



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANBIOTECNOLOGIA

MARINA LIMA RODRIGUES

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS NATURAIS E SINTÉTICAS CONTENDO
LÁTEX DA *EUPHORBIA TIRUCALLI*: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AÇÃO
ANTINOCICEPTIVA

BRASÍLIA-DF

2022

MARINA LIMA RODRIGUES

**NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS NATURAIS E SINTÉTICAS CONTENDO
LÁTEX DA *EUPHORBIA TIRUCALLI*: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
AÇÃO ANTINOCICEPTIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, da Universidade de Brasília-UnB, como requisito parcial à obtenção de título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes.

BRASÍLIA-DF

2022

**NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS NATURAIS E SINTÉTICAS CONTENDO
LÁTEX DA *EUPHORBIA TIRUCALLI*: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
AÇÃO ANTINOCICEPTIVA**

Tese defendida no Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, da Universidade de Brasília, como parte das exigências para obtenção do grau de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia. Defendida em 20 de Dezembro de 2022 pela Banca Examinadora, constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Claire Nain Lunardi Gomes (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa
Universidade de Brasília-Campus Ceilândia

Prof. Dr. Odair Antonio Barbizan
Instituto Federal de Rondônia

Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento
Universidade de Brasília-Campus Ceilândia

Profa. Dra. Amanda de Carvalho Pereira Morais
FMIT - Faculdade de Medicina de Itajubá

Dedico este trabalho aos meus pais, familiares, amigos, a todos os professores que me influenciaram na minha trajetória e Deus, por me dar saúde e força para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus e minha família pelo apoio. Minha mãe especificamente por sempre me incentivar a estudar, me dar todo o suporte que eu precisei para continuar. Aos meus orientadores Doutora Claire Nain Lunardi Gomes e Doutor Anderson de Jesus Gomes, por me ajudarem em todas as etapas do meu projeto. Ao meu professor da faculdade e orientando de Trabalho de Conclusão de Curso Doutor Alvaro Carlos Galdos Riveros, por me incentivar a realizar o mestrado.

A toda a equipe da Faculdade de Ceilândia- UnB, pela amizade, por sempre estarem prontos a ajudar e a me fazer sentir em casa. A minha amiga farmacêutica Daiane, por me ajudar em vários momentos da minha vida profissional e pessoal. Ao meu namorado pelo apoio e cuidado comigo. Agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

“As pessoas podem fazer seus planos, porém
é o Senhor Deus quem dá a última palavra.”

Provérbios 16:1

RESUMO

Euphorbia tirucalli L. é uma planta que apresenta em seu látex o composto eufol que quando altamente diluído tem diversas propriedades medicinais, como anti-inflamatório, anticoncepcionais e antitumorais. A aplicação da nanotecnologia aos fitoterápicos e extratos vegetais podem potencializar a ação dos extratos vegetais, promover a liberação sustentada dos princípios ativos, reduzir a dose necessária e os efeitos colaterais, através do encapsulamento de fármacos, sendo uma estratégia adequada para superar mecanismos de resistência celular e aumentar a seletividade do fármaco por sítios-específicos. A entrega das nanopartículas tem que satisfazer vários requisitos para aplicações clínicas, com objetivo de maior padronização, aprovação e aceitação frente as legislações, no qual neste trabalho foi realizado o preparo das nanopartículas com quitosana e PLGA, avaliação dos parâmetros físico-químicos e teste *in vivo*. As partículas contendo o látex, apresentaram elevada eficiência de encapsulamento (>90 %), com um perfil de liberação em pH ácido, lento e constante durante 6 horas. Através da técnica de espalhamento dinâmico de luz verificou-se que a média das nanopartículas com o fármaco possuem diâmetro próximo de 611 nm, com um bom índice de polidispersão de 0,146 e valor de potencial zeta (2 ± 23 mV). Na espectroscopia de FTIR, as nanopartículas de quitosana apresentaram em 1.566 cm^{-1} , banda fraca de deformação angular usada para caracterizar aminas e amidas secundárias. Avaliação do deslocamento do comprimento de onda do látex de eufol em diferentes pHs apresentaram todos na faixa de 200 a 220 nm. No ensaio de hipernocicepção *in vivo* o látex-eufol e as nanopartículas contendo eufol inibiu significativamente a hipernocicepção mecânica induzida por carragenina.

Palavras-chaves: *Euphorbia tirucalli*; nanopartículas; anti-inflamatório; físico-químicos.

ABSTRACT

Euphorbia tirucalli L. is a plant that has in its latex the compound eufol which, when highly diluted, has several medicinal properties, such as anti-inflammatory, contraceptive and anti-tumor. The application of nanotechnology to herbal medicines and plant extracts can enhance the action of plant extracts, promote the sustained release of active principles, reduce the necessary dose and side effects, through the encapsulation of drugs, being an adequate strategy to overcome resistance mechanisms cell and increase drug selectivity by site-specific. The delivery of nanoparticles has to meet several requirements for clinical applications, with the objective of greater standardization, approval and acceptance in relation to legislation, in which in this work the preparation of nanoparticles with chitosan and PLGA, evaluation of physical-chemical parameters and and in vivo test. Particles containing the latex, high encapsulation efficiency (> 90%), with a release profile at acidic pH, slow and constant for 6 hours. Through the dynamic light scattering technique it was verified that the mean of the nanoparticles with the drug has a diameter close to 611 nm, with a good polydispersion index of 0.146 and a zeta potential value (2 ± 23 mV). In FTIR spectroscopy, as chitosan nanoparticles dissipated at 1.566 cm^{-1} , weak band of angular deformation used to characterize secondary amines and amides. Evaluation of the wavelength shift of the eufol latex at different pHs separated all in the range from 200 to 220 nm. In the in vivo hypernociception assay, latex-eufol and nanoparticles containing eufol significantly inhibited the mechanical hypernociception induced by carrageenan.

Keywords: *Euphorbia tirucalli*; nanoparticles; anti-inflammatory; physicochemical.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Foto da planta <i>E. tirucalli</i>	15
Figura 2 - Geolocalização do clima no mundo, Avelós é comum em regiões de Clima Tropical e Semiárido	16
Figura 3 - Estrutura química do Eufol usando o software ChemSketch	18
Figura 4 - <i>Euphorbia tirucalli</i> atua como anti-inflamatório reduzindo linfócitos CD4+ e CD8+, inibição da IL-2 e Interferon- γ na lesão tecidual.....	20
Figura 5 – Escala nanométrica	21
Figura 6 – Spray dryer marca Büchi modelo B-290.....	29
Figura 7 – Modelo esquemático de uma nanopartícula biodegradável e a estrutura química do PLGA	32
Figura 8 - Quitosana.....	33
Figura 9 - Teste Von Frey.....	48
Figura 10 – Doses por via oral de água, látex com eufol e nanopartículas com eufol	51
Figura 11 - Comparação dos resultados da intensidade hipernociceptiva em gramas	53
Figura 12 - Síntese de micropartículas de quitosana e Spray dryer.....	59
Figura 13 - Espectros de absorção UV-Vis da solução metanólica do pó do látex em faixa de concentração (1,0 mg - 200mg).....	68
Figura 14 - Curva analítica da absorbância em função da concentração de pó do látex.....	69
Figura 15 - Eficiência de encapsulamento das nanopartículas contendo 5 mg, 10 mg e 20 mg do fármaco	71
Figura 16 - Tamanho das nanopartículas de quitosana vazia	73
Figura 17 – Tamanho das nanopartículas de quitosana com o fármaco	73
Figura 18 – Potencial zeta das nanopartículas de quitosana vazia	74
Figura 19 – Potencial zeta das nanopartículas de quitosana com o fármaco.....	75
Figura 20 – Espectro do FTIR látex em pó contendo eufol em KBr	77
Figura 21 – Espectro do FTIR das nanopartículas de quitosana vazia em KBr	78
Figura 22 – Espectro do FTIR das nanopartículas de quitosana contendo o pó do látex em KBr.....	79
Figura 23 – Espectro FTIR do pó do látex contendo eufol, da nanopartícula de quitosana vazia e da nanopartícula de quitosana contendo eufol em KBr	80
Figura 24 - Espectros de absorção UV-Vis da solução tampão do pó (5mg) em diferentes pHs	82
Figura 25 – Avaliação do deslocamento do comprimento de onda máximo do látex de eufol em diferentes pHs	83
Figura 26 - Espectros no Uv-Vis das nanopartículas de quitosana como fármaco no pH 2 por 6 horas	84
Figura 27 - Picos encontrados na emissão de fluorescência das nanopartículas de quitosana com o fármaco no pH 2 por 6 horas	85
Figura 28 - Espectros no Uv-Vis das nanopartículas de quitosana com fármaco no pH 7,4 por 6 horas.....	85

Figura 29 - Picos encontrados na emissão de fluorescência das nanopartículas de quitosana com o fármaco no pH 7,4 por 6 horas	86
Figura 30 - Espectros no Uv-Vis das nanopartículas de quitosana com fármaco no pH 8,5 por 6 horas.....	86
Figura 31 - Picos encontrados na emissão de fluorescência das nanopartículas de quitosana com o fármaco no pH 8,5 por 6 horas	87
Figura 32 - Perfil de liberação das nanopartículas de quitosana com fármaco no pH 2	89
Figura 33 - Cinética da liberação do látex de eufol pH 2	90
Figura 34 - Perfil de liberação das nanopartículas de quitosana com fármaco no pH 7,4	91
Figura 35 - Cinética da liberação do látex de eufol pH 7,4	92
Figura 36 - Perfil de liberação das nanopartículas de quitosana com fármaco no pH 8,5	94
Figura 37 – Perfil de liberação das nanopartículas de quitosana com fármaco no pH 8,5.....	95
Figura 38 - Cinética no tempo da liberação 0,7 a 1,2 horas do látex de eufol pH 8,5	96
Figura 39 - Cinética no tempo 1,2 a 2,6 horas da liberação do látex de eufol pH 8,5	97
Figura 40 - Cinética no tempo 2,6 a 6 horas da liberação do látex de eufol pH 8,5.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos químicos e respectivas indicações medicinais	17
Tabela 2 - Modelos cinéticos usados para análise em geral de liberação de fármacos em materiais nanoestruturados e suas equações	64
Tabela 3 – Eficiência de encapsulamento das nanopartículas com eufol em 5 mg, 10 mg e 20 mg	71
Tabela 4 - Comparação das médias de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas	76
Tabela 5 – Principais bandas de absorção no FTIR dos espectros das nanopartículas e do pó do látex	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES - antiinflamatórios não esteroides

COX-2 – Ciclo-oxigenase-2

CXCL1/KC - quimiocina derivada de queratinócitos 1

DLS - Dynamic Light Scattering ou Espalhamento Dinâmico de Luz

E. - *Euphorbia*

EPR- Efeito de permeabilidade e retenção aprimora

ERK - proteína quinase regulada por sinal anti-extracelular

FF - forma farmacêutica

GAG – glicosaminoglicanos

GSH - glutationa reduzida

IFN- γ - Interferon-gama

IL-1 β - interleucina-1 β

IL-6 - Interleucina 6 ()

iNOS - óxido nítrico-sintase induzida

FDA - Food and Drug Administration

L. – Linnaeus

MCP-1 - quimioatraente de monócitos

MIP-2 - proteína inflamatória de macrófagos

MPO - mieloperoxidase

NAG - N-acetilglucosaminidase

nm – Nanômetro

NP(s) - Nanopartícula(s)

OMS – Organização Mundial da saúde

ON - Óxido nítrico

PBS - tampão fosfato-salina

PCS - Photon Correlation Spectroscopy ou Espectroscopia de Correlação de Fótons

PGA – ácido glicólico

PKC - proteína quinase C

PL - Perfil de liberação

PLA - ácido láctico

PLGA - poli (ácido láctico) e poli (ácido glicólico)

R² - coeficiente de determinação

RMSE - desvio da raiz do erro quadrático médio ou root-mean square error

SNC - Sistema nervoso central

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TPA - 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Euphorbia tirucalli</i> Linnaeus	15
1.2 NANOTECNOLOGIA	20
1.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	22
1.4 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	25
1.5 POLÍMEROS COMO VEÍCULOS NAS FORMULAÇÕES.....	30
1.6 POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO	35
CAPÍTULO 1	40
2. OBJETIVOS	41
2.1 GERAL.....	41
2.2 ESPECÍFICO (S).....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 MATERIAIS.....	42
4.1 TESTE <i>IN VIVO</i>	50
4.1.1 Teste mecânico nociceptivo	50
4.2 ENSAIO DE HIPERNOCICEPÇÃO <i>IN VIVO</i> DO LÁTEX COM EUFOL E NANOPARTÍCULAS CONTENDO EUFOL.....	51
CAPÍTULO 2	55
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
6.1 MATERIAIS.....	56
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
7.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO	67
7.2 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO	69
7.3 ANÁLISE DE TAMANHO, POTENCIAL ZETA E DISPERSÃO DE TAMANHO FORMA E MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS.....	72
7.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	76
7.5 ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV-VIS DE SOLUÇÃO TAMPÃO DO PÓ CONTENDO EUFOL EM DIFERENTES pHs	81
7.6 PERFIL DE LIBERAÇÃO	84
7.7 ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	88
8. CONCLUSÃO	100
9. REFERÊNCIAS.....	101
10. ANEXOS	111

10.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	111
10.2 COMPROVANTE DE CADASTRO	112
10.3 COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO EM REVISTA CIENTÍFICA	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Euphorbia tirucalli* Linnaeus

Euphorbia tirucalli L. é uma planta pertencente à família das euforbiáceas que pode atingir uma altura de 10 metros em seu habitat natural, apresenta troncos verdes cilíndricos extremamente ramificados, folhas e flores pequenas, sendo estas terminais femininas e masculinas com fruto encapsulado contendo três sementes ovoides (2). As folhas de *E. tirucalli* caem mais cedo e, portanto, a maioria das plantas não tem folhas, para reduzir a transpiração, sendo uma planta forte e resistente à seca. Pode ser usada para florestação e proteção do solo para evitar a perda de água e solo, e é ecologicamente valiosa (3).

Figura 1 – Foto da planta *E. tirucalli*



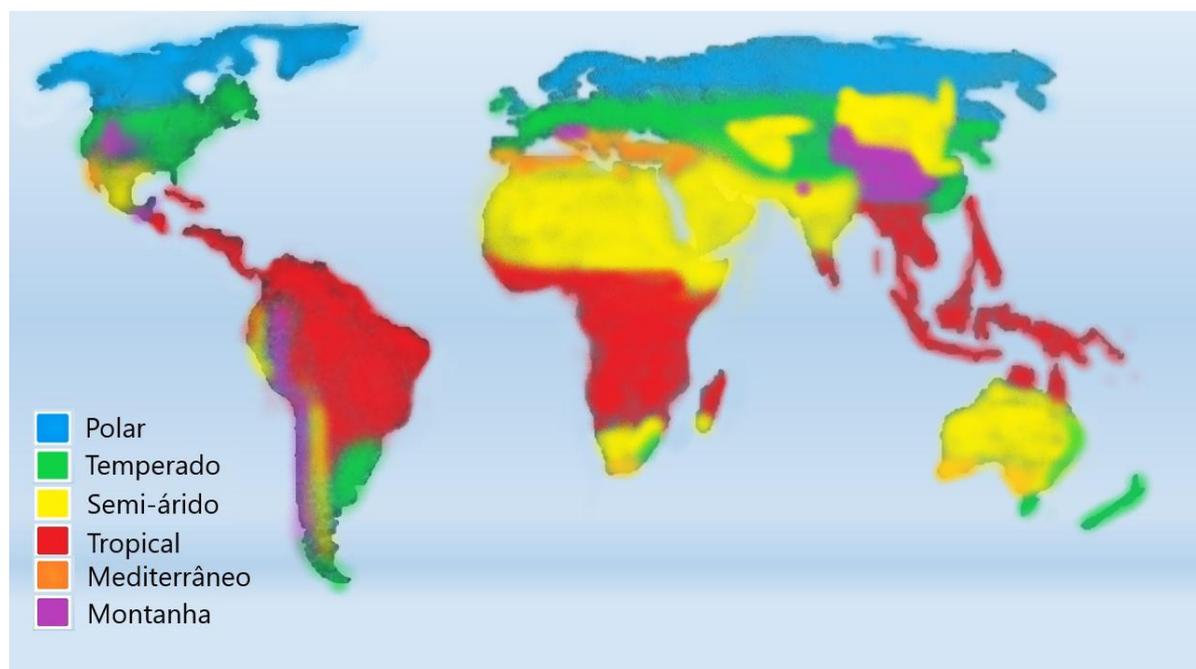
Fonte: Autora (2018)

De acordo com a OMS cerca de 80% da população mundial utiliza fitoterápicos para o tratamento de diversas doenças, mesmo sem orientação médica ou consulta, o que demonstra o interesse das pessoas por medicamentos com menores custos, tornando-os mais acessíveis à população (4, 5).

A *E. tirucalli* também conhecida popularmente como Avelós, Árvore-do-lápis, Labirinto, Pau pelado, Dedo-do-diabo entre outros, contém um látex tóxico que pode causar forte irritação, inflamação da pele, vermelhidão, inchaço, pústulas, dor, coceira e quando altamente diluído apresenta diversas propriedades medicinais (6).

Desta forma é considerada importante na medicina tradicional de culturas da Índia, África, Indonésia, Malásia e até no Brasil (7). Na Figura 2, é apresentada a geolocalização do clima mundial, com ênfase ao Clima Tropical e Semi-árido, onde tem-se a maior região de cultivar de Avelós.

Figura 2 - Geolocalização do clima no mundo, Avelós é comum em regiões de Clima Tropical e Semiárido



Fonte: Autora (2018)

Os componentes do látex da *E. tirucalli* são constituídos de diversos compostos e metabólitos secundários, tais como ésteres de ácidos graxos (ácido mirístico, palmítico, esteárico, oleico e linoleico), ácidos graxos, diterpenos, triterpenos, esteróides) e principalmente triterpenos como eufol e tirucalol (8).

Para uma melhor demonstração, na tabela 1 apresenta as substâncias químicas presentes nas euforbiáceas e suas respectivas propriedades terapêuticas (9):

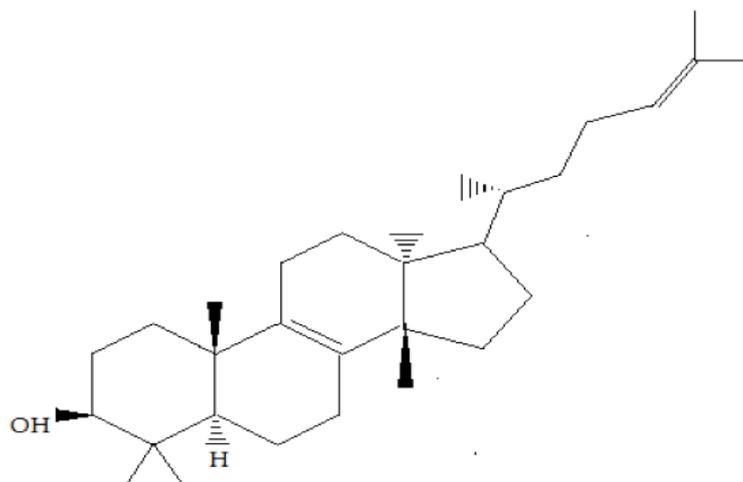
Tabela 1 - Compostos químicos e respectivas indicações medicinais

Substâncias químicas	Indicações medicinais
Diterpenos	Anti-tumor, antibiótico, antifúngico, antiespasmódicos, antiulcerogênica e tripanocida.
Triterpenos	Antibiótico, antifúngico, vasodepressor, anti-inflamatório e analgésico.
Flavonóides	Anti-malária e anti-inflamatório.
Saponinas	Citotóxico e antiulcerogênica.
Taninos	Antisséptico, antiviral, antimutagênico e antifúngico.
Alcaloides	Antibiótico e antitumoral.
Ésteres	Antibiótico, antitumoral, citotóxico, reações alérgicas e cancerígeno.
Ricina	Citotóxico, lipolítico e ativação da invertease.
Fenóis	Antitumoral e antioxidante.

Fonte: Autora (2019) adaptado de Waczuk (2014).

Em relação aos componentes da *E. tirucalli*, destaca-se o eufol que é um álcool triterpênico tetracíclico (Figura 3), sendo descrito como um dos principais constituintes encontrado na seiva e no látex de algumas espécies desta planta, o qual apresenta propriedades anti-inflamatórias, anticoncepcionais e antitumorais, sendo que o látex de *Euphorbia tirucalli* tem demonstrado uma redução eficiente do crescimento tumoral em ratos (10, 11).

Figura 3 - Estrutura química do Eufol usando o software ChemSketch



Fonte: A autora (2018) pelo software ChemSketch

Na literatura científica relata que o composto eufol possui atividades anti-inflamatória (12), antiviral (13), propriedades antinociceptivas (14) e anticancerígenas (7). Popularmente o látex vem sendo utilizado na sua forma bruta, sem modificações ou purificações, em múltiplas funções medicinais, como antibacteriano (15), anticancerígeno, antirreumático, antiviral, antiasmático, expectorante, reversor de impotência sexual, laxante, antiparasitário, antiulceroso, fungicida, antitumoral, hepatoprotetor e queratolítico (16).

Por meio de estudos *in vivo* também foi demonstrado que o composto eufol pode exibir propriedades antinociceptivas na dor inflamatória e neuropática em modelos de ratos e camundongos (17). Estudos fitoquímicos indicam que a presença de esteroides ou triterpenóides no látex de *E. tirucalli* conferem esses efeitos medicinais (18).

As atividades farmacológicas relacionadas com a planta, dentre elas o potencial analgésico, foram testados por imersão da cauda em vários extratos do látex da *E. tirucalli*. Nestes estudos, foram observadas diminuições dos números de contorções abdominais induzidas por ácido acético, pelo emprego dos extratos aquosos do látex 300 mg/kg, diclorometano-metanol 100 mg/kg e éter de petróleo 30 mg/kg de 57,67%, 51,80% e 48,48%, respectivamente (12).

Passos *et al.* (2013) (19) constataram que rações totais de esteroides e terpenóides obtidas do extrato hidro alcoólico da raiz de *E. tirucalli*, apresentaram efeito analgésico e anti-inflamatório significativos nos subseqüentes modelos de edema de pata e contorção abdominal em camundongos.

Silva *et al.* (2018) (7) mostraram em seus estudos que triterpenóides da *E. tirucalli* são capazes de atenuar a inflamação crônica com doses de 200 mg/kg, normalizando o volume alterado da pata, alterações hematológicas e histológicas, sendo um potente agente terapêutico anti-inflamatório natural para o tratamento de artrite.

Estudos também descrevem, que o eufol atenua significativamente os sinais neurológicos da encefalomielite autoimune, podendo estar associados com a sub-regulação de RNAm e expressão de proteína de mediadores pró-inflamatórios, tais como Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) no sistema nervoso central (SNC). Além disso, em análise *in vitro* houve a inibição da resposta imune mediada por células T incluindo a produção de citocinas Th1 e Th17 em células de baço de animais com encefalomielite não tratados (20).

Pesquisas *in vivo* com o eufol foram observadas fortes ações anti-inflamatórias em uso tópico na inflamação induzida pela 12-O-tetradecanoilforbol (TPA), através da regulação da ativação da proteína quinase C (PKC) e proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK), resultando em redução da sobrerregulação de COX-2, proteína inflamatória de macrófagos (MIP-2), quimiocina derivada de queratinócitos 1 (CXCL1/KC) e infiltração de leucócitos (21).

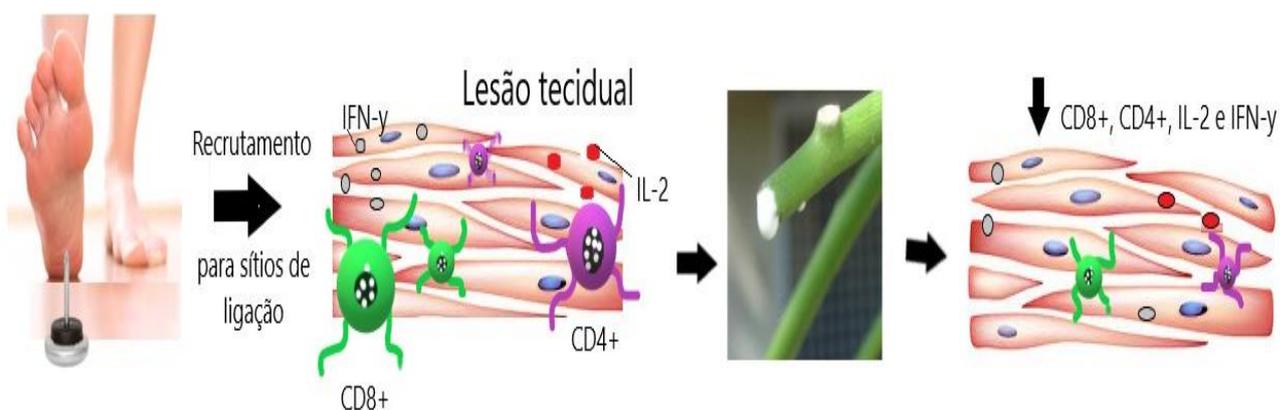
Aplicações contra infecções virais a partir de diterpenos como o ingenol isolados da *E. tirucalli*, ativam diferentes isoformas de PKC, impulsiona a translocação nuclear de NF- κ B, leva à ativação do HIV-LTR e modula vias que interferem indiretamente na replicação viral (13).

