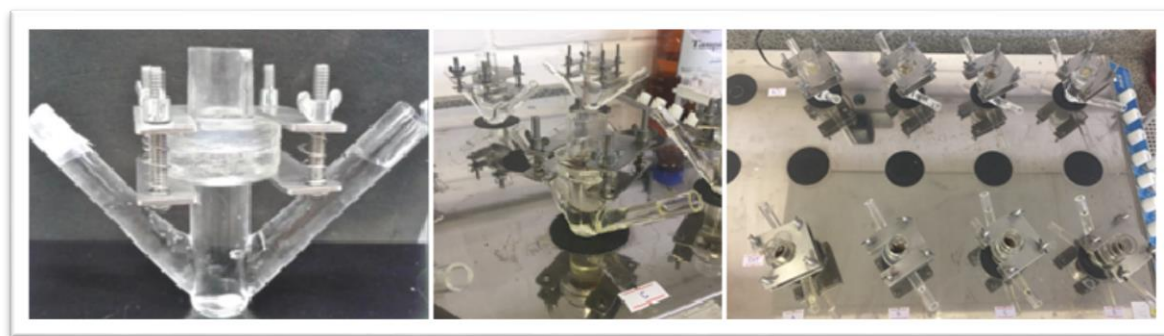
$$EE\% = \left( \frac{Valor_{total} - Valor_{quantificao}}{Valor_{total}} \right) \times 100$$

**Equação 6**

Onde: EE% é a eficiência de encapsulação de fenólicos presentes no extrato nas micropartículas;  $Valor_{quantificado}$  é a quantidade de extrato extraída das micropartículas; e  $Valor_{total}$  é a quantidade de extrato que teoricamente estaria presente em 10 mg das micropartículas desenvolvidas.

**4.7. ESTUDOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO**

O perfil de liberação dos fenólicos presentes no extrato a partir da formulação MP QS 10 foi determinado *in vitro* utilizando-se células de difusão de Franz modificadas (Figura 6). Essa formulação foi escolhida por determinar maior valor de eficiência de encapsulação.



**Figura 6.** Célula de difusão do tipo Franz modificada montada para realização dos estudos *in vitro* de liberação.

Para o ensaio, uma membrana sintética hidrofílica de acetato de celulose foi posicionada entre o compartimento doador e receptor de cada uma das células. O compartimento receptor foi preenchido com uma solução tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,4, enquanto que 60 mg das micropartículas secas foram colocadas sobre a membrana de acetato de celulose no compartimento doador. Amostras (1 mL) da solução receptora foram coletadas em intervalos de tempos definidos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 horas) e levadas para a quantificação. À medida que as amostras eram coletadas, o mesmo volume (1 mL) de solução tampão era repostado no compartimento receptor. Durante todo o experimento as células de Franz foram mantidas em temperatura de ~30° C.

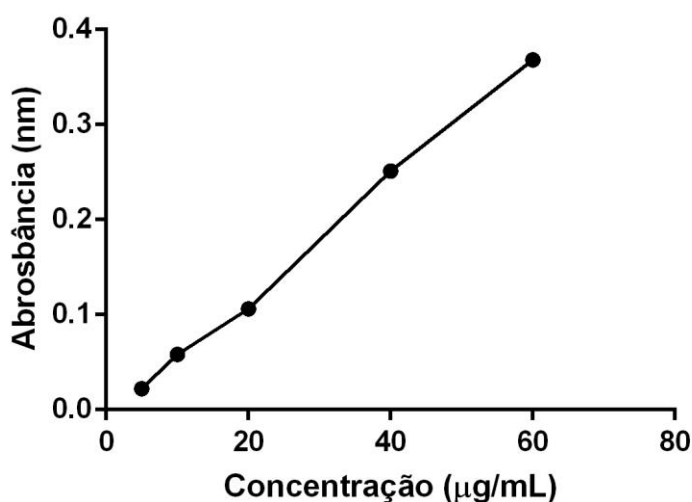
O perfil de liberação dos compostos fenólicos foi determinado construindo-se gráficos que relacionam a quantidade de compostos fenólicos, no extrato, liberado ( $\mu\text{g}$ ) em função do tempo (horas).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1.DOSAGEM DE FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos encontrados em plantas dividem-se em várias categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (SOUSA et al., 2007).

São um grupo de antioxidantes muito importante e específico, formados por um grupo hidroxila ligado a um grupo hidrocarboneto aromático (PENIM, 2015). Com base no número de unidades de fenol existentes, os compostos fenólicos podem ser classificados como fenóis simples ou polifenóis. Um dos métodos mais utilizados para quantificar os compostos fenólicos é com o reagente de Folin-Ciocalteu utilizando o método de (LISTER, WILSON, 2001).



