

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PATRÍCIA BUBNA BISCAIA

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO PIPERINA OBTIDAS POR
SPRAY-DRYING

PONTA GROSSA

2019

PATRÍCIA BUBNA BISCAIA

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO PIPERINA OBTIDAS POR
SPRAY-DRYING**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa, associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Coorientadora: Profa. Dra. Jessica Mendes Nadal

PONTA GROSSA

2019

B621 Biscaia, Patrícia Bubna
Desenvolvimento tecnológico e caracterização de micropartículas
poliméricas contendo piperina obtidas por *spray-drying*/ Patrícia
Bubna. Biscaia. Ponta Grossa, 2019.
85 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Área de
concentração – Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à
Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa; Universidade
Estadual do Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Coorientadora: Profa. Dra. Jéssica Mendes Nadal

1. Cromatografia líquida de ultra eficiência. 2. Eudragit®.
3. Micropartículas. 4. Obesidade. 5. Pungência. 6. *Spray drying*. I.
Farago, Paulo Vitor. II. Nadal, Jéssica Mendes. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. IV. Universidade Estadual do Centro-
Oeste- Mestrado em Ciências Farmacêuticas. V. T.

CDD : 615.7

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia F. Bertholino dos Santos– CRB9/986

Ponta Grossa, 25 de fevereiro de 2019.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 04/2019 DA MESTRANDA **PATRÍCIA BUBNA BISCAIA** REALIZADA NO DIA 25 DE FEVEREIRO DE 2019, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e cinco dias de fevereiro de dois mil e dezenove, às 14h00min, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – sala 115 - Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professora Doutora Jessica Mendes Nadal reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Patrícia Bubna Biscaia na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pelas Professora Doutora Jessica Mendes Nadal(UEPG/PR), demais Doutoradas (membros titulares): Dionízia Xavier Scomparin(UEPG/PR) e Sandra Zanin (UFPR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: **“DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO PIPERINA, OBTIDAS POR SPRAY-DRYING.”**

Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se APROVADA a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): Sugere-se aprovação para doutorado no critério do Colegiado.

Alteração de título: sim ☒ não ☐

Novo título: Desenvolvimento tecnológico e caracterização de micropartículas poliméricas contendo piperina obtidas por spray-drying.

Jessica Mendes Nadal
Jessica Mendes Nadal 1 - (DEFAR - UEPG) Presidente

Dionízia X. Scomparin
Dionízia Xavier Scomparin 2 - (BIOGEN - UEPG) – Titular

Sandra Maria W. Zanin
Sandra Zanin 3 - (FARMÁCIA - UFPR) – Titular

*Dedico este trabalho a minha
mãe e meu irmão, que sempre estão ao
meu lado, me apoiando
incondicionalmente, em todas as minhas
escolhas e decisões...*

AGRADECIMENTOS

Não existem palavras suficientes para expressar a gratidão a todo apoio que tive até aqui, são muitos os que fizeram parte desta etapa, então meus sinceros agradecimentos...

A Deus, por ter me proporcionado um novo caminho a seguir, com uma nova vida, novos objetivos e novas conquistas, por ter me dado forças quando nem eu mesma acreditava mais que conseguiria...

A minha mãe Gilvanete Bubna, que fez de nossas vidas, minha e de meu irmão, a sua vida, não medindo esforços para que hoje fossemos as pessoas que somos. A ela agradeço por absolutamente tudo que sou e por tudo que tenho nesta vida. Agradeço pela forma com que nos ensinou a conquistar nossos objetivos, com honestidade e trabalho acima de tudo. Serei eternamente grata...

A meu irmão Ricardo Biscaia que me apoia e incentiva em todas minhas decisões, que está sempre ao meu lado em todos os desafios que encontro, que me ajudou em todas as dificuldades no dia a dia da pesquisa, como uma instalação de programa ou nas análises de dados, ou simplesmente me ensinado a encontrar as soluções sozinho...

A minha cunhada Isabela, que não media esforços para me ajudar com materiais para estudo, esclarecendo dúvidas relacionadas à pesquisa e sempre torcendo por mim para que conseguisse concluir com êxito o mestrado.

A meu falecido avô João Biscaia, que foi um exemplo de ser humano em sua bondade e sabedoria, que infelizmente não está presente hoje para ver meu sucesso, mas que a medida do possível sempre tentou me ajudar nos estudos.

A toda minha família, que nunca deixou de acreditar em meu potencial, em minha capacidade de lutar e conquistar meus sonhos...

Aos meus amigos que sempre torceram por mim, que entenderam muitas vezes minha ausência em momentos importantes, pois precisava estudar, escrever a dissertação ou preparar uma aula. E em especial a uma amiga que teve um papel muito importante nesta minha realização, Ana Paula Zavadzki, que não me deixou desistir deste caminho sem ter antes tentado...

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, agradeço as contribuições e discussões que foram tão importantes para minha formação profissional e científica, e principalmente a parceria e amizade nesses dois anos. Em especial agradeço a Amanda Martinez Lyra pela disponibilidade e colaboração na parte experimental do trabalho.

Aos colegas de laboratório, que com certeza se tornaram grandes amigos, dividindo alegrias e problemas, sem os quais eu não teria conseguido realizar esse trabalho, devido as dificuldades que encontrei na experimentação animal. Maiara Mikuska Cordeiro, Janaini Brunoski, Guilherme Safraider, Any Caroline de Almeida, muito obrigada por todos os dias, em especial aos domingos de manhã, que foram me ajudar no trabalho com os animais, sou eternamente grata.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa que com excelência nos transmitiram todo seu conhecimento.

Aos técnicos dos laboratórios e do biotério que nunca mediram esforços para me auxiliar em todos os experimentos para que conseguisse entregar os resultados nos prazos.

Um agradecimento especial ao meu orientador Prof. Paulo Vitor Farago, pela oportunidade que me deu no momento em que confiou em mim e me deu a carta de aceite para seleção do mestrado, dois anos atrás, pois não imagina o que esse simples gesto fez em minha vida, agradeço por todas as lições e ensinamentos, por sempre estar disponível mesmo sendo tão ocupado. Tenho extrema admiração por sua inteligência e humildade, um exemplo de pessoa a seguir.

A minha coorientadora Prof^a. Jessica Mendes Nadal e a Prof^a. Dionízia Xavier Scomparin, pela imensa capacidade de dividirem seus conhecimentos contribuindo em minha pesquisa de uma forma tão especial. Não tenho como agradecer todo aprendizado que tive com vocês duas, agradeço pela disponibilidade e interesse que tiveram, me dando todo suporte necessário, sem medir esforços. E acima de tudo agradeço pela amizade e carinho que sempre tiveram comigo nesta etapa tão especial da minha vida, sem vocês isso não seria possível.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A CAPES, pelo auxílio financeiro e FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA pela bolsa de estudos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A piperina (PIP) é um alcaloide encontrado nos frutos e raízes da pimenta, em espécies de *Piper nigrum* (Linnaeus) e *Piper longum* (Linnaeus) que tem sido amplamente utilizada devido sua atividade farmacológica, com efeitos anti-inflamatório, analgésico, anti-depressivo, citoprotetor, antileucêmico, antioxidante e capacidade de aumentar a biodisponibilidade de fármacos. Outra importante atividade da PIP é seu efeito termogênico e redutor de gordura, contudo, sua alta pungência não permite que a população a utilize em doses mais elevadas. Com objetivo de melhorar a biodisponibilidade do fármaco e a sua atividade antiobesidade, com possível redução dos efeitos colaterais, foram desenvolvidas micropartículas a partir dos polímeros Eudragit® RS30D e S100 pelo método de *spray drying*. As formulações foram preparadas em etanol:água (50:50, v/v). Foram obtidas micropartículas com adequados valores de rendimento (39,55% - 57,23%) e umidade (2,97% - 6,25%). A quantificação do fármaco foi realizada por meio do método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência, desenvolvido e validado previamente. O método mostrou-se específico, linear ($r = 0,9999$), preciso, exato e robusto, na faixa de 0,5 a 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com tempo de corrida e tempo de retenção de 2,0 e 1,5 minutos, respectivamente. As micropartículas apresentaram formato arredondado, com característica homogênea, tamanho entre 1,37 μm - 7,27 μm e teor de fármaco entre 66,36% – 90,15%. Nenhuma interação química entre a piperina e os polímeros foi observada nos espectros de infravermelho por transformada em Fourier para as micropartículas. As análises térmicas e de difração de raios X indicaram que a incorporação da PIP às micropartículas contribuiu para a amorfização do fármaco. Assim podemos concluir que as micropartículas poliméricas contendo piperina foram obtidas com êxito para a liberação modificada do fármaco, sugerindo sua utilização no tratamento da obesidade com possível redução dos efeitos colaterais.

Palavras-chave: cromatografia líquida de ultra eficiência, Eudragit®, micropartículas, obesidade, pungência, *spray drying*.

ABSTRACT

Piperine (PIP) is an alkaloid found in fruits and roots of the pepper, in the *Piper nigrum* (Linnaeus) and *Piper longum* (Linnaeus) species that has been widely used because of its pharmacological activity, with anti-inflammatory, analgesic, anti-depressant and cytoprotective effects, antileukemic, antioxidant and its ability to increase the bioavailability of drugs. Another important activity of the PIP is its thermogenic and fat reducing effect, however, its high pungency does not allow the population to use it in higher doses. In order to improve the drug bioavailability and its antiobesity activity with possible reduction of side effects, microparticles were developed from the Eudragit® RS30D and S100 polymers by the spray drying method. The formulations were prepared in ethanol:water (50:50, v/v). Microparticles were obtained with yield (39.55% - 57.23%) and humidity (2.97% - 6.25%) suitable. The drug's quantification was realized by ultra performance liquid chromatography analytical method developed and validated. The method demonstrated to be specific, linear ($r = 0.9999$), precise, accurate and robust in a range of 0.5 to 50.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, with analysis and retention time of 2.0 and 1.5 minutes, respectively. The microparticles presented a rounded shape, with homogeneous characteristics, size between 1,37 μm - 7,27 μm , with drug content between 66.36% and 90.15%. No chemical interactions was observed in the Fourier transformed infrared spectrum for microparticles. The thermal analysis and X ray diffraction indicated that the incorporation of PIP into the microparticles contributed to the amorphization of the drug. Thus we can conclude that piperine-containing polymeric microparticles were successfully obtained for the modified release of the drug, suggesting their use in the treatment of obesity with possible reduction of side effects.

Keywords: Eudragit®, ultra-performance liquid chromatography, microparticles, obesity, pungency, *spray drying*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da Piperina.....	25
Figura 2 – Diagrama esquemático do equipamento de <i>spray-dryer</i>	30
Figura 3 – Estrutura química genérica dos polímeros Eudragit® RS30D e S100	33
Figura 4 – Desenho experimental das etapas da pesquisa	39
Figura 5 – Cromatograma de UPLC correspondente ao padrão analítico de piperina na concentração de 15 µg.mL ⁻¹	48
Figura 6 – Cromatograma da micropartícula MRS_P0.....	48
Figura 7 – Cromatograma da micropartícula MRS_P10.....	49
Figura 8 – Representação gráfica da curva analítica média para a determinação da piperina obtida por UPLC ($\lambda = 262$ nm).....	49
Figura 9 – Eletromicrografias FEG-SEM da piperina pura (PIP) e dos polímeros Eudragit® RS30D (RS30D) e Eudragit® S100 (S100), aumento de 1000 X	55
Figura 10 – Eletromicrografias FEG-SEM das misturas físicas: MF PIP:RS30D (1:1, piperina: Eudragit® RS30D) e MF PIP:S100 (1:1, piperina: Eudragit® S100), aumento de 1000 X	56
Figura 11 – Eletromicrografias FEG-SEM das micropartículas preparadas a partir do polímero Eudragit® RS30D contendo ou não piperina: MRS_P0, MRS_P5, MRS_P10, MRS_P20, aumento de 5000 X.....	57
Figura 12 – Eletromicrografias FEG-SEM das micropartículas preparadas a partir do polímero Eudragit® S100 contendo ou não piperina: MS100_P0, MS100_P5, MS100_P10, MS100_P20, aumento de 5000 X.....	58
Figura 13 – Espectro FTIR da piperina pura	61
Figura 14 – Espectro FTIR do polímero Eudragit® RS30D.....	62
Figura 15 – Espectro FTIR do polímero Eudragit® S100.....	63
Figura 16 – Espectro FTIR do Eudragit® S100 (EUD S100), da piperina pura (PIP), da mistura física (MF) e das micropartículas MS100_P0, MS100_P10 e MS100_P20.	64
Figura 17 – Espectro FTIR do Eudragit® RS30D (EUD RS30D), da piperina pura (PIP), da mistura física (MF) e das micropartículas MRS_P0, MRS_P10 e MRS_P20.....	64

Figura 18 – Difratoograma da piperina pura	66
Figura 19 – Difratoograma do polímero Eudragit® RS30D	67
Figura 20 – Difratoograma do polímero Eudragit® S100.....	67
Figura 21 – Difratoograma do polímero Eudragit® RS30D (EUD RS30D), da piperina pura, da mistura física (MF) e das micropartículas MRS_P0, MRS_P10 e MRS_P20.....	68
Figura 22 – Difratoograma do polímero Eudragit® S100 (EUD S100), da piperina pura, da mistura física (MF) e das micropartículas MS100_P0, MS100_P10 e MS100_P20	69
Figura 23 – Termograma obtido por DSC para a piperina pura.....	70
Figura 24 – Termograma obtido por DSC para o polímero Eudragit® RS30D.....	71
Figura 25 – Termograma obtido por DSC para o polímero Eudragit® S100	71
Figura 26 – Termogramas obtidos por DSC do polímero Eudragit® RS30D (EUD S30D), da piperina pura, da mistura física (MF) e das micropartículas MRS_P0, MRS_P10 e MRS_P20	72
Figura 27 – Termogramas obtidos por DSC do polímero Eudragit® S100 (EUD S100), da piperina pura, da mistura física (MF) e das micropartículas MS100_P0, MS100_P10 e MS100_P20	73
Figura 28 – Curvas termogravimétricas da piperina pura, do polímero Eudragit® RS30D e da mistura física Eudragit® RS30D:piperina (MF).....	74
Figura 29 – Curvas termogravimétricas da piperina pura, do polímero Eudragit® S100 e da mistura física EUD S100:piperina (MF).....	75
Figura 30 – Curvas termogravimétricas das micropartículas MRS_P0, MRS_P5, MRS_P10 e MRS_P20	76
Figura 31 – Curvas termogravimétricas das micropartículas MS100_P0, MS100_P5, MS100_P10 e MS100_P20	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das formulações de micropartículas poliméricas contendo piperina obtidas pelo método de secagem por aspersão	40
Tabela 2 – Percentuais de rendimento e teor de umidade das micropartículas	47
Tabela 3 – Resultados obtidos por ANOVA para linearidade do método analítico.....	50
Tabela 4 – Resumo dos parâmetros da curva analítica da piperina.....	51
Tabela 5 – Dados da repetibilidade e precisão intermediária.....	52
Tabela 6 – Teor ¹ de piperina incorporada nas micropartículas (mg.g ⁻¹) e eficiência de encapsulação ² (EE, %).....	54
Tabela 7 – Tamanho de partícula obtido por espectrometria de difração a laser	60
Tabela 8 – Principais bandas de absorção encontradas no espectro FTIR da piperina	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: adenosina difosfato

AMC: Comitê de Métodos Analíticos, do inglês (*Analytical Methods Committee*)

AMP: adenosina monofosfato

AMPK: adenosina monofosfato proteínquinase ativada

ANOVA: análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP: adenosina trifosfato

AUC: área sob a curva, do inglês (*Area under the curve*)

CA: concentração experimental do analito

CDC: com dieta de cafeteria

COL: colesterol

CPT-1: carnitina palmitol transferase-1

CTA: concentração teórica do analito adicionado

DF: graus de liberdade

DP: desvio padrão

DPR: desvio padrão relativo

DRX: Difração de Raios X, do inglês (*X Ray Diffraction*)

DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial, do inglês (*Differential Scanning Calorimetry*)

EE: eficiência de encapsulação

FAS: ácido graxo sintetase

FDA: Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês (*Food and Drug Administration*)

FEG-SEM: Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo, do inglês (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy*)

FTIR: Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier, do inglês (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

HDL: lipoproteína de alta densidade, do inglês (*High Density Lipoprotein*)

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês (*High Performance Liquid Chromatography*)

ICH: conselho internacional de harmonização dos requisitos técnicos para medicamentos para uso humano, do inglês (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*)

IMC: índice de massa corpórea

KBr: brometo de potássio

LD: limites de detecção

LDL: lipoproteína de baixa densidade, do inglês (*Low Density Lipoprotein*)

LQ: limites de quantificação

MF: mistura física

MS: média dos quadrados

MS100: micropartículas preparadas a partir do polímero Eudragit[®] S100

MS100_P0: micropartícula PIP 0,0g, Eudragit[®] S100 2,0 g, etanol:água (50:50, v/v)

MS100_P5: micropartícula PIP 0,1 g, Eudragit[®] S100 1,9 g, etanol:água (50:50, v/v)

MS100_P10: micropartícula PIP 0,2 g, Eudragit[®] S100 1,8 g, etanol:água (50:50, v/v)

MS100_P20: micropartícula PIP 0,4 g, Eudragit[®] S100 1,6 g, etanol:água (50:50, v/v)

MRS: micropartículas preparadas a partir do polímero Eudragit[®] RS30D

MRS_P0: micropartícula PIP 0,0 g, Eudragit[®] RS30D 2,0 g, etanol:água (50:50, v/v)

MRS_P5: micropartícula PIP 0,1 g, Eudragit[®] RS30D 1,9 g, etanol:água (50:50, v/v)

MRS_P10: micropartícula PIP 0,2 g, Eudragit[®] RS30D 1,8 g, etanol:água (50:50, v/v)

MRS_P20: micropartícula PIP 0,4 g, Eudragit[®] RS30D 1,6g, etanol:água (50:50, v/v)

n: número de repetições

OMS: Organização Mundial de Saúde

P.F.: ponto de fusão

PGLA: poli (ácido láctico-co-glicólico)

pH: potencial hidrogeniônico

PIP: piperina

PTFE: politetrafluoretileno

r: coeficiente de correlação

r²: coeficiente de determinação

R: rendimento

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RS30D: Eudragit[®] RS30D

S: inclinação da curva

S100: Eudragit[®] S100

SDC: sem dieta de cafeteria

SF: sem fármaco

SS: soma dos quadrados

SUS: sistema único de saúde

TG: Termogravimetria, do inglês (*Thermogravimetry*)

UPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência, do inglês (*Ultra Performance Liquid Chromatography*)

UV: ultravioleta

UV-Vis: Espectroscopia ultravioleta-visível, do inglês (*Ultraviolet-visible spectroscopy*)

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade, do inglês (*Very Low Density Lipoprotein*)

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

min: minuto

®: marca registrada

g: grama

mg: miligrama (10^{-3} g)

µg: micrograma (10^{-6} g)

kg: quilograma (10^3 g)

L: litro

mL: mililitro (10^{-3} L)

µL: microlitro (10^{-6} L)

%: porcentagem

°: grau

°C: grau Celsius

cm²: centímetros (10^{-2} m) quadrados

h: hora

mm: milímetro (10^{-3} m)

µm: micrômetro (10^{-6} m)

nm: nanômetro (10^{-9} m)

mm³: milímetro cúbico

kV: quilovolt

Kgf: quilograma - força

rpm: rotações por minuto

λ: comprimento de onda

Å: ångström (10^{-10} m)

ΔH_{fusão}: variação da entalpia de fusão

J: Joule, unidade de energia

Δm: variação de massa

v/v: medida volume:volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	OBESIDADE	21
3.2	FITOATIVOS.....	23
3.3	ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DA PIPERINA.....	25
3.4	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS.....	28
3.4.1	Obtenção de nano/micropartículas pelo método de spray-drying	29
3.4.2	Polímeros e sistemas pH dependentes.....	30
3.5	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA CONTENDO A PIPERINA	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	EQUIPAMENTOS	36
4.2	REAGENTES E SOLVENTES.....	37
4.2.1	Fármaco	37
4.2.2	Polímeros	37
4.2.3	Água Purificada	37
4.2.4	Solventes e demais reagentes	37
4.2.5	Demais Materiais	38
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL	38
4.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	40
4.4.1	Obtenção das micropartículas poliméricas	40
4.4.1.1	Mistura Física	41
4.4.2	Rendimento das micropartículas	41

4.4.3	Determinação do teor de umidade.....	41
4.4.4	Desenvolvimento e validação do método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC)	42
4.4.4.1	Equipamentos e condições cromatográficas.....	42
4.4.4.2	Preparo das soluções padrão.....	42
4.4.4.3	Desenvolvimento e validação do método para quantificação da piperina.....	42
4.4.4.4	Determinação da piperina incorporada nas micropartículas.....	44
4.4.4.5	Eficiência de encapsulação	44
4.4.5	Caracterização dos Sistemas Poliméricos.....	44
4.4.5.1	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy – FEG-SEM)	44
4.4.5.2	Espectrometria de difração a laser.....	45
4.4.5.3	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> – FTIR).....	45
4.4.5.4	Difração de Raios X (<i>X Ray Diffraction</i> – DRX).....	45
4.4.5.5	Análise térmica	45
4.4.5.5.1	Calorimetria Exploratória Diferencial (Differential Scanning Calorimetry – DSC)	45
4.4.5.5.2	Termogravimetria (<i>Thermogravimetry</i> – TG)	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	46
5.1.1	Rendimento e Teor de umidade	46
5.1.2	Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação da piperina.....	47
5.1.3	Quantificação de Piperina incorporado às micropartículas.....	53
5.1.4	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG-SEM)	54

5.1.5	Espectrometria de difração a laser	59
5.1.6	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (FTIR)	60
5.1.7	Difração de Raios X (DRX).....	65
5.1.8	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	69
5.1.9	Termogravimetria (TG).....	73
6	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

A obesidade vem se tornando uma das maiores preocupações em saúde nas últimas décadas devido ao aumento de sua prevalência e severidade. A associação com doenças crônicas torna a obesidade um fator de risco para predisposição de hipertensão, diabetes e doenças cardiovasculares. Mais de 2 bilhões de adultos em todo o mundo estão acima do peso e pelo menos 600 milhões são considerados obesos clinicamente (BRAHMANAIDU et al., 2014; BALAJI et al., 2016).

A gordura do corpo é um indispensável estoque de energia durante mudanças ambientais e exposição ao frio, mas a prolongada ingestão calórica e reduzido gasto energético levam a um desequilíbrio entre energia consumida e energia gasta. O resultado é uma desordem metabólica crônica e persistente causando o aumento do tecido adiposo (SAITO; YONESHIO; MATSUSHITA, 2015).

