

ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DO EXTRATO DE GANODERMA LUCIDUM EM NANOCÁPSULAS

Mayara Thereza Felix SILVA¹; Silvia Maria Batista de SOUZA¹

mayaratfelixs@hotmail.com; souzasmb@femanet.com.br

¹Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA.

RESUMO:

Nano/microcápsulas são sistemas do tipo reservatório onde um invólucro polimérico é envolvido por um núcleo oleoso, a substância a ser encapsulada pode se alojar no interior da nanocápsula e/ou estar envolvida na cadeia polimérica. O cogumelo *ganoderma lucidum* pertence a família dos basidiomicetos e possui numerosos efeitos farmacológicos. O objetivo deste trabalho foi produzir nano/microcápsulas de PLA (ácido polilático)/PEG (polietileno glicol) e incorporação de extrato de ganoderma lucidum. As nanopartículas poliméricas foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado descrito utilizando PLA/PEG com e sem extrato de ganoderma lucidum. Ao microscópio óptico observou-se formação de agregados da ordem micro entre 8000-20000 nm. Pode-se concluir que a metodologia é viável para a formação de microcápsulas.

PALAVRAS-CHAVE: nanocápsulas, microcápsulas, *ganoderma lucidum*

ABSTRACT: Nano / microcapsules are of the reservoir type systems where a polymeric shell is surrounded by an oily core substance to be encapsulated can be housed inside the nanocapsule and / or be involved in the polymeric chain. *Ganoderma lucidum* Mushroom belongs to family of basidiomycetes and have numerous pharmacological effects. The objective of this work was to produce nano / microcapsules PLA (polylactic acid) / PEG (polyethylene glycol) and incorporation of *ganoderma lucidum* extract. The polymeric nanoparticles were prepared by interfacial deposition method of the preformed polymer described using PLA / PEG with and without *Ganoderma Lucidum*

extract. An optical microscope was observed formation of micro order aggregates between 8000-20000 nm. It can be concluded that the method is feasible for the formation of microcapsules.

KEYWORDS : nanocapsule, microcapsule, *ganoderma lucidum*

0. Introdução: As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o princípio ativo estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (SHAFFAZICK, 2003, p.727). São estruturas coloidais constituídas por vesículas de um fino invólucro de polímero biodegradável e uma cavidade central com núcleo oleoso, no qual a substância ativa encontra-se dissolvida, sendo, por isso, consideradas um sistema reservatório, o qual apresenta diâmetro submicrométrico, variando entre 10 a 1000 nm (SCHMALTZ, 2005, p.83).

Um dos fatores limitantes ao uso de nanopartículas como sistemas de liberação controlada de fármaco é quanto a sua estabilidade. Durante o armazenamento pode ocorrer agregação das nanopartículas resultando em sua precipitação. Estes problemas podem ser contornados por técnicas de secagem da suspensão coloidal tais como a liofilização e a secagem por aspersão. O objetivo deste trabalho teve por objetivo nanocápsulas de PLA (ácido polilático) e incorporação de extrato de ganoderma lucidum.

1.Fundamentação Teórica: A técnica de liberação controlada tem-se destacado nos últimos anos devido entre outros fatores a diminuição de dosagem do princípio ativo. Atualmente, sistemas de liberação controlada, tem sido aplicados em diversas áreas tais como em ciência cosmética e farmacêutica. Dentre os sistemas de liberação controlada cita-se os lipossomas, as nanoesferas, as nano e microcápsulas.

Lipossomas (figura 1) são vesículas microscópicas formada por bicamada lipídica concêntricas. Os lipossomas podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, as primeiras ficam concentradas no núcleo aquoso interno e as lipofílicas adsorvidas entre a cauda apolar dos surfactante. Os lipossomas ainda podem conter uma única bicamada lipídica e assim classificados como unilamelares ou possuírem múltiplas bicamadas e assim classificados como multilameares (CHORILLI, et al, 2004, p.76)

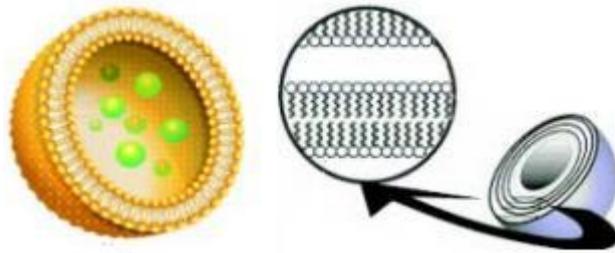


Figura 1: Estrutura de lipossomas unicelular e multicelular (In: CHORILLI; OLIVEIRA; SCARPA, 2004, p. 76).