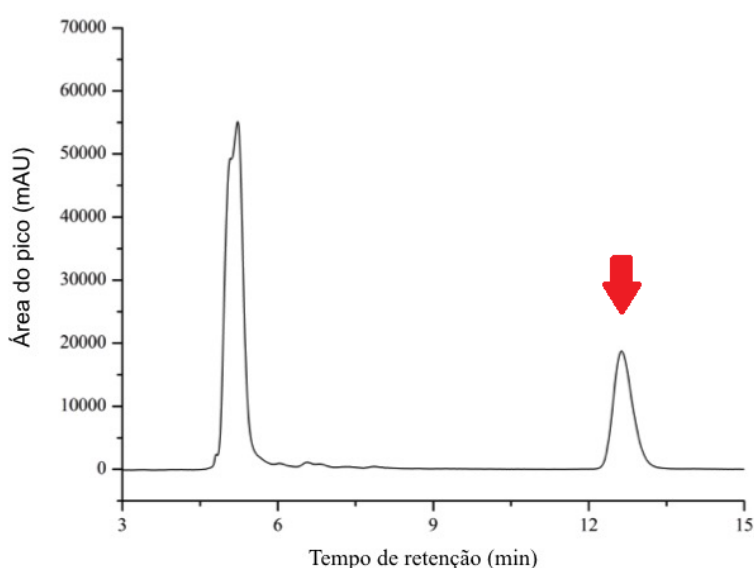
**Figura 7.** Curva do padrão de ácido gálico

Uma curva de calibração foi plotada usando ácido gálico como padrão. A concentração de compostos fenólicos é proporcional à intensidade de luz absorvida em um comprimento de onda de 760 nm. Os fenólicos foram usados como marcador desse extrato, por isso o método analítico utilizado é de dosagem de fenólicos.

## 5.2.VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO

O método analítico foi desenvolvido e validado a fim de assegurar uma dosagem eficaz do ácido betulínico, que é um dos marcadores presentes no extrato. Para isso, inicialmente, foi realizada varredura de uma solução metanólica do padrão de ácido betulínico a 100 µg/mL para definir o comprimento de onda de absorção máxima do marcador. O valor de comprimento de onda de máxima absorção encontrado para o padrão foi de 210 nm, e está de acordo com o descrito na literatura Bae et al. (1996). Sendo assim, esse comprimento de onda foi selecionado para a detecção do ácido betulínico durante a quantificação do extrato por CLAE-UV/Vis, por ser mais seletivo durante as análises, ou seja, observou-se menor incidência de picos de absorção do próprio solvente e outros interferentes no cromatograma analisado neste comprimento de onda.

Para as análises cromatográficas do padrão, com detecção em 210 nm, observou-se que o pico do ácido betulínico foi eluído em 12,5 minutos, conforme é mostrado na Figura 8.



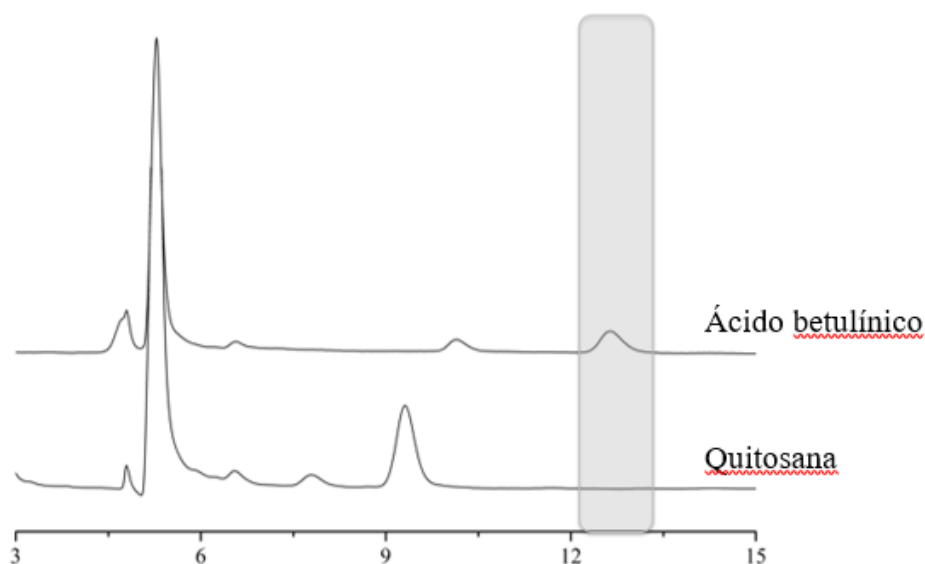
**Figura 8.** Cromatograma referente a solução metanólica do padrão de ácido betulínico na concentração de 100,0 µg/mL.

O pico obtido foi simétrico e eluiu em um tempo longo, o que é desejável para que haja sua separação de outros interferentes das amostras.

Passou-se então para a validação do método proposto. O objetivo de se validar um método analítico é demonstrar por evidência científica que os resultados obtidos com a sua execução são seguros (OLIVEIRA et al, 2017). Assim, é necessária a acreditação da metodologia para se atribuir um grau de reconhecimento, comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade ao método.