Estudos apresentados na literatura, mostram avaliações do potencial antineoplásico do eufol em 73 linhagens de câncer humano de 15 tipos de tumores, confirmando o efeito de citotoxicidade, destacando-se as células escamosas esofágicas, células de carcinoma pancreático, seguidas de próstata, melanoma, e

câncer de cólon, inibindo significativamente a motilidade e migração celular, proliferação e crescimento (22).

Um possível mecanismo de ação (Figura 4) para a atividade anti-inflamatória da *Euphorbia tirucalli* em camundongos com artrite, está relacionada à diminuição dos linfócitos CD4+ e CD8+, inibição da IL-2 (modulador da resposta imune) e de Interferon- γ (proteína que atua como antiviral), atuando como imunossupressor (23).

Figura 4- *Euphorbia tirucalli* atua como anti-inflamatório reduzindo linfócitos CD4+ e CD8+, inibição da IL-2 e Interferon- γ na lesão tecidual



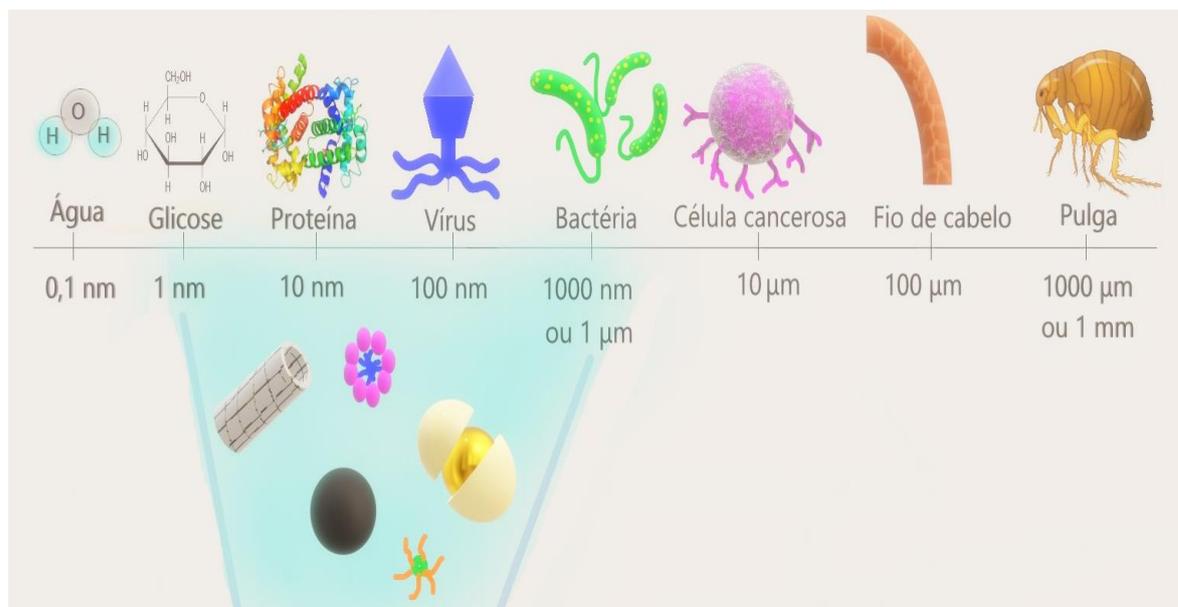
Fonte: Autora baseado nos estudos de Shatkin, 2017.

1.2 NANOTECNOLOGIA

Nanotecnologia é uma área multidisciplinar que reúne um conjunto amplo e diversificado de técnicas e equipamentos, sendo que as nanopartículas estão na faixa de 1,0 nm a 100 nm, mas pode ser estendida em até 1000 nanômetros, por meio da manipulação e incorporação de materiais com aplicações em diversos setores econômicos, tais como: medicina, energia, industrial, ciências, engenharia eletrônica, cosméticos e outras áreas, possibilitando propriedades únicas em nanoescala e desenvolve-se rapidamente em todas as direções (24).

Uma das vantagens da utilização de produtos nanotecnológicos é a economia no desenvolvimento de novos compostos, que contribui para uma melhor farmacoconomia com o crescimento econômico mais verde e sustentável (25).

Figura 5 – Escala nanométrica



Fonte: Autora

Pesquisas relacionadas à saúde trazem diversos avanços à nanociência e nanotecnologia, objetivando o desenvolvimento de formulações nanotecnológicas destinadas ao tratamento de doenças inflamatórias, câncer, cardiovasculares, neurológicas, sendo uma nova opção tecnológica com excelentes resultados na eficácia terapêutica, possuindo diversas vantagens quando contrapostos com as formas farmacêuticas convencionais (26).

O desenvolvimento de nanomateriais com alta especificidade, seja em diagnósticos ou terapias, deve levar em conta o tamanho, a forma, modificação, composição, estabilidade, biodegradação e biodispersão – parâmetros que revelam melhores funções e potencialidades, existindo diversos nanomateriais passíveis de modificações como as nanopartículas metálicas, magnéticas, poliméricas, dendrímeros, nanopartículas com materiais cerâmicos, nanopartículas de sílica, pontos quânticos (*quantum-dots*), nanotubos e nanofibras de carbono e grafenos (27).

A aplicação da nanotecnologia aos extratos vegetais podem potencializar a ação dos extratos vegetais, promover a liberação sustentada dos constituintes ativos, melhorar a atividade, reduzir a dose terapêutica e os efeitos colaterais, através da entrega do constituinte ativo em uma concentração suficiente, durante todo o período de tratamento e direcioná-lo para o alvo desejado, porque esses requisitos não são completamente obtidos pelos tratamentos convencionais (28).

Por meio da nanotecnologia, também é possível empregar sistemas de liberação de fármacos, proteger os princípios ativos sensíveis, bem como a área sadia de tecidos, através do revestimento com materiais biodegradáveis (29).

Estratégias para o direcionamento do fármaco podem ser a partir de modificações na superfície de nanopartículas ou adição de ligantes específicos com afinidade para determinados receptores das células, no qual a captação pelo fígado, baço ou medula óssea fica reduzida e sua permanência na corrente sanguínea é prolongada (30).

Os medicamentos fitoterápicos têm sido usados em todo o mundo por possuírem menos efeitos adversos em comparação com os alopáticos, sendo a entrega desses fármacos problemática devido à fraca solubilidade, permeabilidade, baixa biodisponibilidade, instabilidade no meio biológico e extenso metabolismo de primeira passagem, sendo uma alternativa encapsulando-as com nanomateriais compatíveis para uma melhor entrega e liberação desses fármacos (31).

Extratos de plantas têm sido comumente usados para alimentos, medicamentos, síntese de nanopartículas e biossensores, não apenas por causa da fácil produção e custo baixo comparado a outras biomoléculas (proteínas, enzimas, peptídeos, e DNA), mas também por fornecerem maior simplicidade, custo e de forma ecologicamente correta, possibilitando a ampliação das suas aplicações médicas (32).

Desta forma, por meio da junção dos medicamentos fitoterápicos e à nanotecnologia é possível obter uma melhor entrega do fármaco, com baixo custo e redução de toxicidade ou reações adversas.

1.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Pesquisas científicas e recursos empregados são necessários para a obtenção de medicamentos mais seguros, e este caminho começa no processo de pesquisa pré-clínica com a caracterização físico-química e biológica(33).

O desenvolvimento de um novo medicamento, através de modelos experimentais em células ou animais, para o tratamento de doenças, requer um rastreamento experimental no qual, de cada 10.000 novos compostos, 250 chegam aos testes experimentais pré-clínicos com animais e apenas 5 entram nas fases clínicas (testes em humanos). Ao final, estima-se que apenas uma molécula chegue ao mercado (34).

Os sistemas de administração de medicamentos podem ser projetados para fornecer uma resposta farmacológica rápida para um paciente, devido maior direcionamento do fármaco, sendo que os sistemas convencionais de entrega de medicamentos, geralmente possuem períodos relativamente mais longos e muitos efeitos adversos.

Na administração convencional de fármacos, a concentração da droga na corrente sanguínea aumenta até atingir o nível máximo de dissolução e então decresce, sendo necessária uma nova dose para manter os níveis de concentração terapêuticos, mas os sistemas de liberação controlada de fármacos têm ampla vantagem, incluindo maior eficácia dado ao maior controle da liberação do princípio ativo ao longo do tempo e redução da toxicidade (35, 36).

As vantagens da melhoria da entrega de coloides incluem: manutenção contínua dos níveis de fármaco em um tratamento terapeuticamente desejável; redução de efeitos colaterais prejudiciais devido à entrega direcionada à um tipo de célula ou tecido particular; quantidade potencialmente reduzida de fármaco necessária e suas dosagens, levando a uma melhor adesão do paciente ao regime prescrito e facilitação da administração de medicamentos para fármacos com meia-vida curtas *in vivo* (37).

Modificação de superfície e funcionalização de nanomateriais foram adotadas amplamente na elaboração de sistemas de entrega de medicamentos inteligentes, como testes realizados em película fina de quitosana, os quais demonstraram que

mudanças nos fatores como pH e de glutathione reduzida (GSH) alcançam uma melhor liberação do fármaco (38).

O fígado reconhece nanopartículas, absorve por receptores específicos, sendo nanopartículas biodegradáveis, não citotóxicas sem acionar o sistema retículo endotelial (RES) e as respostas imunes durante a circulação sistêmica (39).

Aplicações práticas revelaram que nanopartículas lipídicas tem um diâmetro capaz de atravessar as janelas (100-110 nm) no endotélio sinusoidal do fígado, entregues especificamente ao fígado e resultam em uma redução significativa no conteúdo de colágeno e em fatores pró-fibrogênicos, como TNF- α e TGF- β , IL-6 e CTGF, com sintomas patofisiológicos aprimorados em ratos modelo de fibrose hepática (40).

Partículas nanométricas podem ser sintetizadas a partir de uma infinidade de materiais, como lipídios, polímeros, metais, sílica, e silício ou isolados a partir de fontes biológicas (41, 42). NPs exibem propriedades únicas que são diferentes da escala macro e molecular como o aumento da área superficial para aumento da função proteica e polimérica, que prolonga a circulação e confere habilidades de direcionamento (43).

Além das propriedades do material, a forma e tamanho de nanopartículas podem conferir habilidades específicas de transporte no corpo, podem ser adaptadas para melhorar as interações com microambientes teciduais que exibem características distintas, como componentes estruturais e biomoléculas. Consequentemente, a entrega específica de sítio de NPs é geralmente superior à de moléculas pequenas (melhoria de 100 a 1000 vezes) (44).

Tradicionalmente, as abordagens de entrega de medicamentos de NP foram divididas em estratégias de direcionamento ativo e passivo, sendo que o ativo envolve a utilização de moléculas de superfície das NPs que se ligam preferencialmente ao tecido de interesse, enquanto o direcionamento passivo envolve a exploração de propriedades físicas, como formato e tamanho das NPs (45).

A entrega das nanopartículas têm que satisfazer vários requisitos para aplicações clínicas, com objetivo de maior padronização, aprovação e aceitação

frente as legislações, dentre eles os materiais devem ser aprovados; os processos reproduzíveis e escalonáveis; materiais com boa caracterização (distribuição de tamanho e propriedades de superfície das nanopartículas); quantidade do fármaco nas nanopartículas suficiente para garantir a chegada do composto e boa taxa de encapsulamento frente aos estudos farmacoeconômicos (46, 47).

1.4 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

A incorporação de nanopartículas em produtos comerciais, medicamentos e processos industriais aumentou amplamente nos últimos anos, o que levanta preocupações sobre seu impacto ambiental e sua segurança (48).

Os produtos naturais são econômicos, eficientes e as nanopartículas podem ser sintetizadas em grandes quantidades. A síntese de nanopartículas é mais benéfica em relação aos outros métodos biológicos e podem ser dimensionados para síntese em grande escala de nanopartículas, ecologicamente correta, econômica e em um processo de etapa única para uso terapêutico (49).

Para garantir sua eficácia e confiabilidade ao usuário final, os métodos analíticos são comumente usados para medir nanopartículas, fornecendo informações, como as propriedades físico-químicas, no qual traz uma boa reprodutibilidade das partículas e informações de como irá responder no momento da sua utilização final (50).

Para a escolha do melhor solvente para solubilização do látex por exemplo, verificou-se a característica do pó do látex que apresenta uma composição mais lipofílica devido seus constituintes fitoquímicos através do coeficiente de partição do eufol, apresentando uma baixa polaridade do fármaco com $\log = 8,9$ (51).

Dessa forma, os solventes mais lipofílicos para solubilização do pó do látex a partir do coeficiente de partição e com o objetivo de evaporação do solvente, que foram testados em laboratório e obteve uma boa dissolução do látex foram o metanol (álcool) e diclorometano.

A característica dos nanomateriais, como tamanho, forma, distribuição de tamanho, área de superfície, forma, solubilidade, agregação, entre outras, precisam ser avaliadas antes de avaliar a toxicidade ou biocompatibilidade (52). Nanocarreadores específicos podem ser obtidos ajustando o tamanho, morfologia, e estrutura de poro, e mais importante, calibrando as propriedades eletrocinéticas.

Algumas técnicas analíticas são necessárias para confirmar as características das nanopartículas, tais como espectroscopia na região do ultravioleta e visível (espectroscopia UV-Vis)(47, 53), espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)(54, 55), entre outras (56). Dessa forma, segue algumas técnicas de caracterização que foram utilizadas neste trabalho para a caracterização de nanopartículas.

1.4.1 Espectroscopia de Uv-Vis

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica versátil, útil, confiável e poderosa para o estudo óptico dos materiais e caracterização primária de nanomateriais sintetizados, que pode ser usada para estudar a cinética de intumescimento e desintegração de microgéis de polímeros (57).

Em uma medição espectroscópica UV-Vis, a absorção de luz em função do comprimento de onda fornece informações sobre as transições eletrônicas que ocorrem no material, verificando seu perfil de liberação e estabilidade, sendo eficaz para verificar o intervalo óptico das nanopartículas (58).

1.4.2 Carga superficial (potencial zeta)

O potencial zeta é o parâmetro usado para descrever a interação superfície-força e o comportamento de estabilização das partículas nas dispersões, que

dependem de muitos fatores, como a fonte de pó, a concentração de eletrólito (força iônica), a concentração e o tamanho das partículas, o pH da solução e o estado de hidratação(59).

O potencial zeta pode ser obtido a partir da medição da mobilidade eletroforética de nanomateriais que expressa o equilíbrio eletroquímico entre partículas e líquidos como em nanopartículas, soluções coloidais com aplicações na medicina, produtos farmacêuticos, produção química, processamento de minerais, purificação de água e solo, pois ao desenvolver nanoformulações terapêuticas relevantes bem definidas precisam de informações sobre o tamanho das NPs, carga superficial, estabilidade e comportamento de aglomeração (60).

Uma superfície sólida em um eletrólito desenvolve uma carga superficial devido às reações de associação / dissociação na superfície e a adsorção de íons. Esta carga superficial pode ser calculada analiticamente como uma função da concentração iônica e do pH, descrevendo a camada dupla elétrica resultante com Distribuição de Boltzmann (61).

1.4.3 Distribuição de tamanho

A nanotecnologia pode favorecer a aplicação e o desenvolvimento de inovações tecnológicas que contêm partículas num estado desagregado ou na forma de um aglomerado em cuja distribuição de tamanho seja maior que 50% e que possua uma ou mais dimensões externas na faixa de tamanhos entre 1,0 e 1000 nm, desde que apresentem propriedades físicas e químicas diferentes das propriedades do mesmo material em escala macro (62).

A distribuição de tamanho das partículas é avaliada pelo método de espalhamento dinâmico de luz (DLS) (63). O DLS mede a função de autocorrelação das flutuações dependentes do tempo na luz espalhada por uma suspensão de nanopartículas, que estão associadas ao movimento browniano das partículas, no

qual o diâmetro hidrodinâmico das partículas é então calculado, através da equação de Stokes-Einstein, que só é aplicável para partículas esféricas (64).

Considerando as limitações das medições de dimensionamento existentes e os desafios impostos, tanto cientistas quanto reguladores encorajam a combinação de múltiplas abordagens ortogonais de alta resolução para lançar luz no espaço de dimensionamento (por exemplo, espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica, fracionamento de fluxo de campo acoplado a detectores de dimensionamento online, técnicas centrífugas, análise de rastreamento de partículas e detecção de pulso resistivo ajustável), como diversos trabalhos seguem adotando (65).

A geometria e as características físicas da superfície são importantes para a compreensão das propriedades únicas das nanopartículas, outra característica relevante é o volume, que é influenciado não só pela superfície e tamanho, mas também pela sua curvatura que afeta seu potencial químico μ , que é essencialmente a força motriz de uma substância para reagir com outra, para mudanças de fase ou para difusão (66).

1.4.4 Secagem por aspersão (Spray dryer)

Diversas técnicas estão sendo desenvolvidas para produzir nanopartículas com propriedades adequadas para fornecer uma melhor administração de medicamentos. A secagem por aspersão é um método bem estabelecido, comumente utilizado no desenvolvimento de formulações, para produzir pós secos a partir de uma amostra líquida. Nanopartículas produzidas por secagem por pulverização passam por secagem gasosa a quente para remover a água da formulação, aumentando assim a estabilidade de longo prazo e a vida útil (67).

Figura 6 – Spray dryer marca Büchi modelo B-290



Fonte: Autora (2020) laboratório da UnB

A formulação de micro e nanopartículas por *spray dryer* confirma que os agentes carreadores são capazes de aprisionar o princípio ativo em sua matriz, atuando como um material de revestimento, capaz de isolar do ambiente externo, no qual o mesmo deverá ser essencialmente inerte à partícula, com a vantagem de produzir micropartículas em uma operação relativamente simples e de processamento contínuo (68, 69).

Além disso, nos últimos anos, a secagem por spray tem se mostrado um método adequado para o preparo de proteínas com maior estabilidade físico-química do produto obtido e facilidade de sua derivação em outras formas farmacêuticas com a liberação por via pulmonar, via enteral e parenteral (70, 71). Essa técnica é adequada para a engenharia precisa de partículas inaláveis, uma vez que, vários parâmetros (fluxo de ar do bico, temperatura de entrada, conteúdo sólido) podem ser modificados durante o processo de produção, o que afetará, entre outros fatores, o tamanho, a morfologia e o teor de água das micropartículas. Ademais, outras

técnicas como liofilização por spray e fluidos supercríticos, também podem ser utilizadas (72).

1.4.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é um método não destrutivo para identificação de grupos funcionais e obtenção de informações sobre interações químicas presentes em uma amostra (73).

Os instrumentos de FTIR se baseiam no interferômetro de Michelson, que utiliza a interferência entre dois feixes de infravermelho para produzir um sinal, denominado interferograma, que é uma função da mudança no comprimento do caminho entre os dois feixes; decomposto nas frequências que formam um sinal, usando algoritmos de transformada de Fourier (74).

As informações obtidas a partir desta caracterização são espectros de transmitância em função do número de onda, de modo que a partir dos picos pelo FTIR, pode-se verificar a ligação ou grupo funcional de nanopartículas e/ou princípio ativo (75, 76).

1.5 POLÍMEROS COMO VEÍCULOS NAS FORMULAÇÕES

Polímeros biodegradáveis são amplamente usados para entrega de fármacos com liberação controlada, porque eliminam a necessidade de remover sistemas de entrega após a administração, recentemente o desenvolvimento de misturas de nanopolímeros tem recebido atenção notável devido às suas propriedades, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e o mais importante, liberação controlada e sustentada de fármacos *in vitro* e *in vivo* (77).

Nanopartículas poliméricas são estruturas sólidas com um núcleo preenchido com polímero, adequadas para cargas úteis de compostos insolúveis em água e de baixo peso molecular, como uma plataforma para distribuição controlada, contínua, mais estável, tamanho uniforme e direcionada de fármacos (42, 78). A entrega controlada do fármaco ocorre quando um polímero, seja natural ou sintético libera o princípio ativo de uma maneira pré-projetada (79).

O princípio ativo é liberado da matriz do polímero por difusão, degradação ou erosão. Micro e nanoesferas fabricadas a partir de um polímero biodegradável para os sistemas de entrega de fármacos tornaram-se cada vez mais importantes, devido ao fato de que tais sistemas permitem que o princípio ativo chegue no local desejado (80).

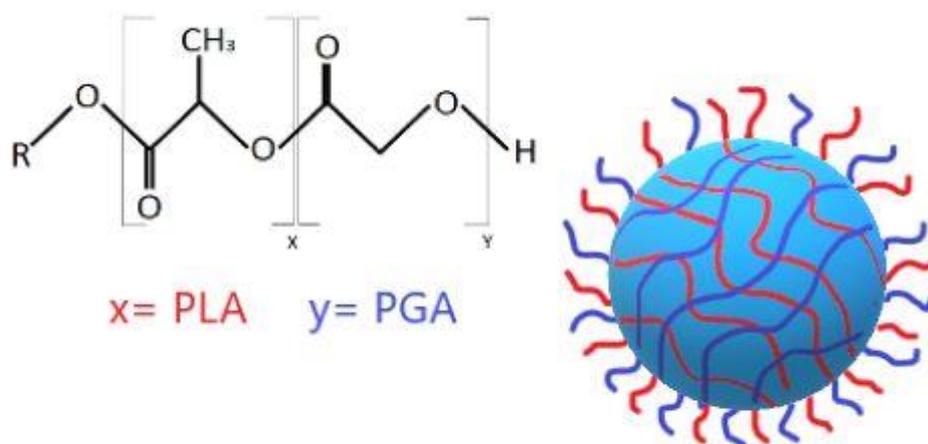
Os polímeros podem ser naturais ou sintéticos, no qual os polímeros naturais comumente conhecidos são amido, quitosana, celulose, glicogênio, entre outros. Polietilenoglicol (PEG), poli-caprolactona (PCL), ácido polilático (PLA), poli- d, l- lactido-co-glicolídeo (PLGA), polivinilpirrolidona (PVP) são alguns dos polímeros sintéticos e biodegradáveis conhecidos (81).

Os polímeros escolhidos para o desenvolvimento desta tese foram o PLGA que é um polímero sintético e a Quitosana que é um polímero natural.

1.5.1 PLGA

Ácido poli (D,L-lático-e-glicólico) ou PLGA é um dos polímeros alifáticos sintéticos de cadeia polimérica linear combinado de Ácido poli-lático (PLA) e Ácido Glicólico (PGA) apresentada na Figura 7, aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) com características biodegradáveis, não tóxica e biocompatíveis (82).

Figura 7 – Modelo esquemático de uma nanopartícula biodegradável e a estrutura química do PLGA



Fonte: Autora

O PLGA é utilizado na forma de nano e micropartículas, pois possui a capacidade de controlar a cinética de liberação do medicamento para atingir a liberação sustentada do medicamento, uma vez que se degrada e o princípio ativo é liberado em intervalo de tempo que podem ser modulados de acordo com a necessidade clínica (83).

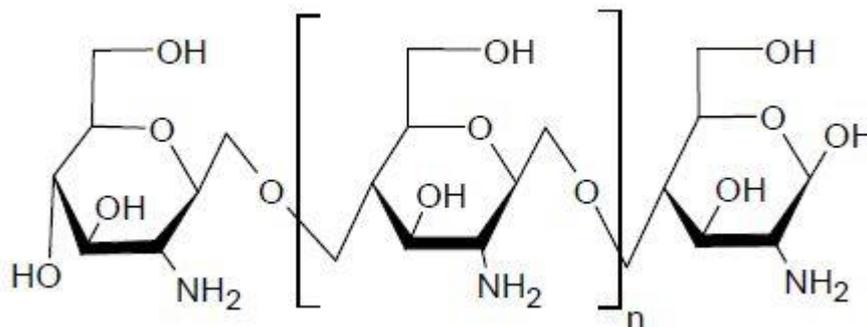
O PLGA pode ser usado como veículo para uma ampla gama de medicamentos, como fármacos de moléculas pequenas, peptídeos, proteínas, antibióticos e anti-inflamatórios, sendo amplamente investigado para melhorar os sistemas de distribuição controlada, capacidade de processar em várias morfologias (por exemplo, micro/nanopartículas injetáveis) através do método de preparação óleo em água ou emulsão água-óleo-água na forma de escala micro ou nano (84, 85).