Em liberação controlada é comum classificar as nanopartículas como sendo partículas com um diâmetro inferior a $1\mu\text{m}$ (1000nm) e micropartículas como sendo partículas com um diâmetro entre $1\mu\text{m}$ a $1000\mu\text{m}$ (10^6 nm) (COIMBRA, 2010, p. 22). As nanopartículas podem ser classificadas de acordo com sua composição ou organização estrutural em nanocápsulas ou nanoesferas (figura 2).

Nano/microcápsulas são sistemas do tipo reservatório onde um invólucro polimérico é envolvido por um núcleo oleoso, a substância a ser encapsulada pode se alojar no interior da nanocápsula e/ou estar envolvida na cadeia polimérica. Em nano/microesferas não há núcleo oleoso e a substância ativa pode se encontrar solubilizada no núcleo ou disperso na matriz polimérica (SCHAFFAZICK et al, 2003, p. 730).

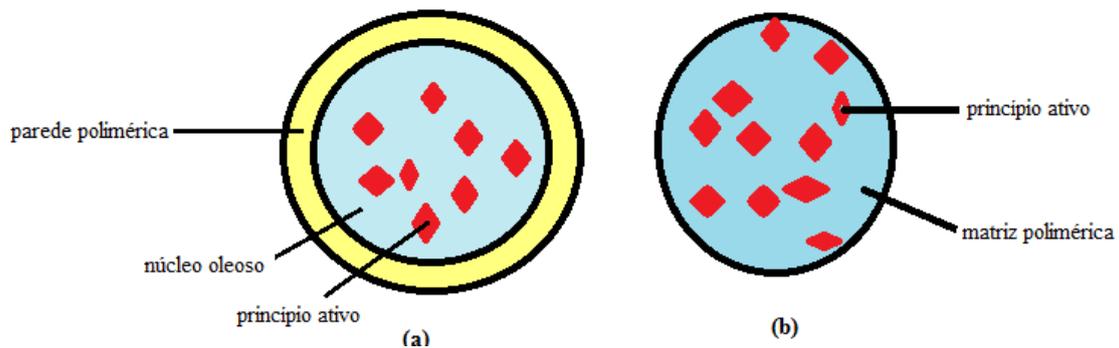


Figura 2: Desenho esquemático de nanocapsula (a) e nanoesfera (b)

O uso dos sistemas encapsulados possuem vantagens sobre o método tradicional para disponibilização de princípios ativos tais como proteger substâncias sensíveis à radiação da luz ultravioleta, sensíveis a variação de pH e proteger da degradação por temperatura acima de 40 °C (KÜLKAMP, et al, 2009, p. 2079).

Existem inúmeros métodos para obtenção das nanopartículas, que em geral podem ser classificados de duas formas: a primeira para obtenção das nanopartículas requer uma reação de polimerização (polimerização *in situ*) e a segunda utiliza um polímero pré-formado, como apresentado na figura 3 (JAGER, 2008, p. 12).

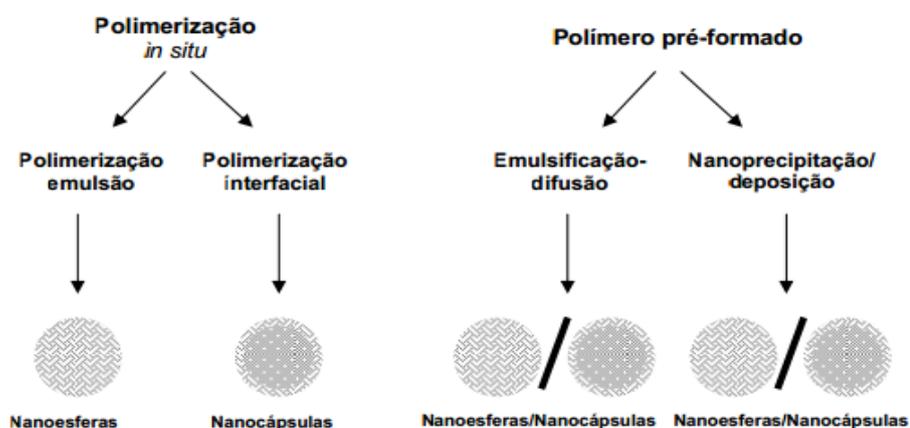


Figura 3: Representação esquemática de métodos de preparação de nanopartículas poliméricas (In: JAGER, 2008, p. 13)

Dentre as técnicas descritas para a preparação de nanopartículas, destaca-se o método descrito por Fessi et al. 1989, p.27 que se baseia na precipitação interfacial de polímeros pré-formados. A este método se dá o nome de precipitação de polímero pré-formado (JAGER, 2008, p. 15).