### 5.2.1. SELETIVIDADE

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação do método e deve ser avaliada constantemente. A seletividade é realizada para avaliar se possíveis interferentes eluem no mesmo tempo de retenção do composto de interesse, no caso de técnicas cromatográficas. A seletividade garante então que o pico de resposta seja exclusivamente do analito (RIBANI et al., 2004; LANÇAS et al., 2004; THOMPSON et al., 2002). Na Figura 9 está representada a sobreposição dos cromatogramas referentes à injeção da solução do extrato metanólico de *D. dentatus* e de uma solução de quitosana.



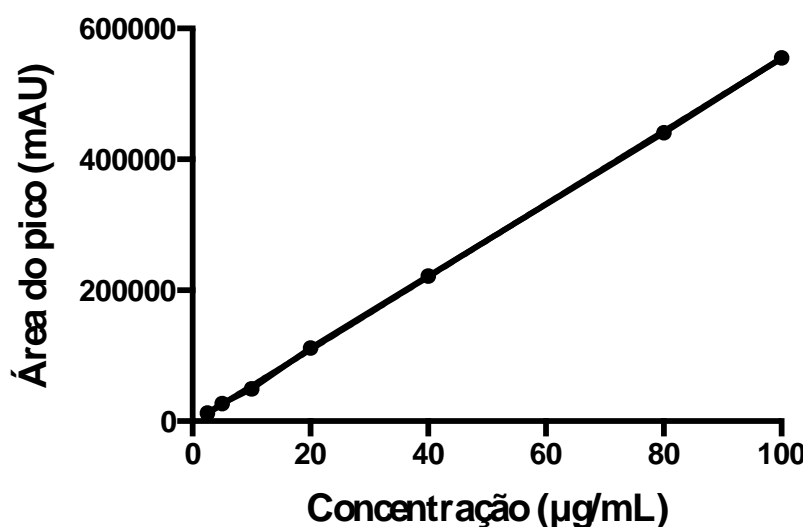
**Figura 9.** Sobreposição dos cromatogramas referentes a uma solução metanólica de ácido betulínico a 100,0 µg/mL e de uma solução metanólica de quitosana a 100 µg/mL.

Verificou-se que no extrato havia ácido betulínico eluído em 12,5 minutos. Já na solução de quitosana, não houve eluição de nenhum composto no mesmo tempo de retenção. Desta forma, conclui-se que o polímero e o extrato não interferiram na quantificação do padrão o que comprova a seletividade do método para determinação de ácido betulínico no extrato de *D. dentatus* encapsulado ou não em micropartículas de quitosana.

### 5.2.2. LINEARIDADE

A linearidade corresponde à capacidade de um método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo apropriado (ANVISA, 2017; LANÇAS et al., 2004; ICH, 2005). É avaliada por meio de uma curva de calibração (curva analítica) a qual descreve matematicamente por meio de uma equação de reta a correlação entre o sinal analítico medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada (SKOOG et al., 2008).

A ANVISA recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações distintas em no mínimo triplicata (ANVISA, 2017). A curva analítica obtida para o estudo de linearidade do método para a quantificação do padrão está representada na Figura 10.



**Figura 10.** Representação gráfica da curva analítica obtida por CLAE-UV/vis para soluções metanólicas de ácido betulínico na faixa de concentração entre 2,5 e 40,0 µg/mL. Equação da reta:  $y = 5619x - 2694$ ,  $r^2 = 0,992$

Por meio do cálculo da regressão linear, verificou-se que o coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) obtido foi igual a 0,992, valor que está de acordo com o limite estabelecido pela RDC n° 166 de 2017 da ANVISA. O método desenvolvido, portanto, pode ser considerado linear para quantificação de ácido betulínico na faixa de concentração que vai de 2,5 µg/mL a 40 µg/mL.

### 5.2.3. PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão é a dispersão entre os resultados de ensaios independentes obtidos em condições estipuladas (THOMPSON et al., 2002; ANVISA, 2017). Normalmente é avaliada em termos de desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), e pode também ser expressa pelo intervalo de confiança da média (RIBANI et al., 2004). A precisão em validação é avaliada em três níveis distintos: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade representa a concordância entre resultados de medições consecutivas de um mesmo método, para a mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, usando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo (LANÇAS, 2004). A ANVISA sugere um mínimo de 9 determinações cobrindo o intervalo linear do método ou seja: três níveis de concentrações (baixo, médio e alto) contendo três réplicas em cada nível. A precisão intermediária representa a concordância entre resultados do mesmo laboratório, mas em diferentes dias, por diferentes analistas, usando diferentes equipamentos (LANÇAS, 2004). A reprodutibilidade representa a concordância entre resultados de medições consecutivas de um mesmo método, para a mesma amostra, mas em diferentes laboratórios, por diferentes analistas, usando diferentes equipamentos (LANÇAS, 2004).