A abordagem terapêutica no tratamento da obesidade visa mobilização, utilização e redução da absorção dos lipídeos, mas os fármacos existentes apresentam inúmeros efeitos colaterais como dores de cabeça, pressão alta, depressão, efeitos cognitivos e psiquiátricos e até efeitos letais que, conseqüentemente, tornam seu uso restrito, sendo assim, fica evidente a necessidade da busca pelo desenvolvimento de novos fármacos para redução de peso (KIM et al., 2011; BRAHMANAIDU et al., 2014; BALAJI et al., 2016).

Mesmo com os notáveis avanços na concepção dos fármacos sintéticos, é crescente a busca por alternativas de fármacos a base de produtos naturais para tratar inúmeras doenças, entre elas, a obesidade (TOMY et al., 2015). Na medicina tradicional asiática um grande número de plantas é utilizado para diminuir as taxas de gordura e os efeitos da obesidade, seus constituintes desempenham importante papel na regulação do apetite e homeostasia energética (BRAHMANAIDU et al., 2014; BALAJI et al., 2016). O tecido adiposo não é apenas ativado para liberação de energia quando é exposto ao frio, mas também por meio da exposição a vários produtos alimentares, como exemplo, a capsaicina na pimenta e as catequinas no chá verde (SAITO; YONESHIO; MATSUSHITA, 2015).

A piperina é um alcaloide cristalino, incolor e pungente, isolado da pimenta preta (*Piper nigrum*), pimenta longa (*Piper longum*) e de outras espécies da família Piperaceae. Classificada quimicamente como 1-piperilpiperidina, com a fórmula molecular $C_{17}H_{19}NO_3$. Estudos estão centrados na investigação dos efeitos farmacológicos da piperina, recentemente foram relatadas suas atividades anti-inflamatória, analgésica, antidepressiva, citoprotetora, antioxidante e anti-leucêmica. Além disso, foi constatada a capacidade da piperina de

aumentar a biodisponibilidade de alguns fármacos quando associados a ela (ASHOUR et al., 2016; WANG et al., 2017).

O tratamento com piperina tem reduzido níveis plasmáticos de colesterol total, triglicerídeos, LDL colesterol, VLDL colesterol em ratos com obesidade induzida, efeitos benéficos da piperina nas dislipidemias. A piperina é um potente ativo na prevenção da esteatose hepática induzida em animais e demonstra ser mais potente, se comparada à sibutramina, na diminuição de peso corporal e peso do fígado, provavelmente resultado do aumento dos níveis de adipocentina (CHOI et al., 2013). A piperina também pode ser utilizada para aplicações terapêuticas ou preventivas no contexto da aterosclerose uma vez que exibe benéficos efeitos cardiovasculares (WANG et al., 2017).

No entanto, alcaloides de piperidina apresentam-se como moléculas com alto grau de pungência, o que se caracteriza pelo efeito irritante, causando dor e queimação com presença de distúrbios gastrintestinais (GOVINDARAJAN; SATHYANARAYANA, 1991).

Sistemas de micropartículas e nanopartículas poliméricas estão sendo apresentados como importantes alternativas para a liberação controlada e proteção da mucosa gástrica contra a ação direta de fitofármacos (JINCHENG; SIHAO, 2010; RESTANI et al., 2010). As tecnologias de liberação modificada têm por objetivo, além da redução da toxicidade e do efeito pungente da piperina, melhorar sua solubilidade, taxas de dissolução e biodisponibilidade após uso oral em relação às formas farmacêuticas convencionais (SHAO et al., 2015). Dentre os principais materiais utilizados para o desenvolvimento das formas farmacêuticas de liberação modificada se encontram os lipossomas, as micropartículas e a nanopartículas (MAINARDES, 2007).

Frente ao exposto, fica evidente a necessidade de estudos adicionais em relação à liberação modificada da piperina com o objetivo de melhorar seu efeito terapêutico para ser utilizada no tratamento e prevenção da obesidade, já que até o presente momento não existem estudos sistemáticos relacionados. Em paralelo a isso, possivelmente reduzir sua pungência por uso oral com a utilização de micropartículas poliméricas, aumentando a adesão do tratamento pelos pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar sistemas poliméricos para a liberação modificada da piperina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar as micropartículas poliméricas contendo a piperina por *spray-drying*, empregando polímeros metacrílicos;
- Desenvolver e validar o método analítico de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) para avaliar a eficiência de encapsulação do fármaco;
- Determinar quantitativamente a piperina incorporada nos sistemas poliméricos pelo método de UPLC, previamente desenvolvido e validado;
- Determinar o tamanho das micropartículas;
- Caracterizar os sistemas poliméricos por meio de análises morfológicas, espectroscópicas e térmicas;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 OBESIDADE

A obesidade é uma desordem metabólica nutricional, desencadeada por falta de balanceamento energético, que tem por consequência acúmulo de gordura e aumento de tecido adiposo (KIM et al., 2011; BRAHMANAIDU et al., 2014). Novas terminologias relacionadas a desordens nutricionais têm sido definidas, assim estados de sobre peso e obesidade foram definidos como excessivo ou anormal acúmulo de gordura que pode prejudicar a saúde. Os principais fatores que parecem conduzir a obesidade são excesso de alimentação, estilo de vida sedentário ou baixa intensidade de atividade física associados a problemas do sono (BISCHOFF et al., 2017).

A obesidade não é uma doença singular e sim um grupo de condições que refletem no fenótipo obeso, comprometendo a saúde do indivíduo, acarretando alterações metabólicas, dificuldades respiratórias e do aparelho locomotor, além de constituir fator de risco para diversas enfermidades como dislipidemias, doenças cardiovasculares e diabetes. Apresenta etiologia multifatorial, envolvendo aspectos biológicos, ambientais, históricos, socioeconômicos, políticos, psicossociais e culturais. (PEREIRA et al., 2003; WANDERLEI; FERREIRA, 2010).

A OMS (Organização Mundial de Saúde) considerou que, o índice de massa corpórea $IMC \geq 25.0$ indica sobre peso e $IMC > 30.0$ indica obesidade, esse índice de massa corpórea pode ser calculado pela divisão do peso, pela altura ao quadrado. Mais de 1,9 bilhões de adultos no mundo estão acima do peso, pelo menos 600 milhões já são clinicamente classificados obesos e perto de 42 milhões de crianças abaixo de cinco anos estão sofrendo com a obesidade, assim a OMS reconheceu a obesidade como sendo o maior problema de saúde crônico em adultos nos últimos tempos. Embora a OMS recomende usar estes índices para todos os países, esta relação entre IMC e saúde pode variar entre diferentes populações, etnias e sexo (AMMAR et al., 2017; BISCHOFF et al., 2017).

Estudos sobre a obesidade e todos os aspectos relacionados ao seu tratamento vêm se tornando mais necessários. Assim, para avaliar novos produtos potenciais com a finalidade de tratar a obesidade, primeiramente deve-se discutir e compreender alguns fatores relacionados à etiologia da doença e o metabolismo na obesidade.

O corpo produz energia na forma de ATP (adenosina trifosfato) pela oxidação de carboidratos, gorduras e proteínas e destina energia para os processos celulares quebrando

esse ATP em ADP (adenosina difosfato) e AMP (adenosina monofosfato). Como primeiro passo do catabolismo lipídico ocorre o estoque de gordura no corpo em forma de triacilgliceróis, que são transformados em ácidos graxos livres e glicerol pelas lipases. A oxidação de ácidos graxos consiste em várias etapas de reações que ocorrem nas mitocôndrias, em condições normais, esta oxidação é maior fonte de energia quando comparada a quantidade equivalente de glicose metabolizada. As duas maiores fontes de energia no corpo humano são os carboidratos e os ácidos graxos (RUPASINGHE et al., 2016).

A primeira etapa da oxidação dos ácidos graxos requer a presença de acyl-CoA e tem o transporte para o interior da mitocôndria facilitado pelo CPT-1 (carnitina palmitol transferase-1). O Malonyl-CoA, um precursor na síntese dos ácidos graxos, é um inibidor competitivo de CPT-1, assim quando os níveis de energia estão altos ele previne a oxidação lipídica, enquanto que, quando os níveis de energia estão baixos, os níveis de malonyl e acetyl CoA caem e consequentemente a beta oxidação é induzida pela ativação do CPT-1. Então as enzimas CPT-1 e FAS (ácido graxo sintetase) são responsáveis diretamente pela regulação do catabolismo e anabolismo dos ácidos graxos. A redução da oxidação dos ácidos graxos é considerada fator de risco para o desenvolvimento da obesidade e estudos indicam que em indivíduos obesos a atividade da CPT-1 é reduzida, o que prejudica o fluxo dos ácidos graxos para a mitocôndria, reduzindo assim, a beta oxidação, sugerindo que os ácidos graxos não são oxidados mesmo após a lipólise, se o CPT-1 não estiver ativado (RUPASINGHE et al., 2016).

Várias hipóteses e teorias foram propostas para explicar a homeostase energética e regulação do ponto de ajuste fisiológico do peso corporal, tais como a sinalização de aminoácidos, controles lipostáticos/glicostáticos para alimentação e saciedade, abordagens metabólicas, participação do sistema neuroendócrino e do eixo intestino – cérebro, mediação de sinais que ligam cérebro a tecido adiposo, microbiota intestinal, hormônios, mediadores de adipócitos e modificadores de comportamento. Tantos pontos de regulação favorecem a investigação de novas moléculas e ações diretas sobre a equação do equilíbrio energético (ingestão de alimentos e termogênese) (SOLAS et al., 2016).

Possíveis mecanismos para diminuição de peso são o controle do apetite e da saciedade os quais são gerenciados pela serotonina, histamina, dopamina e seus receptores; estimulação de gasto de energia induzindo a termogênese; inibição do aumento e diferenciação dos adipócitos; estimulação da hidrólise do triacilglicerol e liberação de ácidos graxos; aumento de AMPK (adenosina monofosfato proteínquinase ativada), que regula o

transporte de glicose e a oxidação de ácidos graxos, estimulando a produção de CPT-1 consequentemente aumentando a oxidação lipídica; diminuição da absorção de gordura; e intervenção em enzimas que regulam a liberação de insulina e o metabolismo lipídico. (RUPASINGHE et al., 2016)

3.2 FITOATIVOS

Os fitoativos representam uma enorme fonte para tratar inúmeras doenças, entre estas a obesidade. Na medicina tradicional Asiática as plantas têm sido cotadas e utilizadas para diminuir as taxas de gordura e os efeitos da obesidade. Esses fitoconstituintes atraem cada vez mais a atenção para nova ênfase no desenvolvimento necessário de novos fármacos antiobesidade e de acordo com a OMS, é contínua a exploração e procura por plantas medicinais com satisfatório e eficiente controle de peso. Estudos tem claramente estabelecido que as plantas e seus constituintes desempenhem um importante papel na regulação do apetite e homeostasia energética (BRAHMANAIDU et al., 2014; BALAJI et al., 2016).

O tecido adiposo não é apenas recrutado para liberação de energia quando é exposto ao frio, mas também por ativação de vários ingredientes alimentares, como por exemplo, a capsaicina na pimenta e as catequinas do chá verde, os quais seriam facilmente utilizados na alimentação diária das pessoas para prevenção da obesidade. É crescente a atenção na eficácia com terapias utilizando especiarias, entre elas a pimenta, pois sua ingestão parece estar ligada ao tratamento de certas doenças crônicas como relatado em várias pesquisas (BRAHMANAIDU et al., 2014; SAITO; YONESHIO; MATSUSHITA, 2015).

Para Williams et al. (2013), os mecanismos de tratamento da obesidade pelos fitoquímicos parecem envolver muitas mediações e sinalizações celulares, como a redução do tecido adiposo por inibição da proliferação das células precursoras, aumento das taxas de apoptose durante o ciclo de vida dos adipócitos e inibição da absorção dos triglicerídeos via redução da formação da lipase pancreática. Como vias complexas e interconectadas de sinalização celular estão relacionadas ao desenvolvimento e manutenção da obesidade, uma combinação de múltiplos fitoquímicos poderia resultar em efeitos sinérgicos no tratamento e prevenção da doença. Estudos sugerem que, o consumo de baixos níveis de fitoquímicos, mas em combinações específicas, poderiam alcançar bons resultados (GONZALEZ-CASTEJON; RODRIGUEZ-CASADO, 2011).

Investigações científicas usando culturas de células e modelos animais têm demonstrado que polifenóis derivados de vegetais podem induzir a lipólise, diminuir a

acumulação de gordura e induzir a apoptose em tecido adiposo, sendo estes mecanismos indicadores potenciais das propriedades antiobesidade (WILLIAMS et al., 2013).

Mopuri & Islam (2017), concluíram em seu trabalho que embora diferentes abordagens terapêuticas sejam relatadas com diferentes fármacos para reduzir a obesidade, o alto custo e severos efeitos adversos como aumento da pressão sanguínea, dores de cabeça, boca seca, constipação, fezes oleosas e insônia fazem com que esses medicamentos sejam pouco populares para uso prolongado, então com a finalidade de desenvolver alternativas de tratamento mais seguras para reduzir a obesidade, tem sido avaliado um grande número de produtos naturais de plantas medicinais. Potencial atividade das frações e extratos de *Garcinia Camboja* (Desrousseaux), *Nelumbo nucifera* (Gaertner), *Grape seeds* (Linnaeus), *Curcuma longa* (Linnaeus), *Emblica officinalis* (Gaertner), *Salacia oblonga* (Wallich) mostraram excelente efeito antiobesidade, particularmente *in vitro* na inibição da lipase, supressão de apetite, inibição da diferenciação dos adipócitos e adipogênese, regulação do metabolismo lipídico e ativação termogênica.

Embora uma grande variedade de estudos em compostos puros e isolados tenha sido realizada *in vivo* e *in vitro* visando diferentes caminhos de sinalização celular, existe a necessidade de um envolvimento entre pesquisadores, órgãos governamentais e indústrias farmacêuticas para examinar os efeitos antiobesidade em ensaios clínicos desses produtos para conseguir superar a epidemia de obesidade com alternativas seguras de medicamentos naturais (MOPURI; ISLAM, 2017).

As síndromes metabólicas como obesidade e diabetes são prioridades médicas no mundo que requerem estratégias melhores de prevenção e tratamento. Em adição ao tratamento farmacológico para pacientes com síndromes metabólicas, o uso de fitoquímicos na prevenção e tratamento de indivíduos com parâmetros limítrofes pode ser útil para evitar a doença e os efeitos colaterais na ingestão de fármacos. Mas apesar de existirem muitos trabalhos sobre compostos naturais, apenas alguns descrevem o uso de fitoativos nas síndromes metabólicas e os que descrevem frequentemente apresentam curta duração experimental ou metodologia de baixa qualidade, então é necessário um ensaio clínico com melhor padronização, com maiores e mais heterogêneas amostras de pessoas com síndromes metabólicas e uma avaliação dos mecanismos dos fitofármacos em relação a suas taxas riscos/benefícios para confirmar sua segurança e eficácia a médio e longo prazo (CICERO; COLLETTI, 2016).

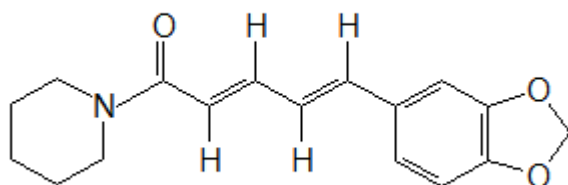
Para Balaji et al. (2015), uma grande variedade de fitoquímicos como alcaloides, taninos, saponinas, terpenos, esteroides e proteínas e fitoconstituintes como a capsaicina,

efedrina, cafeína e piperina têm sido fator chave para o tratamento de graves doenças. O potencial das plantas e seus derivados para o tratamento da obesidade ainda é extensamente inexplorado e podem ser uma excelente alternativa, sendo a natureza fonte importante para um futuro promissor em prol de nosso bem estar.

3.3 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DA PIPERINA

A piperina é um alcaloide encontrado nos frutos e raízes das espécies de *Piper nigrum* (Linnaeus) e *Piper longum* (Linnaeus), da família Piperaceae. Esse alcaloide foi isolado de ambos os grãos da pimenta, pretos e brancos. A piperina apresenta característica cristalina branca, fórmula molecular $C_{17}H_{19}NO_3$ e se funde a 135 °C (ASHOUR et al., 2016), sendo quase insolúvel ou ligeiramente solúvel em água (40 mg/L, 18 °C). É uma base muito fraca, forma sal apenas com minerais ácidos que se dissociam em água (VASAVIRAMA; UPENDER, 2014).

Figura 1 – Estrutura química da Piperina



Fonte: A autora (2018)

Em escala industrial, a pimenta é triturada em flocos ou moída em pó grosseiro e depois a extração é realizada com solventes orgânicos como acetona, etanol ou hidrocarbonetos clorados. O rendimento da extração de piperina na *Piper nigrum* é maior quando comparada a extração na *Piper longum*. As frutas e raízes da *Piper nigrum* e *Piper longum* contém uma série de constituintes, incluindo óleos voláteis, alcalóides, isobutilamidas, lignanas e esteres, entre estes, a piperina é o constituinte primário e mais importante, por conferir valor medicinal a essas especiarias (VASAVIRAMA; UPENDER, 2014).

A *Piper nigrum* da família Piperaceae, é uma espécie nativa da Índia e Sri Lanka sendo amplamente cultivada em áreas tropicais na China, Índia, Indonésia e Filipinas. Existe um grande número de espécies dentro do gênero *Piper*, entre eles, *P. auritum*, *P. jacquemontianum*, *P. glabrescens*, *P. hispidum*, *P. longum*, *P. marginatum* e *P. retrofractum*. A *Piper nigrum* é conhecida popularmente como pimenta preta, quando no estágio madura ou pimenta branca, quando ainda não madura (BARCELOUX, 2009).

A piperina tem sido amplamente utilizada na medicina popular em muitos países Asiáticos e vários estudos tem focado na investigação de seus efeitos farmacológicos. Tradicionalmente vem sendo utilizada contra cólera, dispepsia, doenças gástricas e diarreia, expectorante, antiflatulento, antifúngico e contra epilepsia e dores de cabeça (KIM et al., 2011; BRAHMANAIDU et al., 2014; SHAO et al., 2015). Recentemente foram relatados seus efeitos anti-inflamatório, analgésico, anti-depressivo, citoprotetor, antileucêmico e antioxidante. Além disso, a piperina vem demonstrando melhora significativa na neurodegeneração em modelos animais na doença de Alzheimer (ASHOUR et al., 2016).

Para Shao et al. (2015), outra importante atividade da piperina é sua capacidade de aumentar a biodisponibilidade de fármacos, agindo como inibidor de enzimas metabolizadoras de fármacos. Ashour et al. (2016), relatou que 20 mg de piperina oral pode aumentar a biodisponibilidade de fenitoína e carbamazepina, aumentando sua concentração no plasma. Arcaro et al. (2014), comprovou em seu trabalho que a piperina inibiu o processo de biotransformação da curcumina, aumentando assim a biodisponibilidade deste fármaco em modelos animais em teste para tratamento da diabetes.

Além das diversas atividades biológicas já relatadas, a piperina também vem sendo avaliada em processos de obesidade induzida, onde vários fatores podem ser analisados. O tratamento com piperina tem reduzido os níveis plasmáticos de colesterol total, triglicerídeos, colesterol LDL e VLDL, melhorando os quadros de dislipidemias e reduzindo o peso corporal dos ratos com obesidade induzida. A redução de estresse oxidativo, com diminuição de lipoperoxidação e restauração das atividades de enzimas antioxidantes e glutathione também se encontram entre os efeitos benéficos da piperina (CHOI et al., 2013).

Brahmanaidu et al. (2014), em seu trabalho encontrou decréscimo nas taxas de gordura de maneira dose dependente ao tratamento dos animais com a piperina, sendo a máxima atividade atenuante no processo da obesidade obtida com dose de 40 mg/Kg, o que comprova sua ação antiobesidade. O tratamento oral com piperina reduziu também o IMC, o que ele afirma ser devido à natureza antioxidante da piperina que está envolvida no humor, no sono e regulação do apetite. Observou também um decréscimo plasmático de leptina que é a

chave reguladora de apetite, podendo ser a redução do acúmulo de lipídeos nos adipócitos devida à suplementação com piperina nos ratos com obesidade induzida. Essas observações sugerem fortemente que a piperina é um agente terapêutico eficaz no controle da obesidade.

Como resultado, Choi et al. (2013), observou decréscimo significativo de aproximadamente 20% no peso corporal dos ratos, para dose de 50 mg/Kg de piperina, efeito quantitativamente similar ao observado com sibutramina. Em relação ao peso do fígado o decréscimo com a administração oral da piperina 50 mg/Kg também foi significativo. Os resultados obtidos dos níveis de colesterol, ácidos graxos livres e triglicerídeos no tecido hepático com a administração de piperina 25 e 50mg/kg, quando comparado aos níveis de ratos controle não tratados, tiveram decréscimo importante, sendo que com 50 mg/Kg de piperina os resultados se apresentaram melhores, ou seja, a redução dos níveis foram maiores que com 25mg/kg.

O principal efeito da piperina parece ser atenuar o ganho de gordura, não por mudanças na quantidade de alimento consumido, mas sim por afetar a quantidade de gordura armazenada aumentando a quantidade metabolizada. A piperina foi aprovada pelo FDA para consumo humano, mas em doses muito abaixo das utilizadas em roedores em experimentos para perda de peso. Ela foi aprovada, não para o controle de peso, mas para aumentar a biodisponibilidade de outros fármacos. Os mecanismos com que a piperina promove a diminuição de peso e dos efeitos da diabete não estão claros, muitos alvos já foram identificados, mas ainda não foi demonstrado como ela atua em cada alvo. O estudo mostra um aumento da termogênese no músculo em repouso pela perturbação dos estados da miosina proporcionando assim um dos mecanismos (NOGARA et al., 2016).

O efeito termogênico e redutor de gordura de alguns fitoativos como a piperina e capsaicina foram comprovados em estudos, mas sua alta pungência não permite que a população a consuma em doses elevadas (SAITO et al., 2015). A pungência da piperina é causada pela ativação dos receptores de calor e acidez, das células nervosas sensíveis à dor (VASAVIRAMA; UPENDER, 2014).

No trabalho de Barceloux (2009), o autor sugere que a ingestão de pimenta preta ou vermelha aumenta a secreção parietal e de pepsina, causa diminuição de potássio e irritação gástrica, podendo ocorrer hemorragias gástricas, embora haja variações de sintomas entre os indivíduos.

Frente ao exposto, observando todos os efeitos benéficos da piperina e principalmente sua atividade antiobesidade, fica evidente a importância da continuidade da pesquisa em

relação a seus mecanismos e procura por uma melhor forma de liberação do fármaco, já que existem reações adversas que impedem sua utilização em doses ideais de tratamento.

3.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

De acordo com trabalhos citados, a piperina apresenta inúmeras propriedades farmacológicas, entre elas o controle da obesidade. Mas o uso prolongado da piperina pode causar irritações gástricas, sendo seu uso limitado devido sua pungência. Assim com a finalidade de minimizar esses efeitos e controlar a liberação de fármacos, muitos artigos têm demonstrado novos sistemas de liberação com polímeros.