1.5.2 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo amino natural, derivado do processo de desacetilação da quitina (Figura 8), o qual está presente nos exoesqueletos dos

insetos, crustáceos (caranguejo e camarão) e parede celular de fungos; depois da celulose é considerado o composto orgânico mais importante da natureza (86).

Figura 8 - Quitosana



Fonte: Autora

Este biopolímero é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável e de grande importância econômica e ambiental. Solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino gerando o íon NH_3^+ , que confere propriedades especiais diferenciadas em relação, por exemplo, às fibras vegetais (87).

No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino, sua solubilização depende não só do tamanho e concentração iônica, mas também da distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia principal, além do peso molecular. A quitosana, devido à D-glucosamina, é insolúvel em meio neutro em solução aquosa, mas quitosana na presença de ácido acético e ácido clorídrico mostrou uma melhor solubilidade em ácidos diluídos ($\text{pH} < 6,0 - 6,5$) (88).

A quitosana possui atividades antiácidas e anti-úlceras, no qual previne ou minimiza alguns efeitos colaterais indesejáveis relacionados à administração de medicamentos por via oral, adsorve grande quantidade de água em meio ácido, o que resulta em acentuado intumescimento e aumento de volume, levando à formação de hidrogel (89).

A quitosana é o único polímero catiônico solúvel em água comercialmente disponível, devido às cargas positivas em seus grupos amino, sendo apropriado para uma ampla gama de aplicações em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos como ativação da resposta imune, atividade de redução do colesterol, redução da absorção de gordura, atividade anti-hipertensiva, inibição do crescimento de microrganismos, alívio da dor, promoção da hemostasia e crescimento de células epidérmicas (90).

Este biopolímero catiônico pode interagir com moléculas aniônicas, como glicosaminoglicanos (GAG) componentes fundamentais na matriz extracelular e proteoglicanos. Muitas citocinas/fatores de crescimento estão ligados ao GAG. Um complexo de quitosana-GAG pode reter e concentrar essas substâncias (91).

Modificações físicas através da conversão do pó de quitosana em gel ou nanopartículas pode aumentar sua porosidade, área superficial e locais de adsorção, melhorar suas propriedades mecânicas, expandir cadeias poliméricas de quitosana, diminuir sua cristalinidade e aumentar suas propriedades de intumescimento e difusão. E as modificações químicas pode aumentar sua flexibilidade e estabilidade química e diminuir sua suscetibilidade em meio ácido (92).

A quitosana tem sido amplamente utilizada na indústria farmacêutica em diferentes formas farmacêuticas, como comprimidos, microesferas, micelas, vacinas, ácidos nucleicos, hidrogéis, nanopartículas e conjugados e podem ser utilizados por via parenteral, oral, nasal, ocular e formas implantáveis (93).

A quitosana de alto peso molecular é mais viscosa e atrasa a liberação do princípio ativo, prolonga a duração da atividade do medicamento, melhora a eficiência terapêutica e reduz os efeitos colaterais dos comprimidos orais, que são preparados por complexação entre a quitosana catiônica, com compostos aniônicos, como tripolifosfato ou alginatos (94).

As diferentes respostas físicas e químicas e a potencialização das propriedades que alguns materiais apresentam quando em escala nanométrica, são as principais razões pelo interesse no desenvolvimento e aplicação destes materiais, com propriedades de maior acessibilidade e disponibilidade dos átomos superficiais,

decorrentes da maior área superficial, para a participação em interações com o meio (95).

As micro e nanopartículas de quitosana têm propriedades mucoadesivas, aderem ao trato gastrointestinal por mais tempo, aumenta a biodisponibilidade, capacidade de liberar moléculas bioativas por mais tempo com tamanho ultrafino. A quitosana pode ser um veículo de entrega oral, conhecido por ser biocompatível e apresentar uma toxicidade muito baixa (96).

1.6 POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO

A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, sendo denominada aguda quando persistente com dano inflamatório do tecido e hiperalgesia (duração inferior a 30 dias) ou chamada de dor crônica sendo prolongada e considerada sem nenhum objetivo fisiológico (duração superior a 30 dias), sendo contrastada como valor "patológico" para dor crônica e "fisiológico" para aguda (97).

Segundo dados publicados, cerca de 1,5 bilhão de pessoas no mundo sofrem de dores crônicas, e estima-se que a prevalência oscile entre 11 e 40% da população, da qual até 10% relatam que a dor é grave; com uma série de comorbidades que acabam afetando completamente a qualidade de vida, tornando-se intrinsecamente um problema incapacitante (98).

Os mecanismos biológicos da dor podem ser classificados em três classes: nociceptiva, nociplástica e neuropática(99). A dor nociceptiva é uma resposta de evento agudo e transitório, com o objetivo de manter a homeostase e evitar ou reduzir os danos decorrentes de uma lesão tissular (100).

A dor nociplástica conhecida como "central" é definida como dor que surge da nocicepção alterada, apesar de não ter evidências de dano tecidual real ou ameaçado, causando a ativação de nociceptores periféricos ou evidência de doença ou lesão do sistema somatossensorial que causa a dor (101).

A dor neuropática é resultante de lesões do sistema nervoso central ou periférico que levam a um tipo especial de dor, na ausência de nocicepção, não tem efeito “benéfico” e pode acarretar danos ao sistema somatosensorial, classificada de acordo com sua causa intrínseca ou pelo local da lesão nervosa em central ou periférico (102).

O tratamento da dor crônica é baseado na administração de analgésicos orais de acordo com sua potência: primeiro, analgésicos mais fracos são usados, e na ausência do efeito desejado, analgésicos mais fortes são recomendados(99). Os analgésicos não opióides usados para tratar o primeiro nível de dor são comumente paracetamol (4 - 6 vezes uma dose de 500 - 1000 mg por dia), naproxeno (2 vezes por dia uma dose de 500 mg / dia), diclofenaco (2 vezes 50–150 mg por dia) e ibuprofeno (2–3 vezes 800 mg por dia) (103).

A dipirona é um dos analgésicos mais utilizados no Brasil, devido melhor relação risco-benefício, baixo custo e toxicidade em níveis aceitáveis. Entretanto, devido às suspeitas de causar agranulocitose, foi retirado do mercado de mais de 30 países, incluindo: Estados Unidos, Japão, Austrália e grande parte da União Europeia(104).

O tratamento do segundo nível da dor são os opioides de baixa potência juntamente com analgésicos não opioides são recomendados para pacientes com dor de 2º grau, que incluem dihidrocodeína (2-3 vezes 60-180 mg por dia), tramadol (2-3 vezes 100-300 mg) e tilidina (2–3 vezes 100–200 mg por dia). Em caso de dor crônica muito grave, o nível 3 que é a combinação de analgésicos não opioides e opioides de alta potência, que incluem morfina (6 vezes 5-500 mg por dia), hidromorfona (2-3 vezes 4-200 mg por dia), buprenorfina (3-4 vezes 0,2-1,2 mg por dia), fentanil (0,6-12 mg por via transdérmica) e oxicodona (2-3 vezes 10–400 mg por dia) (103).

A inflamação é o maior componente de diversas condições ligadas à dor, os mediadores inflamatórios sensibilizam as vias neurais, aumentando a percepção da dor e se a dor adaptativa não for adequadamente tratada, ocorrem modificações a nível espinal e supra espinal que determinam a nomenclatura não-adaptativa. Exemplos de dor não adaptativa incluem a dor neuropática, quando ocorre uma

injúria ao sistema nervoso, alterações no processamento e na percepção de um estímulo nódico normal (101).

Os nociceptores musculares são terminações nervosas livres que estão conectadas ao sistema nervoso central (SNC) por fibras mielinizadas finas (grupo III), ou fibras não-mielinizadas (grupo IV), de acordo com a nomenclatura numeral romana por Lloyd (1943) (105).

A carragenina é um dos agentes que produz inflamação aguda e é frequentemente utilizada em modelos de dor inflamatória, induz sensibilização envolvendo mediadores como citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e Óxido nítrico (NO), entretanto o papel dessas citocinas na dor músculo-esquelético são ainda pouco explorados (106).

Alguns modelos experimentais realizados em ratos e camundongos são utilizados e considerados pela comunidade científica como eficientes para a avaliação do potencial antinociceptivo, sendo os principais: Teste de formalina (injetar uma substância na pata traseira), Modelo das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (número de contração e rotação do abdômen), Modelo da placa quente (patas sobre uma superfície aquecida a mais de 50 °C), Teste de pressão crescente na pata de ratos (Von Frey eletrônico) e o Modelo do tail-flick (lapso de tempo entre a aplicação do estímulo térmico na cauda e a retirada da fonte de calor) (107).

Os modelos animais devem ser capazes de prever os efeitos de novos medicamentos em humanos, bem como a sensibilidade analgésica clínica, no qual geralmente são roedores, mas espécies alternativas têm sido buscadas e utilizadas (108).

Apesar dos avanços substanciais nas pesquisas e no tratamento da dor, os efeitos indesejados dos opioides e anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) continuam sendo um desafio significativo para o tratamento da dor a longo prazo. Os opioides causam dependência e tolerância, enquanto os AINEs causam distúrbios gastrointestinais (109).

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), como cetoprofeno (Profenid), diclofenaco (Voltaren), piroxicam (Feldene) e ácido mefenâmico (Ponstan), estão

entre os medicamentos mais comumente usados em todo o mundo para o tratamento da dor e inflamação, como na artrite reumatoide e na osteoartrite. No entanto, apesar dos AINEs apresentarem bons efeitos terapêuticos, podem causar toxicidade e efeitos adversos em diversos casos, como problemas renais por causa de sobredosagem aguda, inclusive na dose terapêutica (110).

A grande variedade de fármacos existentes, como os produtos naturais derivados de plantas com compostos químicos bioativos, representa uma alternativa importante na busca de agentes terapêuticos. Os óleos essenciais, extratos e seus constituintes, apresentam diversas propriedades farmacológicas, dentre elas o potencial efeito analgésico, que muitas vezes são inexplorados (111).

Os compostos 4,4-dimetil fitoesteróis encontrados em plantas e óleos vegetais, atuam no sistema endocanabinoide, promovendo atividade anti-inflamatória contra a artrite e o edema, dentre eles o eufol, primeiro descoberto a produzir efeitos benéficos neste sistema, presente na folha fresca da *Euphorbia tirucalli* (112).

Estudos realizados com o eufol na inflamação de pele a partir de um experimento com camundongos machos Swiss CD-1 administrados por via tópica 2,5 µg de TPA na orelha direita e de uso tópico o eufol 50 e 100 µg por orelha, reduzindo fatores que geram inflamação como a mieloperoxidase (MPO), COX-2, MIP-2, CXCL1/KC e N-acetilglucosaminidase (NAG) (113).

O eufol no tratamento da colite a partir de camundongos machos Swiss CD-1 foram tratados com 3% de (Dextran sulfato de sódio) DSS ou TNBS (15 mg/mL e 100 µL), utilizando por via oral 3, 10 e 30 mg/kg de eufol obteve a redução dos fatores inflamatórios CXCL1/KC, proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1), interleucina-1β (IL-1β), TNF-α, MIP-2, Interferon-gama (IFN-γ), Interleucina 6 (IL-6) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (114).

Efeitos adversos expressivos apresentados pela maioria dos fármacos com ação analgésica disponíveis no mercado farmacêutico, surge o grande interesse dos pesquisadores na descoberta de novos protótipos de fármacos provenientes de plantas da flora brasileira e quando associado a nanotecnologia, pode reduzir os

efeitos as e trazer uma melhor adesão ao tratamento, gerando uma melhor qualidade de vida para o paciente(111).

Esta tese de doutorado foi dividida em dois capítulos dedicados aos polímeros utilizados na produção das nanopartículas. O capítulo 1 trata dos processos envolvendo o polímero sintético PLGA e o capítulo 2 trata dos processos envolvendo o polímero natural quitosana.

CAPÍTULO 1

Produção e ação antinociceptiva das nanopartículas com látex de avelós contendo eufol produzidas com o polímero PLGA.

Contextualização desta etapa do trabalho:

O desenvolvimento experimental e caracterizações das nanopartículas de PLGA com látex de avelós contendo eufol foi realizada no mestrado defendido em 2017. Após este período, durante o doutoramento foi possível realizar novas partículas e avaliar os aspectos em meio biológico, em um modelo animal *in vivo* da ação antinociceptiva destas nanopartículas.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Produzir nanopartículas de PLGA e Quitosana com látex de avelós contendo eufol e analisar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório em modelo animal em teste *in vivo*.

2.2 ESPECÍFICO (S)

- Produzir um sistema de liberação com dimensões nanométricas;
- Encapsular de forma eficiente o princípio ativo selecionado;
- Caracterizar as nanopartículas produzidas frente a técnicas: raio hidrodinâmico, potencial zeta, espectroscopia UV-Vis, perfil de liberação, modelo cinético e FTIR.
- Avaliar o efeito do pH no mecanismo de velocidade de liberação do composto; e determinar a cinética de liberação *in vitro* do fármaco em diferentes meios;
- Produzir um sistema de liberação que não seja tóxico na ausência do princípio ativo;
- Analisar a ação antinociceptiva *in vivo* do extrato do látex de avelós contendo eufol em sua forma livre e encapsulada em polímeros biodegradáveis (PLGA).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Equipamentos

- Agitador magnético, modelo IKA Magnetic Stirrers RH basic 2;
- Analgesímetro Digital ou Teste de von Frey eletrônico (Insight – Brasil)
- Balança analítica marca Marte® modelo AY 220;
- Capela de fluxo laminar unidirecional marca Veco® modelos CFLV 09 e CFLV 12;
- Centrífuga de bancada para microtubos marca Eppendorf® modelo MiniSpin;
- Chapa de agitação e aquecimento marca Logen Scientific® modelo LS61- 220;
- Dispersador de alto desempenho Ultraturrax, marca IKA® modelos T25, equipado com elementos de dispersão S25N-25F ou S25N-18G;
- Dispersador de alto desempenho Ultraturrax, marca IKA® modelo T10 standard PCR kit, equipado com o elemento de dispersão S10N-5G;
- Espectrofotômetro de fluorescência marca Hitachi High-Technologies Corporation® modelo F-7000.
- Espectrofotômetro Infravermelho com transformada de Fourier marca Shimadzu® modelo IRPrestige -21;
- Espectrofotômetro UV-Vis marca Hitachi High-Technologies Corporation®, modelo U-3900H;
- Estufa Incubadora de CO₂ marca Thermo Scientific®, modelo 8000 WJ;
- Medidor de tamanho e potencial zeta, Zetasizer Nano ZS Series, marca Malvern Instruments Limited®
- Micropipetas automáticas com escalas variáveis de 2-20 µL, 20-200 µl e 100-1000 µL, marca Kasvi®, modelo Ecopipette;
- Mini Spray dryer marca Büchi modelo B-290.
- Teste Plantar ou Teste de Hargreaves (Ugo Basile - Itália)

3.1.2 Reagentes

Os materiais propostos e utilizados para o desenvolvimento desta etapa do projeto foram utilizados sem prévia purificação, exceto quando indicados. Na produção, caracterização e análises das nanopartículas, foram utilizados os seguintes reagentes:

- Ácido clorídrico 32% P.A., HCl, MM 36,46 g/mol, teor entre 31 e 33%, 1,16 kg/L, marca Vetec Química Fina®;
- Ácido poli (D,L-láctico-co-glicólico), PLGA, $[C_3H_4O_2]_x[C_2H_2O_2]_y$, proporção 50:50, MM entre 40.000-75.000 g/mol, grau de pureza acima de 99,9%, marca Sigma-Aldrich®;
- Água destilada e Água ultrapura;
- Álcool etílico P.A. ACS, C_2H_6O , MM 46,07 g/mol, dosagem mínima 95,0%; densidade 0,81 g/mL, marca Vetec Química Fina®;
- Álcool Metílico P.A. 99,8% (Metanol) CH_4O , peso molecular: 32.04 g/mol, marca Vetec Química Fina® - Fr 1000 mL;
- Álcool polivinílico, PVA (*Polyvinyl Alcohol*), $[-CH_2CHOH-]_n$, MM entre 13.000-23.000 g/mol, hidrolisado entre 87-89,0%, marca Sigma-Aldrich®;
- Alginato de sódio (MM: 584,44 g/mol Merck);
- Cloreto de Amônio P.A.-A.C.S., 100% Peso Molecular: 53,49 – Synth;
- Cloreto de sódio P.A. A.C.S., NaCl, MM 58,44 g/mol, teor acima de 99,0%, marca Vetec Química Fina®;
- Cloreto de potássio P.A.-A.C.S.– KCl Peso Molecular: 74,55-Synth;
- Diclorometano P.A., CH_2Cl_2 , grau analítico de pureza, teor acima de 99,0%, marca Dinâmica®;
- Dimetilsulfóxido P.A., DMSO, C_2H_6OS , 78,13 g/mol, grau biológico de pureza, teor acima de 99,9%, marca Sigma-Aldrich®;

- Fosfato de potássio dibásico; ref 315.09, Vetec Química Fina[®], Teor: mín. 98,0% pH (Sol. 5% a25°C): 8,5 a 9,6 em frasco de 1000g;
- Fosfato de sódio dibásico dihidratado P.A., Na₂HPO₄.2H₂O, MM 177,99 g/mol, grau de pureza acima de 99,0%, marca Vetec Química Fina[®],
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A., NaH₂PO₄.H₂O, MM 137,99 g/mol, grau de pureza acima de 98,0%, marca Vetec Química Fina[®];
- Hidróxido de amônio PA (amoníaco) frasco 1000 mL, Concentração: 28 a 30%, marca Synth;
- Hidróxido de Sódio Solução 50% NaOH, marca Synth;
- Tampão ácido clorídrico pH 2,0;
- Tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4;
- Tampão cloreto de amônio pH 8,5.

3.1.3 Material vegetal

O látex da *Euphorbia tirucalli* L. foi coletado ao longo de 2017 e 2018, no jardim na cidade do Sol Nascente EQNP 8/12, Ceilândia Sul - Distrito Federal na região centro-oeste do Brasil com latitude -15.837639, longitude -48.121269 a uma altitude de 1170 m ao nível do mar.

A coleta foi armazenada em cinco lotes e mantidos sob refrigeração, de forma a minimizar diferenças sazonais.

Para uma melhor quantificação e precisão nos dados, o látex foi transformado em pó, coletado e separado em lotes. Coletou-se 20 mL do látex e solubilizou em 80 mL de solvente (sendo uma solução de metanol e água 4:1), deixando agitar por 3 dias até obter o pó, sendo o mesmo estocado na ausência de luz e sob refrigeração.

Além disso, foi realizado o registro no Sistema Nacional do Patrimônio Genético e Gestão do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) –A906C8F do látex da *E. tirucalli*.

3.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA

O método de evaporação do solvente foi a escolha para o preparo das nanopartículas vazias e nanopartículas com látex de avelós contendo eufol (figura, cuja etapas de desenvolvimento foram realizadas durante o mestrado para a caracterização. Nesta etapa, foram refeitas novas nanopartículas seguindo a metodologia descrita na dissertação. Brevemente, foram preparadas duas formulações com concentrações de 1 e 5 mg de látex de avelós contendo eufol. No preparo das nanopartículas foram utilizadas duas soluções, sendo a primeira solução de álcool polivinílico 2%. A segunda solução foi preparada pela dissolução de 0,05g de PLGA em 60 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) e as quantidades de látex de avelós contendo eufol descritas acima (115).

A solução aquosa de PVA 2% foi colocada sobre agitação mecânica com o ultraturrax onde foi realizado o gotejamento gradativo com solução orgânica de PLGA+ látex de avelós contendo eufol. Em seguida, a solução foi submetida a agitação magnética durante 4 horas, para ocorrer a evaporação do diclorometano. A solução foi centrifugada por 5 min a 15000 rpm, posteriormente foi retirado o sobrenadante, no qual contém o PVA e analisado em espectrofotômetro para a determinação da porcentagem de látex de avelós contendo eufol encapsulado (116).

As partículas precipitadas foram lavadas duas vezes com água, para remover excesso de PVA, centrifugadas e congeladas com posterior liofilização(117). As micros e nanopartículas produzidas, foram caracterizadas novamente de forma a assegurarmos que possuem as mesmas características das nanopartículas obtidas anteriormente no mestrado. Assim, após essas caracterizações as nanopartículas foram preparadas para os ensaios *in vivo*.

3.3 MODELO ANIMAL E PRINCÍPIOS BIOÉTICOS

Neste estudo foram utilizados ratos machos da família *Muridae*, linhagem Wistar, divididos aleatoriamente em grupos. O planejamento estatístico foi realizado com base na experiência prévia da colaboradora do projeto e no artigo da literatura de Lee *et al.*, (118), conforme prevê o item “5.2.6.2. Aspectos Específicos”, página 15 da “Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos” do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (119).

Os animais são provenientes do biotério da Universidade Católica de Brasília (UCB) mediante um laudo técnico atestando a qualidade sanitária dos animais (análise bacteriológica, bioquímica, hematológica e parasitológica), que passaram por um período de adaptação ao biotério da Faculdade de Medicina (FM – UnB) antes de sua utilização.

Os grupos de animais foram acondicionados em cabines no biotério, dentro de gaiolas de plástico (41 x 34 x 16 cm) com 4 animais por gaiola e mantidos em ambiente com controle de temperatura (20-25° C) e ciclos claro-escuro fixos de 12/12 horas.

Os animais receberam a dieta padrão – DP (Nutriterra - Nutrição Animal e Vegetal - Eireli – ME, Luziânia- DF) na forma de *pellet*, e água filtrada *ad libitum*.

Os animais após o término dos procedimentos relativos aos experimentos comportamentais foram eutanasiados. Os protocolos para uso de animais em experimentação foram seguidos de acordo com as “Normas Éticas para Investigações Envolvendo Dor Experimental em Animais Acordados” (120), com “Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos” e com as “Diretrizes da Prática de Eutanásia” do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (121) e somente foram realizados após aprovação pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB).

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa animal da UnB sob o número de protocolo 58/2019. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

3.4 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

A avaliação da dor ou nocicepção pode ser realizada por meio de testes comportamentais envolvendo a quantificação da sensibilidade dolorosa dos membros pélvicos (patas traseiras) dos ratos a estímulos mecânicos e térmicos. Em ambos os testes os animais foram acondicionados em caixas de acrílico e não sendo manipulados durante os testes, tendo total liberdade de movimento. Os testes consistem em expor os membros pélvicos dos animais a fontes de força ou calor - ambas de intensidade conhecida - para avaliação dos limiares nociceptivos mecânico e térmico, respectivamente. Neste sentido, o limiar mecânico foi analisado utilizando-se um Analgesímetro Digital ou Teste de von Frey eletrônico (Insight – Brasil) e o limiar térmico utilizando-se o Teste Plantar ou Teste de Hargreaves (Ugo Basile - Itália)(99).

O método de von Frey, comumente utilizado para avaliar o comportamento nociceptivo, foi modificado para um método eletrônico usado primeiramente em humanos e posteriormente em ratos e em camundongos utilizando-se um estesiômetro eletrônico (122).

O transdutor Estesiômetro plantar dinâmico (Ugo Basile) de pressão é acoplado a um detector de força digital que mede a força aplicada em gramas (123). Durante a realização dos testes é mensurada a força em gramas necessária para que o animal retire a pata (teste mecânico) ou o tempo que o animal leva para retirar a pata (membro pélvico) da fonte de calor necessária para que seja desencadeada uma reação interpretada como dolorosa. Para o estímulo mecânico quanto menor a força para causar a retirada do membro pélvico, menor é o limiar doloroso. Para o

estímulo térmico, quanto menor for o tempo que o animal tolerar o estímulo no membro pélvico, menor é seu limiar doloroso.

É necessário enfatizar que em nenhum momento o animal é contido, e a retirada do membro pélvico da fonte de força ou calor é livre, portanto, assim que detectada força ou calor suficiente para causar nocicepção espera-se que os animais retirem a pata; ao fazer isso se interrompe o processo imediatamente. Tanto a fonte de força quanto a força de calor não têm potencial para causar lesão tecidual, apenas estimular neurônios sensoriais e desencadear resposta nociceptiva nos animais. Abaixo se encontra Figura 9, referente ao aparato de von Frey Eletrônico, com visualização da fonte de força (124).

Figura 9 - Teste Von Frey



Fonte: Ugo Basile e DOL (124, 125)

Para o teste de Hargreaves o equipamento é semelhante, a principal diferença é a fonte de calor por meio de infravermelho emitida pelo equipamento.