A exatidão expressa a proximidade da concordância entre um valor encontrado e o valor aceito como referência (SKOOG et al., 2008; THOMPSON et al., 2002; LANÇAS, 2004). O número de ensaios recomendado para avaliar a exatidão é de no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível (ANVISA, 2017).

Os procedimentos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos e ensaios de recuperação (INMETRO, 2016). Os materiais de referência certificados (MRC) acompanham um certificado que contém um valor de concentração de um determinado analito ou outra grandeza, para cada

parâmetro e uma incerteza associada (THOMPSON, 2002; INMETRO, 2016; RIBANI et al., 2004).

Outra abordagem para avaliação da exatidão consiste em comparar um método em desenvolvimento com outro de referência, cuja incerteza é conhecida (RIBANI et al., 2004). Já a recuperação consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado (LANÇAS, 2004).

Precisão e a exatidão para o presente método analítico foram determinadas e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores de precisão e exatidão do método analítico para quantificação de ácido betulínico.

<b>Concentração teórica (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Concentração obtida (experimental)</b>	<b>Precisão CV (%)</b>	<b>Exatidão E (%)</b>
<b>Intracorrída (n=9)</b>			
<b>2,5</b>	2,702	3,256	108,086
<b>10</b>	9,213	2,213	92,130
<b>40</b>	39,387	4,956	98,615
<b>Intercorrída (n=9)</b>			
<b>2,5</b>	2,879	4,189	116,101
<b>10</b>	10,742	1,710	107,424
<b>40</b>	39,604	3,856	100,494

A precisão foi avaliada e os valores de coeficiente de variação (CV%) foram de 1,71 a 4,95%, estando de acordo com os limites determinados, em que o valor máximo aceitável para o CV é 5% (ICH, 2005; MATOS et al., 2015). Os valores de exatidão encontrados variaram de 92,13 a 116,10%. Esses valores também estão de acordo com os limites estabelecidos pelas agências regulatórias (ANVISA, 2017; ICH, 2005).

Desta forma, o método pode ser considerável preciso e exato segundo a legislação vigente.



#### 5.2.4. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Limite de detecção de um analito é a menor quantidade de analito e uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado como um valor exato. É estabelecido por intermédio de análises de concentrações conhecidas e decrescentes até atingir o menor nível detectável. A ANVISA recomenda que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base. Já o limite de quantificação é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada quantitativamente com segurança (ICH, 2005). Os limites de detecção e quantificação encontrados para o método foram iguais a 1,327  $\mu\text{g/mL}$  e 4,022  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Estes valores representam as menores quantidades do padrão que podem ser detectadas e quantificadas com precisão e exatidão pelo método desenvolvido, sendo adequados para análise do extrato nas amostras a serem estudadas.

#### 5.3. DESENVOLVIMENTO DAS MICROPARTÍCULAS

Os dados de caracterização das micropartículas obtidas estão resumidos na Tabela 4 abaixo.

**Tabela 4.** Resultados para os parâmetros avaliados para caracterização das micropartículas de quitosana obtidas.

Formulação	Polímero: extrato	Rendimento (%)	Eficiência de encapsulação (%)	Potencial Zeta (mv)	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )
MP QS 0	1:0	24,37	---	+ 27,36 $\pm$ 1,40	8,99 $\pm$ 7,65
MP QS 5	5:1	36,66	40,91 $\pm$ 3,43	+ 27,96 $\pm$ 1,37	8,72 $\pm$ 8,24
MP QS 10	10:1	48,41	60,26 $\pm$ 0,970	+ 28,40 $\pm$ 2,94	8,70 $\pm$ 9,70

#### 5.4. RENDIMENTO

Utilizando-se a técnica de *spray drying*, o rendimento do processo de obtenção das micropartículas, preparadas com quitosana, variou de 24,37 a 48,41% (Tabela 4). Valores relativamente baixos de rendimento como esses têm sido apontados quando se utiliza a

quitosana como polímero na preparação de micropartículas, utilizando-se essa técnica. O rendimento do processo sofre interferências, negativas, na secagem da solução de quitosana no *spray dryer*, onde a solução acaba formando um filme na parede câmara de secagem do equipamento, no ato da pulverização (GELFUSO et al., 2011).

Outro fator influente no rendimento é a quantidade de material a ser seco. O processo de secagem, ao ser realizado em grandes escalas, resultaria em um maior rendimento devido a uma maior quantidade de produto e assim a formação do filme não influenciaria não significativamente no rendimento final (OLIVEIRA, 2017).

Por ser um processo simples e rápido, a técnica de obtenção de micropartículas por *spray drying* foi utilizada e também devido ao fato de ser um método que ocorre em uma única etapa (SILVA et al., 2003). O processo resulta em um pó seco que atribui praticidade no armazenamento e na estabilidade do produto (HE; DAVIS; ILLUM, 1999), características tecnológicas desejáveis para a formulação.