O interesse crescente em desenvolver novos sistemas de liberação de fármacos é devido ao fato de que aproximadamente 40% das substâncias ativas utilizadas na indústria farmacêutica são pouco solúveis em água. Muitas estratégias têm sido empregadas para formular nanopartículas, como o preparo de nanoemulsões, nanosuspensões, lipossomos, micelas e nanopartículas inorgânicas (SCHAFROTH et al., 2012).

As nanopartículas são definidas como estruturas nanométricas compostas por polímeros biodegradáveis, que podem ser divididas em nanocápsulas e nanoesferas. As nanocápsulas apresentam um núcleo oleoso ou aquoso envolto por um invólucro polimérico, onde o fármaco pode estar dissolvido nesse núcleo ou aderido à partícula na parede polimérica. As nanoesferas não apresentam núcleo definido, são destituídas de óleo em sua composição, formando uma matriz polimérica na qual o fármaco encontra-se homogeneamente disperso (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

A técnica de microencapsulação é o processo onde o fármaco é encapsulado por matriz polimérica biocompatível e/ou biodegradável que geralmente produz partículas com diâmetros entre 1 a 1000 μm , tendo inúmeras aplicações farmacêuticas como preparação de medicamentos com liberação prolongada ou comprimidos com ativos incompatíveis, utilizada também em novos conceitos de formulações para cremes, aerossóis, emplastros, curativos cirúrgicos e injetáveis (MITHU et al., 2017).

As micropartículas representam um sistema simples, mas eficaz de liberação de fármacos. Muitos fármacos hidrofóbicos podem ser encapsulados por técnicas de evaporação de solvente, contudo a taxa de remoção do solvente afeta fortemente as características das micropartículas formadas, dependendo da temperatura, pressão, características de solubilidade do polímero e do solvente (SHAHANI; PANYAM, 2011).

3.4.1 Obtenção de nano/micropartículas pelo método de *spray-drying*

O maior desafio da indústria farmacêutica é aumentar a solubilidade e a permeabilidade de fármacos e assim melhorar sua biodisponibilidade. Várias técnicas têm sido utilizadas para melhorar a hidrossolubilidade de fármacos e seus perfis de liberação, e as dispersões sólidas são consideradas as técnicas que apresentam melhores resultados. Existem dois métodos de preparar as dispersões sólidas, os métodos de fusão, como o de extrusão por fusão a quente e métodos de evaporação de solvente, como o método por *spray-drying* (ASHOUR et al., 2016).

A produção de nano e micropartículas obtidas pelo método de *spray-drying* tem sido introduzida nos processos da indústria farmacêutica devido a sua grande aplicabilidade e facilidade de produção em larga escala cumprindo as exigências requeridas (SCHAFROTH et al., 2012).

A secagem por pulverização é utilizada em muitos ramos relevantes, como o da indústria farmacêutica, com o objetivo de estabilizar materiais sensíveis como as proteínas, ou gerar pós com propriedades específicas de liberação controlada de fármaco encapsulado, tendo como principais vantagens a alta flexibilidade para manipular o tamanho e a morfologia da partícula do produto gerado, mantendo sua natureza e estabilidade (BECK-BROICHSITTER; STREHLOW; KISSEL, 2015).

O método de *spray-drying* é, em termos gerais, a transformação do produto de alimentação (solução, suspensão ou emulsão) em estado fluido a partículas secas, por meio de pulverização dos produtos de alimentação em meio de secagem a quente (MITHU et al., 2017). O processo é composto por três estágios, a atomização de um líquido alimentando o spray, a mistura no spray das gotículas de alimentação com a corrente de gás aquecida para evaporar o solvente e a separação e coleta do pó seco da corrente de gás (LIU; CHEN; SELOMULYA, 2015).

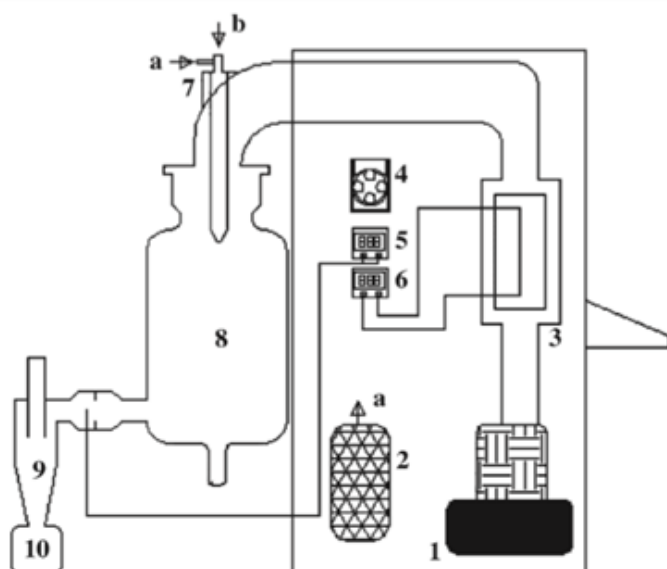
O método de *spray-drying* foi implementado com sucesso na microencapsulação de isoniasida, o que comprovou ser uma abordagem promissora no desenvolvimento de formas de liberação controlada de medicamentos (MITHU et al., 2017). Técnicas também utilizadas comumente para preparar formulações de micropartículas nanoencorporadas incluem a secagem por pulverização e secagem por congelamento, que removem o líquido a partir das suspensões coloidais para formar o pó seco de micropartículas (WANG et al., 2017).

A microencapsulação pelo *spray-drying* é largamente utilizada na indústria alimentícia devido ao baixo custo do processo, eficácia na proteção dos materiais, alta estabilidade no

produto final e produção em massa, embora o objetivo principal dessa técnica seja proteger o princípio ativo no interior do material ela também pode melhorar sabor, aroma, estabilidade, valor nutricional e aparência do produto microencapsulado (PORRAS-SAAVEDRA et al., 2015).

Rattes; Oliveira (2007) avaliou os efeitos das condições do *spray dryer* (Figura 2) e da composição dos microencapsulados nas propriedades físicas e de liberação de micropartículas de diclofenaco de sódio, utilizando Eudragit® RS 30D e Surelease®, e com os resultados do trabalho confirmou a viabilidade do *spray drying* para preparação de sistemas de micropartículas e que as propriedades físicas e químicas destas micropartículas mostram dependência dos parâmetros utilizados no spray e da composição do microencapsulado.

Figura 2 – Diagrama esquemático do equipamento de *spray-dryer*



Fonte: Adaptado de Rattes; Oliveira (2007).

Nota: Descrição - (1) ventilador + filtro de ar; (2) compressor de ar; (3) aquecedor; (4) bomba peristáltica; (5) controle de temperatura; (6) entrada do termopar; (7) atomizador: (a) ar comprimido; (b) alimentação do microencapsulador; (8) câmara de secagem; (9) ciclone; (10) coletor de produto seco.

3.4.2 Polímeros e sistemas pH dependentes

Polímeros são macromoléculas, naturais ou sintéticas, caracterizadas por seu tamanho, estrutura química e interações intramoleculares e intermoleculares, possuindo unidades químicas ligadas por covalências, repetidas regularmente ao longo da cadeia, denominadas meros (MANO; MENDES, 2004).

Os excipientes poliméricos constituem um grande e vasto grupo de substâncias, incluindo compostos macromoleculares de origem natural (gelatina, quitosana, celulose), polímeros semissintéticos (derivados da celulose, polietilenoglicóis, poliamidas) e produtos de fermentação (goma xantana). Esses polímeros são empregados em inúmeras formas medicamentosas através de muitas vias de administração (oral, parenteral, inalatória, etc.) (KAROLEWICZ, 2016).

Os polímeros, além de suas funções básicas, podem ter propriedades adicionais, como sensibilidade a estímulos, muco adesão, inibição de enzimas, aprimoramento da capacidade de penetração de epitélio intestinal, propriedades absorptivas, habilidade de mascarar sabores, atividades farmacológicas, inibição de bomba de efluxo, aumento de capacidade tampão e capacidade de interação ou conjugação com enzimas responsáveis pelo metabolismo de fármacos, sendo todas características muito importantes no emprego da tecnologia farmacêutica, em sistemas inteligentes de liberação de drogas (KAROLEWICZ, 2016).

Os polímeros Eudragit[®] são copolímeros derivados de ésteres do ácido acrílico e metacrílico, com propriedades físico-químicas determinadas por grupos funcionais. São disponíveis em diferentes formas físicas como, dispersão aquosa, grânulos de solução orgânica e pós. É feita uma distinção básica entre dois tipos de Eudragit[®], os solúveis em fluidos digestivos pela formação de sal com grupos ácidos ou alcalinos que permitem a liberação do ativo pela ação do pH do meio e os insolúveis, mas permeáveis em fluidos digestivos, como polímeros alcalinos e neutros que permitem a liberação do ativo por inchamento por liberação controlada por tempo (INFORME TÉCNICO, 2018).

Entre os tipos de polímeros citados estão o Eudragit[®] S100, que se enquadra nos polímeros com características de sensibilidade a estímulos, neste caso aos estímulos de pH, ou seja pH dependentes e o Eudragit[®] RS30D que é um dos polímeros de liberação controlada por tempo, independente de pH, cuja estrutura química genérica de ambos pode ser observada na Figura 3.

O Eudragit[®] S100 é uma substância sólida na forma de pó branco com um odor característico fraco, têm peso molecular, valor ácido e temperatura de transição vítrea de aproximadamente 125.000 g/mol, 190 mg KOH/g de polímero e > 150° C, respectivamente. O Eudragit[®] S100 está disponível na forma de pó, se dissolve em pH 7,0 e é usado para a liberação de drogas direcionadas ao cólon (PATRA et al., 2017).

O Eudragit[®] S100 é um copolímero aniônico, baseado em ácido metacrílico e metacrilato de metila, insolúvel em meio ácido, mas solúvel em meio intestinal pH 7, solubilidade pH dependente, promovendo gastroresistência e propriedades de liberação

controlada às formulações, o que poderia beneficiar pacientes em tratamentos com fármacos associados a complicações gastrointestinais. Assim, a mistura dos polímeros Eudragit[®] S100 e Pullulan (um promissor biopolímero) contendo risedronato pode ser uma estratégia eficaz para reduzir a possibilidade de alta concentração local de fármaco na mucosa gastrointestinal e prolongar o tempo de sua liberação (DE ARCE VELASQUEZ et al., 2014).

A dispersão sólida é uma das tarefas cruciais ao projetar novas formulações com polímeros e o conhecimento da composição do fármaco e polímero fornecem informações úteis sobre a seleção de espécies de polímeros apropriadas e como adapta-los de acordo com as propriedades de cada fármaco. Os estados moleculares de droga e de polímero em dispersões sólidas mudam dependendo da proporção da composição, tempo e condições de armazenamento e a taxa de dissolução das dispersões sólidas amorfas é significativamente influenciada pelos estados moleculares. Um polímero aniônico, o Eudragit[®] S100, que é composto de ácido metacrílico e unidades de monômeros metacrilato de metila, foi utilizado como transportador de dispersão sólida de glibenclamida e obteve como resultado, uma dispersão sólida amorfa com concentrações de 5 a 75% de droga (HIGASHI et al., 2015).

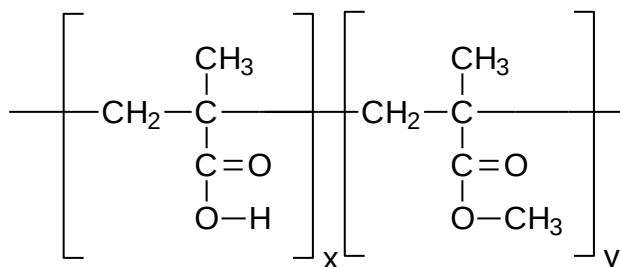
No trabalho de Cruz et al. (2010), uma nova formulação de alendronato de sódio usando uma mistura de polímeros composta por Eudragit[®] S100 e Methocel[®] K15M, onde o Eudragit[®] S100 foi escolhido, devido sua característica pH dependente, com a finalidade de proteger a porção mucosa superior do trato gastrointestinal dos efeitos irritantes do fármaco e o Methocel[®] K15M para garantir uma liberação controlada.

O Eudragit[®] RS30D é um copolímero de etil acrilato, metil metacrilato e um baixo teor de éster de ácido metacrílico com grupos de amônio quaternário. Os grupos amônio estão presentes como sais, a presença de sais torna-os mais permeáveis. O Eudragit[®] RS30D é um líquido de baixa viscosidade com uma cor branca leitosa que mostra um odor característico fraco. Com peso molecular acima são 32.000 g / mol, disponível na forma de 30% de dispersão aquosa, esse polímero de Eudragit[®] é insolúvel, exibe baixa permeabilidade com pH inchaço independente, é usado para perfil de liberação modificada e personalizado e também em associações de polímeros em diferentes proporções (PATRA et al., 2017).

Dispersões aquosas de diclofenaco de sódio com Eudragit[®] RS30D e Surelease[®], foram avaliadas. O diclofenaco de sódio é um anti-inflamatório não esteroideamente utilizado em tratamentos de longo prazo em doenças reumáticas, contudo, muitos efeitos adversos associados a esses tratamentos como úlceras gástricas, queimação abdominal, dores, cólicas, náuseas, toxicidade do fígado, podem ocorrer. Assim, a eficácia terapêutica foi maximizada e os efeitos indesejados do diclofenaco de sódio minimizados, devido às

propriedades biofarmacêuticas de liberação controlada dos polímeros, sendo que, o Eudragit[®] RS30D também melhora a biodisponibilidade de fármacos (RATTES; OLIVEIRA, 2007).

Figura 3 – Estrutura química genérica dos polímeros Eudragit[®] RS30D e S100



Fonte: A autora (2018)

Nota: Onde x representa os grupos carboxílicos livres e y, os esterificados.

3.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA CONTENDO A PIPERINA

A piperina não tem sido amplamente utilizada na clínica pelo fato de apresentar baixa solubilidade, baixas taxas de dissolução e biodisponibilidade. Por esse motivo Shao et al. (2015) desenvolveram e avaliaram em sua pesquisa um sistema de auto emulsificação de medicamentos contendo a piperina, obtendo sucesso nos resultados, sendo que a biodisponibilidade relativa da formulação após administração oral foi de 625,7% em comparação às cápsulas auto preparadas, sugerindo que a metodologia do preparo da formulação é um sistema potencial para a administração oral de fármacos pouco solúveis em água como a piperina.

Pentak (2016), em seu trabalho realiza uma medição detalhada da localização das moléculas de piperina nas membranas lipídicas dos lipossomas e também investiga as propriedades físicas e químicas dos lipossomos contendo piperina, avaliando a estabilidade e eficácia antioxidante do fármaco retido. Os resultados mostraram que os lipossomos contendo piperina tinham boa estabilidade e elevada eficácia de aprisionamento. As moléculas de piperina estavam ancoradas a uma bicamada fosfolipídica e que com o aumento da temperatura se movem em direção à área hidrofílica da membrana, resultados comprovados por análise de RMN e FTIR. O estudo UV-Vis indica que a encapsulação de lipossomos pode retardar significativamente a velocidade de degradação da piperina.

Ashour et al. (2016), em seu trabalho com o objetivo de aumentar a solubilidade e permeabilidade da piperina, a fim de melhorar sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica,

utilizou três veículos poliméricos para formação de dispersões sólidas de piperina pelo processo de extrusão por fusão a quente. Os resultados demonstraram uma significativa melhora na permeabilidade da piperina, utilizando saco intestinal de modelo animal e boa estabilidade da formulação demonstrada pela inibição da recristalização do fármaco, comprovando a possibilidade da melhora nas formulações de piperina em novos sistemas de liberação.

Com a finalidade de superar as limitações encontradas na utilização da piperina devido sua baixa solubilidade em água e imunotoxicidade e aumentar sua atividade contra a proliferação de células cancerígenas, Pachauri et al. (2015) desenvolveram nanopartículas poliméricas de PGLA contendo piperina pelo método de simples emulsificação e evaporação do solvente. Resultados de análises de caracterização e liberação de fármaco comprovaram a eficácia do método de desenvolvimento das nanopartículas e testes em culturas de linhagens de células cancerígenas sugerem que em combinação com paclitaxel, a piperina, no novo sistema de liberação, apresentou melhora em seu potencial terapêutico como adjuvante no tratamento de câncer de mama.

Em outro trabalho também foram preparadas, nanopartículas de curcumina e piperina através de quatro métodos diferentes, hidratação de película fina, dispersão sólida, emulsão por polimerização e método de Fessi com o objetivo de superar as limitações de biodisponibilidade oral e melhorar o alcance de células cancerígenas. As nanopartículas foram formadas espontaneamente e identificadas pela turbidez, como resultado da deposição de polímero na interface entre a fase orgânica e a fase aquosa, quando o solvente orgânico miscível aquoso se difunde rapidamente para a fase aquosa. Este sistema de administração de fármaco nanoparticulado duplo pareceu ser promissor para o tratamento do câncer (MOORTHY et al., 2012).

Moorthi et al. (2013) desenvolveu e validou uma metodologia em HPLC para separação, identificação e doseamento simultâneo de piperina e curcumina encapsuladas em nanopartículas de Eudragit[®] E 100. O método foi implementado com sucesso e considerado adequado para uso em rotinas de análise e dosagem de curcumina e piperina em formas farmacêuticas, o que é de extrema importância considerando-se o avanço em pesquisas de nanotecnologia utilizando fitoativos como a piperina.

Devido à utilização de diferentes sistemas de liberação contendo piperina, com a finalidade de melhorar a sua estabilidade e solubilidade em água, aumentar sua biodisponibilidade e utilizar destes sistemas de liberação controlada para alcançar diferentes alvos no organismo pressupõe-se que, micropartículas poliméricas associadas à piperina

podem minimizar seu efeito pungente e assim facilitar a adesão ao tratamento do paciente permitindo sua utilização em doses mais elevadas às quais são requeridas para o tratamento da obesidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético (SOLAB, modelo SL-91, Piracicaba, Brasil);
- Analisador automático de Bioquímica Respons 920 (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Alemanha);
- Analisador de umidade (SHIMADZU, modelo MOC63u, Quioto, Japão);
- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Coluna cromatográfica C18, Shim-pack XR-ODS III (200 mm x 2 mm, tamanho de partícula 2,2 μm);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu Nexera X2);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difrátômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, Japão);
- Espectrômetro de auto correlação a laser (MALVERN INSTRUMENTS, modelo Zetasizer Nano series ZS90, Worcestershire, Reino Unido);
- Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR-Prestige-21, Quioto, Japão);
- Estufa (NOVA ÉTICA, modelo 410/D, Vargem Grande Paulista, Brasil);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura com efeito de emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca);
- Potenciômetro digital de bancada (HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 221, São Paulo, Brasil);
- Sistema de calorimetria exploratória diferencial STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos);
- Sistema de secagem por aspersão, *Spray dryer* (LABMAQ, modelo MSD 0.5; Ribeirão Preto, Brasil);
- Sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q[®], MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos);
- Ultracentrífuga refrigerada (HITACHI, modelo Himac CR21GII, Tóquio, Japão);
- Ultrassom, *Ultrasonic Cleaner* (ODONTOBRÁS, 1440DA, Ribeirão Preto, Brasil).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

- Piperina (PIP, $\geq 97,0\%$ de pureza, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- Padrão interno: *piperine* matrix substance for MALDI-MS, $\geq 99,0\%$ (HPLC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

4.2.2 Polímeros

- Eudragit[®] RS30D [cloreto de poli (metacrilato de trimetilamonioetila-co-metacrilato de metila-co-acrilato de etila)], dispersão aquosa (teor 30%), doado por Evonik Industries AG (Darmstadt, Alemanha).
- Eudragit[®] S100 [poli (metacrilato de metila-co-ácido metacrílico)], doado por Evonik Industries AG (Darmstadt, Alemanha).

4.2.3 Água Purificada

- Para análises em cromatógrafo líquido, determinação do tamanho de partícula foi utilizada água ultrapura, obtida por sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q[®], MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos).
- Para o desenvolvimento dos sistemas microparticulados e demais análises foi empregada água destilada em equipamento FANEM LTDA (modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil).

4.2.4 Solventes e demais reagentes

- Acetonitrila grau HPLC (ApplyChem Panreac Química, Barcelona, Espanha);
- Brometo de potássio (KBr) grau espectroscópico (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Etanol P.A. (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Metanol grau HPLC (ApplyChem Panreac Química, Barcelona, Espanha);
- Solução salina 0,9% (Sorimax FARMAX, Divinópolis, Brasil);

Os solventes orgânicos apresentaram grau analítico e foram usados sem tratamento prévio.

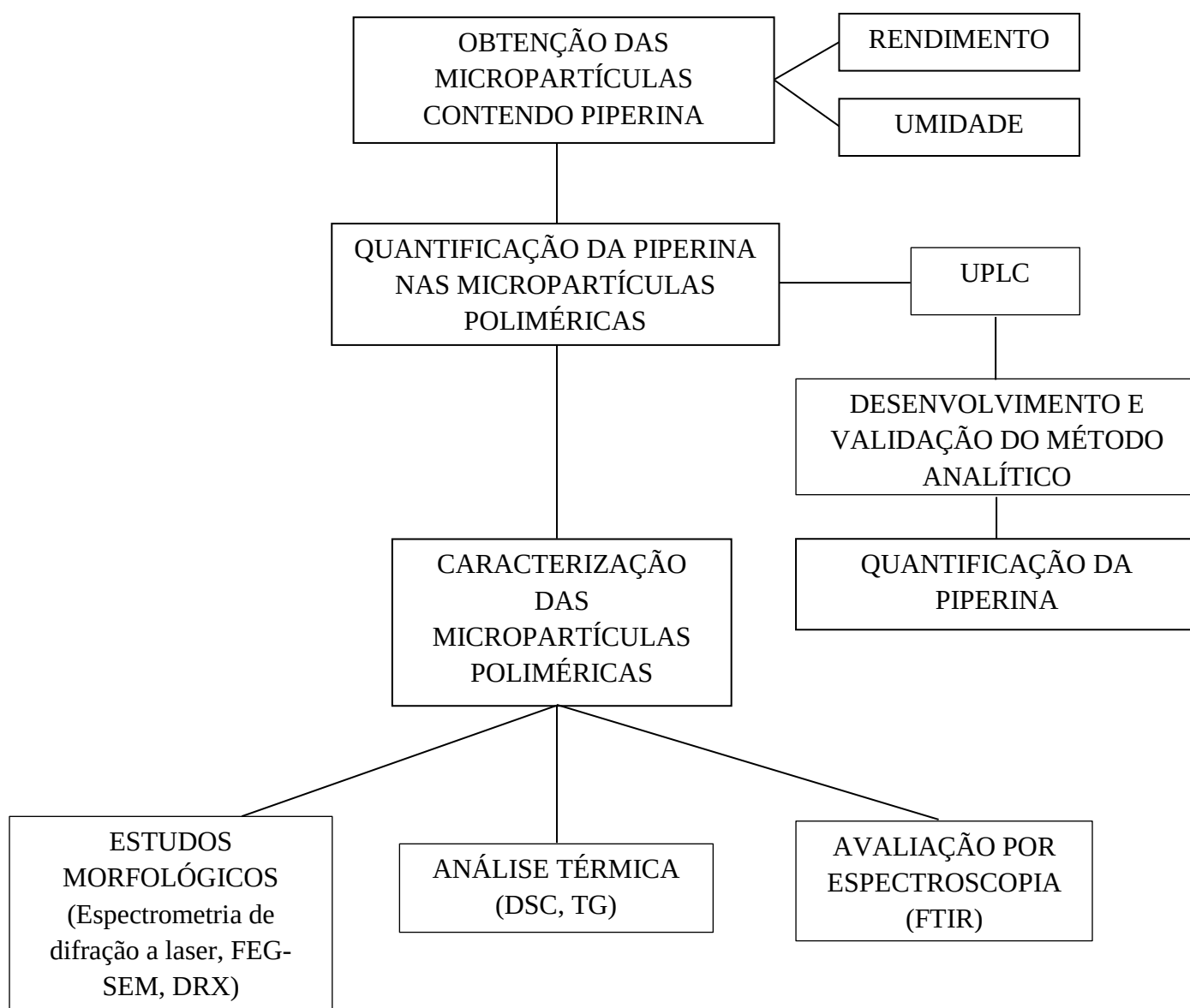
4.2.5 Demais Materiais

- Filtro para seringa PTFE (politetrafluoretileno) (0,45 µm x 25 mm, Cromafil[®], Xtra, MACHEREY-NAGEL GNBH & CO. KG, Düren, Alemanha);
- Seringa para HPLC de 100 µL (Microliter 710, HAMILTON, Bonaduz, Suíça).