Antes de começar o experimento, os ratos foram colocados em gaiolas de acrílico com pisos de grade de arame por 15-30 minutos, o que permitiu que os ratos começassem a adaptação ambiental.

Os testes foram realizados em diferentes tempos após os tratamentos e os experimentos foram conduzidos de forma cega, ou seja, o experimentador não sabe quais tratamentos os grupos receberam.

3.4.1 Análise estatística

Os resultados são expressos com médias feitas em 5 animais em cada grupo e representam a intensidade da hipernocicepção mecânica. Comparações entre três ou mais tratamentos foram feitas usando ANOVA de uma via com testes t *post hoc* de Tukey (Prism 8.0, GraphPad, San Diego, EUA), em que, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta etapa são apresentados os resultados obtidos dos ensaios *in vivo* com as nanopartículas de PLGA contendo látex de avelós contendo eufol.

4.1 TESTE *IN VIVO*

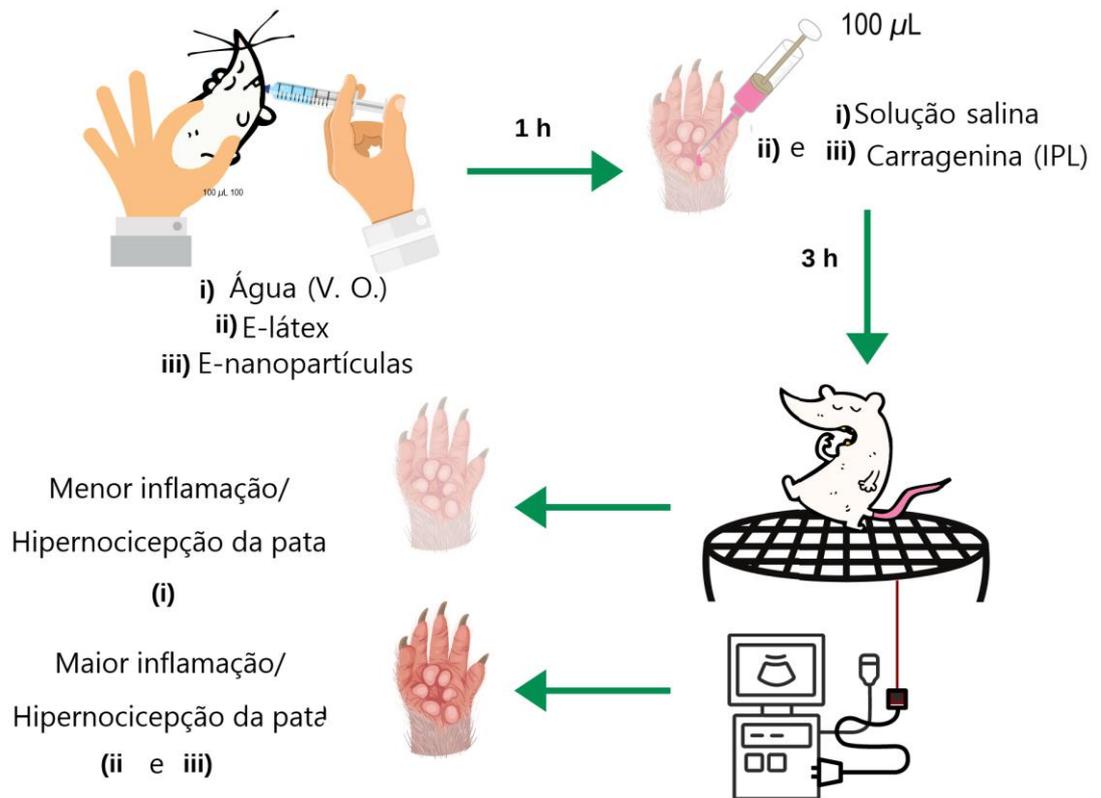
4.1.1 Teste mecânico nociceptivo

O teste Von Frey eletrônico emprega uma Ponta Universal contendo um filamento, que aplica pressão para cima na pata traseira do rato, para evocar um reflexo de flexão da pata traseira. Uma vez que a pata foi puxada para longe, o rato imediatamente estremece. Por meio da remoção da pata, a força registrada foi exibida automaticamente(126). Os resultados são expressos como força de hipernocicepção (em gramas), que é determinada pela subtração da força medida após o tratamento do valor basal (força 0).

A indução da hiperalgesia inflamatória foi utilizado carragenina a 100µg/50µL em ambas patas traseiras, hiperalgesia inflamatória ocorrendo dentro de 6h, cujo pico da dor ocorre na terceira hora (127).

A carragenina foi administrada localmente (pata traseira, intraplantar - i.pl.) em um volume de 100 µL por pata. Nanopartículas contendo eufol e apenas o látex de avelós contendo eufol foram entregues por via oral (V.O.). Os efeitos de pré-tratamento de nanopartículas com eufol e apenas eufol (60 min antes) foram testados contra sensibilização mecânica induzida por carragenina.

Figura 10 – Doses por via oral de água, látex com eufol e nanopartículas com eufol



Fonte: Autora (2021)

As doses de eufol (3 e 30 mg / Kg), nanopartículas com eufol (3, 30 e 100 mg / Kg) e carragenina (100 µg) foram derivados de estudos anteriores e experimentos piloto(123). O látex de avelós contendo eufol foi diluído em etanol e as nanopartículas contendo eufol foram diluídas em água e carragenina (Sigma, EUA) em solução salina, imediatamente antes do uso. O efeito de sensibilização mecânica da carragenina foi avaliado 3 horas após sua administração (19, 128).

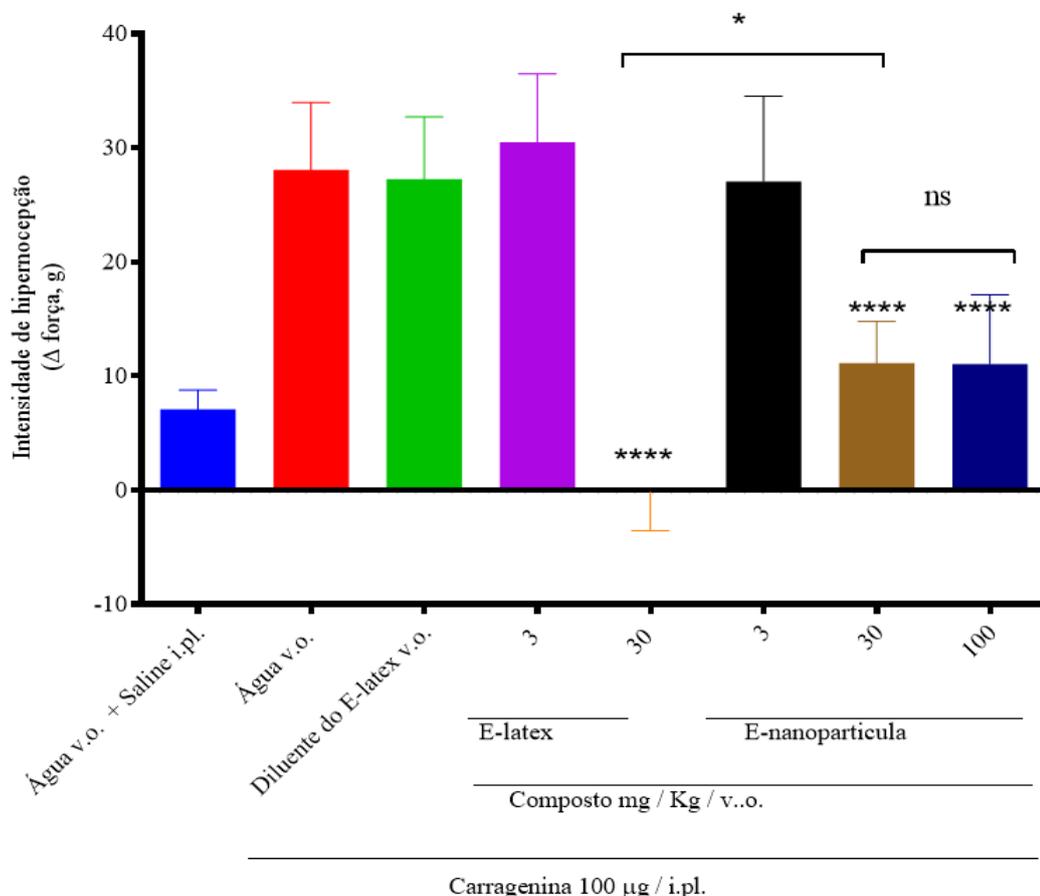
4.2 ENSAIO DE HIPERNOCICEPÇÃO *IN VIVO* DO LÁTEX COM EUFOL E NANOPARTÍCULAS CONTENDO EUFOL

Conforme descrito antes, o eufol isolado mostrou efeito antinociceptivo em camundongos após administração (14, 128, 129). O látex puro administrado por via oral na concentração de 30 mg/Kg apresentou um excelente resultado, no qual não houve variação de hipernocicepção, comprovando o potencial antinociceptivo. O látex puro na concentração de 100 mg/Kg levou os animais a óbito. O encapsulamento do látex-eufol em nanopartículas de PLGA visa preservar o efeito antinociceptivo em comparação com sua forma de látex-eufol livre.

O pré-tratamento com nanopartículas contendo eufol (30 ou 100 mg / Kg) por via oral ($\% \pm 11,150 \ 1,622$, $n = 5$ e $\% \pm 11,068 \ 2,701$, $n = 5$, respectivamente) ou látex-eufol (30 mg / Kg) por via oral ($\% -0,178 \ 1,513$, $n = 5$) inibiu significativamente a hipernocicepção mecânica induzida por carragenina. Foi a primeira vez que os efeitos antinociceptivos para nanopartículas com eufol foram descritos e de acordo com os dados do controle do látex-eufol, bem como dados semelhantes ao da pesquisa de Quintans(130).

A comparação entre a intensidade dos efeitos do látex e das nanopartículas mostrou uma diferença significativa, como vemos na figura 11. Uma vez administrado, a liberação do medicamento é um parâmetro importante para saber como o sistema manterá a concentração do composto nos tecidos alvos em um valor desejado o maior tempo possível, exercendo um controle sobre a taxa de liberação do fármaco e sua duração.

Figura 11 - Comparação dos resultados da intensidade hipernociceptiva em gramas



No teste *in vivo* observa uma grande antinocicepção com eufol nos ratos, como também verificado nas sequências do trabalho de Dutra *et al* (17), no qual houve uma maior eficácia na inibição da expressão de mediadores pró-inflamatórios *in vitro* e *in vivo*.

As propriedades farmacocinéticas, bem como farmacodinâmicas conferidas pela nanoencapsulação do látex-eufol pode ser explorada em estudos futuros. Os dados demonstraram o efeito antinociceptivo para nanopartículas contendo eufol, sugerindo que a nanoencapsulação do látex-eufol preservou as propriedades desejadas.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo revelaram que as E-NPs foram preparadas com sucesso usando o método de evaporação de solvente com uma eficiência de encapsulamento de 75%. As características físico-químicas deste sistema de liberação como diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e estabilidade física, bem como a biocompatibilidade e biodegradabilidade do polímero indicaram que as E-NPs são adequadas para administração oral devido à biodegradação versátil em pH distinto.

Os ensaios em animais com E-NPs e E-látex inibiram significativamente a hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina, confirma que o processo de nanoencapsulação do látex de avelós protege não só o princípio ativo encapsulado, como também o paciente, evitando os efeitos adversos e tóxicos, levando o fármaco ao local de ação e com ação antinociceptiva, com efetiva entrega do fármaco. Mais estudos são necessários para explorar o uso da nanotecnologia para o possível efeito antinociceptivo induzido pelo E-látex.

Os testes em animais com nanopartículas e látex puro inibiram significativamente a hipernocicepção mecânica induzida por carragenina, sugerindo que o processo de nanoencapsulação do látex-eufol preservou as características desejadas. Estudos posteriores podem explorar o uso da nanotecnologia para o possível efeito antinociceptivo induzido pelo látex da *E. tirucalli*.

CAPÍTULO 2

Produção e caracterização de nanopartículas de quitosana contendo látex da avelós contendo eufol produzidas por spray dryer.

Contextualização desta etapa do trabalho:

O desenvolvimento experimental e caracterizações das nanopartículas de quitosana foram durante o doutorado, no qual foi realizado toda caracterização físico-química e não foi realizado os ensaios *in vivo* devido a pandemia de Covid-19.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 MATERIAIS

6.1.1 Equipamentos

- Agitador magnético, modelo IKA Magnetic Stirrers RH basic 2;
- Balança analítica marca Marte[®] modelo AY 220;
- Capela de fluxo laminar unidirecional marca Veco[®] modelos CFLV 09 e CFLV 12;
- Chapa de agitação e aquecimento marca Logen Scientific[®] modelo LS61- 220;
- Espectrofotômetro de fluorescência marca Hitachi High-Technologies Corporation[®] modelo F-7000.
- Espectrofotômetro Infravermelho com transformada de Fourier marca Shimadzu[®] modelo IRPrestige -21;
- Espectrofotômetro UV-Vis marca Hitachi Hight-Technologies Coporation[®], modelo U-3900H;
- Estufa Incubadora de CO₂ marca Thermo Scientific[®], modelo 8000 WJ;
- Medidor de tamanho e potencial zeta, Zetasizer Nano ZS Series, marca Malvem Instruments Limited[®]
- Micropipetas automáticas com escalas variáveis de 2-20 µL, 20-200 µl e 100-1000 µL, marca Kasvi[®], modelo Ecopipette;
- Mini Spray dryer marca Büchi modelo B-290.

6.1.2 Reagentes

Os materiais propostos e utilizados para o desenvolvimento deste projeto foram utilizados sem prévia purificação, exceto quando indicados. Na produção, caracterização e análises das nanopartículas, foram utilizados os seguintes reagentes:

- Ácido clorídrico 32% P.A., HCl, MM 36,46 g/mol, teor entre 31 e 33%, 1,16 kg/L, marca Vetec Química Fina®;
- Água destilada e Água ultrapura;
- Álcool etílico P.A. ACS, C₂H₆O, MM 46,07 g/mol, dosagem mínima 95,0%; densidade 0,81 g/mL, marca Vetec Química Fina®;
- Álcool Metílico P.A. 99,8% (Metanol) CH₄O, peso molecular: 32,04 g/mol, marca Vetec Química Fina® - Fr 1000 mL;
- Alginato de sódio (MM: 584,44 g/mol Merck);
- Cloreto de Amônio P.A.-A.C.S., 100% Peso Molecular: 53,49 – Synth;
- Cloreto de sódio P.A. A.C.S., NaCl, MM 58,44 g/mol, teor acima de 99,0%, marca Vetec Química Fina®;
- Cloreto de potássio P.A.-A.C.S.– KCl Peso Molecular: 74,55-Synth;
- Diclorometano P.A., CH₂Cl₂, grau analítico de pureza, teor acima de 99,0%, marca Dinâmica®;
- Fosfato de potássio dibásico; ref 315.09, Vetec Química Fina®, Teor: mín. 98,0% pH (Sol. 5% a25°C): 8,5 a 9,6 em frasco de 1000g;
- Fosfato de sódio dibásico dihidratado P.A., Na₂HPO₄.2H₂O, MM 177,99 g/mol, grau de pureza acima de 99,0%, marca Vetec Química Fina®,
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A., NaH₂PO₄.H₂O, MM 137,99 g/mol, grau de pureza acima de 98,0%, marca Vetec Química Fina®;
- Hidróxido de amônio PA (amoníaco) frasco 1000 mL, Concentração: 28 a 30%, marca Synth;
- Hidróxido de Sódio Solução 50% NaOH, marca Synth;
- Quitosana (Sigma Chem. Aldrich);
- Tampão ácido clorídrico pH 2,0;
- Tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4;

- Tampão cloreto de amônio pH 8,5.

6.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

O preparo das nanopartículas iniciou-se com o preparo de uma solução de quitosana com ácido acético, na qual foi adicionada 500 mg de quitosana dissolvida em 50 mL de água ultrapura e 1,0 mL de ácido acético a 1%, sob agitação com a barra magnética até total dissolução, transparência e eliminação do odor do ácido acético na solução.

No preparo de nanopartículas de quitosana com o fármaco, foi seguido o mesmo procedimento anteriormente apresentado com a adição de 250 mg do látex de avelós contendo eufol em forma de pó, agitando até total solubilização.

Após o preparo das soluções (nanopartículas de quitosana vazia e nanopartículas de quitosana com o fármaco) foram introduzidas no Mini Spray dryer marca Büchi modelo B-290, com as seguintes especificações: temperatura de entrada (Inlet) 110 °C; temperatura de saída (Outlet) 63°C e vazão de bombeamento (Pump) 15 %.

A formação de gotículas a partir do bico atomizador, em meio de secagem quente, gerou a evaporação do solvente, difusão do soluto, secagem e precipitação em um coletor final, no qual foi armazenado em frasco âmbar e em temperatura ambiente. Procedimento no qual pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 - Síntese de micropartículas de quitosana e Spray dryer



Fonte: Autora

6.2.1 Caracterização para estabilidade física e química do sistema nanoestruturado

6.2.1.1 Análise física - Espalhamento dinâmico de luz

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS), é amplamente utilizada para a avaliação das dimensões de partículas em suspensão, nas áreas de pesquisa como na indústria (131).

O DLS é bem estabelecido e fácil de usar em amostras homogeneamente dispersas, fornecendo informações sobre a distribuição de tamanho das dispersões de NP. A presença de poucas partículas grandes, tais como agregados ou aglomerados, pode, no entanto, dominar a intensidade do sinal luminoso disperso, obscurecendo a presença das partículas constituintes mais pequenas (132).

As análises das nanopartículas de quitosana foram verificadas por espalhamento dinâmico de luz (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Reino Unido), considerando a média de três medições; configurando no equipamento no equilíbrio igual a 0, a uma temperatura de 25 ° C, sendo diluído 100 vezes as nanopartículas (5 mg) em 25 mL de PBS inicialmente e inserida na cubeta para análise a quantidade de 1000 µL, no ângulo de espalhamento fixado em 173° e aquisições automáticas (com relação ao número e ao tempo de aquisição).

A análise do índice de polidispersão mostram nanopartículas agregadas ou dispersas, no qual valores próximos a 0 mais dispersas e próximos a 1 mais agregadas.

6.2.1.2 Análise física – Potencial Zeta

O potencial zeta é um termo científico para a eletrocinética em sistemas coloidais, isto é, a função da carga na dupla camada elétrica na superfície da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda, possibilitando analisar a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada estacionária de fluido ligado à partícula dispersa (133, 134).

O potencial zeta está relacionado ao tamanho da partícula, em que, uma diminuição no tamanho desta, leva a uma área de superfície específica maior e um aumento do valor do potencial zeta absoluto, o que ajudará a partícula a melhorar a estabilidade do sistema e *vice-versa* (134).

Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão, uma vez que grandes forças repulsivas tendem a evitar agregação, o qual indicam boa estabilidade coloidal de dispersão acima de 30 mV ou acima de -30 mV (135).

As nanopartículas de quitosana (5 mg) foram diluídas 40 vezes em PBS, inseridas no equipamento (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Reino Unido)

modo Zeta, em uma temperatura de 25° C, realizadas em triplicata e analisadas as cargas das nanopartículas.

6.2.1.3 Análise físico-química - Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento foi definida como a razão, em porcentagem, da quantidade de fármaco associada as nanopartículas pela quantidade inicial de fármaco utilizada para produção das partículas, em triplicatas, e utilizando os valores obtidos na seguinte equação (136):

$$EE(\%) = \left(\frac{\text{Quantidade de Droga Nanoencapsulado}}{\text{Quantidade inicial de Droga}} \right) \times 100 \%$$

6.2.1.4 Análise - Espectroscopia de Absorção Molecular (UV-Vis)

Com as cubetas limpas foi inserido o solvente, no qual foram avaliadas as nanopartículas para obtenção da linha de base e em seguida posicionada a cubeta com as amostras do látex de avelós contendo eufol em forma de pó diluídas 100 X com o solvente metanol e outra varredura com as nanopartículas de quitosana diluídas, verificando as medidas de absorbância através do modo de varredura dentro da faixa espectral de 200 a 800 nm, com velocidade de escaneamento de 240 nm/min(137).

Os dados obtidos foram tratados com o software UV Solutions 3.0® e transferidos para o programa de construção gráfica GraphPad Prism 7.0®.

6.2.1.5 Análise físico-química e espectroscópica - Perfil de liberação

A liberação do fármaco é um importante meio de caracterização de uma forma farmacêutica (FF) no desenvolvimento galênico, identificação de variáveis críticas na formulação, controle de qualidade, assuntos regulamentares, estabelecimento de correlações *in vitro/in vivo* e sua resposta no meio biológico (138).

A difusão é o movimento térmico de qualquer partícula de um líquido, gás e alguns sólidos a temperaturas acima do zero absoluto, explica o fluxo líquido de matéria de maior para menor concentração e pode ser discutida do ponto de vista das leis de Fick, na presença de um gradiente de concentração, ou do ponto de vista físico e atômico considerando o movimento aleatório das partículas; como ocorre em uma única direção (unidimensional), como no caso do fluxo sanguíneo por uma artéria (139).

A determinação do perfil de liberação (PL) foi realizada com as nanopartículas contendo o fármaco, utilizando-se a técnica de Espectrometria de Absorção Molecular no Ultravioleta/Visível. Desta forma, em um recipiente inseriu-se 10 mg de nanopartículas contendo o fármaco encapsulado e completou-se com 3 mL da solução tampão (pHs 2,0; 7,4 e 8,5) em temperatura de 36,5° C.

Os sobrenadantes foram transferidos para uma cubeta, apenas no momento da leitura. A avaliação foi realizada em espectrofotômetro com a linha de base pronta, no $\lambda = 238$ nm, acrescentando uma barra magnética para agitar a solução tampão com a inserção das nanopartículas e depois foi acompanhada nos primeiros 10 minutos com pausas de 1 em 1 minuto, depois de 5 em 5 minutos até completar 1 hora, medidas de 10 em 10 minutos até completar 1 hora e depois pausas de 1 em 1 hora, avaliando a liberação durante 6 horas.

Os valores obtidos no estudo do perfil de liberação podem ser analisados quantitativamente usando diferentes modelos matemáticos, estas mudanças qualitativas e quantitativas em uma formulação podem alterar a liberação de fármacos e desempenho *in vivo*, desenvolvendo ferramentas que facilitam o desenvolvimento do produto, reduzindo a necessidade de estudos biológicos ou contribuindo para um melhor entendimento da farmacocinética e farmacodinâmica (140).

6.2.1.6 Estudo da cinética de liberação *in vitro*

Novos materiais podem ser empregados para promover a liberação gradual de um fármaco veiculado em uma forma farmacêutica utilizando excipientes como polímeros, com características e propriedades especiais com a capacidade de formação matrizes ou membranas microporosas/semipermeáveis, capacidade de intumescimento (expansão) frente a água e capacidade de complexação com fármacos (141).

Dentre os tipos de matrizes para revestimento podem ser divididas em hidrofílicas como por exemplo a quitosana, goma xantana, hidroxietilcelulose e hidrofóbicas como cera de carnaúba, cera de abelha, polietilenos, entre outros (142).

Os sistemas de matrizes hidrofílicas, no caso a quitosana, resultam da interação complexa entre a dissolução, a difusão e os mecanismos de erosão, no qual a água presente no trato gastro intestinal penetra na superfície da FF, hidrata o polímero, que intumescer e forma uma camada gelificada. O fármaco é liberado por difusão através dessas camadas gelificadas e/ou erosão da matriz, expõe a superfície da FF novamente e o processo se repete (143).

O uso de modelos cinéticos é útil na elucidação de mecanismos de liberação, a partir dos parâmetros obtidos em um modelo cinéticos, há uma melhor comparação dos diferentes sistemas de entrega de fármacos, bem como correlacionar com dados do perfil de liberação (144).

A qualidade geral do ajustamento do modelo de regressão é medida pelo coeficiente de determinação ou R^2 (Eq. 1), no qual indica que a proporção da variação da variável dependente ou regressa, é explicada pela variável explanatória ou regressor, sendo o valor de R^2 entre 0 e 1, quanto mais próximo de 1, melhor o ajuste (145).

$$R = \frac{[N \cdot \sum_{i=1}^N (x_i \cdot y_i) - \sum_{i=1}^N x_i \cdot \sum_{i=1}^N y_i]^2}{[N \cdot \sum_{i=1}^N x_i^2 - (\sum_{i=1}^N x_i)^2] \cdot [N \cdot \sum_{i=1}^N y_i^2 - (\sum_{i=1}^N y_i)^2]} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

y_i = valor observado

i = ponto de dados

N = número de pontos de dados

O desvio da raiz do erro quadrático médio, *Root-mean square error* ou RMSE (Eq. 2) é uma medida utilizada frequentemente das diferenças entre os valores (amostra ou população valores) previstos por um modelo, para examinar qual dos conjuntos de previsões fornece a melhor precisão; o analista pode usar critérios com base em algumas funções de perda média ou mediana dos erros de previsão (146).