A precipitação de polímero pré-formado (figura 4) consiste na precipitação e formação de vesículas de tamanho coloidal, formadas por uma fase oleosa revestida por uma camada polimérica, em um ambiente aquoso (PEREIRA, 2006, p.21).

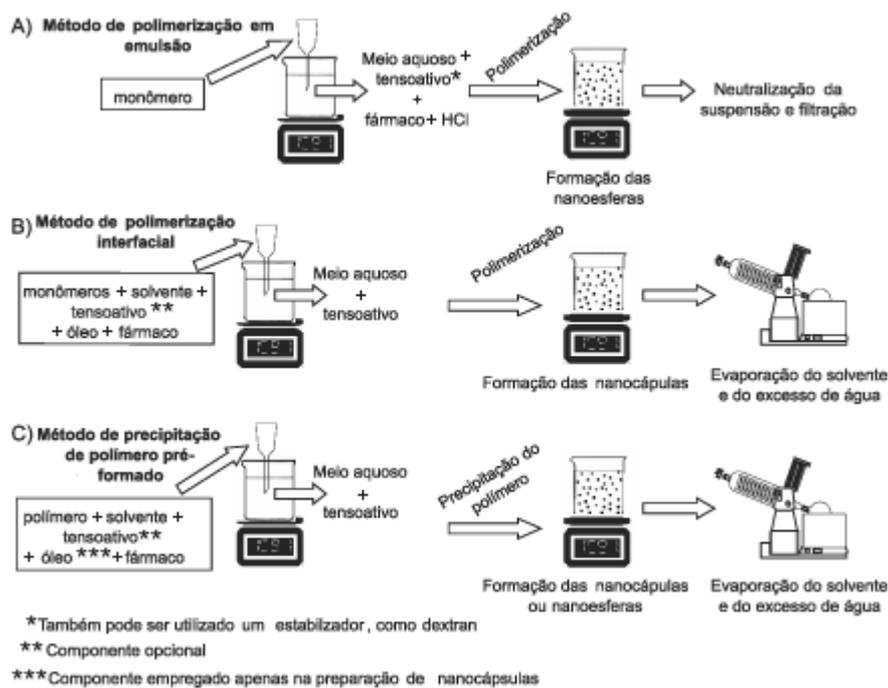


Figura 4: Métodos utilizados na preparação de nanopartículas poliméricas empregando monômeros dispersos ou polímeros pré-formados (In: SCHAFFAZICK et al., 2003, p.727)

No preparo de nanocápsulas, pelo método do polímero pré-formado, o polímero e o tensoativo lipofílico são dissolvidos em um solvente semipolar solúvel em água. Esta solução é vertida em uma solução aquosa que contém tensoativo, como o polissorbato 80, em agitação magnética (JAGER, 2008, p. 17). O princípio ativo a ser encapsulado deve ser solubilizado na fase orgânica, se houver caráter lipofílico ou na fase aquosa se houver caráter hidrofílico.

Após a mistura das duas fases, o polímero precipita na interface pela redução da sua solubilidade, uma vez que a difusão dos solventes favorece a formação de nanogotas de óleo que servirão como núcleo para o precipitado do polímero. Há o surgimento instantâneo de uma suspensão leitosa, que são as nano/microcápsulas. (SCHAFFAZICK, 2003, p.727).

Uma grande variedade de polímeros sintéticos, naturais e semi-sintéticos são investigados na produção de nano/micropartículas. Um requisito fundamental para que o polímero seja escolhido é que ele e os produtos de sua degradação sejam atóxicos e que sejam biocompatíveis. Outras propriedades importantes são quanto ao caráter hidrofílico/lipofílico e também se o polímero é biodegradável (COIMBRA, 2010).