## **5.5. ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DAS MICROPARTÍCULAS**

As MP QS 10 e as MP QS 0 tiveram tamanho médio de 8,7  $\mu\text{m}$  e 8,9  $\mu\text{m}$  respectivamente, e a distribuição de tamanho teve alta dispersividade (Tabela 4).

Apesar do tamanho acima do esperado, todas as micropartículas se encontram em uma faixa de tamanho que pode ser avaliada para atuar nos alvéolos após inspiração pois, segundo Sung, Pulliam e Edwards (2007), por possuírem uma maior densidade de massa, devido ao seu maior diâmetro, o tamanho das partículas aumenta suas propriedades de dispersão, podendo resultar em uma maior deposição da dose administrada e podendo também evitar a fagocitose por serem muito grandes.

Pode ser observado também que a presença do extrato nas micropartículas não alterou de forma significativa as propriedades físicas das partículas, que apresentaram tamanho médio estatisticamente iguais.

## **5.6. POTENCIAL ZETA**

O potencial zeta positivo das partículas parece sofrer baixa influência da quantidade do extrato das folhas de *D. dentatus* empregado no preparo. Com a diminuição na quantidade

do extrato das folhas de *D. dentatus*, o potencial zeta diminui porém, sem significativa variação na concentração de carga superficial.

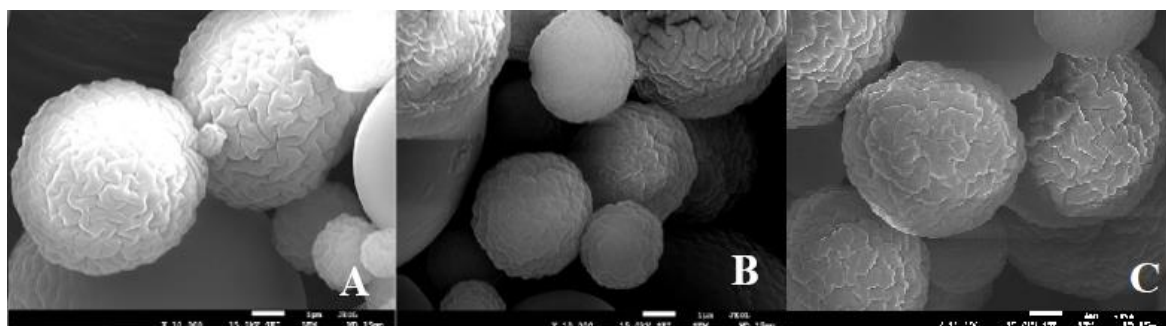
Elas apresentaram residual de carga positiva de +28,4 mV para as MP QS 10 e +27,36 mV para as MP QS 0, sendo esse um resultado importante para garantir a estabilidade física da dispersão, ou seja, evitar a aglomeração das partículas e, além disso, conferir a elas propriedades de mucoadesão. Isso ocorre devido à alta positividade dos grupamentos amino da quitosana, os quais estão em grande número em suas cadeias, e que deverão contribuir para a bioadesividade do sistema formado (HARRIS; LECUMBERRI; HERAS, 2010).

### 5.7.MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia das micropartículas foi analisada por MEV e as fotomicrografias capturadas estão apresentadas na Figura 11.

De maneira geral, as micropartículas obtidas foram esféricas e com dimensões variadas, porém superiores a 5  $\mu\text{m}$  e apresentaram uma superfície rugosa e irregular, morfologia semelhante à observada anteriormente por Gelfuso e colaboradores (GELFUSO et al., 2011) que se justifica provavelmente por a quitosana ser um polímero hidrofílico e as micropartículas assumirem tal morfologia quando a água, presente na solução de preparo, é seca no *spray drier*. Como esta morfologia não foi restrita às partículas com extrato, concluiu-se que o extrato não é um fator interferente no formato das partículas.

As rachaduras superficiais observadas em algumas fotos podem ser elementos da análise como resultado do aumento do potencial elétrico para aproximação das imagens (OLIVEIRA, 2017).



**Figura 11.** Fotomicrografias obtidas por MEV para as micropartículas de quitosana. (A) MP QS 0; (B) MP QS 5; (C) MP QS 10. Aumento de 5000 a 10000 vezes.

## 5.8. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência de encapsulação das micropartículas é uma das propriedades mais importantes na biodistribuição, liberação e eficácia terapêutica dos agentes farmacológicos carregados em sistemas particulados; portanto, sua otimização poderia melhorar o resultado terapêutico (HONARY; EBRAHIMI; HADIANAMREI, 2013).