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y})^2}{N}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Para comparar os modelos cinéticos que mais se enquadram em cada perfil de liberação, foi feita uma análise do maior R^2 e do menor RMSE através do software KinetDS 3[®], sendo testados em todas os pHs com as nanopartículas em todos os seguintes modelos matemáticos: Ordem zero, Ordem 1, Ordem 2, Ordem 3, Korsmeyer-Peppas, $y=a*\ln(x)+b$, Weibull, Weibull with lag time, Hixson-Crowell, Hickson-Crowell with lag time, Higuchi, Baker-Lonsdale e Korsmeyer-Peppas com lag.

Os modelos cinéticos que foram usados na interpretação dos dados de liberação do medicamento, a partir do software e são apresentados na Tabela 2 com as equações dos modelos cinéticos, realizados a partir dos resultados obtidos no perfil de liberação.

Tabela 2 - Modelos cinéticos usados para análise em geral de liberação de fármacos em materiais nanoestruturados e suas equações

Modelo	Equação
--------	---------

Ordem zero	$Q = k \times t + Q_0$
Ordem 1	$Q=Q_0e^{k \times t}$
Ordem 2	$\frac{1}{Q} = k \times t + \frac{1}{Q_0}$
Ordem 3	$\frac{1}{Q^2} = k \times t + \frac{1}{Q_0^2}$
Korsmeyer-Peppas	$Q=k \times t^2$
Probabilidade Log $y=a*\ln(x)+b$	$y=a \times \ln(x)+b$
Weibull	$m=1-\exp\left[\frac{-(t)^b}{a}\right]$
Weibull com tempo log	$m=1-\exp\left[\frac{-(t-T_{log})^b}{a}\right]$
Hixson-Crowell	$Q^{\frac{1}{3}}=k \times t + Q_0^{\frac{1}{3}}$
Hixson-Crowell com tempo log	$Q^{\frac{1}{3}}=k \times (t-T_{log}) + Q_0^{\frac{1}{3}}$
Higuchi	$Q=k \times \sqrt{t}$
Baker-Lonsdale	$\frac{3}{2} \times [1-(1-Q)^{2/3}] - Q = k \times t$
Korsmeyer-Peppas com tempo log	$Q=k \times (t - T \log)^2$

Q - quantidade (%) de substância liberada no momento t

Q_0 - valor inicial de Q

t - tempo

k - constante de taxa
n - expoente de liberação
m - quantidade de medicamento liberado; $Q = 100\% * m$
a - constante de tempo
b - parâmetro de forma
T log – Tempo de atraso

6.2.1.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho das nanopartículas de quitosana contendo o pó do látex e do pó do látex, foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro FTIR (Fourier Transform Infrared), modelo IR Prestige 21 da marca Shimadzu®, para verificação da presença de grupos funcionais. Para leitura das amostras foram preparadas 04 pastilhas de brometo de potássio (KBr) com massa média de 130 mg, sendo uma pastilha para verificação dos espectros do látex com 100 mg de KBr e 30 mg do fármaco, uma pastilha de 100 mg de KBr e 30 mg das nanopartículas de quitosana com o fármaco, 100 mg de KBr e 30 mg das nanopartículas de quitosana e 100 mg de KBr para realizar o espectro do branco.

Os dados foram analisados e aperfeiçoados utilizando o programa Graph Pad Prism 7 e Microsoft Excel® 2013. Os gráficos do FTIR foram tratados inicialmente pelo software Shimadzu® IR solution 1.50, 2008. Os gráficos e ajustes estatísticos dos dados do espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta foram obtidos a partir do Zetasizer software 7.03 Malvern instruments® 2002-2013.

As estruturas químicas foram criadas a partir do software ACD/ChemSketch® 2010, versão 12.01 e as ilustrações criadas a partir do software Paint 3D da Microsoft Corporation. O gerenciamento e formatação das referências foi utilizado o software EndNote x9.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coleta para obtenção do látex de avelós contendo eufol ocorreu ao longo de 2018 e 2020, principalmente no verão, a partir de uma árvore, com proximidade nas datas das coletas para obtenção de lotes mais uniformes e confiáveis, sendo armazenados sob refrigeração, para prevenir a perda dos seus compostos.

Em seguida para conseguir concentrações precisas da quantidade que seria utilizada do látex em cada etapa dos testes de caracterização das nanopartículas, foi necessária a transformação do látex, sob estado líquido, em estado sólido, contribuindo inclusive no armazenamento e conservação do mesmo.

A identificação das características do látex obtido pela *E. tirucalli* como seus constituintes fitoquímicos e pelo coeficiente de partição mais lipofílica, $\log = 8,9$, é importante para analisar o resultado do material usado na síntese das nanopartículas (147), neste caso a união da quitosana frente ao pó obtido do látex e sua conformação.

As vantagens na síntese de nanopartículas de quitosana pelo método de spray dryer, onde pode-se atingir faixas de tamanho, entre 100 nm e 350 nm com uso de materiais para revestimento das nanopartículas como gomas, amidos e maltodextrinas e obtenção de emulsões estáveis, com alta eficiência de encapsulação, no qual a síntese dessas nanopartículas conseguiram chegar em boas condições (148, 149).

Antes de encapsular o fármaco com quitosana foi realizada a curva de calibração para confirmar o grau da correlação entre as concentrações do fármaco.

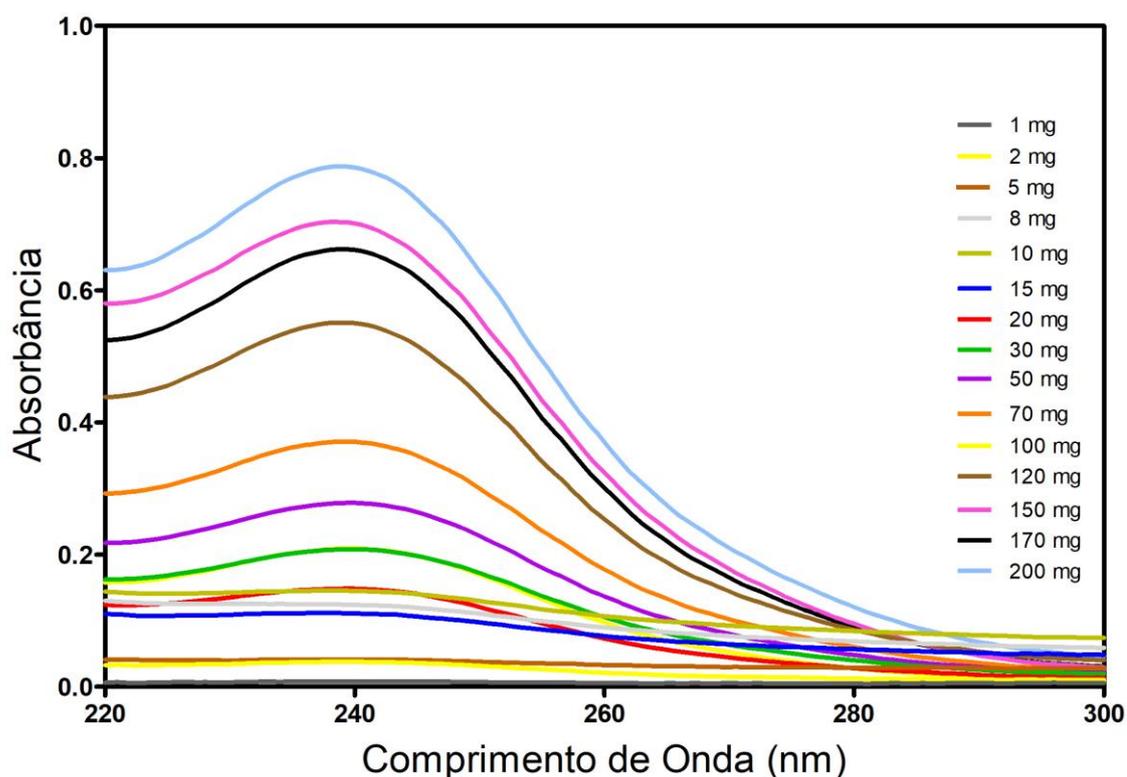
7.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

A curva analítica foi preparada em 15 pontos nas seguintes concentrações do pó do látex (1, 2, 5, 8, 10,15, 20, 30, 50, 70, 100, 120, 150, 170 e 200 mg), sendo que cada concentração foi solubilizada em 10 mL de metanol.

Os valores de absorvância foram determinados por espectrofotômetro no comprimento de onda de 250 nm em todas as soluções, medidas em cubetas de

quartzo com percurso óptico de 1,0 cm e tendo como “branco” o metanol. Os resultados obtidos na Figura 13 correspondem as medidas das 15 concentrações. Os espectros foram utilizados para a construção da equação da reta, resultando na curva de regressão linear (Figura 14).

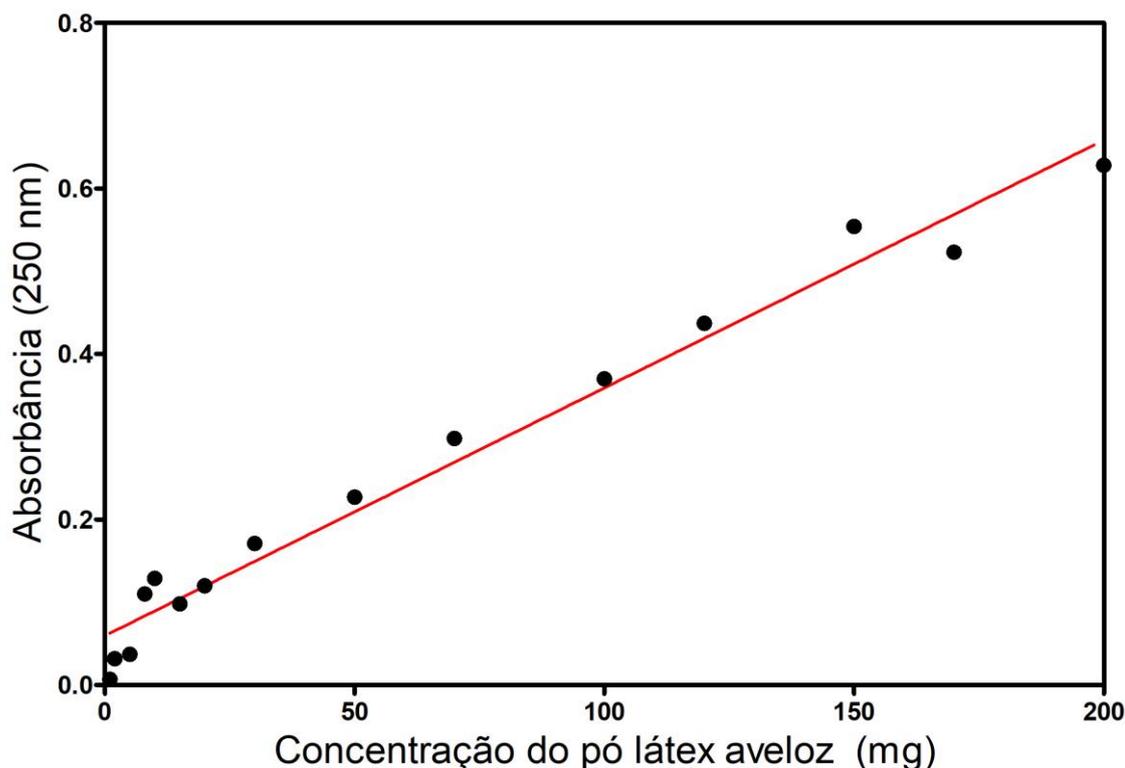
Figura 13 - Espectros de absorção UV-Vis da solução metanólica do pó do látex em faixa de concentração (1,0 mg - 200mg)



A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra, dentro de um intervalo definido com no mínimo 5 concentrações diferentes (150).

A absorbância das amostras foi avaliada em 250 nm e calculou-se a média para cada concentração. A partir dos valores obtidos, construiu-se a curva analítica de absorbância em função da concentração (Figura 14).

Figura 14 - Curva analítica da absorbância em função da concentração de pó do látex



A partir da curva analítica obteve-se a equação da regressão linear ($y = ax + b$) da curva analítica. Com os resultados obtidos das medidas espectrofotométricas, a equação da curva de calibração foi determinada em: $y = 2,9 \times 10^{-3} - 0,05956$, $R^2 = 0,9747$. Dessa forma, o qual o R^2 com valores acima de 0,95 e mais próximo de 1, demonstram uma maior confiabilidade nos dados obtidos, resultando em um coeficiente de determinação de 0,9747, representando uma forte correlação entre as concentrações (151).

7.2 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

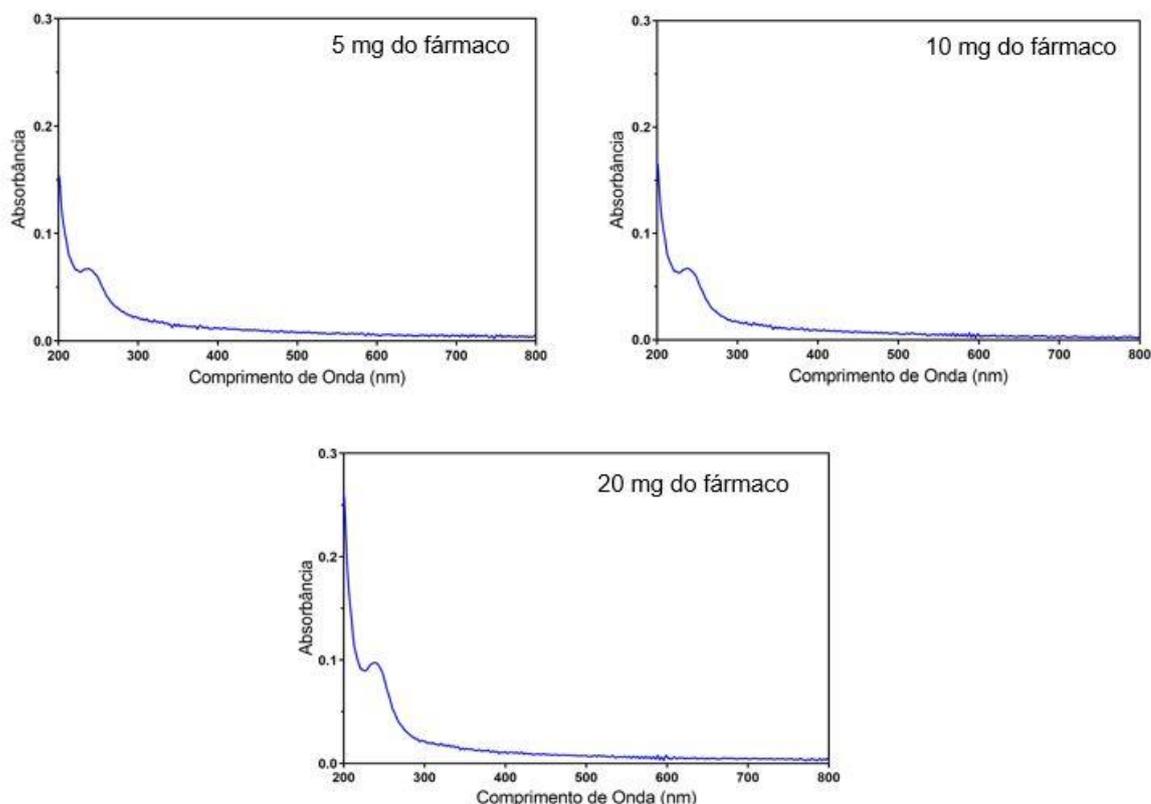
A eficiência de encapsulação (EE%) representa a porcentagem de fármaco que foi incorporado pelo sistema em relação à quantidade adicionada (152). Quanto maior a EE%, mais eficiente o processo de nanoencapsulação (153).

Para a realização da nanoencapsulação, promove-se a solubilização do ácido acético, o fármaco e água ultrapura à quitosana, por ser um composto natural, atóxico e biocompatível, sendo um bom encapsulante com potenciais plastificantes(154). Aplica-se para a formação das nanopartículas a técnica do spray-drying, com os benefícios de preservação do fármaco e economia para obtenção das nanopartículas (155).

A concentração da solução de quitosana possui grande influência na eficiência do processo, pois a sua redução afeta a condição de reatividade dependendo da sua utilização final (156). Dessa forma, foram realizadas análises em 3 concentrações diferentes (5 mg, 10 mg e 20 mg) das nanopartículas de quitosana contendo látex de eufol, baseado em Santos, 2013 (157), as quais foram diluídas em 2 mL de água destilada e após 24 horas foram realizadas as medidas no espectrofotômetro.

Com base nos dados obtidos pela espectroscopia e nos dados da curva de calibração, o valor de absorção para o cálculo é referente ao comprimento de onda de 238 nm nas três concentrações (Figura 15), devido à maior absorção neste comprimento de onda, sendo que na concentração de 5 mg tem uma absorção de 0,0671, em 10 mg possui uma absorção de 0,0672 e em 20 mg possui uma absorção de 0,0976.

Figura 15 - Eficiência de encapsulamento das nanopartículas contendo 5 mg, 10 mg e 20 mg do fármaco



Por meio da inserção da absorbância correspondente a concentração de 5 mg de nanopartículas de quitosana com eufol na equação da curva de calibração, para quantificar a concentração do fármaco que foi encapsulada, foi constatado que 99,49% do fármaco foi encapsulado. Já nas concentrações de 10 mg e 20 mg, foram obtidos 99,78% e 99,83% do fármaco encapsulado, respectivamente, sendo que em todas as concentrações apresentaram um excelente resultado.

Tabela 3 – Eficiência de encapsulamento das nanopartículas com eufol em 5 mg, 10 mg e 20 mg

Eficiência de encapsulamento	
Nanopartículas de 5 mg	99,49% do fármaco foi encapsulado
Nanopartículas de 10 mg	99,78% do fármaco foi encapsulado
Nanopartículas de 20 mg	99,83% do fármaco foi encapsulado

A eficiência de encapsulamento obtido neste estudo foi de 99% nas três concentrações do fármaco estudadas (5, 10 e 20 mg), resultados que estão de

acordo com Hellen (158) e Liang (159), os quais obtiveram 90% e 80 % de eficiência de encapsulamento, respectivamente. Contudo, resultados divergentes foram observados em outros estudos, tais como por Kumar (160) e Collado (161), nos quais obtiveram 26 % e 46,8 % de eficiência de encapsulamento, respectivamente. Tais resultados se deram provavelmente pela obtenção de micropartículas e não nanopartículas, e também por utilizar quitosana com outros materiais.

7.3 ANÁLISE DE TAMANHO, POTENCIAL ZETA E DISPERSÃO DE TAMANHO FORMA E MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS

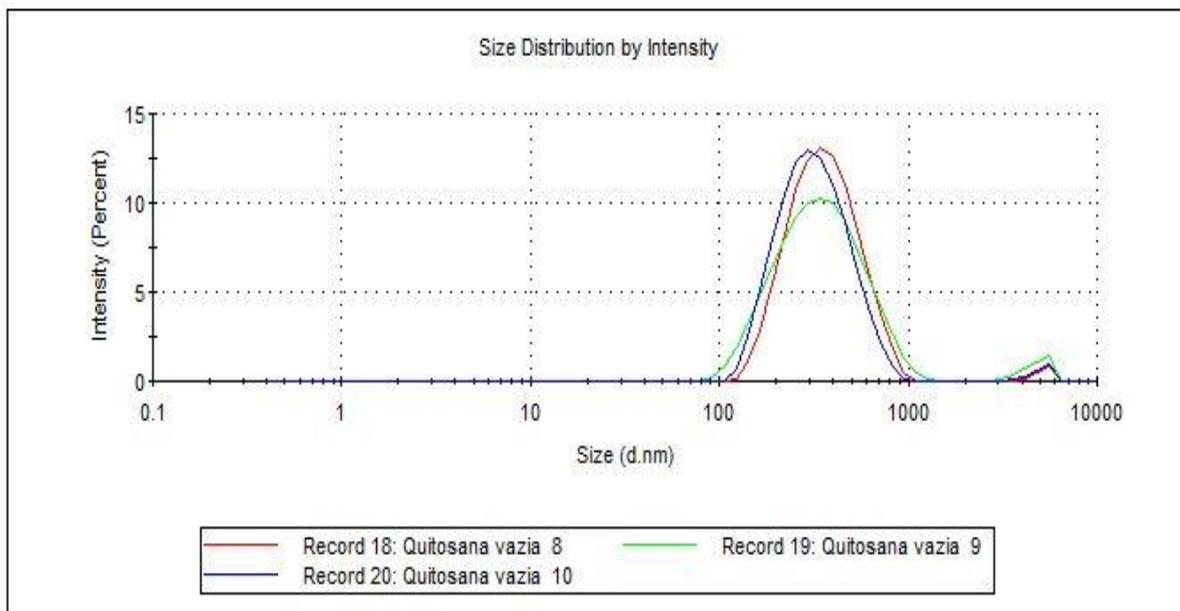
Análises do tamanho, potencial zeta e o índice de polidispersão foram realizadas nas nanopartículas vazia e nas nanopartículas com fármaco, todas para as nanopartículas em meio aquoso e realizadas a 25 °C.

7.3.1 Análise de tamanho (diâmetro das partículas)

O controle do tamanho e da distribuição hidrodinâmico das partículas são importantes, pois esses parâmetros interferem na reprodutibilidade da liberação do fármaco, na absorção e, conseqüentemente, na biodisponibilidade (162).

A média da distribuição do tamanho das nanopartículas de quitosana vazia (figura 16), medida em triplicata, apresentou um tamanho de 329 nm com o Índice de Polidispersão de 0,22.

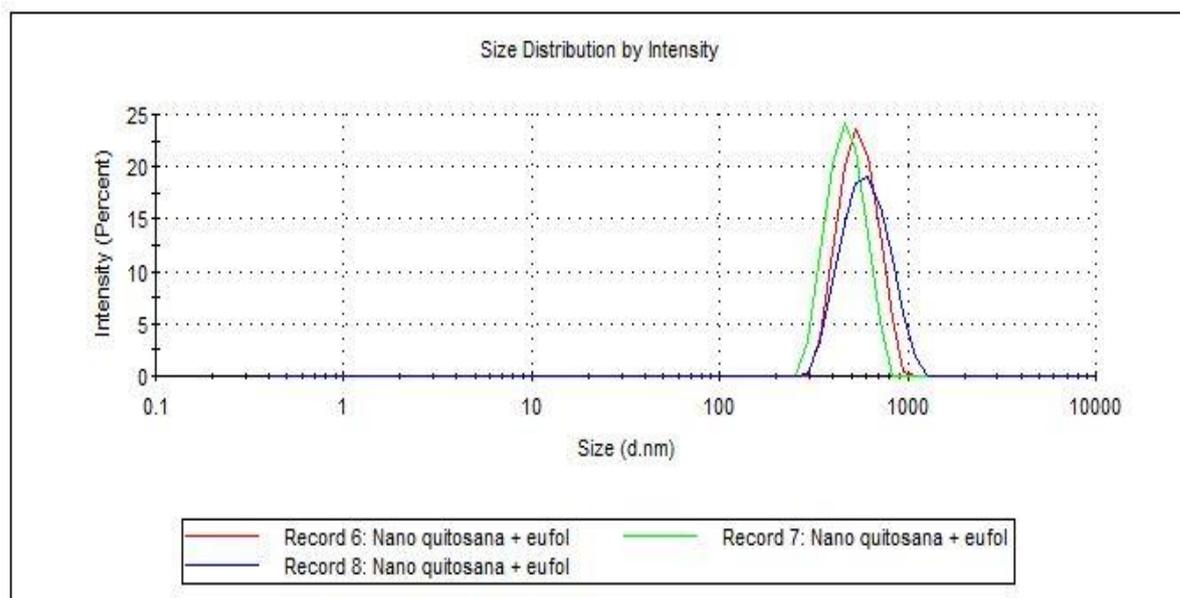
Figura 16 - Tamanho das nanopartículas de quitosana vazia



Fonte: Autora pelo software do equipamento Nanozetasizer

O tamanho médio da distribuição das nanopartículas de quitosana com o fármaco (figura 17), realizado em triplicata, apresentou 611,1 nm com o Índice de Polidispersão de 0,146.