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

As etapas sequenciais da pesquisa tiveram início com a obtenção das micropartículas poliméricas de RS30D e S100, contendo PIP por *spray drying*. Em seguida, foi realizada a quantificação do fármaco nas micropartículas, empregando o método UPLC, previamente desenvolvido e validado. Posteriormente, as micropartículas obtidas foram caracterizadas por meio de métodos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. As etapas realizadas no presente trabalho estão esquematizadas no fluxograma a seguir (Figura 4):

Figura 4 – Desenho experimental das etapas da pesquisa



Fonte: A autora (2018)

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Obtenção das micropartículas poliméricas

A obtenção das micropartículas foi conduzida pelo método de secagem por aspersão ou *spray-drying*.

A partir do fármaco (piperina, PIP) e dos polímeros Eudragit[®] S100 e Eudragit[®] RS30D denominados pelas siglas S100 e RD30D, respectivamente, foram desenvolvidas as formulações de micropartículas denominadas MS100 (micropartículas preparadas a partir do polímero Eudragit[®] S100) e MRS (micropartículas preparadas a partir do polímero Eudragit[®] RS30D). As concentrações teóricas de PIP utilizadas foram de 0, 5, 10 e 20%, indicadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição das formulações de micropartículas poliméricas contendo piperina obtidas pelo método de secagem por aspersão

Formulação	Composição				
	PIP (g)	S100 (g)	RS30D (g)	H ₂ O ultrapura (mL)	Álcool etílico (mL)
MS100_P0	—	2,00	—	200	200
MS100_P5	0,10	1,90	—	200	200
MS100_P10	0,20	1,80	—	200	200
MS100_P20	0,40	1,60	—	200	200
MRS_P0	—	—	6,67	200	200
MRS_P5	0,10	—	6,33	200	200
MRS_P10	0,20	—	6,00	200	200
MRS_P20	0,40	—	5,33	200	200

Fonte: A autora (2018)

Nota: PIP (Piperina); MS100_P (micropartícula de Eudragit[®] S100 e PIP); MRS_P (micropartícula de Eudragit[®] RS30D e PIP); MS_P0 e MRS_P0 (controles negativos).

Com o método utilizado, o material polimérico foi dissolvido/disperso em 200 mL de álcool etílico por agitação magnética (800 rev.min⁻¹), sendo adicionada em seguida a PIP. Após a dissolução do fármaco e polímeros, 200 mL de água destilada foi adicionada lentamente e a solução mantida sob agitação por 12 h. Transcorrido esse período, as formulações foram conduzidas à secagem por aspersão, utilizando o equipamento *Spray*

Dryer LABMAQ, modelo MSD 0.5, operando nas seguintes condições: diâmetro do atomizador: 0,82 mm, pressão de atomização: 3 kgf.cm⁻², fluxo do ar de secagem: 50 L.min⁻¹, fluxo de alimentação da formulação em secagem: 0,20.h⁻¹, temperatura de entrada: 135 ± 5 °C e temperatura de saída: 60 ± 5 °C.

Todas as formulações foram obtidas em triplicata e os produtos foram armazenados à temperatura ambiente, em recipientes hermeticamente fechados, ao abrigo da luz. As condições estabelecidas (tempo de agitação, pressão, fluxo e temperatura) foram mantidas constantes para minimizar as flutuações.

4.4.1.1 Mistura Física

Misturas físicas (MF) entre os polímeros utilizados e a PIP pura foram preparadas para uma caracterização comparativa dos sistemas microparticulados em estudo. Foram elaboradas misturas físicas na proporção, em massa, de 1:1 (PIP:polímero) (50%). Ambos foram pesados e misturados com auxílio de uma espátula, resultando em uma mistura simples e homogênea.

4.4.2 Rendimento das micropartículas

O rendimento (R) das formulações foi calculado pela razão entre a massa obtida após a preparação, e a soma das massas utilizadas do polímero e do fármaco, conforme apresentado na Equação 1.

$$R = \frac{\text{massa obtida de micropartícula}}{\text{massa inicial (polímero + piperina)}} \times 100 \quad (1)$$

4.4.3 Determinação do teor de umidade

O conteúdo de água presente nas formulações foi determinado por analisador de umidade (SHIMADZU, modelo MOC63u, Quioto, Japão), previamente calibrado. Cada amostra, de aproximadamente 0,05 g foi colocada em um prato de alumínio e mantida em aquecimento a 105 °C, até peso constante, resultando no teor de umidade expresso em porcentagem. Os ensaios com as micropartículas foram realizados, em triplicata, logo após obtenção das mesmas.

4.4.4 Desenvolvimento e validação do método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC)

4.4.4.1 Equipamentos e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas no cromatógrafo líquido de ultra eficiência Shimadzu Nexera X2, equipado com SPD-M20A detector DAD, bomba LC-30AC, degaseificador DGU-20A5RA e SIL-30AC Autosampler/amostrador, CTO-20A forno, CBM-20A communications bus module e software Labsolutions versão 5.73.

Foi utilizada Coluna (C_{18}) Shim-pack XR-ODS III (200 mm x 2 mm, tamanho de partícula 2,2 μm).

A eluição foi realizada a 30° C, em modo isocrático, sendo a fase móvel acetonitrila:água (70:30, V/V), com fluxo de 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e volume de injeção de 4 μL . O tempo de análise foi de 5,0 minutos e a detecção UV-Vis ocorreu em 262 nm.

4.4.4.2 Preparo das soluções padrão

A solução padrão estoque de PIP foi preparada em metanol (500,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Diluições em acetonitrila:água (70:30, V/V) foram realizadas com objetivo de obter soluções com concentração entre 0,5 e 50,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, onde a concentração de 15,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ponto médio da curva) foi definida como 100%. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as soluções foram filtradas em filtro de politetrafluoretileno (PTFE, Cromafil® Xtra, 0,45 μm x 22 mm, Macherey-Nagel GNBH & Co. KG, Düren, Alemanha).

4.4.4.3 Desenvolvimento e validação do método para quantificação da piperina

Para avaliar a melhor condição para a corrida cromatográfica, foi realizado um experimento em gradiente exploratório, variando a concentração de acetonitrila de 5 a 100% em 60 minutos. Após isso, as condições cromatográficas foram otimizadas para se obter melhor resolução do pico da PIP. Uma amostra contendo os polímeros foi injetada antes das análises para todas as amostras, como controle negativo.

A validação do método analítico por UPLC foi realizada segundo os critérios propostos pela *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) e pela Resolução 166 de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017). Foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

A especificidade foi determinada por análise dos cromatogramas das micropartículas com fármaco em comparação àqueles obtidos com as formulações sem fármaco, com o objetivo de confirmar que nenhum componente da formulação interfere na quantificação da PIP.

A linearidade do método foi avaliada por regressão linear usando o método dos mínimos quadrados, pela média dos pontos de três curvas analíticas autênticas, nas concentrações de: 0,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0 e 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A inclinação e outros parâmetros das curvas analíticas foram calculados por regressão linear e análise de variância (ANOVA). Avaliação de cada ponto foi realizada em triplicata.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão (DP) e inclinação (S) das curvas analíticas, por meio das Equações 2 e 3.

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{S} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{S} \quad (3)$$

A precisão do método foi determinada seguindo o guia do ICH (2005). A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária.

Para repetibilidade, três concentrações (2,0; 25,0 e 40,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram avaliadas em triplicata. A precisão intermediária foi avaliada por desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) de seis injeções a 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, analisadas intradia, interdía e com diferentes analistas.

A exatidão foi determinada por análises de recuperação, adicionando-se volume de concentração equivalente a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PIP a soluções de concentração 2, 10 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, resultando em amostras de 22, 30 e 45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. Os testes foram feitos em triplicata, e a exatidão do método foi calculada segundo a Equação 4, onde, CA é a concentração experimental do analito e CTA é a concentração teórica do analito adicionado.

$$\% \text{ Exatidão} = \frac{CA (\text{amostra adicionada}) - CA (\text{amostra}) \times 100}{CTA} \quad (4)$$

A robustez foi avaliada nas amostras a 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, por variações na taxa de fluxo para 0,595, 0,600 e 0,605 mL.min^{-1} , e na concentração da fase móvel acetonitrila:água para 70:30 (v/v), 69:31 (v/v) e 71:29 (v/v). Teste Tukey de Análise de variância (ANOVA) foi realizado para avaliar se as variações alteram o resultado das análises cromatográficas. Os

resultados foram analisados utilizando o DPR comparando com os valores obtidos para a condição padrão (taxa de fluxo de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e fase móvel acetonitrila:água 70:30 (v/v)).

4.4.4.4 Determinação da piperina incorporada nas micropartículas

Para o doseamento do fármaco, foi pesada uma massa exata de micropartículas, equivalente a 20 mg de PIP e colocadas em balões volumétricos com 8 mL de acetonitrila:água (70:30, V/V) e mantidas sob agitação magnética ($1000 \text{ rev} \cdot \text{min}^{-1}$) por 24 horas. Após, as amostras foram submetidas a banho de ultrassom por 30 minutos, os volumes foram completados para 10 mL e filtrados em PTFE ($0,45 \mu\text{m}$). Antes da corrida analítica, as amostras foram diluídas para se obter concentrações teóricas de $20,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, considerando 100% de incorporação. O mesmo procedimento foi realizado com o fármaco puro para que pudesse ser observada uma possível degradação.

O doseamento foi realizado em triplicata, frente ao método analítico previamente validado na faixa de $0,50$ a $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e no comprimento de onda de 262 nm.

4.4.4.5 Eficiência de encapsulação

Considerando os resultados obtidos na quantificação da piperina, a eficiência de encapsulação (%) foi calculada a partir da diferença entre a massa de fármaco inicialmente adicionado em cada formulação e a massa presente nas micropartículas (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008), conforme demonstrado na Equação 5.

$$\text{Eficiência de encapsulação} = \frac{\text{massa de piperina nas micropartículas}}{\text{massa inicial (teórica) de piperina}} \times 100 \quad (5)$$

4.4.5 Caracterização dos Sistemas Poliméricos

4.4.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy – FEG-SEM)

A avaliação morfológica e de superfície das micropartículas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram submetidas à metalização com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, foi empregada voltagem de aceleração de 15 kV e utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

4.4.5.2 Espectrometria de difração a laser

O tamanho de partícula e potencial zeta foram determinados por espalhamento de luz dinâmico, após o preparo de uma suspensão das micropartículas (1:500, V/V) em água ultrapura. As medidas, em triplicata, foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano series ZS90 (MALVERN INSTRUMENTS, Worcestershire, Reino Unido).

4.4.5.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – FTIR)

As micropartículas poliméricas foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no equipamento IR Prestige 21 (SHIMADZU, Quito, Japão), na faixa de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scan.min^{-1} . Os espectros obtidos foram avaliados frente aos espectros do fármaco puro, da mistura física e da formulação branco referente.

4.4.5.4 Difração de Raios X (*X Ray Diffraction* – DRX)

As micropartículas foram examinadas em difratômetro de raios X Shimadzu XRD-6000, *scan* de $2^\circ.\text{min}^{-1}$ e 2θ de 5° a 80° , radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.5418\text{ \AA}$), corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.4.5.5 Análise térmica

4.4.5.5.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC)

As amostras foram colocadas em célula calorimétrica de alumina. O instrumento STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos) foi calibrado usando índio (In; P.F.= $156,6^\circ\text{C}$; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54\text{ J.g}^{-1}$) como padrão. As amostras foram aquecidas a uma taxa constante de $10^\circ\text{C.min}^{-1}$, de 20 a 600°C , sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min^{-1}) constante.

4.4.5.5.2 Termogravimetria (*Thermogravimetry* – TG)

A análise termogravimétrica foi realizada no mesmo equipamento, STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos), utilizando célula calorimétrica de alumina, onde as amostras foram aquecidas a uma taxa constante de $10^\circ\text{C.min}^{-1}$, de 20 a 600°C , sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min^{-1}) constante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As micropartículas poliméricas preparadas a partir do Eudragit[®] S100 e do Eudragit[®] RS30D foram obtidas com sucesso por *spray drying*. Após a secagem, os materiais apresentaram um aspecto macroscópico pulverulento de cor levemente amarelada, tonalidade semelhante àquela observada para a PIP pura, enquanto que, nas micropartículas que não continham o fármaco (MS100_P0 e MRS_P0) foi verificado um aspecto físico de pó branco.

5.1.1 Rendimento e Teor de umidade

A Tabela 3 sumariza os resultados percentuais de rendimento e teor de umidade, apresentados na forma de valor médio e desvio padrão.

Os rendimentos das micropartículas foram calculados com base na Equação 1, em triplicata.

Os rendimentos obtidos variaram entre 39,55% e 57,23%, sendo que as formulações com o polímero RS30D apresentaram rendimento superior às contendo S100. Tais valores foram adequados, tendo em vista a dificuldade de se obter rendimentos muito altos utilizando o *spray dryer*, onde quantidade significativa do material fica aderida às paredes do equipamento (HEGAZY; DEMIREL; YAZAN, 2002; SOSNIK; SEREMETA, 2015).

Com relação aos resultados referentes ao teor de água presente nas micropartículas (Tabela 3) frente aos valores de umidade obtidos para a PIP pura (1,98% $\pm$ 0,20), polímero RS30D (4,70% $\pm$ 0,83) e polímero MS100 (6,46% $\pm$ 1,30), observa-se que o teor de umidade das micropartículas foi semelhante ao do fármaco e dos polímeros puros, variando de 3,88% a 5,66% para as formulações MRS e de 2,97% a 6,25% para as formulações MS100, sendo notado crescente o valor de umidade com a diminuição da concentração de PIP nas formulações. Esses resultados indicam que o processo de secagem por aspersão foi efetivo na remoção da mistura água-etanol (50:50 v/v) empregada como solvente no processo de microencapsulação.

Tabela 2 – Percentuais de rendimento e teor de umidade das micropartículas

Formulação	Rendimento (%)	Umidade (%)
	Média ± DP*; DPR**	Média ± DP*; DPR**
MRS_P0	57,23 ± 9,60; 16,77	5,66 ± 0,98; 17,31
MRS_P5	52,40 ± 2,12; 4,05	4,67 ± 0,35; 7,49
MRS_P10	44,37 ± 7,09; 15,98	4,08 ± 0,59; 14,46
MRS_P20	48,93 ± 7,07; 14,45	3,88 ± 0,35; 9,02
MS100_P0	40,48 ± 2,94; 7,26	6,25 ± 1,89; 30,24
MS100_P5	39,55 ± 4,66; 11,78	5,89 ± 0,79; 13,41
MS100_P10	47,27 ± 6,47; 13,68	5,21 ± 1,32; 25,34
MS100_P20	42,93 ± 10,84; 25,25	2,97 ± 0,49; 16,49

Fonte: A autora (2018)

Nota: média (n = 3) *DP: desvio padrão; **DPR: desvio padrão relativo

No trabalho de Wang et al. 2017, os autores obtiveram rendimentos entre 20 a 40% nas suas micropartículas, pois em grande parte isso depende da quantidade de pó seco a ser pulverizado e da temperatura de transição vítrea dos excipientes a serem utilizados, assim, quando comparados, os resultados de rendimento do presente trabalho obtiveram resultados ainda mais satisfatórios. Em relação ao teor de umidade, no referido trabalho, os resultados ficaram entre 1,5% e 5,6%, e em média, as formulações obtidas com polímero RS30D, apresentaram menor teor de umidade que as obtidas com polímero S100 e próximas ao do autor citado, sendo que para processamento, armazenamento e administração os pós com menor teor de umidade são normalmente mais desejáveis por proporcionar maior estabilidade ao produto e manuseio mais reprodutível e robusto.

5.1.2 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação da piperina

Durante o desenvolvimento e validação do método analítico por UPLC para quantificação da PIP presente nas micropartículas, na corrida em gradiente exploratório, foi definida a fase móvel acetonitrila:água 70:30 (v/v) e o fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ como sendo as condições padrão para o restante das análises. O tempo de corrida e o tempo de retenção foram 2,0 e 1,5 minutos, respectivamente, o que é adequado para rotina laboratorial, onde é imprescindível que as análises sejam simples e rápidas.

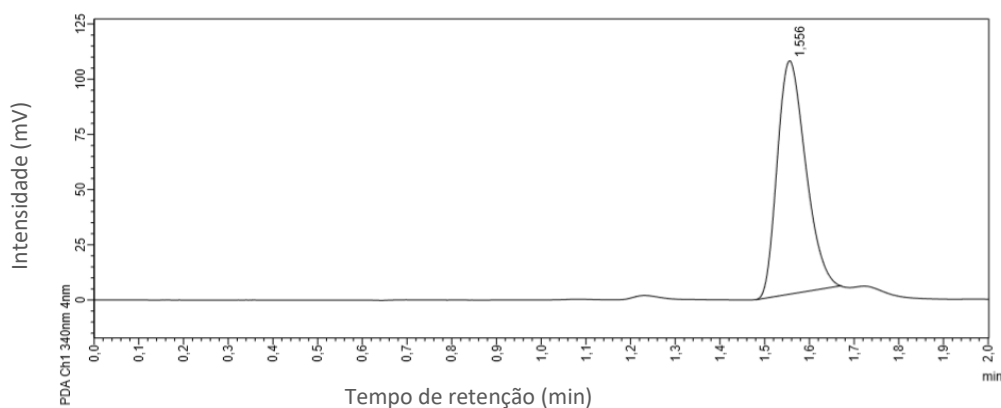
A especificidade de um método é determinada por análise do fármaco padrão e amostras teste, ou seja, a habilidade de um método analítico de diferenciar e quantificar o

analito em presença de impurezas ou outros componentes na amostra (ICH, 2005; VYAS et al., 2013).

O cromatograma do padrão analítico de PIP na concentração de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 5) mostra a especificidade do método para a PIP, frente a possíveis impurezas. A especificidade em relação às micropartículas foi demonstrada por comparação dos cromatogramas das micropartículas sem o fármaco (MRS_P0) e contendo a PIP (MRS_P10), ilustrados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

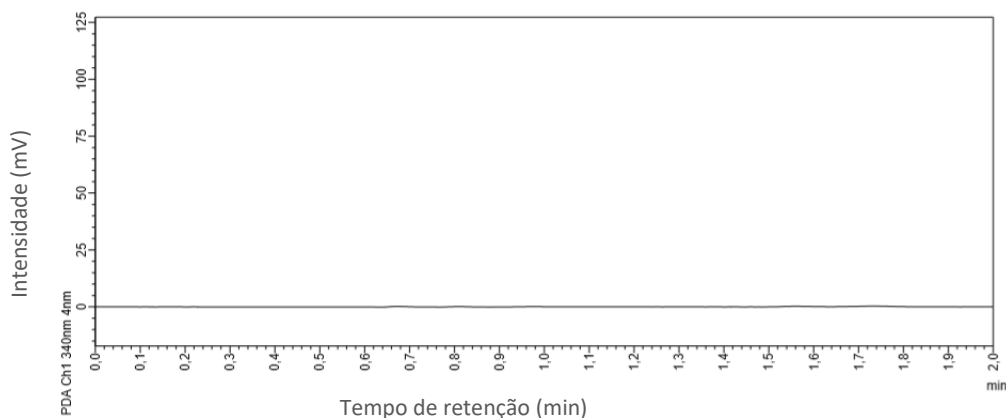
Comparando os cromatogramas obtidos (Figura 6 e 7), demonstrou-se a especificidade do método, sem apresentar interferentes no tempo de retenção do analito, em concordância com as especificações oficiais (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Figura 5 – Cromatograma de UPLC correspondente ao padrão analítico de piperina na concentração de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$.