Um dos polímeros utilizados em produção de nanopartículas poliméricas é o ácido polilático que é um polímero biodegradável. O ácido polilático (figura 5) é produzido por mecanismo que inclui a produção e o isolamento de um intermediário, dímero cíclico de ácido lático, seguido pela polimerização (AJIOKA et al, 1995, p. 226; KHAZIR E SHETTY, 2014, p. 37), como apresentado na figura 1.

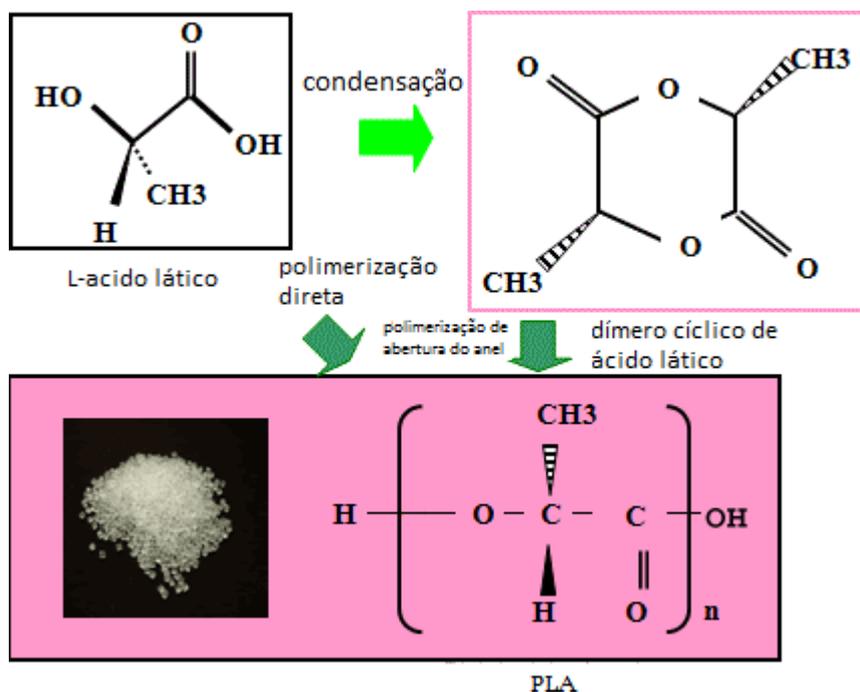


Figura 5: Processo de produção do PLA, (In: KHAZIR E SHETTY, 2014, p. 37)

O polietileno glicol (PEG) tem sido investigado como estabilizador estérico, isto provavelmente a maior flexibilidade de sua cadeia, ter caráter hidrofílico e neutralidade elétrica pela ausência de grupos funcionais em sua cadeia (MAINARDES, 2007, p. 20). GRANADA et al., 2007 observou uma melhora na disponibilidade terapêutica do fármaco camptotecina quando encapsulado em nanocápsula de PLA-PEG no efeito de células tumorais.

O cogumelo *ganoderma lucidum* pertence a família dos basidiomicetos e possui numerosos efeitos farmacológicos. Os constituintes farmacologicamente mais importantes são triterpenóides e polissacarídeos. Triterpenóides foram relatados possuir efeito hepatoprotetor, anti-hipertensivo anti-tumoral (BOH et al, 2007, 266). TAO E FENG, 1990, avaliaram o efeito da agregação plaquetária da *ganoderma lucidum* em pacientes com doença ateroscleróticas e concluíram que ser um agente inibidor das plaquetas e eficaz na agregação.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

- Poli(butileno adipato cotereftalato) (PBAT)
- Ácido Poli (D,L láctico) – (Natureworks – Cargill)
- Acetona P.A. (Dinâmica)
- Lecitina de soja (Armagistral)
- Triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico (Vital)
- Polissorbato 80 (Politecnico)
- Extrato alcoólico de *Ganoderma lucidum* (Juncal Brasil)
- Diestearato de polietilenoglicol 150, Mapric
- Água destilada
- Balança analítica (Marte, AX220)
- Agitador magnético (Tecnal, Te-085)
- Evaporador rotativo (Tecnal, Te-210)
- Microscópio (Opton, Tim 2005-B)
- Beker
- Funil
- Pipetas
- Provetas
- Bastão

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Obtenção da nanocápsula de PLA

A obtenção das nanocápsulas de PBAT ou PLA foi realizado pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI et al., 1989, p.27), envolvendo uma mistura de fase orgânica em outra mistura de fase aquosa. A fase orgânica foi constituída do polímero PBAT ou PLA (100 mg), acetona (30 ml), lecitina de soja (40 mg) e triglicerídeo de ácido cáprico e caprílico (200 mg) e diestearato de polietilenoglicol 150. A fase aquosa foi constituída de água destilada (30ml) e polissorbato 80 (60 mg).