Figura 17 – Tamanho das nanopartículas de quitosana com o fármaco



Fonte: Autora pelo software do equipamento Nanozetasizer

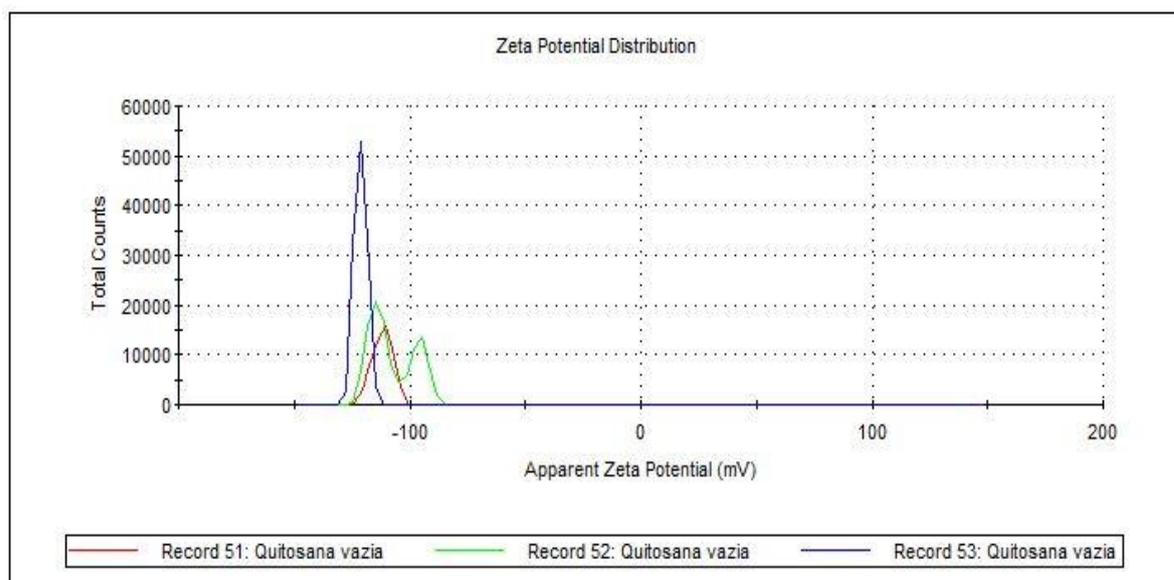
Ao verificar o tamanho das nanopartículas, constatou-se um aumento no tamanho das mesmas, com o acréscimo do fármaco, apresentando os seguintes diâmetros: nanopartículas vazias e nanopartículas com o fármaco, 329 nm e 611.1 nm, respectivamente. Resultados apresentados foram equivalentes aos observados em estudos realizados por Liu(163) e Wang(164) os quais obtiveram tamanhos próximos a 300 nm.

7.3.2 Análise do potencial zeta

A avaliação do potencial zeta foi realizada com o objetivo de compreender o comportamento das nanopartículas, que compõe o sistema, comportamento que pode estar diretamente relacionado ao intumescimento do polímero, à propriedade mucoadesiva e conseqüentemente ao processo de liberação do fármaco.

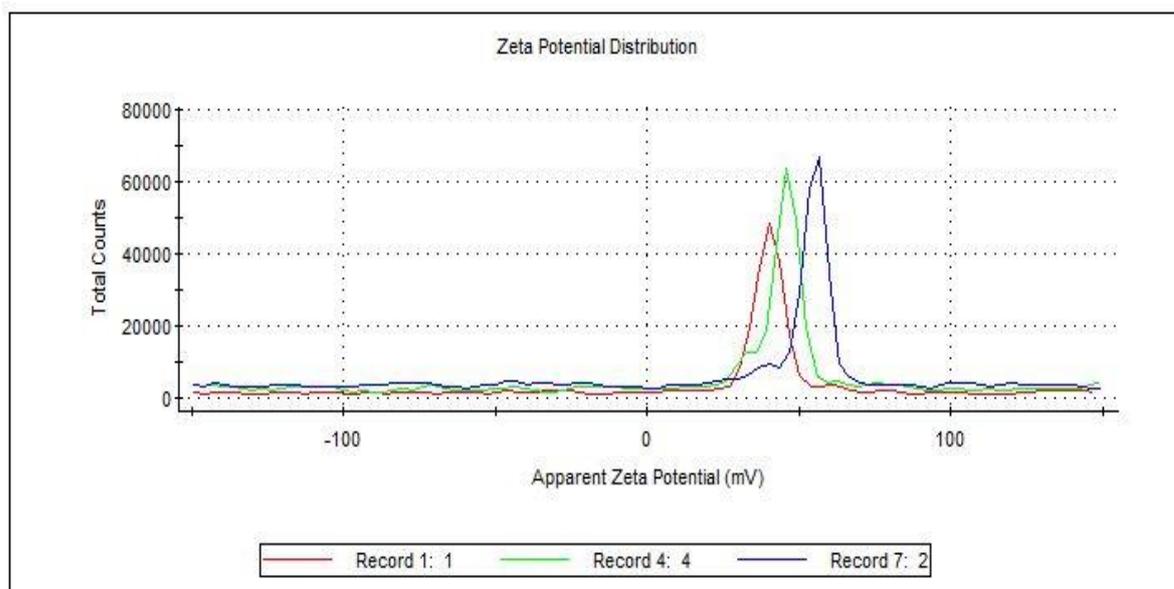
O potencial zeta verificado com as nanopartículas vazias de quitosana realizado em triplicata obteve uma média de 10,7 mV, como observamos na figura 18.

Figura 18 – Potencial zeta das nanopartículas de quitosana vazia



O potencial zeta verificado das nanopartículas de quitosana com látex de avelós contendo eufol, realizado em triplicata obteve uma média de 2,23 mV, como verificado na figura 19 abaixo:

Figura 19 – Potencial zeta das nanopartículas de quitosana com o fármaco



No potencial zeta constataram resultados com cargas positivas, em que a quitosana vazia apresentou 10,7 mV e a quitosana com látex de avelós contendo eufol apresentou 2,23 mV. Devido à presença de amins primárias de quitosana na superfície das nanopartículas (catiônica), possuem afinidade com qualquer carga superficial negativa, com características de aglomeração e menos estabilidade do que o esperado. Cabe ressaltar que a estabilidade neste tipo de análise é avaliada após a adição de tampão as partículas o que difere de estabilidade de estocagem a seco (165).

7.3.3 Comparação dos tamanhos das nanopartículas, Pdl e do potencial zeta

Na tabela 4 mostra a comparação dos resultados das médias do tamanho das nanopartículas, do índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas.

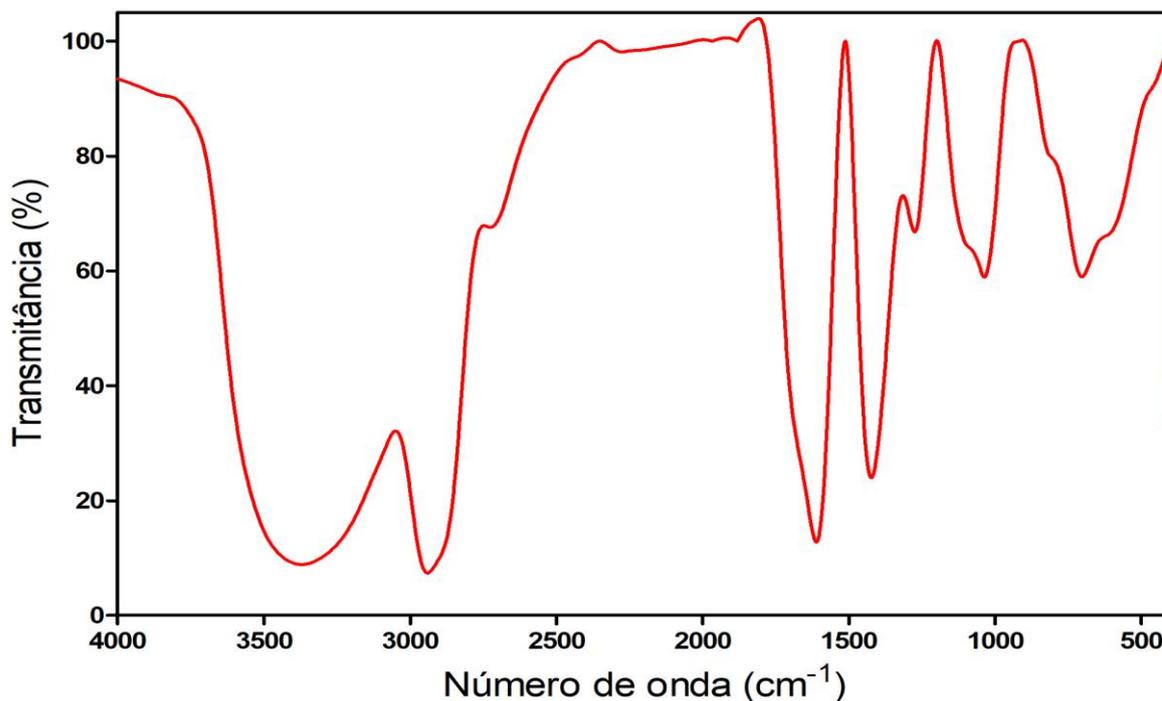
Tabela 4 - Comparação das médias de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas

Média do Tamanho, Potencial Zeta e PDI das Nanopartículas			
Nanopartículas	Size	Pdl	Zeta
Quitosana vazia	329 ± 1 nm	0,222	10 ± 7 mV
Quitosana com látex da avelós contendo eufol	611 ± 1 nm	0,146	2 ± 23 mV

7.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os espectros de absorção molecular na região do infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro do tipo FTIR como descrito no item 1.4.5. Foram analisadas amostras do pó do látex, das nanopartículas de quitosana vazia e das nanopartículas de quitosana com o fármaco. Os principais picos identificados nos espectros das amostras foram listados na tabela 5 juntamente com suas interações moleculares e todos os espectros de FTIR apresentados foram coletados no modo de transmitância, que está após os espectros apresentados de cada análise.

Figura 20 – Espectro do FTIR látex em pó contendo eufol em KBr



O pó do látex na figura 20 acima, possui uma banda larga na faixa de $2937 \pm 150 \text{ cm}^{-1}$ até 3500 cm^{-1} , característico à ligação C-H (hidrocarbonetos) e hidroxilas na molécula, apresenta estiramento próximo a 1618 cm^{-1} relacionado a presença de ligações duplas e/ou anéis aromáticos.

Nos espectros na região do infravermelho do pó obtido do látex da planta *Euphorbia tirucalli*, apresentaram várias ligações como uma banda larga na faixa de 2937 cm^{-1} até 3500 cm^{-1} característico de C-H (hidrocarbonetos).

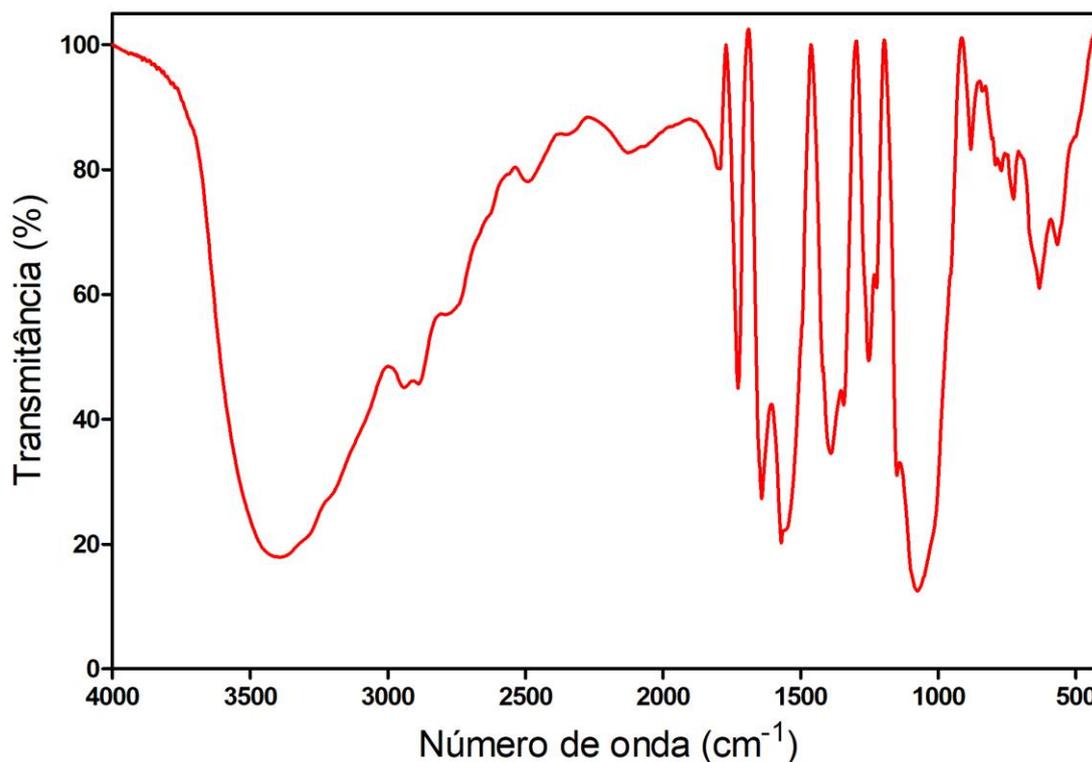
Uma banda forte na região próximo de 1618 cm^{-1} de característica alifática saturada e com ligações simples entre carbono de forma cíclica. Os espectros do látex de avelós contendo eufol apresentaram-se equivalentes aos observados no trabalho de Lunardi (166), em que também apresentou hidrocarbonetos e características alifáticas na mesma faixa do número de onda.

A banda de 1421 cm^{-1} aparece bandas de deformação angular, característica de CH_2 adjacente a carbonila, S=O (sulfóxido) em 1041 cm^{-1} e anel aromático em 700 cm^{-1} .

O espectro da figura 21 apresenta uma banda larga e forte devido ao alongamento axial de O-H por volta de 3000 e 3500 cm^{-1} , pico em 3080 cm^{-1} é

atribuído ao estiramento antissimétrico do grupo =CH₂. Uma absorção acima de 3000 cm⁻¹ indica a presença de uma instauração (dupla ou tripla ligação ou um anel aromático).

Figura 21 – Espectro do FTIR das nanopartículas de quitosana vazia em KBr



Estiramento C-O em 1251 cm⁻¹ com média intensidade e 03 estiramentos em 1394 e 1247 cm⁻¹ características de álcool ou éter e 1560 cm⁻¹ de amina (característica da quitosana). Há absorção de dois picos entre 1820 a 1630 cm⁻¹ indicando carbonilas.

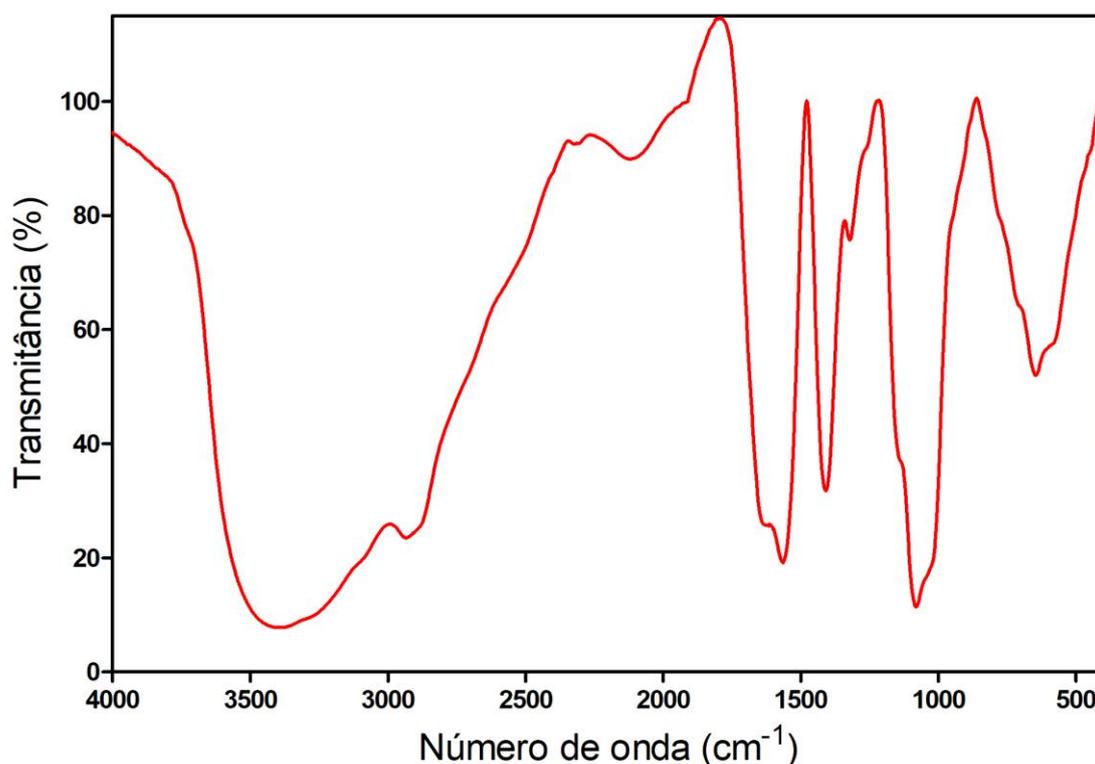
É possível perceber bandas típicas de aminas, situadas em 1.641 cm⁻¹ e 3402 cm⁻¹, além da banda 1074 cm⁻¹ (vibração do esqueleto envolvendo C-O) são características da estrutura do sacarídeo.

Os espectros obtidos pelo FTIR relacionado a nanopartículas de quitosana, estão similares aos trabalhos de Corazzari *et al.* (167) e Branca *et al.* (168), no qual exibem bandas largas e fortes devido ao alongamento axial de O-H e N-H

centralizado em 3440 cm^{-1} e próximo a 1580 cm^{-1} atribuível à deformação angular das ligações N-H dos grupos amino e absorção de dois picos entre 1820 a 1630 cm^{-1} indicando carbonilas.

No espectro da figura 22 das nanopartículas de quitosana contendo o pó do látex, há um aumento da banda na região de $3.500 - 2.800\text{ cm}^{-1}$, essa região é associada às vibrações de deformação axial nos átomos de hidrogênio ligados a carbono, oxigênio e nitrogênio (C-H, O-H e N-H) reduzindo a separação da banda se comparado ao espectro do pó do látex.

Figura 22 – Espectro do FTIR das nanopartículas de quitosana contendo o pó do látex em KBr

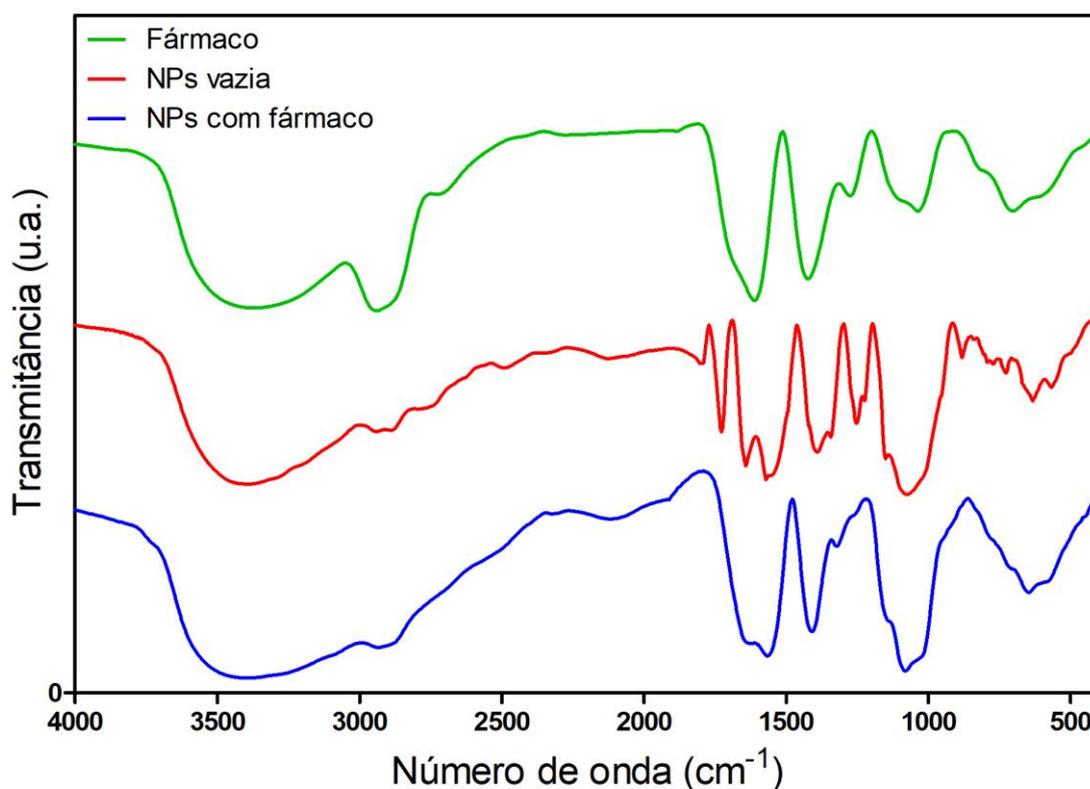


O espectro em 1.566 cm^{-1} apresenta banda fraca de deformação angular é usada para caracterizar aminas e amidas secundárias, característica da quitosana. Em 1409 cm^{-1} também possui CH_2 adjacente a carbonila e grupo C=O de anidridos em 1802 cm^{-1} , possivelmente relacionado a desidratação de algum ácido.

No espectro de FTIR das nanopartículas de quitosana com o látex da avelós contendo eufol, observa o aumento da banda e seu estiramento próximo a região de 3000 cm^{-1} , associada às vibrações de deformação axial nos átomos de hidrogênio ligados a carbono, oxigênio e nitrogênio e se comparada com o espectro das nanopartículas de quitosana vazia, desaparece o pico em 1242 cm^{-1} .

Abaixo segue os 03 espectros em apenas um gráfico, para uma melhor comparação entre os mesmos (figura 23).

Figura 23 – Espectro FTIR do pó do látex contendo eufol, da nanopartícula de quitosana vazia e da nanopartícula de quitosana contendo eufol em KBr



Para verificar o comprimento de onda no FTIR e seus respectivos grupos funcionais em cada uma das amostras de nanopartículas com fármaco, nanopartículas vazias e apenas o fármaco, a tabela 5 mostra os grupos funcionais presentes em cada uma das amostras.

Tabela 5 – Principais bandas de absorção no FTIR dos espectros das nanopartículas e do pó do látex

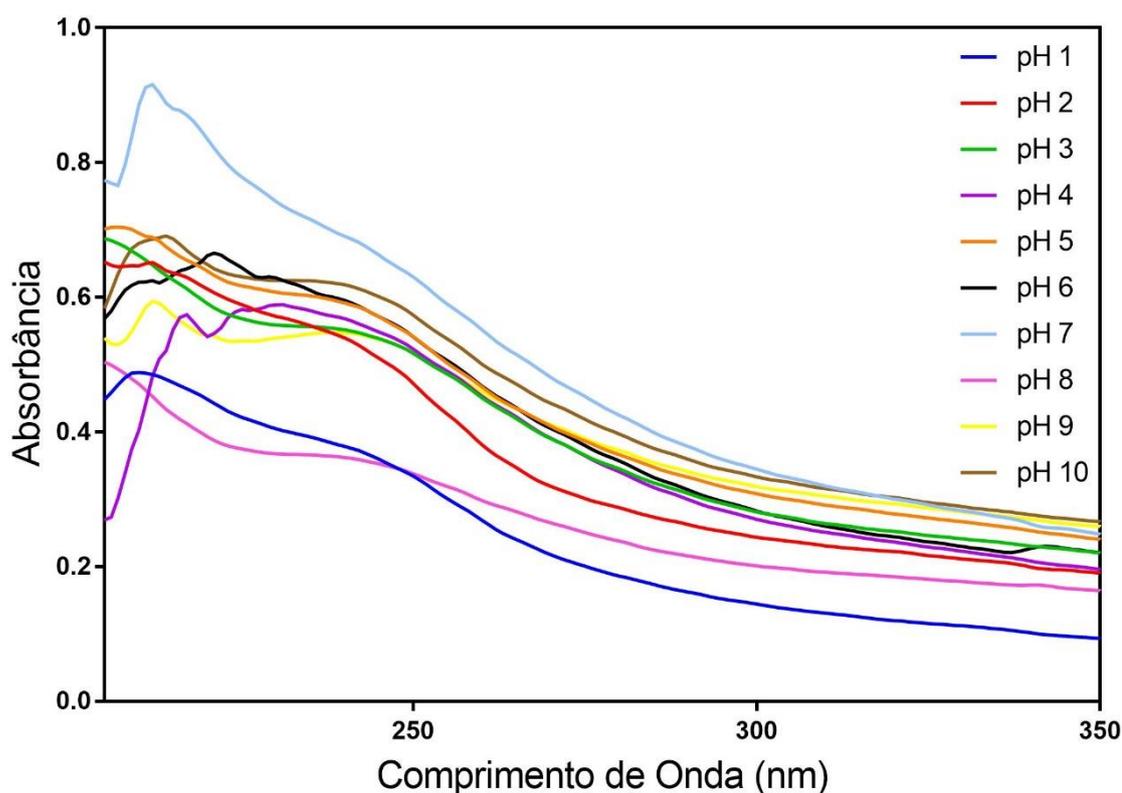
Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	NPs vazia	Fármaco	NPs com a fármaco
3.600 - 3.200	O-H	X	X	X
≅ 3400	NH	X		X
≅ 3.300	C-H	X	X	X
≅1.600	C=C de aromáticos	X	X	
≅ 1.566	NH ₂	X		X
≅1.420	CH ₂ adjacente a carbonila		X	X
≅1250	C-O	X		
1050 - 1300	C-O de ésteres, éter e álcool	X		
1.060 - 1.040	S=O (sulfóxido)		X	
700	Anel aromático		X	

7.5 ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV-VIS DE SOLUÇÃO TAMPÃO DO PÓ CONTENDO EUFOL EM DIFERENTES pHs

Inicialmente foram preparados tampões de pH 1 a 10, para comparação do pó obtido pelo látex da *E. tirucalli* em diferentes pHs. Também foi preparada uma solução estoque com 5 mg do pó do látex em 2 mL de metanol, sendo utilizados 100 µL desta solução estoque solubilizados em 1900 µL com cada um dos 10 pHs.