Variáveis como o tipo de polímero, o valor do pH da solução de polímeros, a proporção polímero/extrato, bem como o tipo e tempo de procedimentos de homogeneização podem influenciar diretamente na eficiência de encapsulação das micropartículas de quitosana (FARHADIAN et al., 2018). O resultado obtido para essa análise de eficiência de encapsulação foi de  $60,26 \pm 0,97$  %, percentual considerado aceitável porém não ideal tendo em vista que Bastos et al., (2009) obteve uma eficiência de encapsulação de aproximadamente a 92,6% para micropartículas contendo ácido rosmarínico, que também é um composto fenólico.

A explicação para esse fato, segundo Martins, Lopes e Andrade, (2013), pode estar relacionada com a maior acidez dos fenóis ( $pK_a \sim 10$ ) que são espécies catiônicas (CAVAZOS-GARDUNO, A. et al., 2014). Portanto, uma das possíveis razões para a baixa eficiência de encapsulação é que, segundo Bhumkar e Pokharkar (2006), a quitosana é policatiônica em meio ácido ( $pK_a 6.5$ ) e não interage bem com a carga positiva dos fenóis.

## 5.9. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

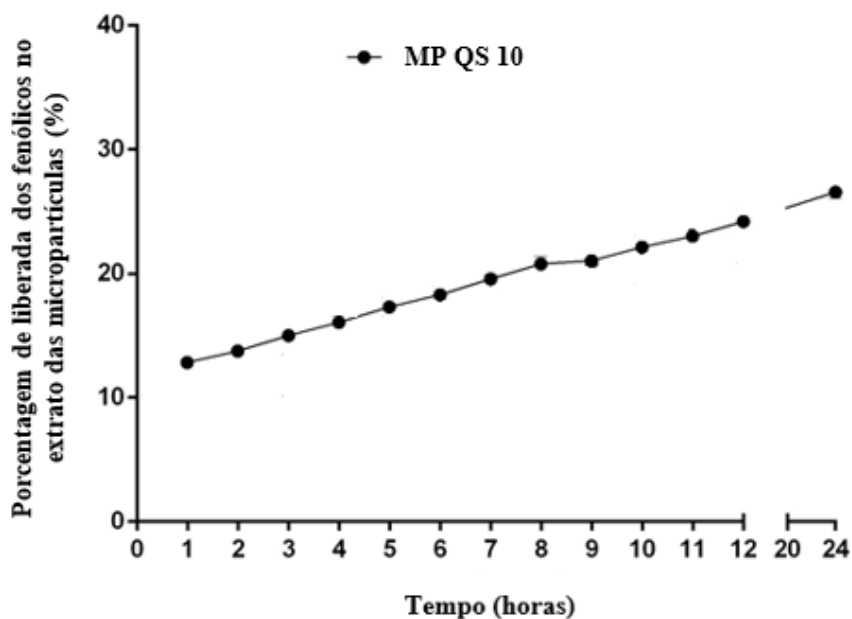
A liberação de um fármaco a partir de micropartículas de quitosana compreende o intumescimento da matriz polimérica ao entrar em contato com o meio aquoso externo, e a difusão da molécula do fármaco através da matriz da partícula (OLIVEIRA, 2017).

É possível observar que as MP QS 10 liberaram lentamente os compostos encapsulados, ou seja, em 12 horas de ensaio, praticamente 25% da quantidade de fenólicos contidos no extrato foi liberada pela formulação.

Na Figura 12 são mostrados os perfis de liberação do extrato a partir das micropartículas (MP QS 10) obtidas.

Como o extrato apresenta ação contra o bacilo da tuberculose, uma liberação lenta dos marcadores pode ser conveniente para o sistema, pois uma menor quantidade liberada para as vias aéreas inferiores resultaria em um efeito inibidor sucessivo sobre os micro-organismos causadores da infecção. A liberação sustentada do marcador a partir das

micropartículas evitaria a necessidade de se fazer múltiplas administrações do extrato, proporcionando uma maior adesão dos pacientes ao tratamento (OLIVEIRA, 2017).



**Figura 12.** Perfis de liberação *in vitro* do extrato, em tampão fosfato pH 7,4, a partir das micropartículas de quitosana com extrato encapsulado e liberação do extrato diretamente do compartimento doador.

## 6. CONCLUSÃO

O método de CLAE/UV desenvolvido forneceu uma quantificação simples do ácido betulínico, que pode ser útil para a determinação e quantificação desse marcador no extrato etanólico das folhas de *D. dentatus*. O método analítico demonstrou ser seletivo frente aos interferentes da quitosana e apresentou baixos limites de detecção e quantificação, permitindo sua utilização em ensaios cinéticos.

As micropartículas contendo o extrato etanólico das folhas de *D. dentatus* desenvolvidas com o polímero quitosana, apresentaram-se como um sistema de liberação viável com promissora aplicação para o tratamento local de infecções do trato respiratório. O potencial zeta positivo das partículas indicam seu potencial mucoadesivo, que deve possibilitar que após serem administradas as micropartículas permanecerão por um período prolongado em contato com a mucosa liberando o marcador progressivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APONTE, J.C., VAISBERG, A.J., ROJAS, R., CAVIEDES, L., LEWIS, W.H., LAMAS, G., SARASARA, C., GILMAN, R.H., HAMMOND, G.B. Isolation of cytotoxic metabolites from Target Peruvian Amazonian medicinal plants. *J. Nat. Prod.* 71, 102–105, 2008.