Os componentes da fase orgânica e aquosa foram colocados separadamente em um béquer, mantidos em agitação constante a 40°C por uma hora e na temperatura de 30°C, a fase orgânica foi vertida da fase aquosa e manteve-se agitação por mais 10 minutos.

Esta mistura foi concentrada a 10 ml, em evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico.

2.2.2 Obtenção da nanocápsula PLA contendo extrato de *ganoderma lucidum*

Para a obtenção de nanocápsulas contendo extrato de *ganoderma lucidum*, realizou-se o procedimento descrito no item 2.2.1 adicionando-se o extrato alcoólico de *ganoderma lucidum* (40 mg) no fim do aquecimento da fase aquosa

3. Resultados e Discussão

As nanopartículas poliméricas foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. Foi obtido emulsões contendo o polímero PBAT, entretanto a emulsão mostrou-se instável, após 30 minutos ocorreu separação de fase (figura 6).

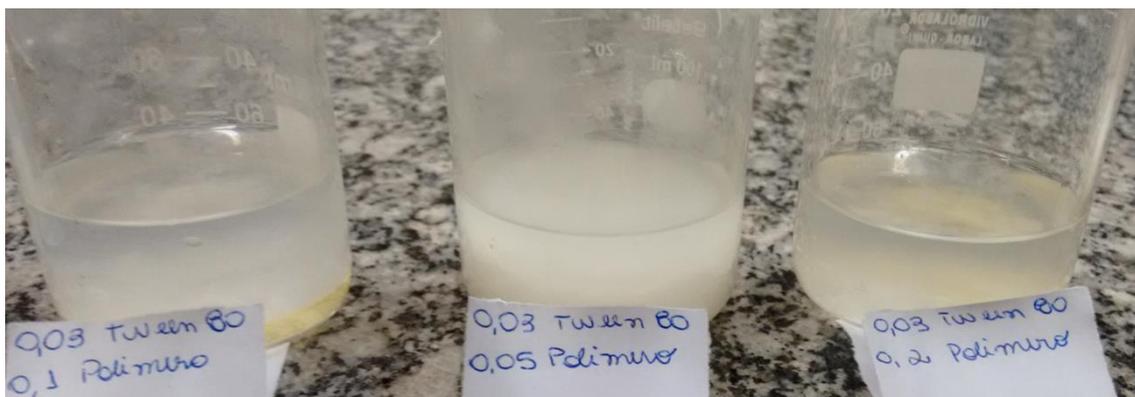


Figura 6: Emulsão contendo PBAT contendo 0,05g, 0,1g e 0,2g.

Foram produzidas emulsões com variações na concentração do polímero PLA. As emulsões realizadas com o polímero PLA mostrou-se homogênea na concentração de 0,03g de tween 80 e 0,2g de PLA, como apresentado nas figura 7.