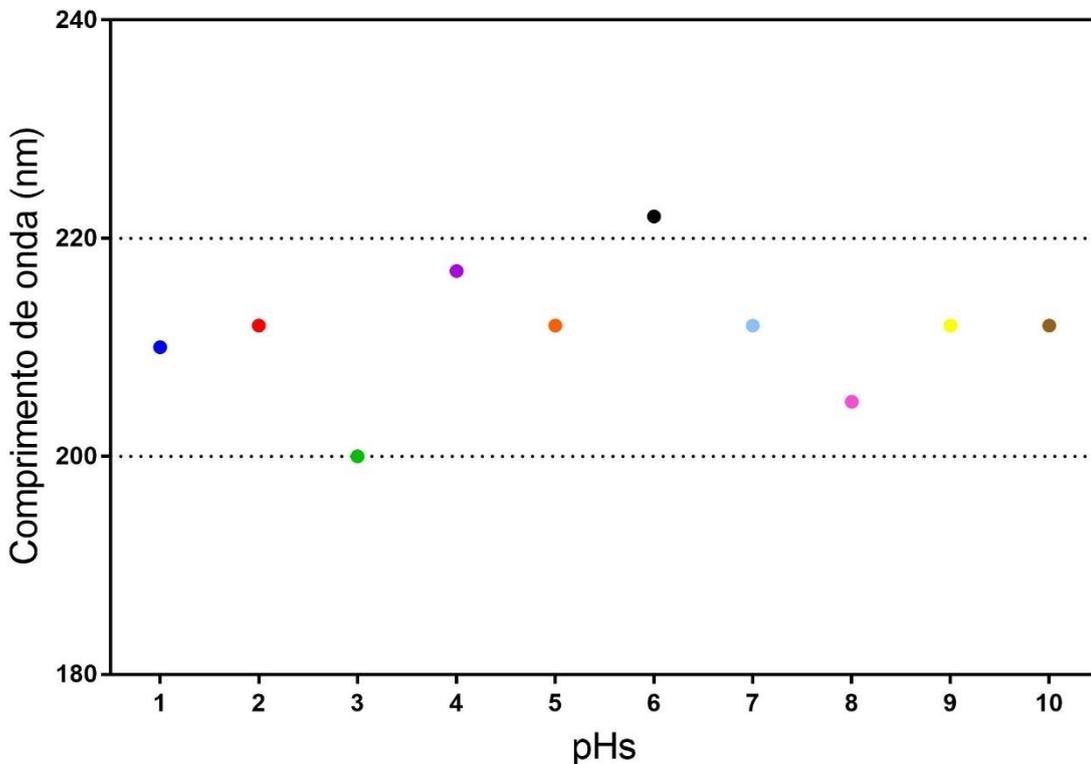
Com a utilização do espectrofotômetro UV- Vis, marca Hitachi Hight-Technologies Corporation®, modelo U-3900H, foram obtidos os espectros em cada pH (figura 24), logo após o preparo e a verificação dos comprimentos de onda que obtiveram uma maior absorbância e a formação de novas bandas de absorção no espectro.

Figura 24 - Espectros de absorção UV-Vis da solução tampão do pó (5mg) em diferentes pHs



Após a obtenção dos espectros de cada um dos pHs avaliados, foi construído um gráfico de absorbância, no ponto máximo de absorção em cada pH versus pH. Este gráfico observado na figura 25, foi construído para avaliar se ao mudar o pH do meio, o perfil espectral do látex seria deslocado. A importância deste deslocamento, poderia indicar a faixa de comprimento de onda máximo a ser usado nas medidas do perfil de liberação.

Figura 25 – Avaliação do deslocamento do comprimento de onda máximo do látex de eufol em diferentes pHs



Pode-se observar que o espectro de absorção do pó do látex da *E. tirucalli*, em todos os 10 pHs, apresentam-se aproximadamente na faixa de 200 a 220 nm, no qual se verifica que a mudança de pH no meio, promoveu um pequeno deslocamento do valor máximo em alguns pontos. Nas análises de perfil de liberação, foram escolhidos os pHs 2, 7,4 e 8,5, cujos valores de comprimento de onda são os mesmos e também devido a uma comparação respectivamente com o pH gástrico (ácido), pH sanguíneo (neutro) e pH intestinal (básico), para simular a possível resposta das nanopartículas dentro do corpo humano.

A resposta do látex de avelós contendo eufol frente as mudanças de concentrações hidrogeniônicas no meio, ao utilizar soluções tampão (pH= 1 - 10), mostrou bons resultados, pois não foi observado nos espectros de absorção no UV-Vis da solução de látex um grande deslocamento no pico máximo significativo, entre os diferentes pHs, em particular nas soluções tampões de pH 2, 7,4 e 8,5, estando todos próximos a faixa de 200 a 220 nm, no qual indica um controle de como o conjunto de compostos orgânicos, inorgânicos presentes no látex se comportam frente a mudança do meio.

7.6 PERFIL DE LIBERAÇÃO

O perfil de liberação foi realizado com 10 mg de nanopartículas de quitosana com fármaco em três pHs diferentes: pH 2 (ácido); pH 7,4 (pH fisiológico normal); e pH 8,5 (básico) utilizando 3 mL de cada pH, sob agitação no Fluorímetro e analisando no UV-Vis.

No Uv-Vis a análise do espectro do látex da *E. tirucalli* em forma de pó apresentou um pico no comprimento de onda de 245 nm. As amostras foram diluídas na hora da medida, com linha de base feita, para receber as amostras, objetivando uma maior confiabilidade nos resultados.

Os espectros das figuras 26 e 27 correspondem ao pH 2, as figuras 28 e 29 ao pH 7,4 e as figuras 30 e 31 ao pH 8,5, como demonstrado a seguir:

Figura 26 - Espectros no Uv-Vis das nanopartículas de quitosana como fármaco no pH 2 por 6 horas

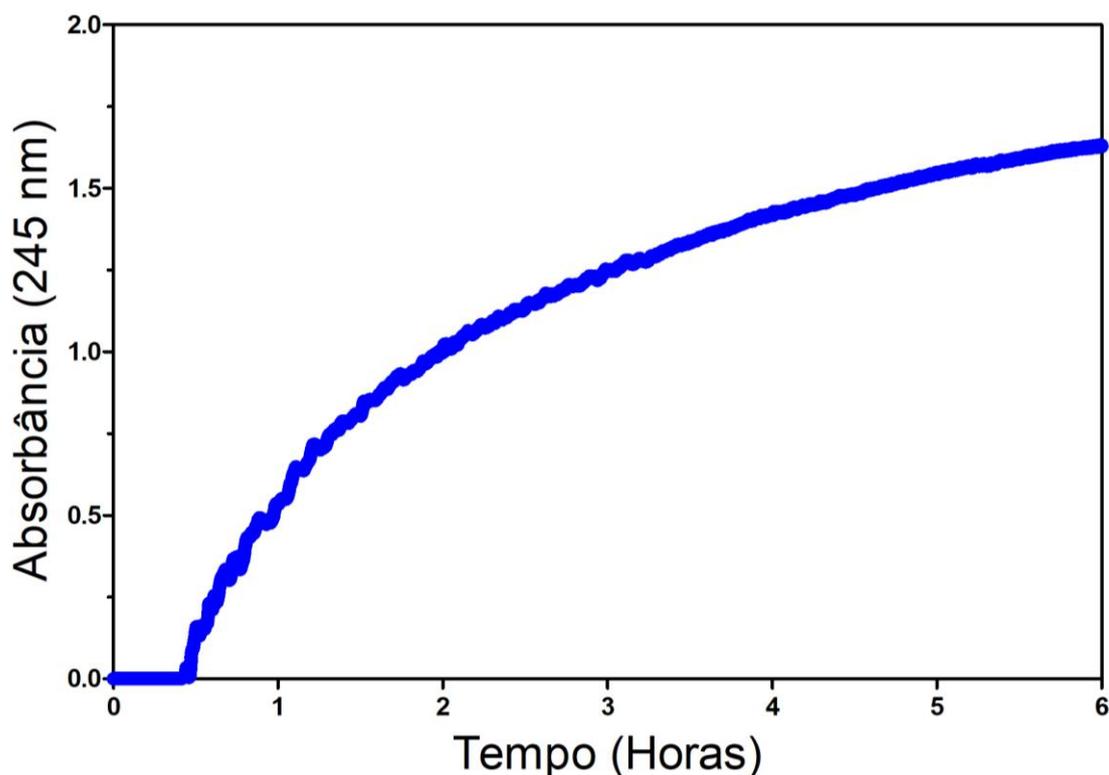


Figura 27 - Picos encontrados na emissão de fluorescência das nanopartículas de quitosana com o fármaco no pH 2 por 6 horas

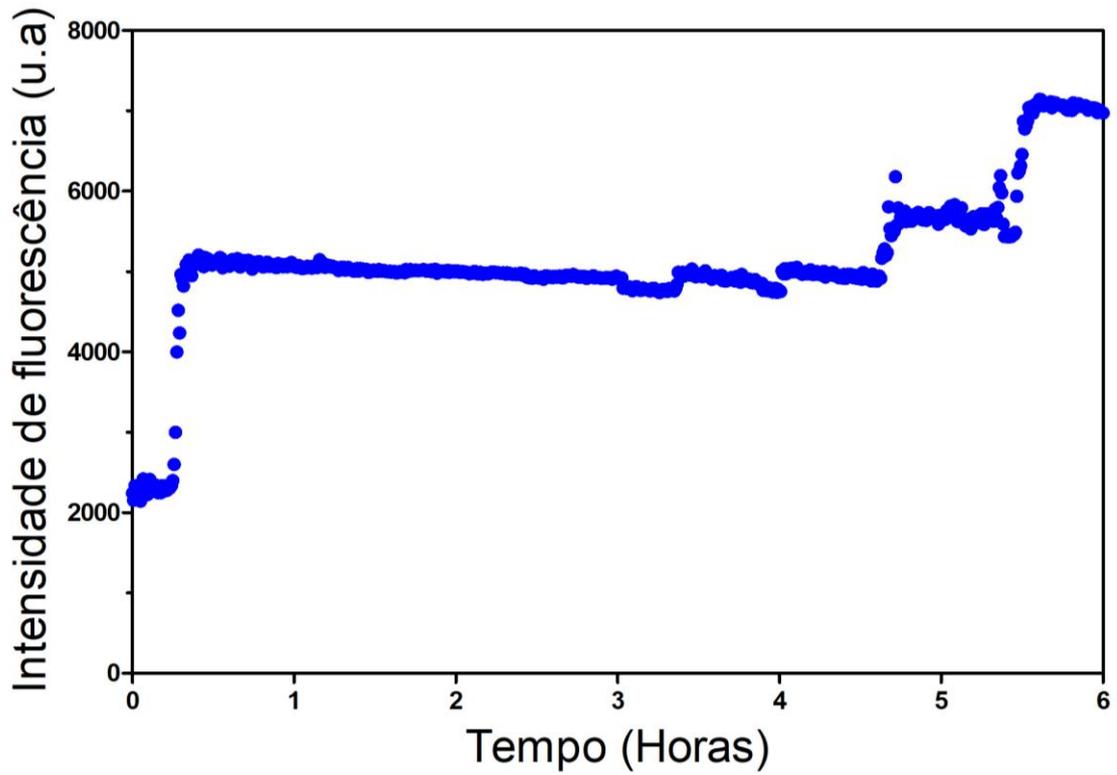


Figura 28 - Espectros no Uv-Vis das nanopartículas de quitosana com fármaco no pH 7,4 por 6 horas

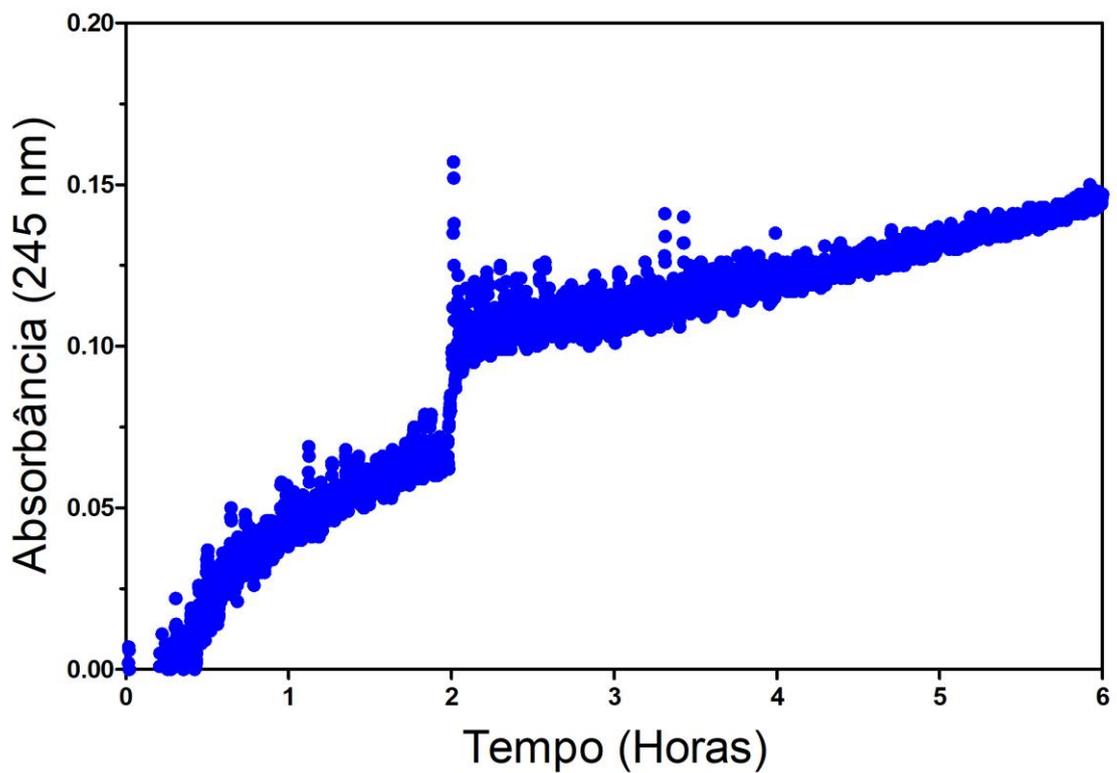


Figura 29 - Picos encontrados na emissão de fluorescência das nanopartículas de quitosana com o fármaco no pH 7,4 por 6 horas

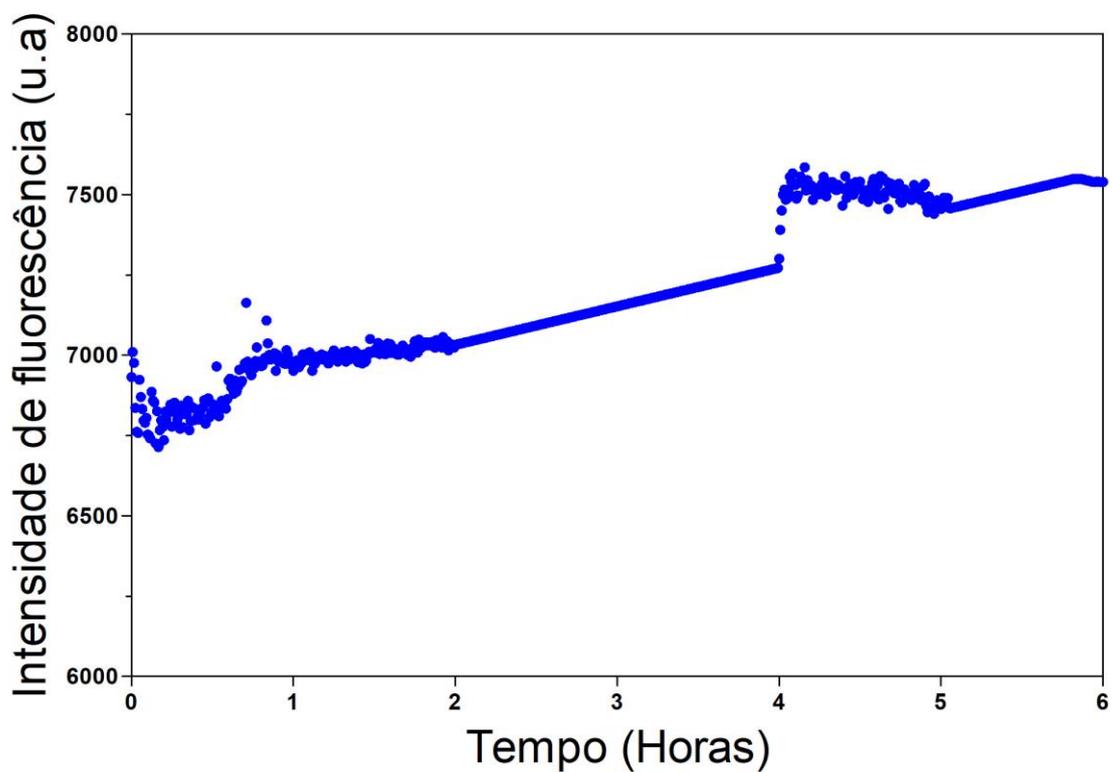


Figura 30 - Espectros no Uv-Vis das nanopartículas de quitosana com fármaco no pH 8,5 por 6 horas

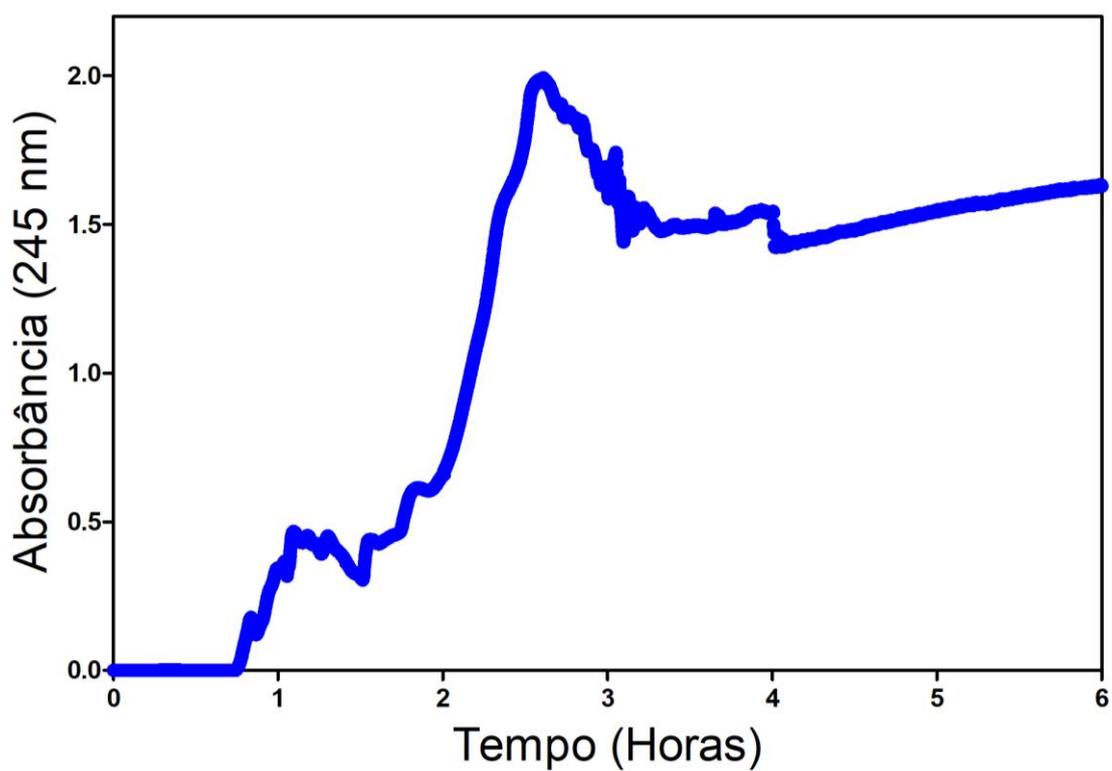
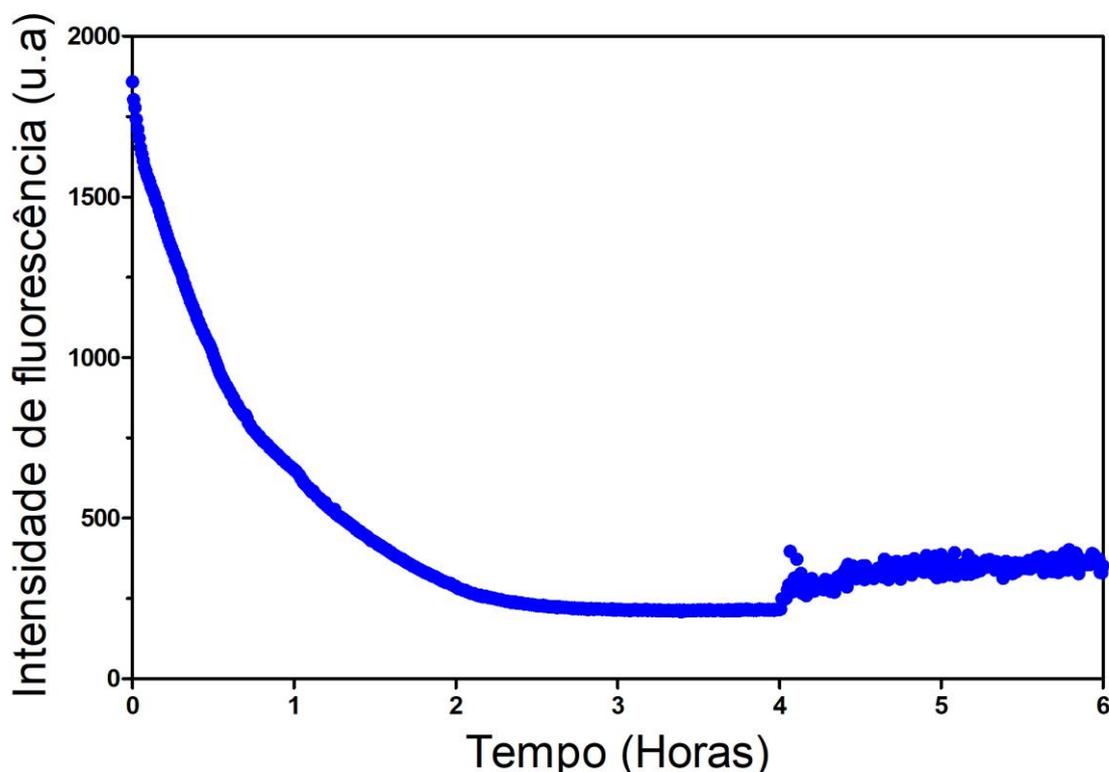


Figura 31 - Picos encontrados na emissão de fluorescência das nanopartículas de quitosana com o fármaco no pH 8,5 por 6 horas



Para a realização do teste de perfil de liberação foram utilizados os pHs 2 (ácido), 7,4 (normal sanguíneo) e 8,5 (básico) (169), que são ideais para o teste e que estão com absorvância em 245 nm, obtendo um padrão de absorvância frente do látex da avelós com eufol em diferentes pHs.

O perfil de liberação no pH ácido e pH 7,4 ocorreu a liberação do fármaco de maneira lenta e contínua, em ambiente ácido, no qual geralmente a alta taxa de liberação resulta em mais inchaço e difusão do princípio ativo, sendo encontrado a mesma característica como Elbially (170) e Qin (171). Os gráficos de acordo com o tempo, obteve-se uma liberação lenta e gradual, o que é um esperado nos sistemas de liberação de fármacos a partir de nanopartículas.