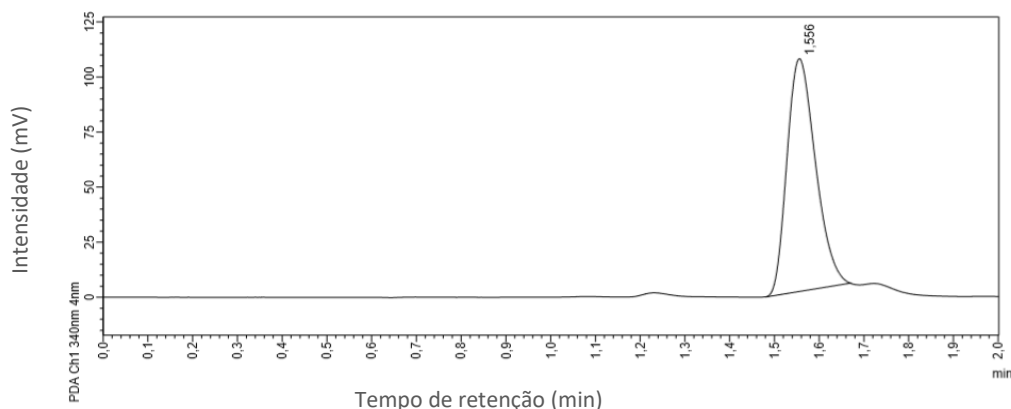
Fonte: A autora (2018)

Figura 6 – Cromatograma da micropartícula MRS_P0



Fonte: A autora (2018)

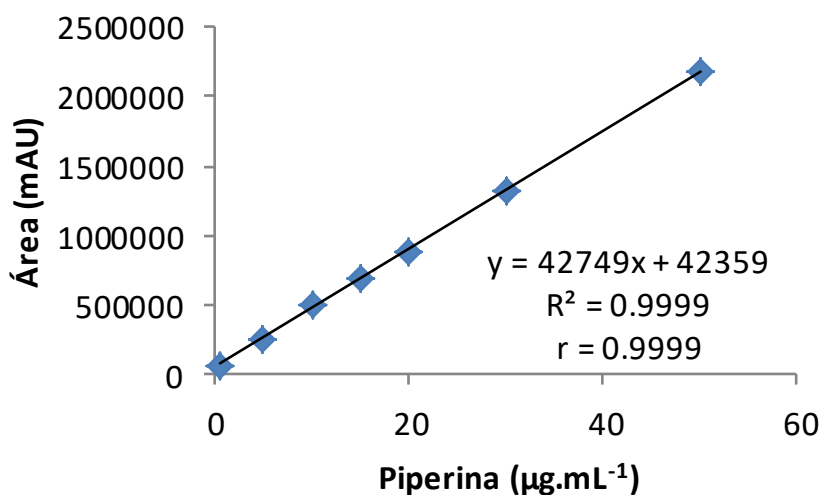
Figura 7 – Cromatograma da micropartícula MRS_P10



Fonte: A autora (2018)

A linearidade do método foi avaliada por meio de sete níveis de concentração: 0,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0 e 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi observada relação linear entre a área do pico e a concentração de PIP em uma faixa de concentração de 0,5 a 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A equação linear obtida para o método foi $y = 42749x + 42359$ ($n = 3$, $r = 0,9999$) (Figura 8).

Figura 8 – Representação gráfica da curva analítica média para a determinação da piperina obtida por UPLC ($\lambda = 262 \text{ nm}$)



Fonte: A autora (2018)

O DPR da inclinação foi de 3,86%, estando de acordo com o limite proposto pelo ICH e pela ANVISA de até 5%. O valor de b está dentro do intervalo de confiança de 95% da curva analítica, pelo teste ANOVA.

De acordo com o *Analytical Methods Committee* (AMC), um valor de coeficiente de correlação próximo a 1 não é necessariamente o resultado de relação linear, e por isso, deve ser aplicado o teste de falta de ajuste (*lack of fit*). Este teste avalia a variação dos valores residuais (GOMES et al., 2015a; HADAD; EMARA; MAHMOUD, 2009). O teste ANOVA para a linearidade está apresentado na Tabela 4. Para falta de ajuste, o valor de F foi menor que o valor de F tabelado, para o intervalo de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$), portanto, a regressão linear não apresentou falta de ajuste (KLEIN; LONGHINI; DE MELLO, 2012).

Tabela 3 – Resultados obtidos por ANOVA para linearidade do método analítico

	SS	DF	MS	F	Ftab
Modelo	9.415497E+12	1	9.415497E+12	51398.06	2,990
Resíduo	3.480568E+09	19	1.831878E+08		
				Linear	
Falta de ajuste	1.241713E+09	5	248342625	1.552935	2,307
Erro puro	2.238855E+09	14	159918191		
				Não há falta de ajuste	

Fonte: A autora (2018)

Nota: Onde SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados, F : valor F do teste; F_{tab} : valor do F tabelado

Para ser linear, o F do Modelo tem que ser maior que o F_{tab} (tabelado). É linear. Para não ter falta de ajuste, o F da falta de ajuste tem que ser menor que o F_{tab} (tabelado). Não tem falta de ajuste.

A menor concentração onde a PIP pode ser detectada (LD) e quantificada (LQ) com aceitável precisão e exatidão foi 0,1244 e 0,377 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A Tabela 5 resume os parâmetros da curva.

Tabela 4 – Resumo dos parâmetros da curva analítica da piperina

Linearidade	
Faixa linear	0,5 – 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Limite de Detecção	0,124 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Limite de Quantificação	0,377 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Dados de regressão	
<i>N</i>	3
Inclinação (α)	42749
Desvio Padrão da Inclinação	1628,55
Desvio Padrão Relativo da Inclinação (%)	3,86
Intercepto (<i>b</i>)	+ 42359
Coeficiente de correlação (<i>r</i>)	0,9999

Fonte: A autora (2018)

Nota: $*y = ax + b$, onde *x* é a concentração do composto e *y* é a área sob a Curva

A precisão de um método analítico descreve a proximidade das medidas individuais de uma substância quando o procedimento é aplicado repetidamente para múltiplas alíquotas (ICH, 2005). Repetibilidade expressa à precisão sob as mesmas condições de operação durante um curto intervalo de tempo.

Foi avaliada a precisão intermediária, expressa como variação intradia, interdia e com diferentes analistas. O teste *t*-student avalia a existência de qualquer diferença entre os diferentes níveis de um fator. Até 5 % não há diferença significativa na área do pico e no tempo de retenção da PIP (ANVISA, 2017). O DPR para repetibilidade nas concentrações 2,0, 25,0 e 40,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram de 3,06%, 2,95% e 0,75%, respectivamente. Quanto à precisão intermediária, os valores de DPR foram de 2,39%, 2,88% e 2,99% para intradia, interdia e segundo analista, respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 6, confirmando a precisão do método desenvolvido.

Tabela 5 – Dados da repetibilidade e precisão intermediária

	Concentração Teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$, Média $\pm$ DP*)	DPR** (%)
Repetibilidade (n = 9)			
	2,0	2,08 $\pm$ 0,06	3,06
	25,0	24,89 $\pm$ 0,73	2,95
	40,0	39,07 $\pm$ 0,29	0,75
Precisão intermediária			
Intradia (n = 3)	10,0	10,29 $\pm$ 0,25	2,39
Interdia (n = 3)	10,0	10,28 $\pm$ 0,29	2,88
Diferentes analistas (n = 3)	10,0	10,19 $\pm$ 0,30	2,99
Média $\pm$ DP* (n = 9)	10,0	10,25 $\pm$ 0,05	0,54

Fonte: A autora (2018)

Nota: *DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo

A exatidão do método por ensaios de recuperação foi determinada pela adição de quantidade exata de PIP a soluções de concentração conhecida do fármaco. A porcentagem média de recuperação $\pm$ DP e DPR foram $99,04 \pm 0,52$ e $0,53\%$, $100,66 \pm 0,62$ e $0,61\%$, $101,42 \pm 1,39$ e $1,37\%$ para as concentrações avaliadas, respectivamente. Assim, resultados obtidos indicam que o método proposto é considerado exato.

A robustez de um procedimento analítico é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas e deliberadas variações dos parâmetros do método, fornecendo uma indicação da sua confiabilidade em condições normais de uso (ICH, 2005).

Para a avaliação da robustez, o fluxo de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ e a fase móvel acetonitrila : água 70:30 (v/v) foram consideradas condições padrão. A robustez foi avaliada nas amostras a $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, por variações na taxa de fluxo para $0,595$, $0,600$ e $0,605 \text{ mL.min}^{-1}$, e a concentração da fase móvel acetonitrila : água para 69:31 (v/v), 70:30 (v/v), e 71:29 (v/v). Os resultados foram analisados utilizando o DPR comparando com os valores obtidos para a condição padrão. O teste Tukey a um nível de significância de 5% mostrou que não houve diferença significativa na área do pico e o tempo de retenção da PIP quando a taxa de fluxo variou de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ para $0,595 \text{ mL.min}^{-1}$ (DPR = $0,48\%$) e para $0,605 \text{ mL.min}^{-1}$ (DPR = $0,41\%$), e quando a concentração da fase móvel variou de 70:30 (V/V) para 71:29 (V/V) (DPR = $1,24\%$) e para 69:31 (V/V) (DPR = $0,41\%$). Portanto, o método provou ser robusto para o fármaco analisado, sob as condições avaliadas.

5.1.3 Quantificação de Piperina incorporado às micropartículas

As micropartículas MRS e MS100, preparadas em etanol:água (50:50, v/v) apresentaram teor de fármaco entre 66,36% - 90,15% e 78,69% - 81,74% respectivamente, com baixos valores de desvio padrão e desvio padrão relativo para as análises em triplicata (Tabela 7). Outros trabalhos com PIP apresentaram eficiência de encapsulação entre 72% a 87% em nanopartículas (BASPINAR et al., 2018) e de 54,8% a 84,3% em micropartículas de PIP com quitosana produzidas pelo método de ionização por eletro-spray (PENGPONG et al., 2014)

Em um estudo comparativo entre métodos de preparação de micropartículas utilizando *spray drying* e um novo sistema de processamento de partículas ultrafinas, os resultados de eficiência de encapsulação ficaram em torno de 84,65% e 90,16% respectivamente em cada método, demonstrando serem tecnologias apropriadas, para utilização no preparo de medicamentos macromoleculares sensíveis, protegendo o encapsulado (ZHU et al., 2015).

Com o objetivo de aperfeiçoar o preparo de micropartículas de isoniazida e avaliar as interações químicas entre fármaco e polímeros foram avaliadas formulações preparadas com Eudragit[®] S100 e etil celulose, obtendo resultados de eficiência de encapsulação entre 81% e 94,4%, as variações foram observadas em diferentes formulações de polímeros devido a prováveis perdas de algumas porções por escape no ciclone ou por adesão do pó as suas paredes, mas demonstrou-se elevada eficiência de encapsulação do fármaco sem diferença significativa entre os diferentes polímeros utilizados (MITHU et al., 2017).

Assim, pode-se concluir que a eficiência de encapsulação nas micropartículas MRS e MS100 (Tabela 7) se encontra adequada e com variações que podem ser justificadas pelo método utilizado para obtenção das micropartículas. A formulação MRS_P10 apresentou a melhor eficiência de encapsulação, o que justifica sua utilização no ensaio biológico *in vivo*.

Tabela 6 – Teor¹ de piperina incorporada nas micropartículas (mg.g⁻¹) e eficiência de encapsulação² (EE, %)

Micropartículas	Concentração teórica (mg.g ⁻¹)	PIP encapsulada (mg.mg ⁻¹) ¹	EE (% ± DP*) ²	DPR**
MRS_P5	50,00	33,18 ± 0,13	66,36 ± 0,27	0,41
MRS_P10	100,00	90,15 ± 0,95	90,15 ± 0,95	1,05
MRS_P20	200,00	155,20 ± 1,78	77,60 ± 0,90	1,15
MS100_P5	50,00	39,34 ± 0,13	78,69 ± 0,25	0,31
MS100_P10	100,00	81,74 ± 0,45	81,74 ± 0,45	0,62
MS100_P20	200,00	160,58 ± 3,45	80,29 ± 1,73	2,16

Fonte: A autora (2018)

Nota: ¹média (n = 3) ± desvio padrão

²média (n = 3) ± desvio padrão *DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo

5.1.4 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG-SEM)

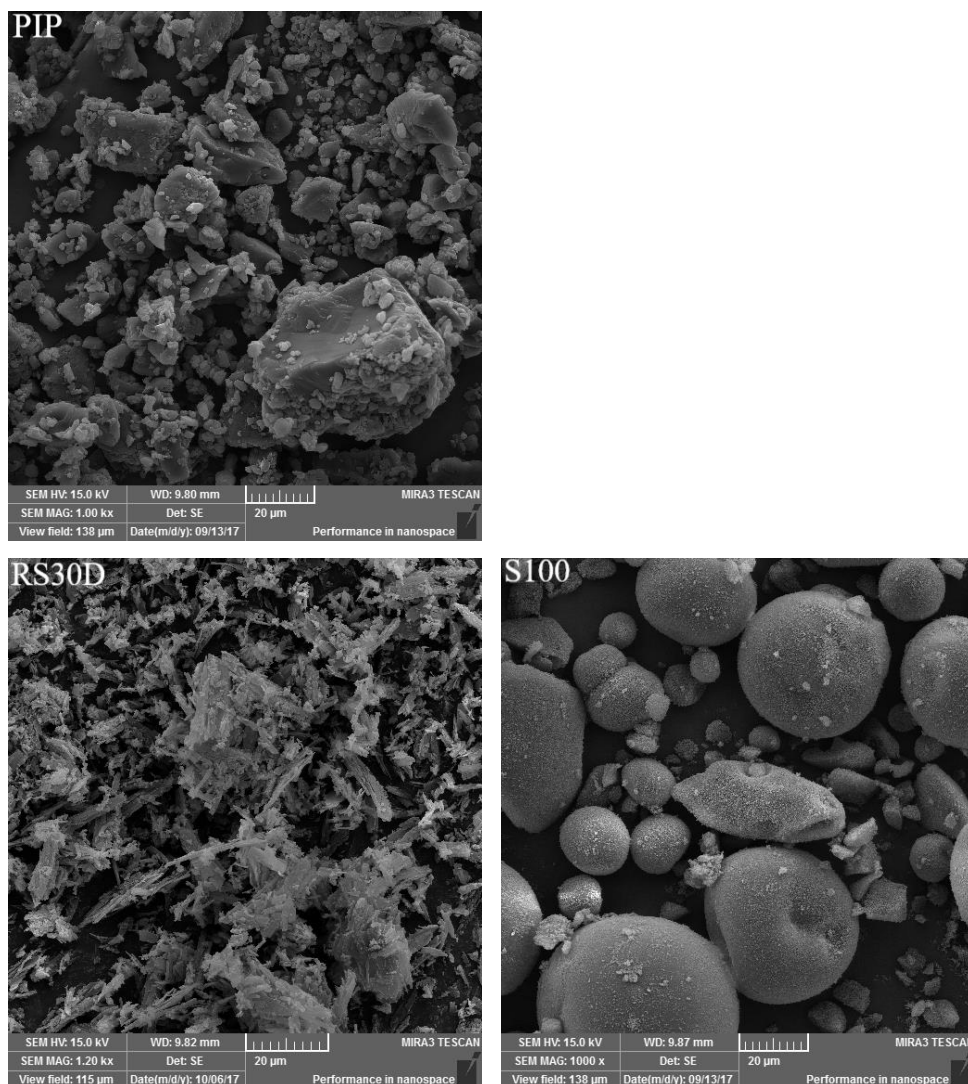
A análise por FEG-SEM é um importante estudo morfológico para partículas poliméricas que fornece a ideia sobre forma e tamanho das estruturas. Muitos fatores podem afetar as características morfológicas e estruturais na produção de micropartículas poliméricas, como o volume do solvente e reações com os solventes, alterando a uniformidade do tamanho e características de superfície, altas taxas de evaporação de solvente no *spray-dryer*, por exemplo, podem obter partículas mais esféricas que aquelas obtidas por solventes com maiores valores de ponto de ebulição, o que pode ser avaliado pela microscopia eletrônica de varredura (ROLAND; BHAWANI, 2016; SCHAFROTH et al., 2012).

A eletromicrografia do fármaco (Figura 9) confirma seu caráter cristalino, apresentando-se na forma de cristais, conforme relatado previamente na literatura (PADALKAR; GAIKAR, 2008), onde observou que podem existir variações de regularidade e porosidade superficial na estrutura, dependendo do solvente utilizado para sua extração.

Enquanto alguns polímeros apresentam-se predominantemente na forma de esferas de tamanhos variados como o Eudragit[®] S100 na apresentação em pó, caracterizado na Figura 9, o Eudragit[®] RS30D, que se encontra na forma de dispersão aquosa a 30%, sendo necessária sua liofilização ou secagem para microscopia eletrônica de varredura, apresentou características de aspereza em sua superfície, similar aos pellets de polímeros RS30D produzidos por aquecimento (SA-BARRETO et al., 2017) e um comportamento frágil e dúctil conforme relatado na literatura (WU; MACGINITY, 2001).

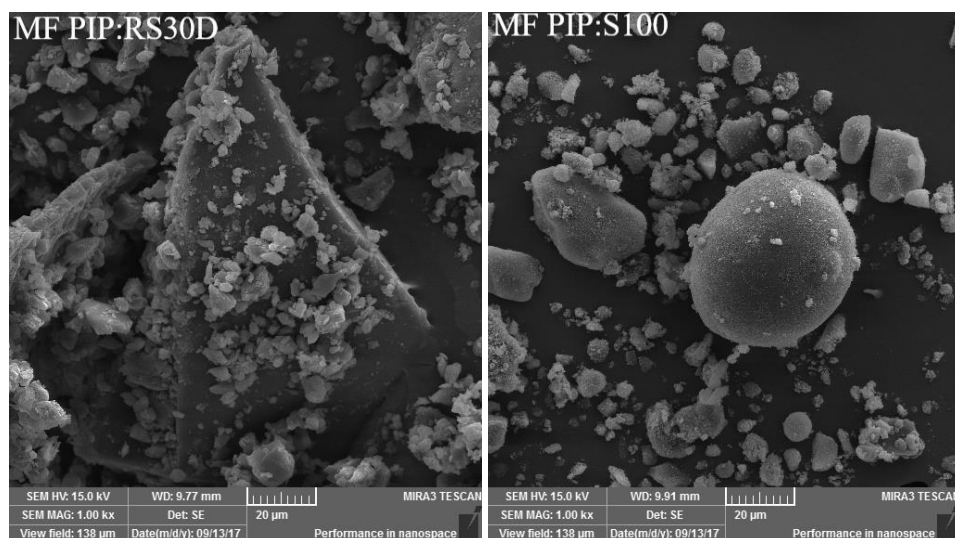
Na Figura 10, as misturas físicas (MF) preparadas com os polímeros e o fármaco, evidenciaram que as características individuais de cada produto foram mantidas, sem que ocorresse nenhum tipo de interação ou modificação morfológica.

Figura 9 – Eletromicrografias FEG-SEM da piperina pura (PIP) e dos polímeros Eudragit® RS30D (RS30D) e Eudragit® S100 (S100), aumento de 1000 X



Fonte: A autora (2018)

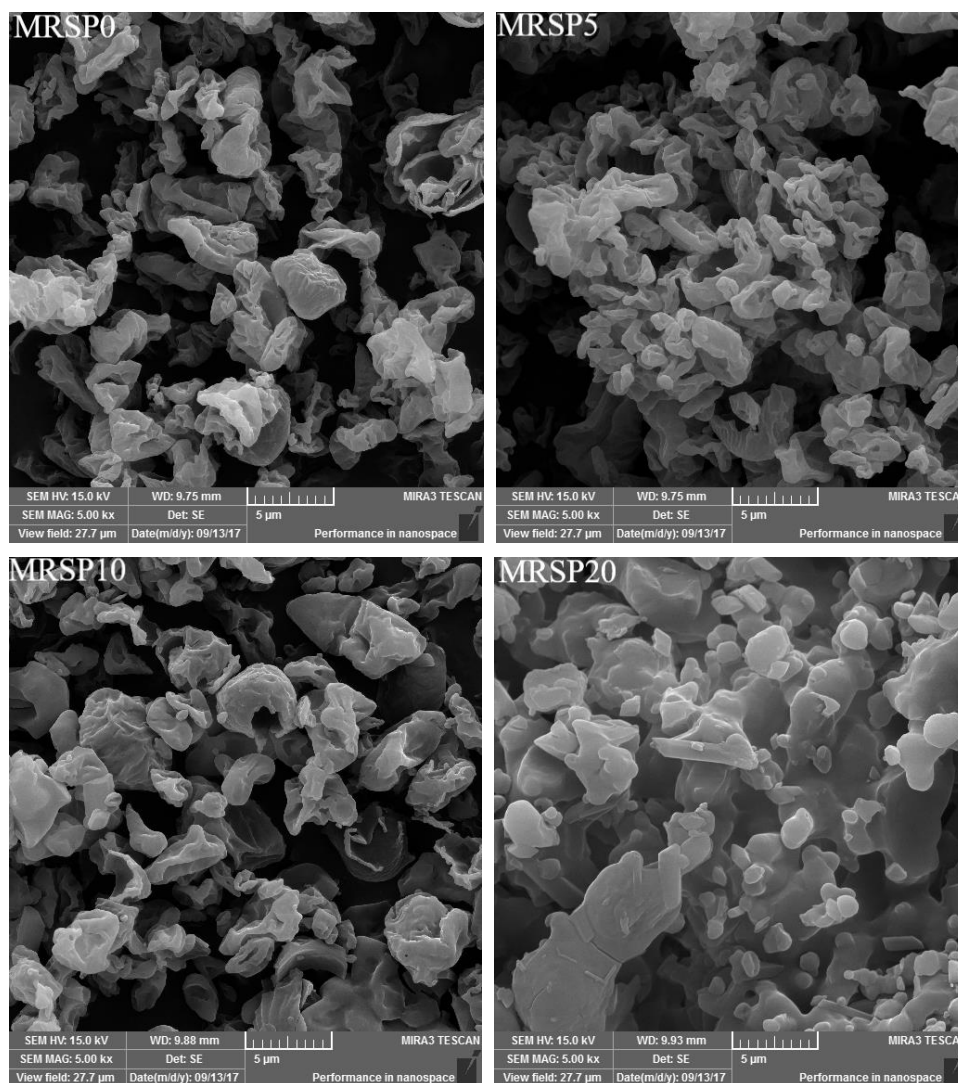
Figura 10 – Eletromicrografias FEG-SEM das misturas físicas: MF PIP:RS30D (1:1, piperina: Eudragit[®] RS30D) e MF PIP:S100 (1:1, piperina: Eudragit[®] S100), aumento de 1000 X



Fonte: A autora (2018)

As micropartículas preparadas com Eudragit[®] RS30D (Figura 11) apresentaram formato arredondado, com característica homogênea, aparência suave e sem presença de fármaco livre em sua superfície nas formulações MRS_P0, MRS_P5 e MRS_P10, assim como àquelas encontradas na literatura para micropartículas com RS30D, por spray drying (RATTES; OLIVEIRA, 2007). Entretanto, na formulação MRS_P20 detecta-se a presença de algumas estruturas cristalinas na superfície das micropartículas o que pode caracterizar a presença de PIP não encapsulada.