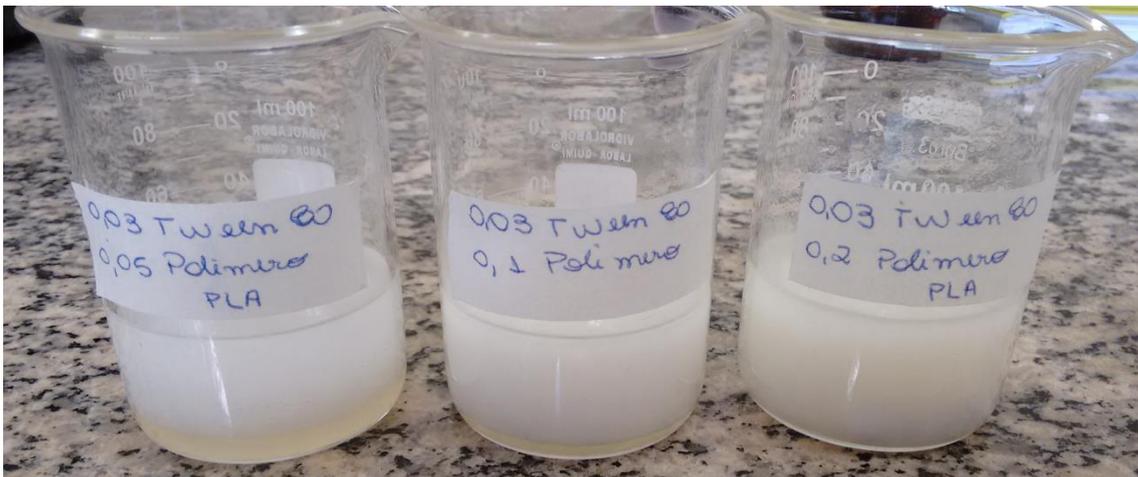


Figura 7: Emulsão contendo PLA contendo 0,05g, 0,1g e 0,2g.

A suspensão coloidal obtida com maior estabilidade foi a que continha 0,03g de tween 80 e 0,2 g de PLA esta suspensão foi analisada no microscópio com aumento de 400X e pode-se observar a formação de agregados indicando a formação de microcapsulas, figura 8.

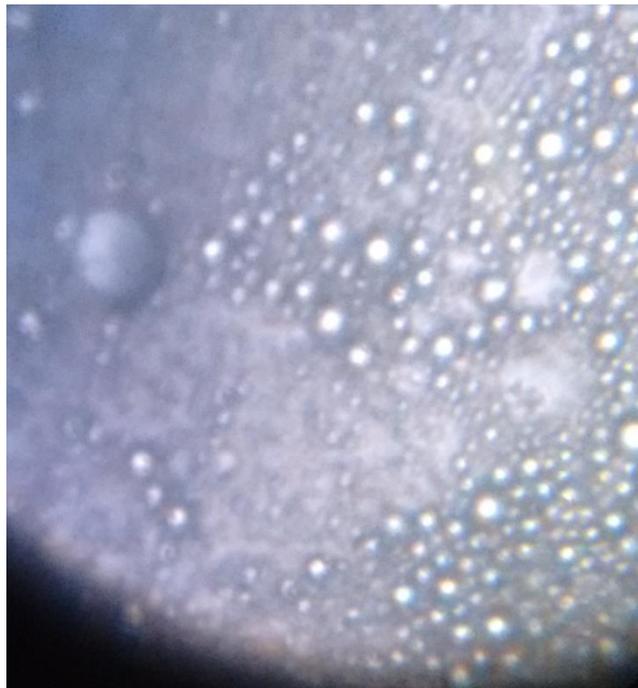


Figura 8: Suspensão das partículas ao microscópio. 400x.

Segundo MAINARDES, 2007, o PEG associado ao PLA contribui para uma melhor uniformidade das partículas. Aos experimentos com esta associação de polímeros foi adicionado extrato de ganoderma, figura 9. Observou-se melhor homegeneidade e estabilidade da emulsão com esta associação.



Figura 9: Emulsão contendo PLA/PEG com e sem extrato de ganoderma

Na figura 10 pode-se observar a formação de agregados com melhor uniformidade de tamanho, isto se deve provavelmente a associação do PEG ao PLA.

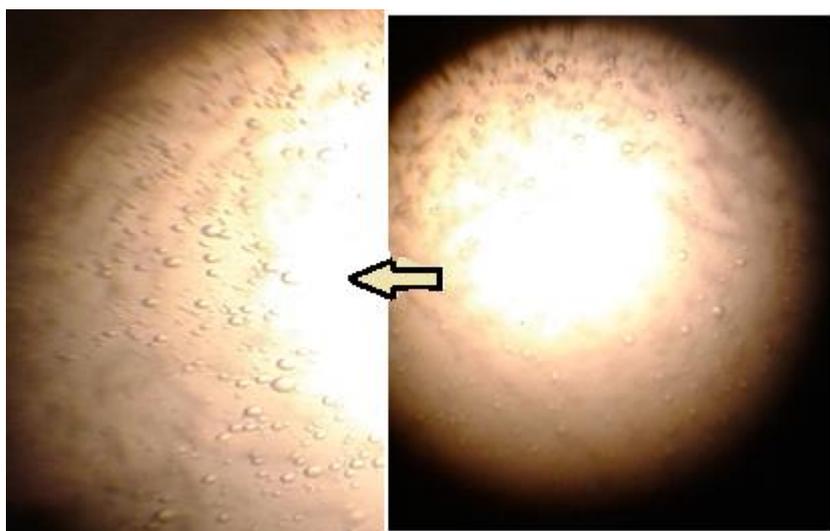


Figura 10: Emulsão contendo PLA/PEG com extrato de ganoderma

Observou-se a suspensão com lamina de Neubauer ao microscópio No centro da lâmina existem linhas com marcações em quadrantes. Pelo microscópio podem-se perceber três tipos de quadrantes; as partículas foram medidas no quadrante de $0,0025 \text{ mm}^2$ de área. Tirando a raiz quadrada da área, obtemos o tamanho de $0,05 \text{ mm}$ de lado e com isso podemos calcular o tamanho médio das partículas.