Bae, K.H., Lee, S.M., Lee, E.S., Lee, J.S., & Kang, J.S. (1996). Isolation and quantitative analysis of betulinic acid and alphitolic acid from *Zizyphi fructus*. *Yakhak Hoechi*, 40, 558–562.

BASTOS, F. C. C., Encapsulation of Rosmarinic acid into biopolymer-based microparticles for topical delivery, Tese de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2013

BHUMKAR, D. R.; POKHARKAR, V. B. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. *Aaps Pharmscitech*, [s.l.], v. 7, n. 2, p.138-143, jun. 2006. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS).

BIANKI FILHO, C.A., CARDOSO, C.A.L., COELHO, R.G., LANZA-JUNIOR, U., BALEN, E., KASSUYA, C. A.L. Atividade antiedematogênica e inibitória da atividade da mieloperoxidase de extrato de folhas de *Doliocarpus dentatus* em ratos. 17º Workshop de Plantas Mediciniais do Mato Grosso do Sul. 7º Empório da Agricultura Familiar, 2015.

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos - Julho, 2017.

CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciênc. Agrotec.* 25 (1), 102–123, 2001.

CAVAZOS-GARDUNO, A. et al. Operating and compositional variables for preparation of betulinic acid nanoemulsions. *Rev. Mex. Ing. Quím, México* , v. 13, n. 3, p. 689-703, 2014 .

FARHADIAN, N. et al. Chitosan/gelatin as a new nano-carrier system for calcium hydroxide delivery in endodontic applications: Development, characterization and process optimization. *Materials Science And Engineering: C*, [s.l.], v. 92, p.540-546, nov. 2018.

FDA, Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Center for Drug Evaluation and Research, 2001.

FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R. M.; SILVA, A. M. P.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das flhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. *Ver. Bras. Farmacogn.*, p. 338-343, 2005.

FULDA, S.; KROEMER, G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. *Drug discov. Today*, v.14n. 17/18, 2009.

GELFUSO, G. M. Desenvolvimento de sistemas de liberação para a administração tópica passiva e iontoforética do minoxidil no tratamento da alopecia androgênica. Tese de

Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

GELFUSO, G. M. et al. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. *Journal of Microencapsulation*, v. 28, n. 7, p. 650–658, 2011.

GERT, N. et al. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: state-of-the-art and challenges. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 499, p. 358–367, 2016.

GONZÁLEZ A. G., HERRADOR M. A., A practical guide to analytical method validations, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 227-238.

HAJATI, R. J. et al. Improved accumulation of betulin and betulinic acid in cell suspension culture of *Betula pendula* roth by abiotic and biotic elicitors. *Preparative Biochemistry And Biotechnology*, [s.l.], p.1-10, 8 out. 2018. Informa UK Limited.

HOLONEC, L. et al. Evaluation of Betulin and Betulinic Acid Content in Birch Bark from Different Forestry Areas of Western Carpathians. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj- napoca*, [s.l.], v. 40, n. 2, p.99-105, 5 nov. 2012. AcademicPres (EAP) Publishing House.

HARRIS, R.; LECUMBERRI, E.; HERAS, A. Chitosan-genipin microspheres for the controlled release of Drugs: clarithromycin, tramadol and heparin. *Marine drugs*, v. 8, n. 6, p. 1750–1762, 2010.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 187, n. 1, p. 53–65, 1999.

HONARY, S.; EBRAHIMI, P.; HADIANAMREI, R. Optimization of particle size and encapsulation efficiency of vancomycin nanoparticles by response surface methodology. *Pharmaceutical Development And Technology*, [s.l.], v. 19, n. 8, p.987-998, 23 out. 2013. Informa UK Limited.

HUSSAIN K, ISMAIL Z AND SADIKUN A. High performance thin-layer chromatography method for quantification of betulinic acid in extracts of leaves of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Asian J. Chem.*, 23(3): 977-979, 2011.

IKAWA, M.; SHAPER, T.; DOLLARD, C.; SANSER, J. Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1811 – 1815, 2003.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos de ensaio químico. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Revisão 05, 2016

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH), Guideline Q2B Revision 4, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH, Geneva, 2005.

ISHIKAWA, R.B., LEITÃO, M.M., KASSUYA, R.M., MARCORINI, F.M.F.M., CARDOSO, C.A.L., COELHO, R.G., POTT, A., GELFUSO, G.M., CRODA, J., OLIVEIRA, R.J., KASSUYA, C.A.L. Anti-inflammatory, antimycobacterial and genotoxic evaluation of *Doliocarpus*. *J. Ethnopharmacol.* 204, 18–25, 2017.