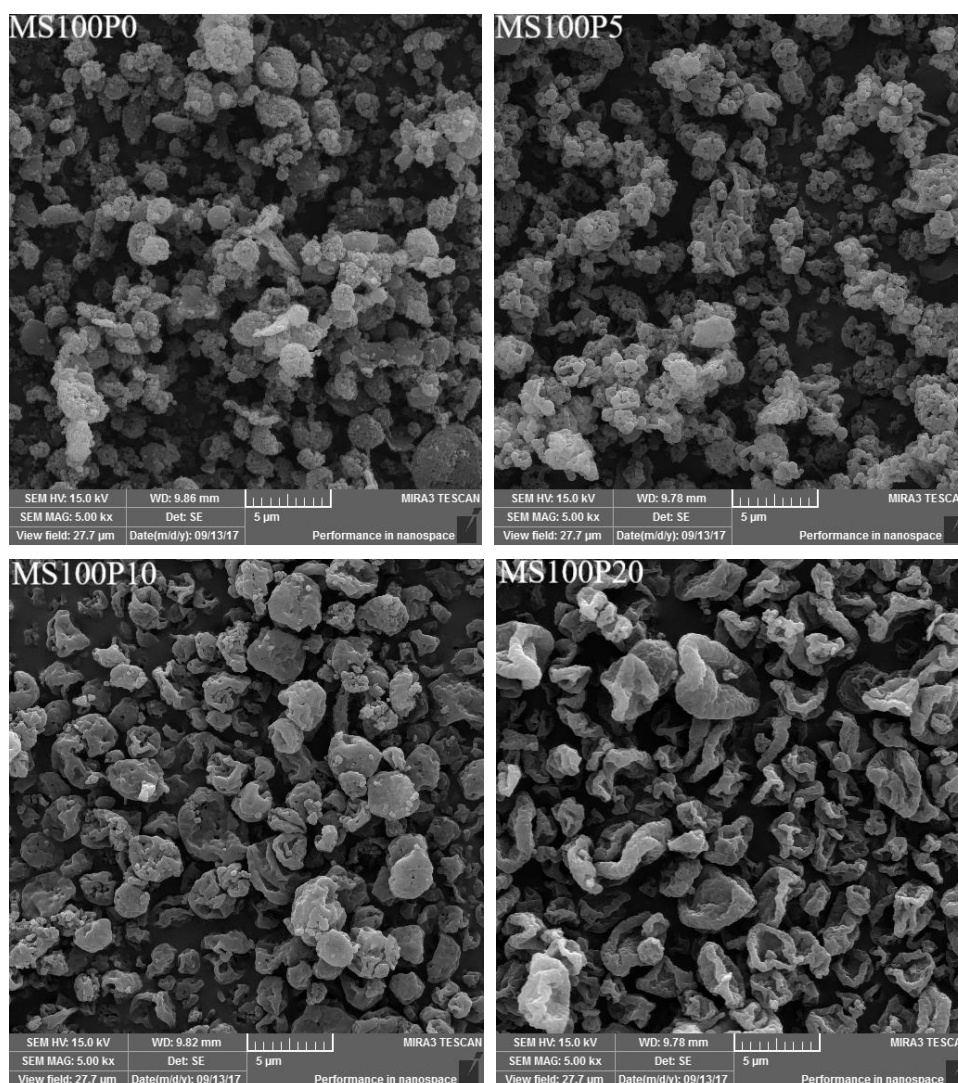
Figura 11 – Eletromicrografias FEG-SEM das micropartículas preparadas a partir do polímero Eudragit® RS30D contendo ou não piperina: MRS_P0, MRS_P5, MRS_P10, MRS_P20, aumento de 5000 X



Fonte: A autora (2018)

As micropartículas MS100 preparadas em etanol:água (50:50, V/V), apresentaram morfologia esférica (Figura 12), similar àquelas encontradas na literatura para micropartículas com S100, por *spray drying* (CRUZ et al., 2010; ESPOSITO et al., 2002; RAFFIN et al., 2007a).

Figura 12 – Eletromicrografias FEG-SEM das micropartículas preparadas a partir do polímero Eudragit® S100 contendo ou não piperina: MS100_P0, MS100_P5, MS100_P10, MS100_P20, aumento de 5000 X



Fonte: A autora (2018)

Algumas micropartículas apresentaram rugosidades e concavidades na superfície. Essa irregularidade pode ser devida ao encolhimento da micropartícula, observado durante sua secagem e resfriamento. Vacúolos e concavidades também podem ser originados durante a evaporação do solvente, decorrentes da ação de capilaridade na superfície seca das partículas, criando uma pressão interna sub-atmosférica, resultando em partículas colabadas, devido à pressão parcial maior gerada no centro da micropartícula durante o processo de secagem por aspersão (KULKARNI; NAIK, 2013; RAFFIN et al., 2007a; WALTON, 2000).

A absorção de água é outro fator crítico para manter a estrutura das micropartículas estável, quando os pós absorvem umidade, associado ao impacto das partículas úmidas na parede da câmara de secagem, elas acabam por deformar, mudando sua estrutura física,

resultando em partículas colabadas, aglomeradas e com mudanças em sua viscosidade. (PORRAS-SAAVEDRA et al., 2015)

A presença ou aumento da concentração de PIP não alterou o tamanho e a morfologia das micropartículas preparadas em etanol:água (50:50, v/v), assim como em micropartículas de ciclosporina produzidas por *spray drying* (SCHAFROTH et al., 2012).

5.1.5 Espectrometria de difração a laser

A microencapsulação pelo método de *spray-drying* é utilizada para produzir partículas com diâmetro na escala de 1 μm a 1000 μm , com o objetivo de obter sistemas de liberação controlada de medicamentos e aumentar sua taxa de dissolução pelo aumento da superfície de contato, no caso de fármacos com baixa solubilidade em água (MITHU et al., 2017).

O tamanho das micropartículas obtidas variou entre 1,37 μm e 7,27 μm (Tabela 8), assim como no trabalho de Mithu et al., (2017) que obteve micropartículas de 1,2 μm a 9,4 μm de diâmetro, utilizando o polímero S100 e Porras-Saavedra et al., (2015), com partículas entre 2 μm e 7 μm , utilizando maltodextrina e goma arábica na formulação, ambos pelo método de *spray-drying*.

As micropartículas produzidas a partir do polímero RS30D apresentaram diâmetros relativamente maiores, entre 4,09 μm e 7,27 μm , que as micropartículas produzidas com o polímero S100 com diâmetros médios entre 1,37 μm e 1,87 μm . Colomé et al., (2007), em seu trabalho com micropartículas contendo pantoprazol em formulações preparadas a partir de S100 e RS30D também apresenta variações de diâmetro em seus resultados, obtendo partículas com diâmetro entre 9,1 μm e 53,5 μm , podendo ser este último valor ser mais aumentado devido a presença de aglomeração de partículas.

Os valores de tamanho das micropartículas determinados por espectrometria de difração a laser foram confirmados pelos resultados obtidos na análise por FEG-SEM.

Entre os fatores que podem interferir no tamanho da micropartícula produzida estão a agitação da formulação durante sua produção, as propriedades físico-químicas do material utilizado na formulação e a metodologia de obtenção das micropartículas, onde a pressão e temperatura de evaporação dos solventes estão diretamente relacionadas com as características morfológicas das micropartículas obtidas (LI et al., 2008), assim, como todos os parâmetros de produção das micropartículas contendo PIP utilizados foram os mesmos, o fator que pode justificar essa pequena variação de tamanho entre as micropartículas produzidas a partir de S100 e RS30D é a propriedade físico-química dos polímeros utilizados.

Tabela 7 – Tamanho de partícula obtido por espectrometria de difração a laser

FORMULAÇÃO	TAMANHO (μm)
	MÉDIA $\pm$ DP*; DPR**
MRS_P0	4,09 $\pm$ 0,12; 2,86
MRS_P5	5,68 $\pm$ 1,21; 21,31
MRS_P10	6,50 $\pm$ 0,99; 15,29
MRS_P20	7,27 $\pm$ 2,60; 35,80
MS100_P0	1,55 $\pm$ 0,14; 8,78
MS100_P5	1,37 $\pm$ 0,08; 5,97
MS100_P10	1,76 $\pm$ 0,05; 2,68
MS100_P20	1,87 $\pm$ 0,14; 7,25

Fonte: A autora (2018)

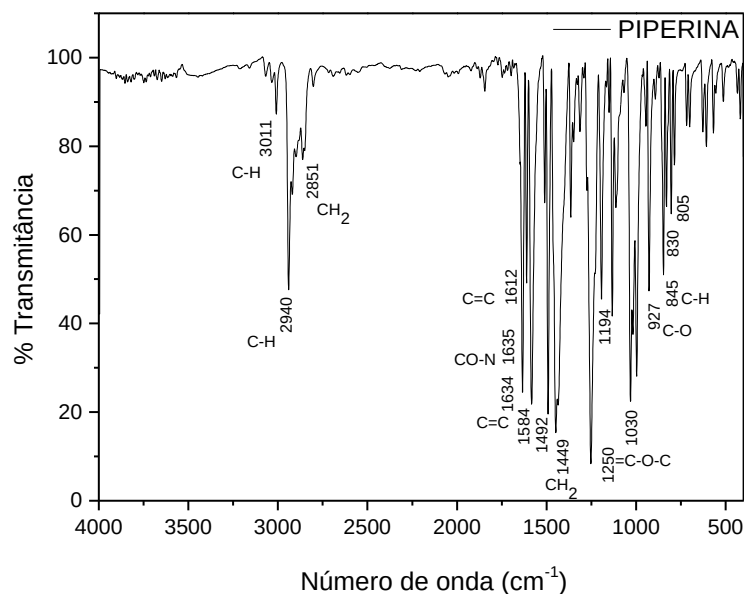
Nota: *DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo (%)

5.1.6 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia de infravermelho é um importante método de caracterização para detectar grupos funcionais nas moléculas de um composto. Interações químicas entre fármacos e polímeros são comumente identificadas por mudanças nos padrões do FTIR, assim com a intenção de explorar se o processo de microencapsulação resulta em alguma mudança química são comparadas as características de bandas entre matérias primas e formulações. A porção de maior utilidade para a análise desses grupos está situada entre 4000 e 400 cm^{-1} (ROLAND; BHAWANI, 2016; ALMEIDA et al., 2014).

Com o objetivo de avaliar possível interação entre fármaco e carreador, foram analisados espectros da piperina pura, polímeros puros, mistura física e formulações com e sem fármaco. O espectro FTIR da PIP pura (Figura 13) apresentou as bandas características do fármaco, estando de acordo com os dados apresentados na Tabela 8 encontrados na literatura.

Figura 13 – Espectro FTIR da piperina pura



Fonte: A autora (2018)

Tabela 8 – Principais bandas de absorção encontradas no espectro FTIR da piperina

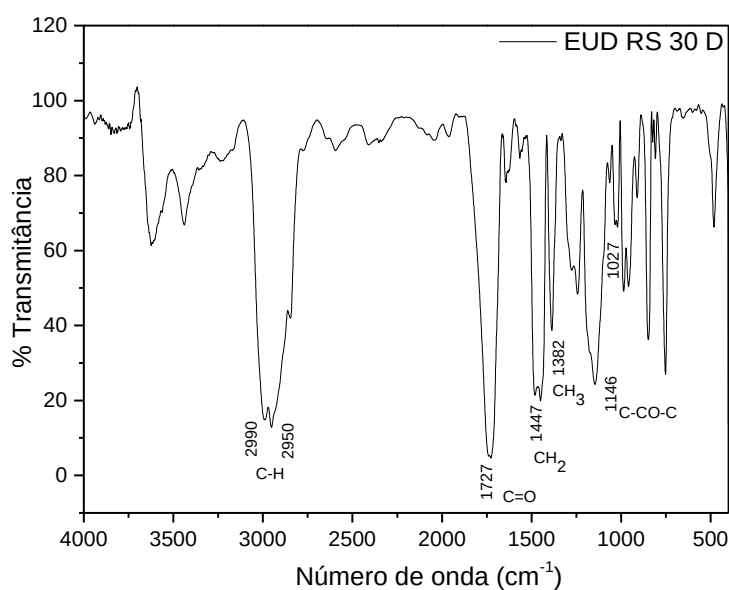
BANDAS	RESULTADO (cm. ⁻¹)	LITERATURA (cm. ⁻¹)	REFERÊNCIAS*
Estiramento aromático (-CH)	3011	3011	a, b
Vibração de estiramento alifática assimétrica (CH ₂)	2940	2940	c, e, a, f, b
Vibração de estiramento simétrica (CH ₂)	2851	2851	c, d
Vibração de estiramento (-CO-N)	1635	1635, 1644	g, b
Vibração do estiramento simétrica (C=C)	1634	1634,5; 1631	c, e, a, g, f
Vibração do estiramento assimétrica (C=C)	1612	1612,5; 1608	c, e, a, g
Vibração aromática (C=C)	1584	1608,1580, 1495, 1584	g, f, b
Deformação angular (CH ₂)	1445	1449, 1445	c, g, f, b
Vibração de estiramento assimétrico (=C-O-C)	1250	1194, 1250, 1245	c, g, b
Vibração de estiramento simétrico (=C-O-C)	1030	1030, 1025	e, b
Vibração de estiramento (C-O)	927	927, 935	e, g, b
Vibração angular (C-H)	845	850,845 830,805	g, b

Fonte: A autora (2018)

Nota: *Referências: a) (SAHA et al., 2013); b) (DAHIYA et al., 2018); c) (PENTAK, 2016); d) (ROLAND; BHAWANI, 2016); e) (PENG PONG et al., 2014); f) (PACHAURI; GUPTA; GHOSH, 2015); g) (SWAPNA et al., 2012)

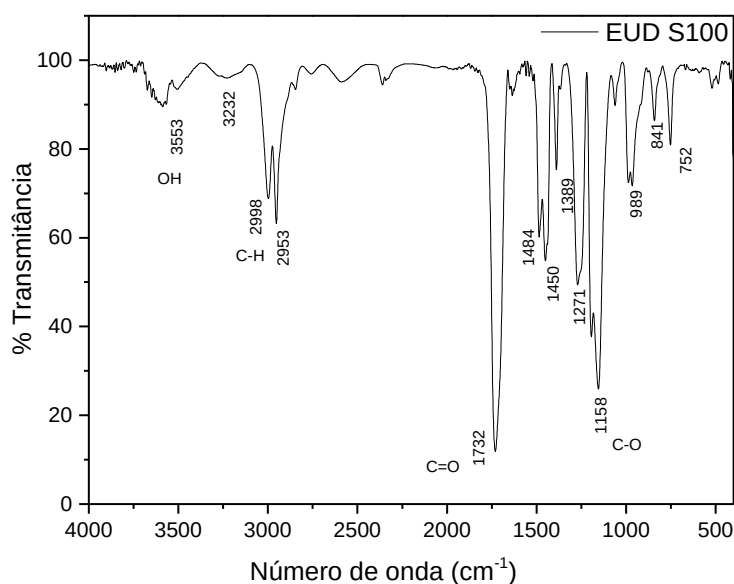
Os espectros dos polímeros foram muito semelhantes entre eles, uma vez que a estrutura base é a mesma, assim nos espectros de Eudragit® RS30D e Eudragit® S100 é possível observar bandas características da vibração C=O de ácido carboxílico esterificado em torno de 1730 cm^{-1} , bem como vibrações características de grupos CH entre 2900 a 3000 cm^{-1} , confirmadas pela presença das bandas 1385 , 1450 e 1485 cm^{-1} e uma banda larga detectada próxima a 3500 cm^{-1} pode ser atribuída à presença de grupos OH e água. Os espectros obtidos para os polímeros (Figuras 14 e 15) foram condizentes com os encontrados na literatura (FARAGO, 2007; COLOMÉ, 2006; GHAFARI et al., 2007; KHUATHAN; PONGJANYAKUL, 2014; BUNHAK et al., 2015).

Figura 14 – Espectro FTIR do polímero Eudragit® RS30D



Fonte: A autora (2018)

Figura 15 – Espectro FTIR do polímero Eudragit® S100



Fonte: A autora (2018)

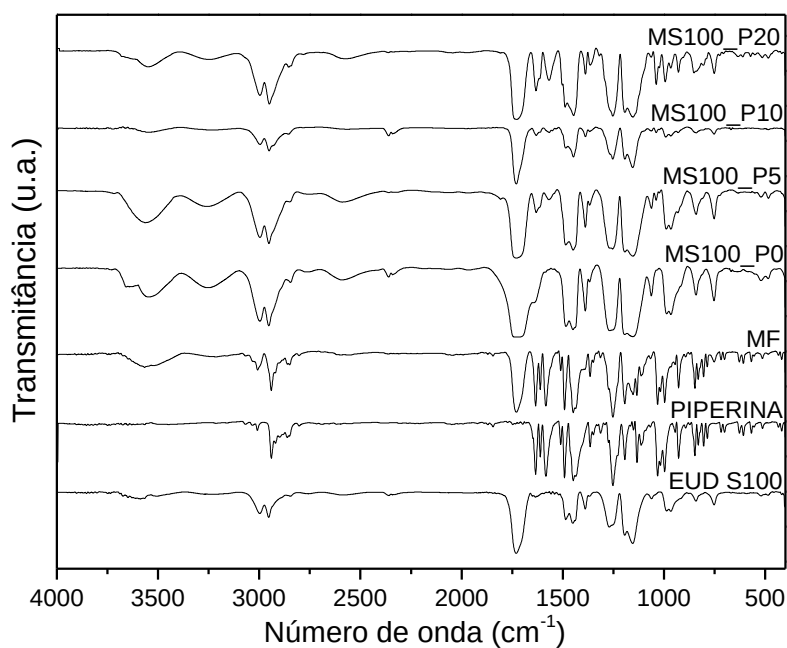
As Figuras de 16 a 17 mostram os comparativos entre os espectros FTIR do fármaco, das misturas físicas e das micropartículas preparadas com e sem a presença de PIP. Nos espectros notam-se as bandas de absorção referente ao fármaco nas mesmas posições tanto para as micropartículas carregadas com PIP como para as misturas físicas.

Nos espectros das micropartículas sem fármaco, MRS_P0 e MS100_P0, observa-se a ausência de bandas características da PIP pura.

Nas formulações preparadas em etanol:água (50:50, v/v) houve manutenção das bandas características do fármaco, sem surgimento de novas bandas, sugerindo que não houve ligação química entre o fármaco e os polímeros (MENDES, 2011).

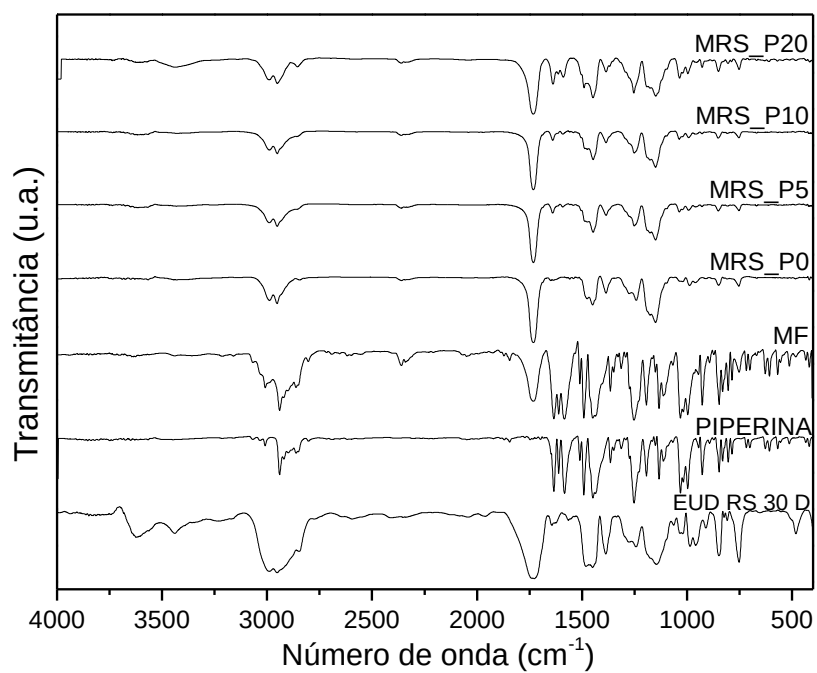
Nos espectros das micropartículas das formulações com 20% de fármaco, MRS_P20 e MS100_P20, algumas bandas características da PIP se tornam presentes podendo ser devido à presença de fármaco livre na superfície da partícula, o que pode ser observado em outras análises como FEG-SEM.

Figura 16 – Espectro FTIR do Eudragit® S100 (EUD S100), da piperina pura (PIP), da mistura física (MF) e das micropartículas MS100_P0, MS100_P10 e MS100_P20.



Fonte: A autora (2018)

Figura 17 – Espectro FTIR do Eudragit® RS30D (EUD RS30D), da piperina pura (PIP), da mistura física (MF) e das micropartículas MRS_P0, MRS_P10 e MRS_P20



Fonte: A autora (2018)

5.1.7 Difração de Raios X (DRX)

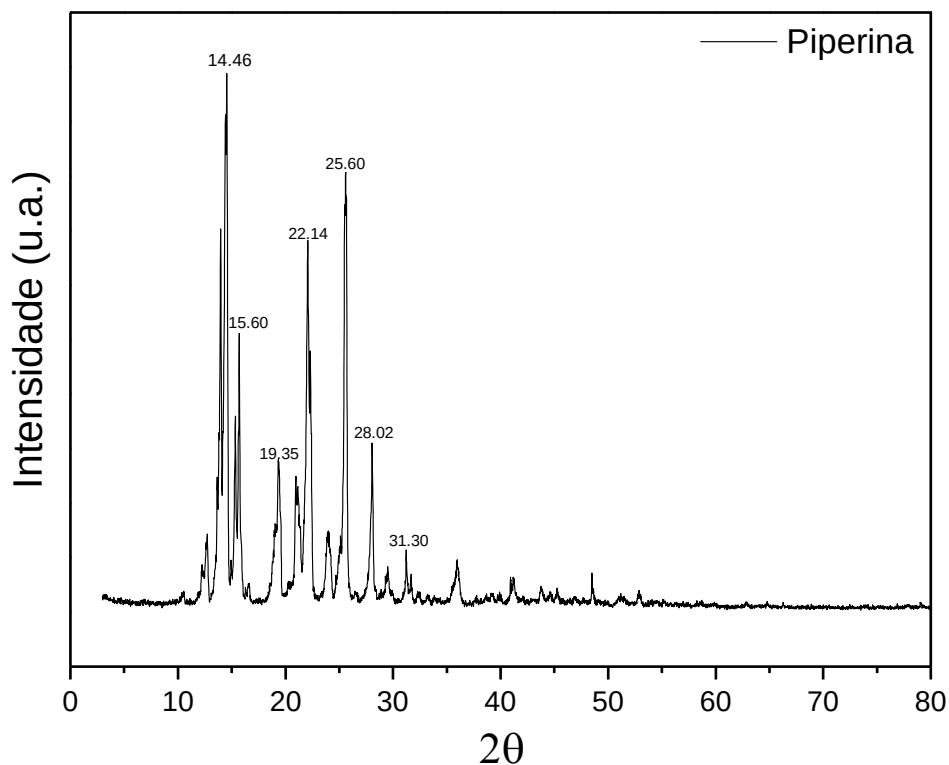
A técnica de difração de raios X é uma das principais em avaliação da cristalinidade do material, utilizada para identificação da estrutura cristalina em dispersões sólidas. No difratograma de raios X, a forma cristalina do produto mostra geralmente picos agudos no ângulo de 2θ , enquanto a forma amorfa mostra um pico em halo, não bem definido, então ambas as formas podem ser facilmente diferenciadas, pois o padrão difratométrico é único para cada composto cristalino (PATEL et al., 2015).