Os resultados apresentados indicam que os tamanhos das partículas obtidas através desta metodologia mostraram ter dimensões da ordem de micro. Os cálculos

demonstram uma população de partículas na casa de 8 a 20 µm, que, de acordo com a literatura, evidencia a formação de microcápsulas (SANTOS; TRINDADE; GROSSO, 2005, p. 325).

4. Conclusão

Conclui-se com os resultados experimentais que a emulsão contendo PLA E PEG mostrou-se mais estável e com maior homogeneidade estrutural dos agregados, obteve-se a formação de microcápsulas.

5. Referências Bibliográficas

AJIOKA, M., ENOMOTO, K., SUZUKI, K., YAMAGUSHI, A., The basic properties of poly(lactic acid) produced by the direct condensation polymerization of lactic acid. JOURNAL OF ENVIRONMENT POLYMER DEGRADATION, v.3, 1995, p. 225-234.

BOH, B., BEROVIC, M., ZHANG, J., ZHI-BIN, L. Ganoderma lucidum and its pharmaceutically active compounds, BIOTECHNOL. ANNU. REV., v.13, 2007, p.265-301.

CHORILLI, M; OLIVEIRA, G.R; SCARPA, M.V. Lipossomas em formulações dermocosméticas. INFARMA, v.16, n.7-8, 2004. p. 75-79.

COIMBRA, Patricia Manuela Almeida, **Preparação e caracterização de sistema de liberação controlada de fármaco com base em polímeros de origem natural**, 2010, 241p., Tese – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Portugal, Coimbra, 2010.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. INTERNATIONAL JOURNAL PHARMACEUTICS, v. 55, 1989. p.25-28.

GRANADA, A., NEMEN, D. DORA, C.L., NECKEL, G.L., LEMOS-SENNA, E. Estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados, JOURNAL OF BASIC AND APPLIED PHARMACEUTICAL SCIENCES, v.28, n.2, 2007, p.129-139.

JAGER, Eliézer. **Controle da liberação do éster etílico de indometacina a partir de nanocápsulas poliméricas através da variação da concentração do monoesterato de sorbitano.** 2008. 113 p. Dissertação – Programa de Pós graduação em ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

KHAZIR, S., SHETTY, S., Bio- based polymer in the word, INT. J. LIFESC. BT & PHARM. RES. v.3, 2014, p.35-43,

KÜLKAMP, I.C., PAESE, K., GUTERRES, S.S., POHLMANN. A.R., Estabilização de ácido lipóico, via encapsulação em nanocápsula polimérica planejada para aplicação cutânea. QUÍMICA NOVA. v.32, 2009, p.2078-2084.

MAINARDES, Rubia Mara, **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina.** 2007. 133 p. Tese - Programa de Pós graduação em ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêutica – Universidade Estadual de São Paulo “Julio Mesquita Filho”, Araraquara/SP, 2007.

PEREIRA, Maria Alves. **Nanocápsulas: preparação, caracterização e marcação com Tc- HMPAO para estudos de biodistribuição em modelo experimental em inflamação.** 2006. 103p. Dissertação – Faculdade de Farmácia – Universidade federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

SANTOS, A. B.; TRINDADE, C. S. F.; GROSSO, C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. CIÊNC. TECNOL. ALIM. v.25, 2005. p. 322-326.

SCHAFFAZICK, S.R., GUTERRES, S.S., FREITAS, L.L., POHLMANN. A.R., Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármaco. QUÍMICA NOVA. v.26, 2003, p.726-737.

SCHMALTZ, C.; SANTOS, J. V.; GUTERRES, S., Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. INFARMA, v.16, 2005. p.80-85.

TAO, J., FENG, K.Y., Experimental and clinical studies on inhibitory effect of ganoderma lucidum on platelet aggregation, J TONGJI MED UNIV., v.10, 1990, p. 240-243.