ISLAM, M. A. et al. Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: An updated review. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 6077–6093, 2012.

JAGESSAR, R.C., HOOLAS, G., MAXWELL, A.R. Phytochemical screening, isolation of betulinic acid, trigonelline and evaluation of heavy metals ion content of *Doliocarpus dentatus*. *J. Nat. Prod.* 6, 5–16, 2013.

JAGESSAR, R.C., PERSID, R. Antimicrobial activity of uncombined and combined extracts of *Doliocarpus dentatus* and *Montrichardia arborescens*. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 5 (1), 286–29., 2014.

LANÇAS, F. M. *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*. 6. ed. São Carlos: RiMa Editora, 2004.

LISTER, E., WILSON, P. Measurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity (personal communication). Lincoln, New Zealand: Crop Research Institute, 2001.

MANCA, M. L. et al. PLGA, chitosan or chitosan-coated PLGA microparticles for alveolar delivery. A comparative study of particle stability during nebulization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 62, n. 2, p. 220–231, 2008.

MARTINAC, A. et al. Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 291, n. 1-2, p. 69–77, 2005.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química Nova*, [s.l.], v. 36, n. 8, p.1248-1255, 2013.

MATOS, B. N. et al. Development and Validation of a Simple and Selective Analytical HPLC Method for the Quantification of Oxaliplatin. *Journal of Chemistry*, v. 2015, p. 1–6, 2015.

MOGHADDAM M. G, AHMAD J. B. H., SAMZADEH-KERMANI A. Biological activity of betulinic acid: a review. *Pharmacol Pharm* 2012; 3: 119–123.

MORAIS, G. G. *Otimização da terapia da tuberculose: desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em nanotecnologia*. Ribeirão Preto, 2011. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, B. H.; SANTOS, C. A. M.; ESPÍNDOLA, A. P. D. M. Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC. *Phytochemical Analysis*, [s.l.], v. 13, n. 2, p.95-98, mar. 2002. Wiley.



OLIVEIRA, P. M. et al. Microparticles prepared with 50–190 kDa chitosan as promising non-toxic carriers for pulmonary delivery of isoniazid. *Carbohydrate Polymers*, [s.l.], v. 174, p.421-431, out. 2017.

PATEL, B. B.; PATEL, J. K.; CHAKRABORTY, S. Review of patents and application of spray drying in pharmaceutical, food and flavor industry. *Recent patents on drug delivery & formulation*, v. 8, n. 1, p. 63–78, 2014.

PENIM, D. F. L. Microencapsulação de própolis em matrizes de polissacarídeos e estudos de liberação controlada. Tese de mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2015.

PHAM, D.-D.; FATTAL, E.; TSAPIS, N. Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 478, n. 2, p. 517–529, 2015.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C.B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p.771-780, 2004.

RODRIGUES, V. E. G., CARVALHO, A. D. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais no Domínio do Cerrado na Região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciênc. Agrotec.* 25, 102–123, 2001.

RODRIGUES, V.E.G. Etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na região do Alto Rio Grande. MG. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2007.

ROUSSEAU, C. G.; SCHACHTER, H. Regulatory issues concerning the safety, efficacy, and quality of herbal remedies. *Birth Defects Research B*, v.68, n. 6, p.505-10, 2003.

SARGAÇO B. R., Otimização e validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a determinação do edulcorante ciclamato. Ocorrência em adoçantes de mesa, Tese de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2013.

SAUVAIN, M., KUNESCH, N., POISSON, J., GANTIER, J.C., GAYRAL, P., DEDET, J.P., 1996. Isolation of Leishmanicidal Triterpenes and Lignans from the Amazonian Liana *Doliosarpus dentatus* (Dilleniaceae). *Phytotherap Res.* 10, 1-4.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, n. 1, p. 1–20, 2003.

SOUSA, Cleyton Marcos de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, [s.l.], v. 30, n. 2, p.351-355, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO).

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; CROUCH, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

STORPIRTIS, S. et al. Sistemas de liberação: Estratégias para medicamentos eficazes. In: *Biofarmacotécnica - Ciências Farmacêuticas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 72–95.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J.; *Mol. Cell. Biochem.* 2004, 266,

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1992

YOGEE SWARI, P.; SRIRAM. D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Curr. Med. Chem.*, v. 12, n. 6, p.657-666, 2005.

ZHAO, G.; YAN, W.; CAO, D. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, [s.l.], v. 43, n. 3, p.959-962, fev. 2007. Elsevier BV.

ŞOICA, C. M. et al. Physico-chemical comparison of betulinic acid, betulin and birch bark extract and in vitro investigation of their cytotoxic effects towards skin epidermoid carcinoma (A431), breast carcinoma (MCF7) and cervix adenocarcinoma (HeLa) cell lines. *Natural Product Research*, [s.l.], v. 26, n. 10, p.968-974, maio 2012.