Substâncias amorfas têm suas moléculas arranjadas ao acaso, não apresentando picos bem definidos no difratograma como as cristalinas e sendo assim, mais solúveis devido à disposição aleatória de suas moléculas e necessitando de baixa energia para separá-las (STULZER et al., 2007). Logo, a dissolução tende a ser mais rápida no estado amorfo (RIEKES et al., 2011). Assim, a cristalinidade da substância é uma característica que pode influenciar a solubilidade e, portanto, interferir na biodisponibilidade oral (COSTA, 2011; GOMES et al., 2015b; KAWABATA et al., 2011).

Com a finalidade de observar uma possível redução da cristalinidade, foram obtidos difratogramas da PIP pura, dos polímeros, das misturas físicas e das micropartículas com e sem fármaco.

A PIP pura (Figura 18) apresentou difratograma com uma série de picos bem definidos na região de $2\theta = 10$ a 30° , e outros com pequena intensidade na região de $2\theta = 30$ a 60° , conforme dados da literatura (VINOD et al., 2011; EZAWA et al., 2016). Os picos principais encontrados foram em $2\theta = 14,46^\circ$, $15,60^\circ$, $19,35^\circ$, $22,14^\circ$, $25,60^\circ$, $28,02^\circ$ e $31,30^\circ$, além de outros picos secundários confirmando a natureza cristalina do fármaco, visualizada também por FEG-SEM.

Figura 18 – Difratoograma da piperina pura

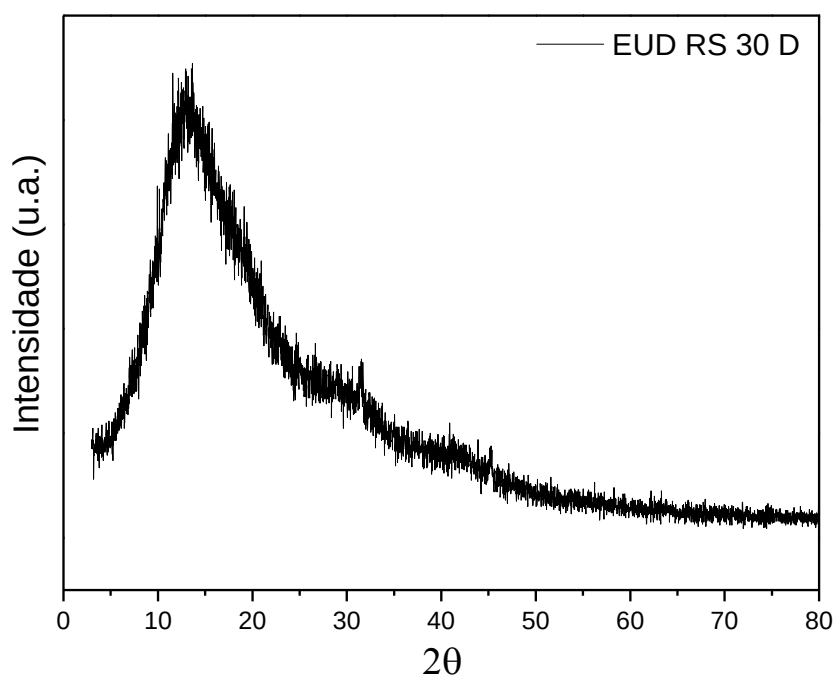


Fonte: A autora (2018)

Os polímeros não apresentaram picos de cristalinidade bem definidos (Figura 19 e 20) sendo semelhante ao encontrado na literatura (FARAGO, 2007).

Ghaffari et al. (2007) encontrou alguns picos no difratograma do Eudragit[®] RS 30 D em $2\theta = 36,4^\circ$ e $42,3^\circ$, contudo afirma que o mesmo pode ser considerado amorfo e que não apresentou qualquer pico característico em seu padrão de difração, sendo insignificante o percentual de cristalinidade encontrado em seu difratograma, o que foi confirmado na Figura 19.

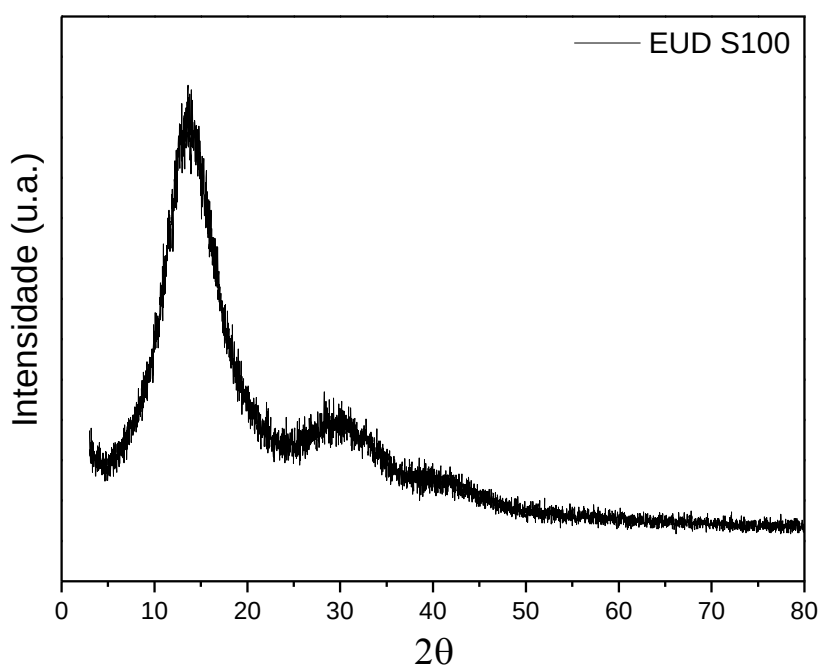
Figura 19 – Difratoograma do polímero Eudragit® RS30D



Fonte: A autora (2018)

Assim como o RS30D, o polímero S100 exibiu picos no difratograma que confirmam sua natureza amorfa, com baixa intensidade, sendo o resultado encontrado compatível com literatura (HIGASHI et al., 2015; MITHU et al., 2017)

Figura 20 – Difratoograma do polímero Eudragit® S100



Fonte: A autora (2018)

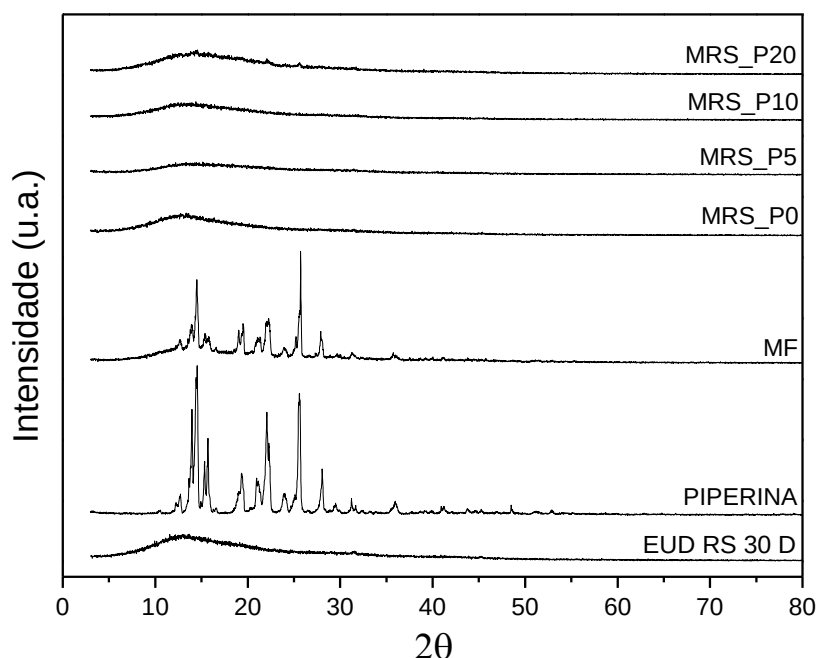
Nos difratogramas das misturas físicas, (Figura 21 e 22), pode-se observar picos em $2\theta = 14,46^\circ$ e $19,6^\circ$, indicando a presença de fármaco na forma cristalina.

As micropartículas sem fármaco apresentaram caráter amorfo, semelhante aos respectivos polímeros, como pode ser visto nos difratogramas (Figura 21 e 22).

A redução na intensidade dos picos de cristalinidade indica aumento da amorfização do fármaco no produto obtido pelo spray-dryer e tem sido observado que um aumento na quantidade de polímero nas formulações tem resultado um decréscimo na cristalinidade para todas as composições fármaco/ polímero (MITHU et al., 2017).

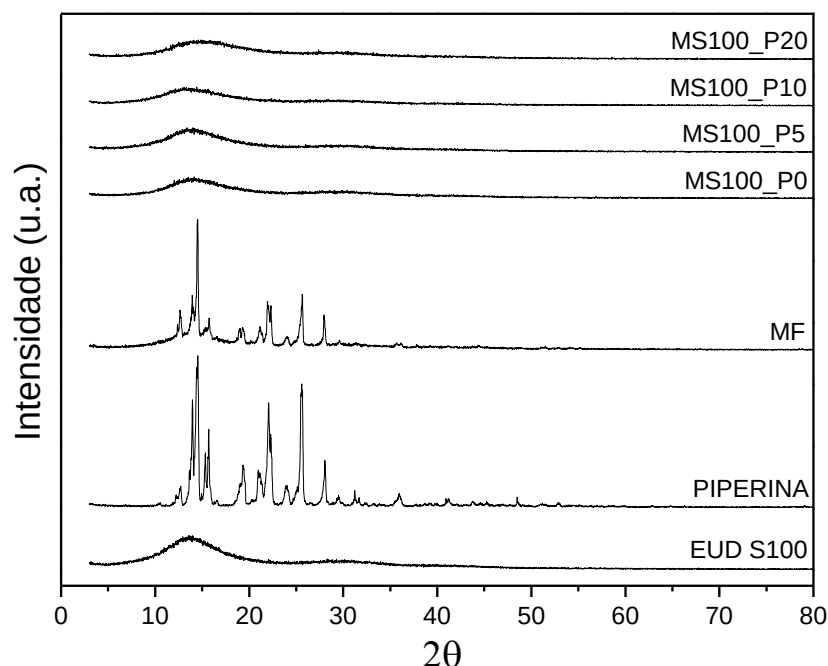
Pode-se observar que a PIP em seu estado cristalino foi transformada em estado amorfo pelo processo de secagem por aspersão tanto com o polímero S100 quanto com o RS30D. As micropartículas carregadas com PIP, (Figura 21 e 22), apresentaram ausência dos picos de cristalinidade, sugerindo amorfização do fármaco durante o processo de encapsulação. Este resultado indica que uma dispersão sólida amorfa foi formada.

Figura 21 – Difratograma do polímero Eudragit[®] RS30D (EUD RS30D), da piperina pura, da mistura física (MF) e das micropartículas MRS_P0, MRS_P10 e MRS_P20



Fonte: A autora (2018)

Figura 22 – Difratoograma do polímero Eudragit® S100 (EUD S100), da piperina pura, da mistura física (MF) e das micropartículas MS100_P0, MS100_P10 e MS100_P20



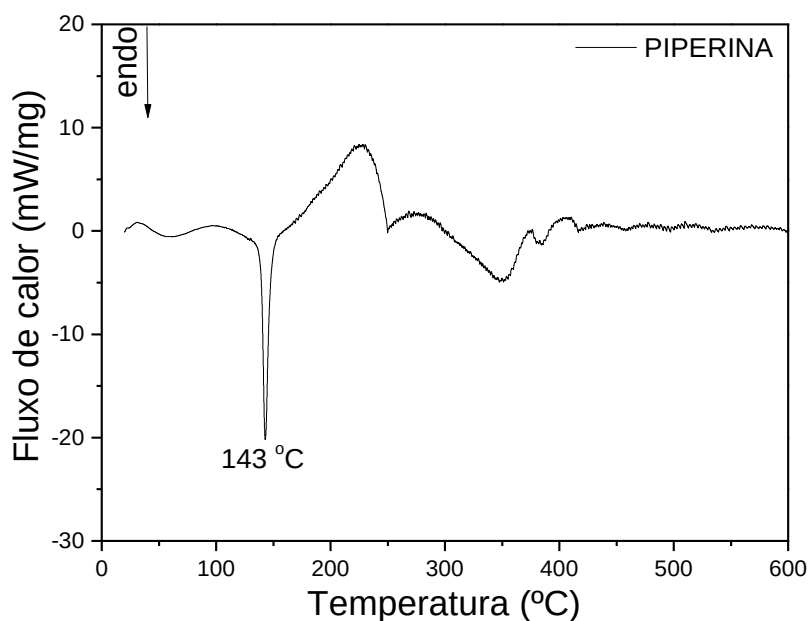
Fonte: A autora (2018)

5.1.8 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A técnica é uma ferramenta analítica eficaz para caracterizar as propriedades físicas de um polímero, envolve aquecimento da amostra e medida subsequente da temperatura e da energia associadas a uma série de eventos térmicos, incluindo fusão, cristalização, transição vítrea e reações de decomposição (SCHICK, 2009). Esta análise foi empregada às micropartículas elaboradas em etanol:água (50:50, v/v) a fim de avaliar a possível amorfização ou degradação do fármaco decorrente do processo de encapsulação.

A PIP pura exibiu um pico agudo endotérmico em torno de 143 °C, como mostra a Figura 23. O resultado obtido apresenta-se similar aos encontrados na literatura, 131,66 °C (SWAPNA et al., 2012), 131,73 °C (ALSHEHRI; HAQ; SHAKEEL, 2018), 135 °C (ASHOUR et al., 2016), 131,8 °C (DAHIYA et al., 2018), valores que são atribuídos para o pico referente ao processo de fusão do fármaco.

Figura 23 – Termograma obtido por DSC para a piperina pura

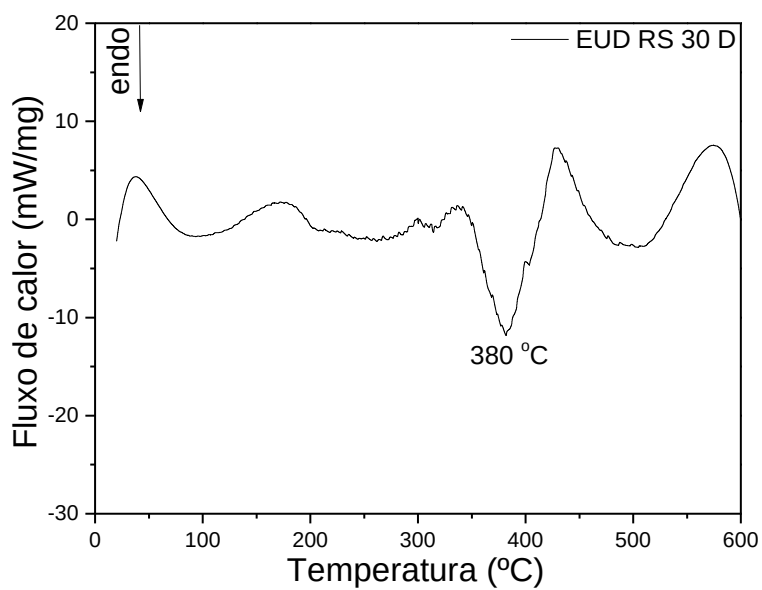


Fonte: A autora (2018)

Ambos os polímeros apresentaram pico endotérmico em 70 °C, condizente com o encontrado por Raffin et al. (2007a) em 69 °C.

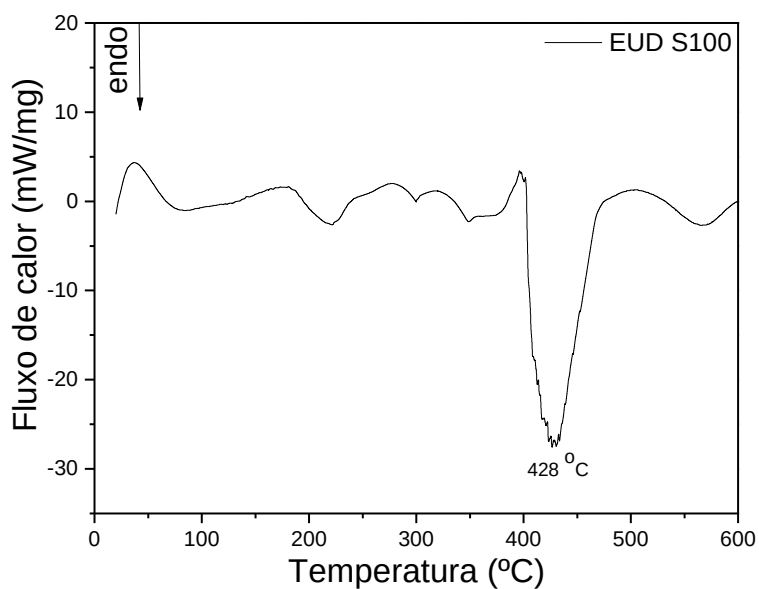
O pico referente à decomposição térmica do RS30D foi de 380 °C (BUNHAK et al., 2015) e 380,4 °C (KHUATHAN; PONGJANYAKUL, 2014), compatível com o resultado obtido de 380 °C (Figura 24). A degradação térmica referente ao polímero S100 ocorreu a 428 °C (Figura 25).

Figura 24 – Termograma obtido por DSC para o polímero Eudragit® RS30D



Fonte: A autora (2018)

Figura 25 – Termograma obtido por DSC para o polímero Eudragit® S100

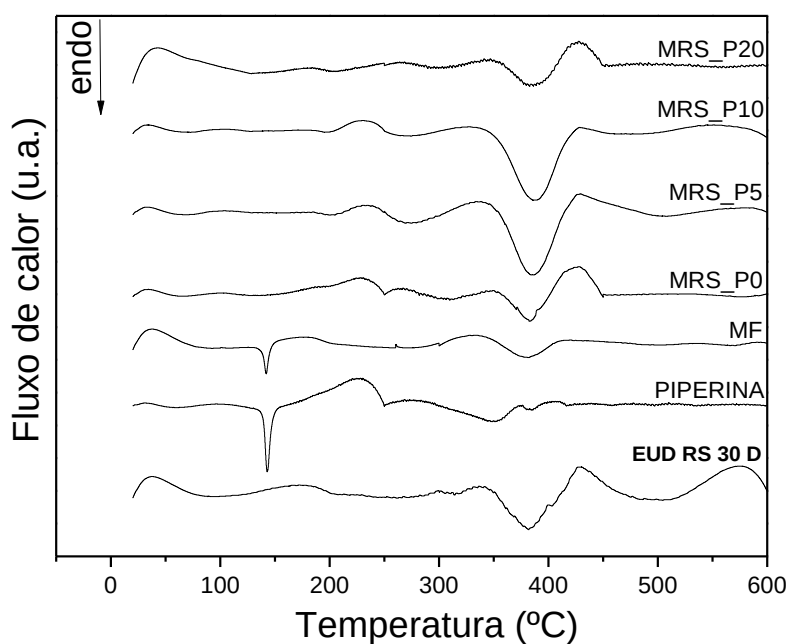


Fonte: A autora (2018)

As misturas físicas também apresentaram o pico endotérmico referente ao fármaco, em torno de 143 °C, embora em menor intensidade. As curvas mostram características tanto do fármaco quanto do polímero (Figura 26 e 27).

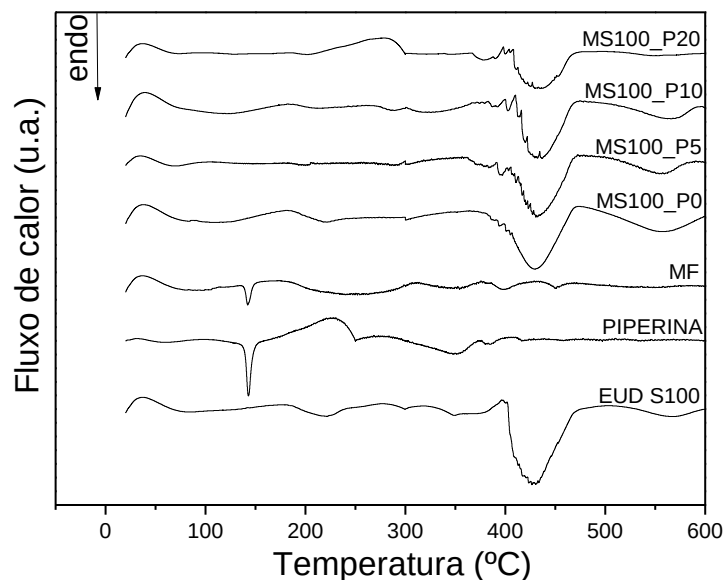
As micropartículas sem fármaco apresentaram curvas semelhantes a dos polímeros utilizados, demonstrando que a metodologia utilizada para obtenção do produto, o spray-dryer, não altera suas características. Nas micropartículas carregadas com PIP, o pico de fusão do fármaco não foi observado, sugerindo possível amorfização (Figura 26 e 27) (GOMES et al., 2015b; MADHUSUDHAN et al., 2012).

Figura 26 – Termogramas obtidos por DSC do polímero Eudragit® RS30D (EUD RS30D), da piperina pura, da mistura física (MF) e das micropartículas MRS_P0, MRS_P10 e MRS_P20



Fonte: A autora (2018)

Figura 27 – Termogramas obtidos por DSC do polímero Eudragit® S100 (EUD S100), da piperina pura, da mistura física (MF) e das micropartículas MS100_P0, MS100_P10 e MS100_P20



Fonte: A autora (2018)

5.1.9 Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas são utilizadas para avaliar as propriedades térmicas dos materiais e sua estabilidade, onde o parâmetro medido é massa e sua variação em função da temperatura. Os polímeros apresentam um decaimento em sua massa entre 350 °C – 460 °C, resultado de mudanças estruturais, que ocorrem quando são submetidos a um tratamento térmico (FAYAD, 2010).

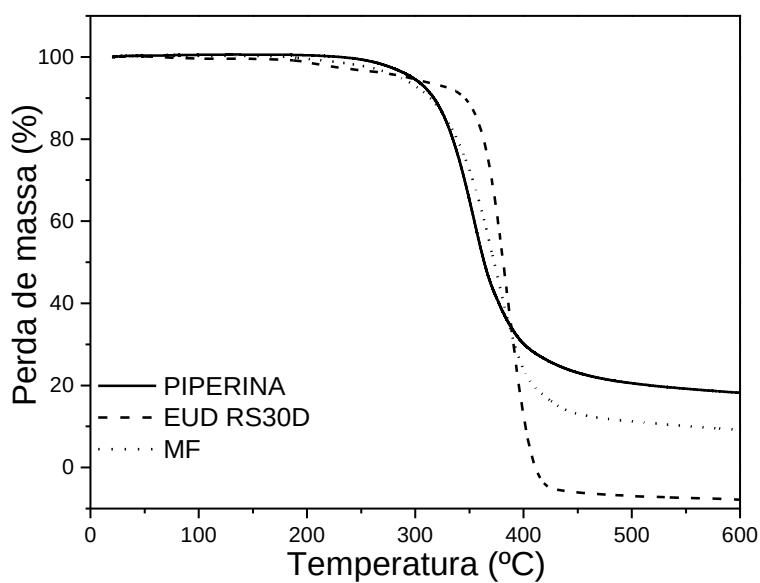
O RS30D apresentou decaimento em torno de 350 °C, como demonstrado por Ghaffari et al., (2007), onde nenhum evento térmico ocorreu até 300 °C e sendo o primeiro evento com taxa máxima em 354 °C; e por Bunhak et al., (2015), com principal etapa de degradação térmica entre 327 °C a 440 °C.

Em relação à curva de S100 pode-se afirmar que o polímero apresentou um evento de perda de massa entre 350 °C e 450 °C, com perda máxima de massa próxima a temperatura de 400 °C.

A curva termogravimétrica da PIP (Figuras 28 e 29) apresenta um processo de decomposição térmica em torno de 260 °C, que se encontra entre os valores de 250 °C (DAHIYA et al., 2018) e 297 °C (ALSHEHRI; HAQ; SHAKEEL, 2018).

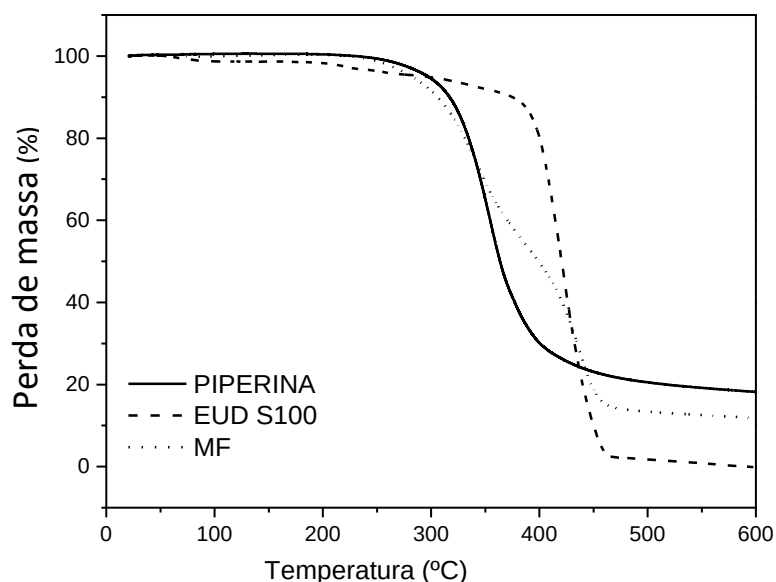
As misturas físicas apresentaram dois eventos, além da perda de água, um entre 230 °C – 300 °C referente à fusão do fármaco e outro entre 350 – 460 °C, referente à fusão do polímero (Figuras 28 e 29).

Figura 28 – Curvas termogravimétricas da piperina pura, do polímero Eudragit® RS30D e da mistura física Eudragit® RS30D:piperina (MF)



Fonte: A autora (2018)

Figura 29 – Curvas termogravimétricas da piperina pura, do polímero Eudragit® S100 e da mistura física EUD S100:piperina (MF)

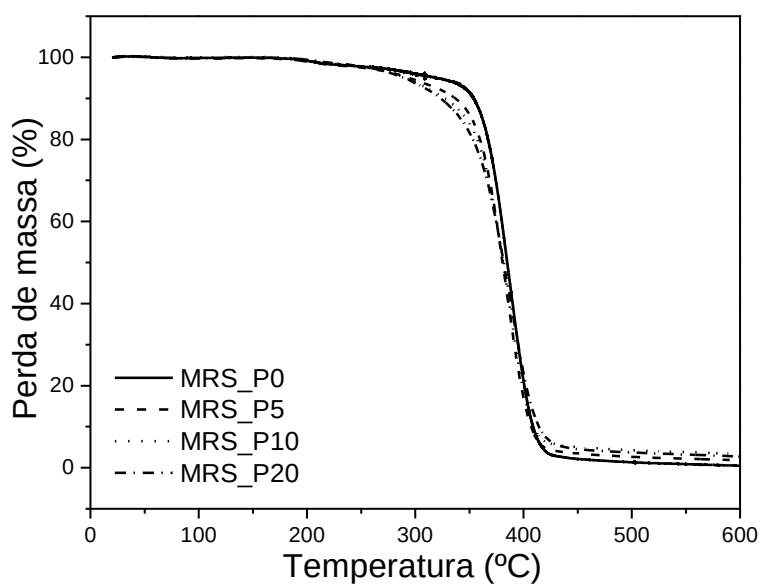


Fonte: A autora (2018)

A produção das micropartículas pelo processo de secagem por aspersão não interferiu na estabilidade térmica do fármaco, visto que as micropartículas apresentaram o Δm referente à perda de água, um decaimento entre 230 °C a 300 °C, que condiz com a fusão do fármaco e outro decaimento, entre 350 °C – 460 °C referente à fusão do polímero que pode ser observado nas Figuras 30 e 31.

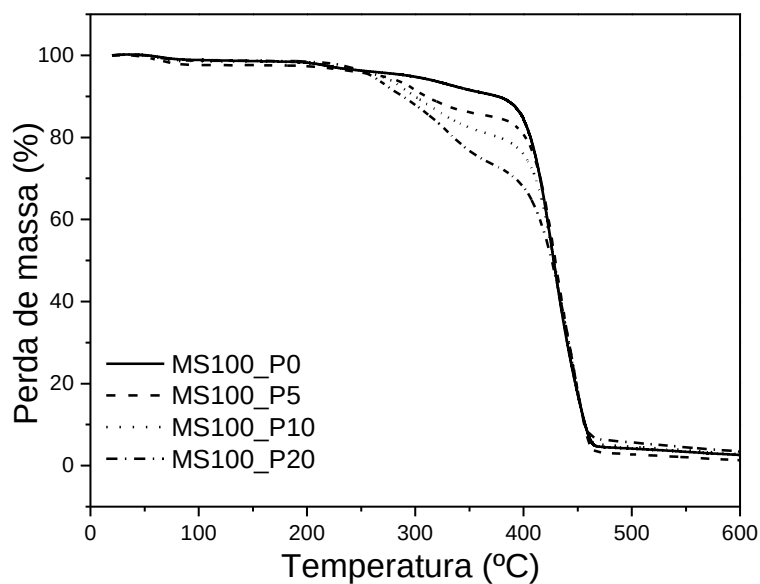
As micropartículas sem fármaco apresentaram apenas um decaimento, entre 350 °C – 460 °C, além da perda de água, condizente com o valor encontrado para a fusão dos polímeros (Figuras 30 e 31).

Figura 30 – Curvas termogravimétricas das micropartículas MRS_P0, MRS_P5, MRS_P10 e MRS_P20



Fonte: A autora (2018)

Figura 31 – Curvas termogravimétricas das micropartículas MS100_P0, MS100_P5, MS100_P10 e MS100_P20



Fonte: A autora (2018)

Os termogramas mostram uma primeira variação de massa até 100 °C, referente à perda de água; uma segunda variação indicativa do decaimento do fármaco; e uma terceira

variação relativa ao decaimento do polímero, sugerindo a estabilidade dos produtos da formulação após processo de obtenção.

6 CONCLUSÃO

As micropartículas poliméricas contendo PIP obtidas apresentaram morfologia, tamanho, teor de fármaco, rendimento e umidade adequados.

O método analítico de cromatografia líquida de ultra eficiência demonstrou ser um método simples, específico, linear, preciso, exato e robusto, com picos bem definidos e de boa resolução, representando uma boa alternativa na rotina laboratorial para análise do fármaco.

Com o espectro FTIR pode-se concluir que a formação das micropartículas não alterou quimicamente as estruturas dos componentes iniciais e o processo de obtenção das micropartículas promoveu a amorfização do fármaco, fato comprovado pelos estudos de FEG-SEM, DRX, DSC e TG.

A micropartícula MRS_P10 apresentou melhores resultados quando avaliada a eficiência de encapsulação do fármaco.

Assim podemos concluir que as micropartículas poliméricas contendo piperina foram obtidas com êxito para a liberação modificada do fármaco, sugerindo sua utilização no tratamento da obesidade com possível redução dos efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. A. *et al.* Enhanced gastric tolerability and improved anti-obesity effect of capsaicinoids-loaded PCL microparticles. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 40, p. 345-356, 2014.
- ALSHEHRI, S.; HAQ, N.; SHAKEEL, F. Solubility, molecular interactions and mixing thermodynamic properties of piperine in various pure solvents at different temperatures. **Journal of Molecular Liquids**, v. 250, p. 63-70, 2018.
- AMMAR, N. M. *et al.* Serum metabolomics reveals the mechanistic role of functional foods and exercise for obesity management in rats. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 142, p. 91-101, 2017.
- ARCARO, C. A. *et al.* Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e113993, 2014.
- ASHOUR, E. A. *et al.* Hot melt extrusion as an approach to improve solubility, permeability and oral absorption of a psychoactive natural product, piperine. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 68, n. 8, p. 989-998, 2016.
- BALAJI, M. *et al.* A review on possible therapeutic targets to contain obesity: The role of phytochemicals. **Obesity research & clinical practice**, v. 10, n. 4, p. 363-380, 2016.
- BARCELOUX, D. G. Pepper and capsaicin (*Capsicum* and *Piper* species). **Disease-a-month : DM**, v. 55, n. 6, p. 380-390, 2009.
- BASPINAR, Y. *et al.* Curcumin and piperine loaded zein-chitosan nanoparticles: Development and in-vitro characterisation. **Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 26, n. 3, p. 323-334, 2018.
- BECAK, Willy. JORGE PAULETE. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976.
- BECK-BROICHSITTER, M.; STREHLOW, B.; KISSEL, T. Direct fractionation of spray-dried polymeric microparticles by inertial impaction. **Powder Technology**, v. 286, p. 311-317, 2015.
- BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol*:40:527-8. 1968.
- BISCHOFF, S. C. *et al.* Towards a multidisciplinary approach to understand and manage obesity and related diseases. **Clinical nutrition**, v. 36, n. 4, p. 917-938, 2017.
- BRAHMANAIDU, P. *et al.* Mitigating efficacy of piperine in the physiological derangements of high fat diet induced obesity in Sprague Dawley rats. **Chemico-biological interactions**, v. 221, p. 42-51, 2014.
- BRASIL. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Aprova “Critérios para a validação de métodos analíticos”**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de

Vigilância Sanitária. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 08 de agosto de 2017.

BUNHAK, É. J. *et al.* Physicochemical Analyses of Modified Chondroitin Sulfate Biofilms. **Química Nova**, 2015.

CHOI, S. *et al.* Piperine reverses high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice. **Food chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3627-3635, 2013.

CICERO, A. F.; COLLETTI, A. Role of phytochemicals in the management of metabolic syndrome. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 23, n. 11, p. 1134-1144, 2016.

COLOMÉ L.M. *et al.* Pantoprazole-loaded Eudragit blended microparticles: preparation, characterization, in vitro gastro-resistance and in vivo anti-ulcer evaluation. **J. Drug Del. Sci. Tech.**, v. 17, n.2, p. 113-118, 2007

COSTA, M. D. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas incrementadores de dissolução de efavirenz**. 2011. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

CRUZ, L. *et al.* Gastroresistant microparticles containing sodium alendronate prevent the bone loss in ovariectomized rats. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 441-447, 2010.

DAHIYA, S. *et al.* Conjugation of epigallocatechin gallate and piperine into a zein nanocarrier: implication on antioxidant and anticancer potential. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 3, p. 035011, 2018.

DE ARCE VELASQUEZ, A. *et al.* Novel Pullulan-Eudragit(R) S100 blend microparticles for oral delivery of risedronate: formulation, in vitro evaluation and tableting of blend microparticles. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 38, p. 212-217, 2014.

ESPOSITO, E. *et al.* Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1, p.329-334, 2002.

EZAWA, T. *et al.* Changes in the Physicochemical Properties of Piperine/beta-Cyclodextrin due to the Formation of Inclusion Complexes. **International journal of medicinal chemistry**, v. 2016, p. 8723139, 2016.

FAYAD, S. J. **Obtenção e caracterização de micro e nanopartículas a base de proteína isolada de soja**. 2010. 106.f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.

FARAGO, P. V. **Desenvolvimento de sistemas poliméricos para a liberação modificada do cloridrato de metformina**. 2007. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

GHAFFARI, A. *et al.* Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit RS intended for sigmoidal drug delivery. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 67, n. 1, p. 175-186, 2007.

GOMES, M. L. S. et al. A Simple RP-HPLC/UV Method for Determination of Cilostazol in Polymeric Nanoparticles Suspensions: Development and Validation. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 4, p.803-809, 2015a.

GOMES, T. A. et al. Estratégias utilizadas para o incremento da solubilidade do fármaco antiretroviral classe II: Efavirenz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p.239-249, 2015b.

GONZALEZ-CASTEJON, M.; RODRIGUEZ-CASADO, A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: a review. **Pharmacological research**, v. 64, n. 5, p. 438-455, 2011.

GOVINDARAJAN, V. S.; SATHYANARAYANA, M. N. Capsicum--production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 29, n. 6, p. 435-474, 1991.

HADAD, G. M.; EMARA, S.; MAHMOUD, W. M. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of paracetamol with dantrolene or/and cetirizine and pseudoephedrine in two pharmaceutical dosage forms. **Talanta**, v. 79, n. 5, p.1360-1367, 2009.

HEGAZY, N.; DEMIREL, M. Z.; YAZAN, Y. Preparation and in vitro evaluation of pyridostigmine bromide microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1, p.171-174, 2002.

HIGASHI, K. et al. The effect of drug and EUDRAGIT(R) S 100 miscibility in solid dispersions on the drug and polymer dissolution rate. **International journal of pharmaceutics**, v. 494, n. 1, p. 9-16, 2015.

ICH. International Conference on the Harmonisation of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use guideline, **Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1)**, v. 1, 2005.

INFORME Técnico: Darmstadt; Germany: **EVONIK Rohm GmbH**. Disponível em: <www.rofarma.com/allegati/97.pdf>. Acesso em: 31 maio 2018.

JINCHENG, W.; SIHAO, C. Preparation and Characterization of Microcapsules containing Capsaicin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, p.2234–2241, 2010.

KAROLEWICZ, B. A review of polymers as multifunctional excipients in drug dosage form technology. **Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 24, n. 5, p. 525-536, 2016.

KAWABATA, Y. et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p.1-10, 2011.

KHUATHAN, N.; PONGJANYAKUL, T. Modification of quaternary polymethacrylate films using sodium alginate: film characterization and drug permeability. **International journal of pharmaceutics**, v. 460, n. 1-2, p. 63-72, 2014.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; DE MELLO, J. C. P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). **Talanta**, v. 88, p.502-506, 2012.

KIM, K. J. *et al.* Piperidine alkaloids from *Piper retrofractum* Vahl. protect against high-fat diet-induced obesity by regulating lipid metabolism and activating AMP-activated protein kinase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 411, n. 1, p. 219-225, 2011.

KULKARNI, N. B.; NAIK, P. S. W. J. B. Metformin hydrochloride microparticles for oral controlled release: Effect of formulation variables. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, 2013.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. **International journal of pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 26-39, 2008.

LIU, W.; CHEN, X. D.; SELOMULYA, C. On the spray drying of uniform functional microparticles. **Particuology**, v. 22, p. 1-12, 2015.

MADHUSUDHAN, A. *et al.* Design and evaluation of Efavirenz loaded solid lipid nanoparticles to improve the oral bioavailability. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 4, p.84-89, 2012.

MAINARDES, M. M. Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina. 133 p. **Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara**, 2007.

MANO, E. B.; MENDES L.C. **Introdução a polímeros** - 2. ed. rev. e ampl.. São Paulo: Edgard Blucher, 2004.

MENDES, J. B. E. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas poliméricas contendo resveratrol**. 2011. 88.f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, 2011.

MITHU, S. H. *et al.* Evaluation of the surface chemistry and drug-polymer interaction of semi-crystalline micro-particles for the development of controlled release formulations. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 76, p. 559-567, 2017.

MOPURI, R.; ISLAM, M. S. Medicinal plants and phytochemicals with anti-obesogenic potentials: A review. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 89, p. 1442-1452, 2017.

MORAES C., DAVEL A.P., ROSSONI L.V., ANTUNES E., ZANESCO A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physiol**, v.29, n.8, p. 8-12, 2008.

MOORTHY, C. *et al.* Preparation and characterization of curcumin–piperine dual drug loaded nanoparticles. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 11, p. 841-848, 2012.

MOORTHY, C. *et al.* Application of validated RP–HPLC–PDA method for the simultaneous estimation of curcumin and piperine in Eudragit E 100 nanoparticles. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 3, p. 224-229, 2013

NASCIMENTO A.F., SUGIZAKI M.M., LEOPOLDO A.S., LIMA-LEOPOLDO A.P., LUVIZOTTO R.A., NOGUEIRA C.R., *et al.* A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in wistar rats. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.52, n.6, p 968-74, 2008.

NOGARA, L. *et al.* Piperine's mitigation of obesity and diabetes can be explained by its up-regulation of the metabolic rate of resting muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 46, p. 13009-13014, 2016.

PACHAURI, M.; GUPTA, E. D.; GHOSH, P. C. Piperine loaded PEG-PLGA nanoparticles: Preparation, characterization and targeted delivery for adjuvant breast cancer chemotherapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 29, p. 269-282, 2015.

PADALKAR, K. V.; GAIKAR, V. G. Extraction of Piperine from *Piper Nigrum* (Black Pepper) by Aqueous Solutions of Surfactant and Surfactant + Hydrotrope Mixtures. **Separation Science and Technology**, v. 43, n. 11-12, p. 3097-3118, 2008.

PATEL, B. B. *et al.* Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement. **Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 23, n. 4, p. 352-365, 2015.

PATRA, C. N. *et al.* Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 33-45, 2017.

PENGPONG, T. *et al.* Design, synthesis and in vitro evaluation of mucoadhesive p-coumarate-thiolated-chitosan as a hydrophobic drug carriers. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 86, n. 3, p. 487-497, 2014.

PENTAK, D. In vitro spectroscopic study of piperine-encapsulated nanosize liposomes. **European biophysics journal : EBJ**, v. 45, n. 2, p. 175-186, 2016.

PEREIRA L.O., FRANCISCHI R. P., LANCHETA JR. A.H.. Obesidade: Causas e Consequências. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, vol 47, nº 2, Abril, 2003.

PORRAS-SAAVEDRA, J. *et al.* Microstructural properties and distribution of components in microparticles obtained by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, v. 152, p. 105-112, 2015.

RAFFIN, R. *et al.* Development of HPMC and Eudragit S100[®] blended microparticles containing sodium pantoprazole. **Pharmazie**, v. 62, n. 5, p.361-364, 2007a.

RATTES, A. L. R.; OLIVEIRA, W. P. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. **Powder Technology**, v. 171, n. 1, p. 7-14, 2007.

RESTANI, R. B.; CORREIA, V. G.; BONIFÁCIO, V. D. B.; AGUIAR-RICARDO, A. Development of functional mesoporous microparticles for controlled drug delivery. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 333-339, 2010.

RIEKES, M. K. P. et al. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 5, p.962-968, 2011.

ROLAND, R. M.; BHAWANI, S. A. Synthesis and Characterization of Molecular Imprinting Polymer Microspheres of Piperine: Extraction of Piperine from Spiked Urine. **Journal of analytical methods in chemistry**, v. 2016, p. 5671507, 2016.

RUPASINGHE, H. P. *et al.* Phytochemicals in regulating fatty acid beta-oxidation: Potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss. **Pharmacology & therapeutics**, v. 165, p. 153-163, 2016.

SA-BARRETO, L. C. *et al.* SEM-image textural features and drug release behavior of Eudragit-based matrix pellets. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 42, p. 292-298, 2017.

SAHA,K.C.; SEAL, H.P.; NOOR,M.A. Isolation and characterization of piperine from the fruits of black pepper (*Piper nigrum*). **J. Bangladesh Agril. Univ.**, 11(1): 11–16, 2013.

SAITO, M.; YONESHIO, T.; MATSUSHITA, M. Food Ingredients as Anti-Obesity Agents. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 26, n. 11, p. 585-587, 2015.

SCHAFROTH, N. *et al.* Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 90, p. 8-15, 2012.

SCHICK, C. Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 395, n. 6, p. 1589-1611, 2009.

SHAHANI, K.; PANYAM, J. Highly loaded, sustained-release microparticles of curcumin for chemoprevention. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 7, p. 2599-2609, 2011.

SHAO, B. *et al.* Enhanced oral bioavailability of piperine by self-emulsifying drug delivery systems: in vitro, in vivo and in situ intestinal permeability studies. **Drug delivery**, v. 22, n. 6, p. 740-747, 2015.

SOLAS, M. *et al.* Precision Obesity Treatments Including Pharmacogenetic and Nutrigenetic Approaches. **Trends in pharmacological sciences**, v. 37, n. 7, p. 575-593, 2016.

SOSNIK, A.; SEREMETA, K. P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 223, p.40-54, 2015.

SWAPNA, D.P.R. Isolation, identification and antimycobacterial evaluation of piperine from *Piper longum*. **Der Pharmacia Lettre**, v.4 (3), p. 863-868, 2012.

TOMY, M. J. *et al.* Derivatives form better lipoxygenase inhibitors than piperine: in vitro and in silico study. **Chemical biology & drug design**, v. 85, n. 6, p. 715-721, 2015.

VASAVIRAMA K., UPENDER M. Piperine: a valuable alkaloid from piper species. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.4, p 34-38, 2014.

VINOD K.R.; SANTHOSHA D.; ANBAZHAGAN. S. Formulation and evaluation of piperine cream-a new herbal dimensional approach for vitiligo patients. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, vol 3, p.29-33, 2011.

VYAS, J. *et al.* Development of HPTLC method for estimation of piperine, guggulsterone E and Z in polyherbal formulation. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, n. 6, p. 259-264, 2013.

WALTON, D. The morphology of spray-dried particles a qualitative view. **Drying Technology**, v. 18, n. 9, p.1943-1986, 2000.

WANDERLEY E. N., FERREIRA V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, n.1, p 185-194, 2010.

WANG, L. *et al.* Piperine inhibits ABCA1 degradation and promotes cholesterol efflux from THP-1-derived macrophages. **Molecular nutrition & food research**, v. 61, n. 4, 2017.

WANG, Y. *et al.* Investigation of nanocarriers and excipients for preparation of nanoembedded microparticles. **International journal of pharmaceuticals**, v. 526, n. 1-2, p. 300-308, 2017.

WILLIAMS, D. J. *et al.* Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 323-333, 2013.

WU, C.; MCGINITY, J.W. Influence of Ibuprofen as a solid-state plasticizer in Eudragit® RS30D on the physicochemical properties of coated beads. **AAPS PharmSciTech**, v. 2, n. 4, article 24, p. 1-9, 2001.

ZHU, C. *et al.* Comparative studies on exenatide-loaded poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) microparticles prepared by a novel ultra-fine particle processing system and spray drying. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 132, p. 103-110, 2015.