No pH 8,5 ocorre uma liberação gradual das nanopartículas, sendo que a partir de 2 horas ocorre um maior pico de liberação do fármaco, decrescendo após 3 horas, retardando uma liberação brusca inicial do fármaco.

Para uma melhor análise e verificação das características de liberação do fármaco, os perfis de liberação em espectroscopia de Uv-Vis foram realizados

conversões das absorvâncias em porcentagem, obtendo maior precisão para comparação dos dados, no qual é apresentado no próximo tópico do estudo cinético.

7.7 ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO IN VITRO

As nanopartículas de quitosana com látex de avelós contendo eufol no pH 2, pH 7,4 e pH 8,5 apresentaram uma maior absorvância no comprimento de onda de 245 nm.

A partir desse comprimento de onda foram analisados e transformados em porcentagem de liberação do fármaco ao longo do tempo, sendo comparados com modelos matemáticos usados para descrever os perfis de dissolução existentes e identificando qual modelo melhor se enquadra em cada um dos perfis de liberação, através do software GraphPad Prisma[®].

O perfil de liberação do látex de eufol em pH = 2,0 corresponde a equação de Dose-resposta bifásica. Esta equação é utilizada quando os valores X são concentrações, doses ou tempo, trata-se de um desvio comum da forma sigmóide monotónica padrão é a forma sigmóide bifásica, dada pela equação:

$$Y = \text{Bottom} + \text{Section1} + \text{Section2}$$

$$\text{Span} = \text{Top} - \text{Bottom}$$

$$\text{Section1} = \text{Span} \times \text{Frac} / (1 + (\text{EC50}_1 / X)^{nH1})$$

$$\text{Section2} = \text{Span} \times (1 - \text{Frac}) / (1 + (\text{EC50}_2 / X)^{nH2})$$

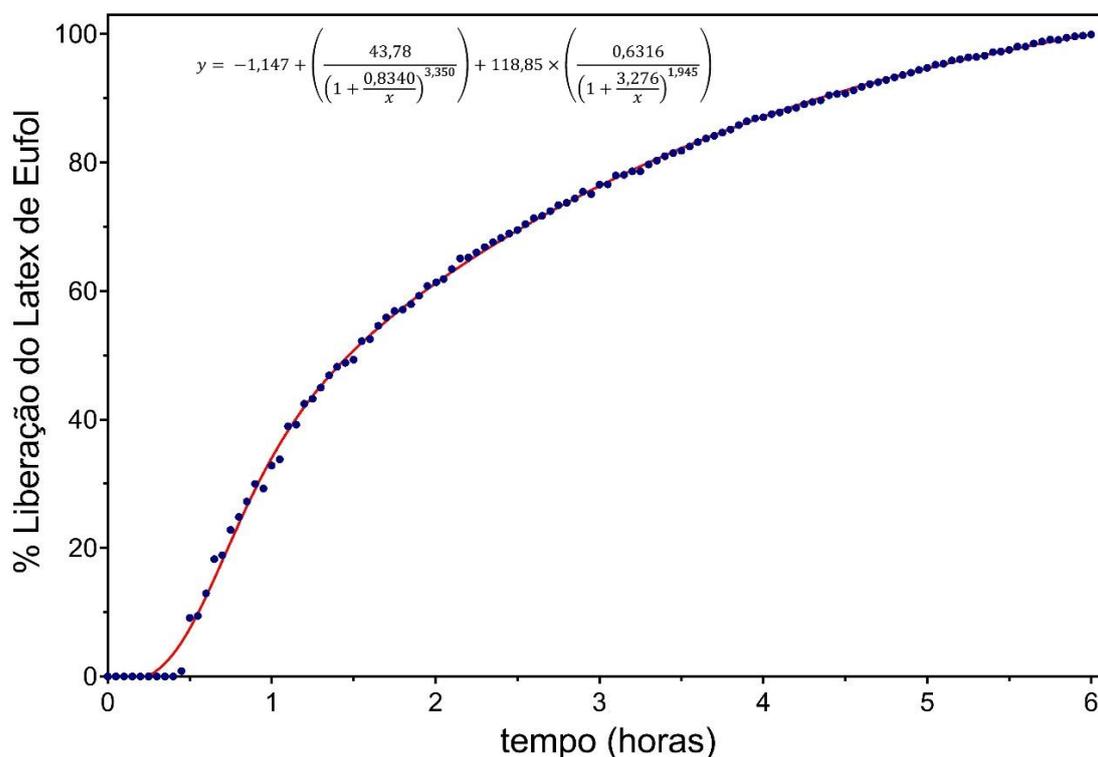
Onde: Top e Bottom são os platôs nas extremidades esquerda e direita da curva, nas mesmas unidades que Y. EC50₁ e EC50₂ são os tempos que produzem efeitos de estimulação e inibição semi-máxima nas mesmas unidades que X. nH1 e nH2 são os fatores de inclinação sem unidades ou declives de Hill, os quais devem ser restritos entre 1,0 (estimulação) e -1 (inibição). Frac é a proporção da resposta máxima, devido à fase mais potente.

$$y = -1,147 + \left(\frac{118,85 \times 0,3684}{\left(1 + \frac{0,8340}{x}\right)^{3,350}} \right) + 118,85 \times \left(\frac{1 - 0,3684}{\left(1 + \frac{3,276}{x}\right)^{1,945}} \right)$$

$$y = -1,147 + \left(\frac{43,78}{\left(1 + \frac{0,8340}{t}\right)^{3,350}} \right) + \left(\frac{75,07}{\left(1 + \frac{3,276}{t}\right)^{1,945}} \right)$$

As formas farmacêuticas de dosagem nesses perfis liberam a mesma quantidade de medicamento por unidade de tempo e é o método ideal de liberação de fármacos para alcançar uma ação prolongada farmacológica (172).

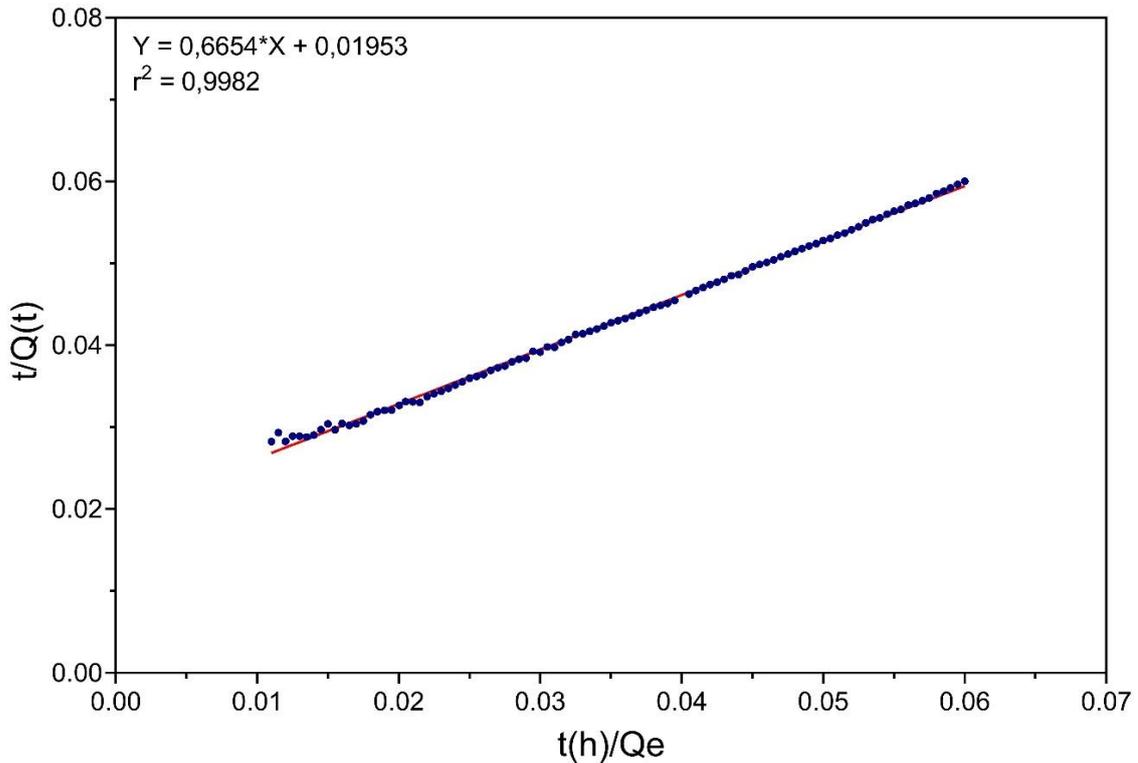
Figura 32 - Perfil de liberação das nanopartículas de quitosana com fármaco no pH 2



No pH 2,0 a cinética de liberação do látex de eufol a partir da matriz de quitosana (figura 33) obedece a uma cinética de degradação de pseudo segunda ordem dada pela equação presente na figura 32, onde são plotados os valores da

relação do tempo pela quantidade de composto liberado (t/Q_t) em função da relação entre tempo e a quantidade do látex no equilíbrio (t/Q_e).

Figura 33 - Cinética da liberação do látex de eufol pH 2



No perfil de liberação de pH 7,4 correspondente a figura 34, dos modelos matemáticos que melhor corresponde é $RMSE = 1,05^{15}$ e $R^2 = 0,8688$. No qual observa que após 2 horas ocorreu uma alta liberação do fármaco, depois uma contínua e lenta liberação. Se comparado ao gráfico de pH 2, a liberação do fármaco em pH 7,4 liberou uma maior porcentagem do fármaco em menos tempo.

O perfil de Liberação do látex de eufol em pH = 7,4 cujo modelo de equação matemática é bifásico:

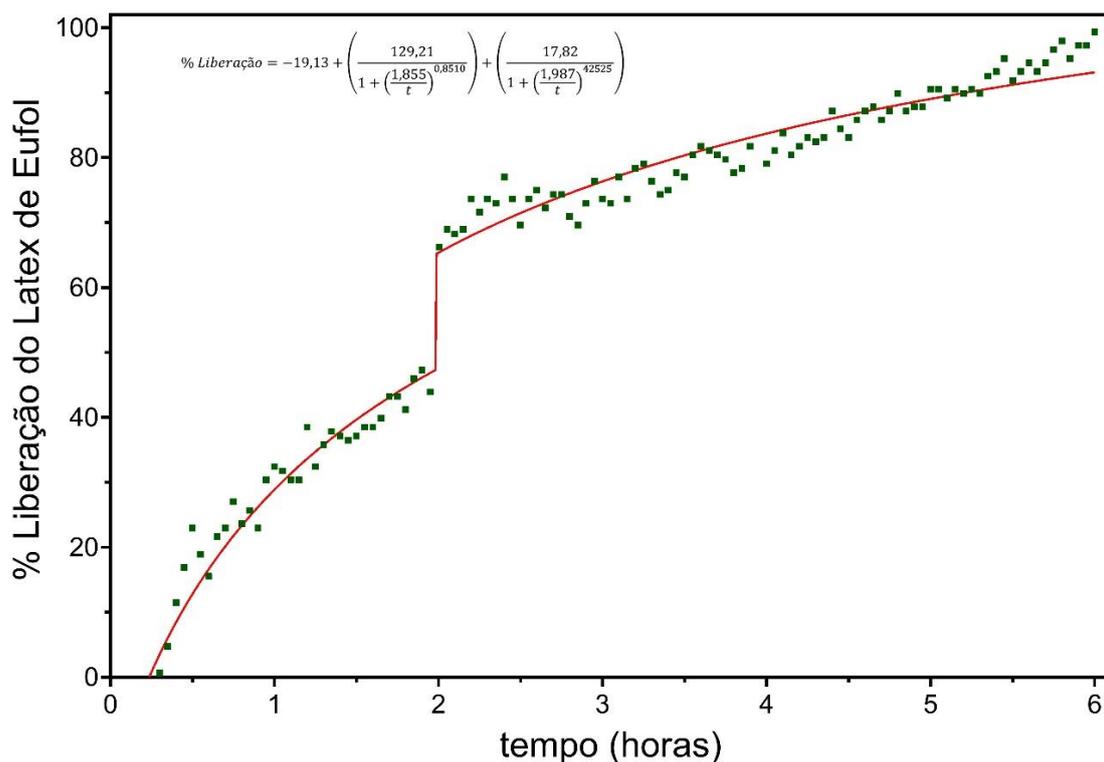
$$Y = Bottom + Section1 + Section2$$

$$y = Bottom + \left((Top - Bottom) \times \frac{Frac}{1 + \left(\frac{EC50_1}{x}\right)^{nH1}} \right) + \left((Top - Bottom) \times \frac{(1 - Frac)}{1 + \left(\frac{EC50_2}{x}\right)^{nH2}} \right)$$

$$y = -19,13 + \left((147,03) \times \frac{0,8788}{1 + \left(\frac{1,855}{x}\right)^{0,8510}} \right) + \left((147,03) \times \frac{(1 - 0,8788)}{1 + \left(\frac{1,987}{x}\right)^{42525}} \right)$$

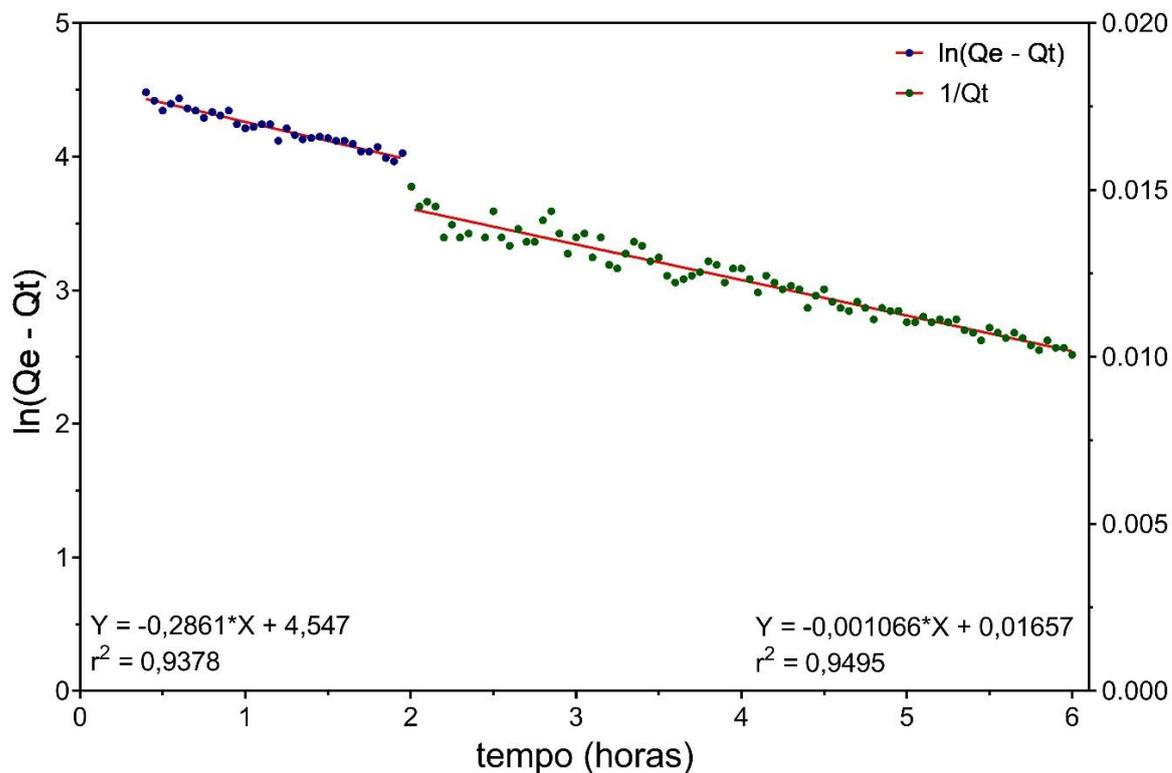
$$\% \text{ Liberação} = -19,13 + \left(\frac{129,21}{1 + \left(\frac{1,855}{t}\right)^{0,8510}} \right) + \left(\frac{17,82}{1 + \left(\frac{1,987}{t}\right)^{42525}} \right)$$

Figura 34 - Perfil de liberação das nanopartículas de quitosana com fármaco no pH 7,4



Em pH 7,4 a cinética de liberação do látex da avelós contendo eufol a partir da matriz de quitosana obedece a uma cinética de degradação de pseudo primeira ordem nas duas primeiras horas, já no intervalo subsequente entre duas e seis horas é observado um perfil cinético de segunda ordem, como pode ser observado através da Figura 35.

Figura 35 - Cinética da liberação do látex de eufol pH 7,4



No perfil de liberação de pH 8,5 (figura 36), corresponde ao RMSE = 1,92¹⁵ e R² = 0,7481. A liberação do fármaco em sua totalidade iniciou-se em 2 horas e meia e continua até 3 horas, sendo que decresce após esse tempo. O processo de liberação constante de um único fármaco por dispositivo de entrega, como comprimidos osmóticos orais, sistemas transdérmicos, comprimidos de matriz com medicamentos de baixa solubilidade e outras formas é o objetivo com a utilização da nanotecnologia (173).

A equação Dose-Resposta Bell-shaped também está relacionado ao perfil de liberação no pH 8,5. Alguns medicamentos podem causar uma resposta inibitória em baixas concentrações, e uma resposta estimulante em altas concentrações, ou vice-versa. O resultado líquido é uma curva dose-resposta em forma de seno.

O modelo aqui explicado é a soma de duas ou mais curvas de dose-resposta, uma que estimula e outra que inibe.

$$Y = \text{Dip} + \text{Section1} + \text{Section2}$$

$$y = Dip + \left[\frac{span\ 1}{1 + \left(\frac{EC_{50\ 1}}{x}\right)^{nH1}} \right] + \left[\frac{span\ 2}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50\ 2}}\right)^{nH2}} \right]$$

$$y = Dip + \left[\frac{Plateau\ 1 - Dip}{1 + \left(\frac{EC_{50\ 1}}{x}\right)^{nH1}} \right] + \left[\frac{Plateau\ 2 - Dip}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50\ 2}}\right)^{nH2}} \right]$$

Onde: Plateau 1 e Plateau 2 são segmentos planos nas extremidades esquerda e direita da curva, nas mesmas unidades de Y. Dip é o nível do segmento plano no meio da curva, nas mesmas unidades de Y. EC50_1 e EC50_2 são os tempos em que os efeitos de estimulação e inibição semi-máxima ocorrem nas mesmas unidades de X. O nH1 e nH2 são os fatores de inclinação sem unidades ou declives de Hill, onde se deve considerar a restrição destes entre 1,0 (estimulação) e -1 (inibição).

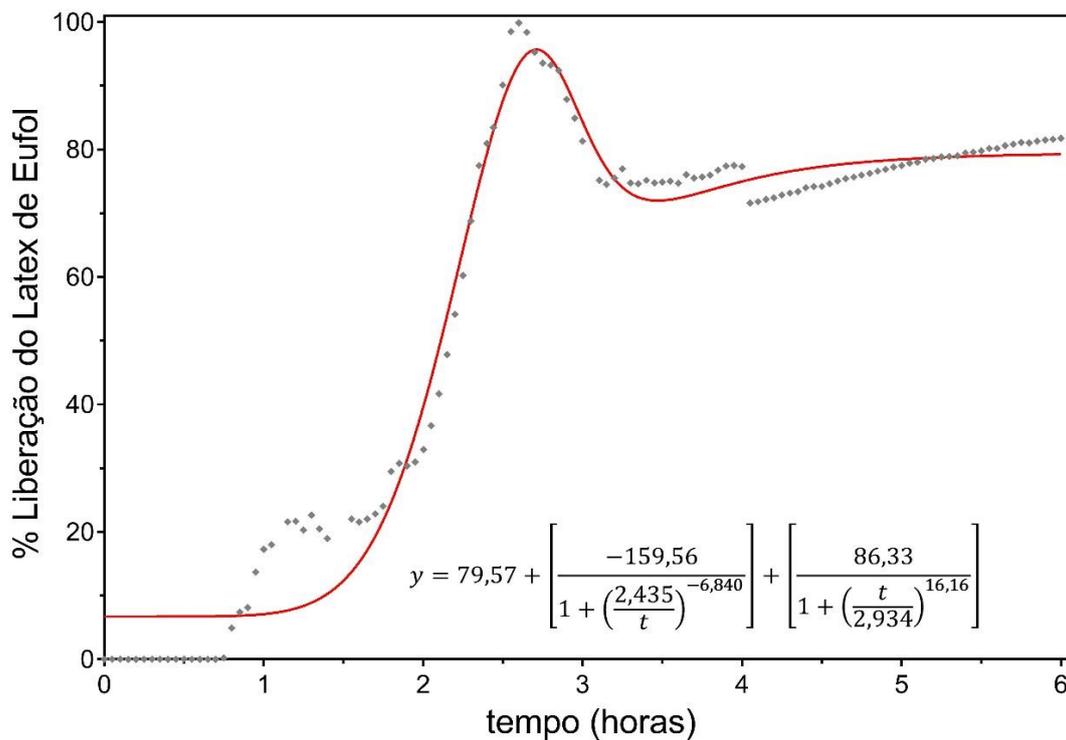
Substituindo os valores experimentais na equação temos:

$$y = 79,57 + \left[\frac{-79,99 - 79,57}{1 + \left(\frac{2,435}{t}\right)^{-6,840}} \right] + \left[\frac{166,3 - 79,57}{1 + \left(\frac{t}{2,934}\right)^{16,16}} \right]$$

$$y = 79,57 + \left[\frac{-159,56}{1 + \left(\frac{2,435}{t}\right)^{-6,840}} \right] + \left[\frac{86,33}{1 + \left(\frac{t}{2,934}\right)^{16,16}} \right]$$

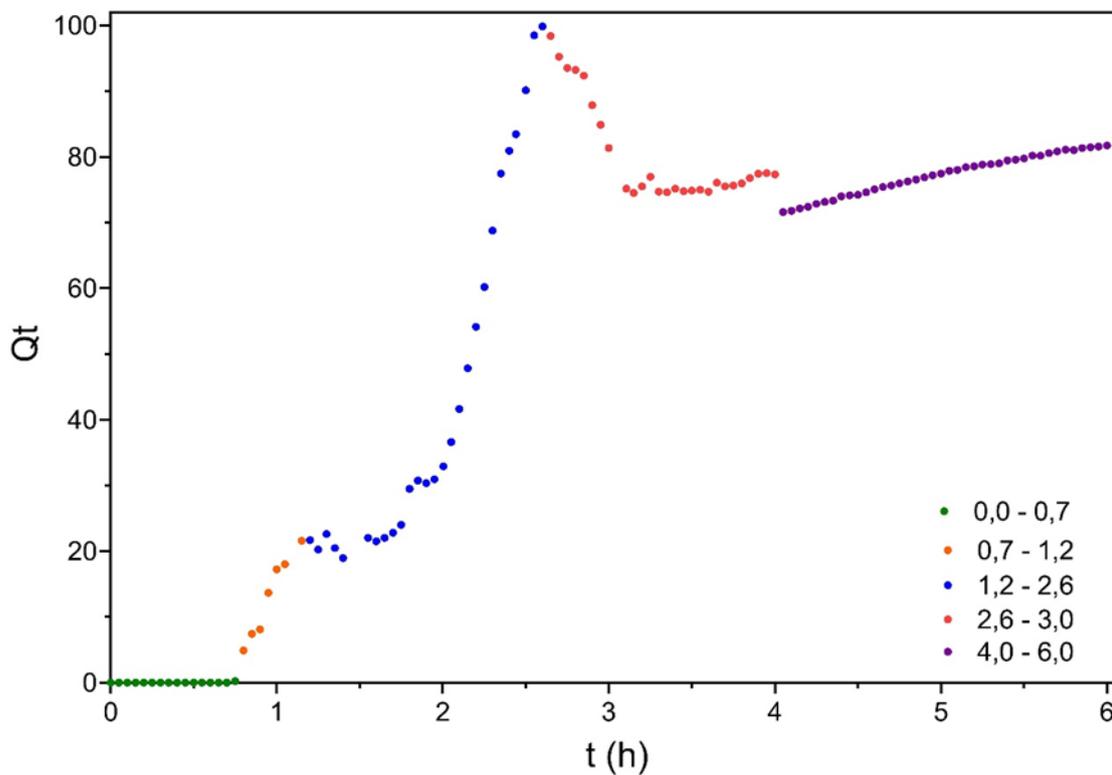
Esta entrega ideal é importante em certas classes de medicamentos destinados, por exemplo, para administração de antibióticos, coração e pressão arterial manutenção, controle da dor e antidepressivos.

Figura 36 - Perfil de liberação das nanopartículas de quitosana com fármaco no pH 8,5



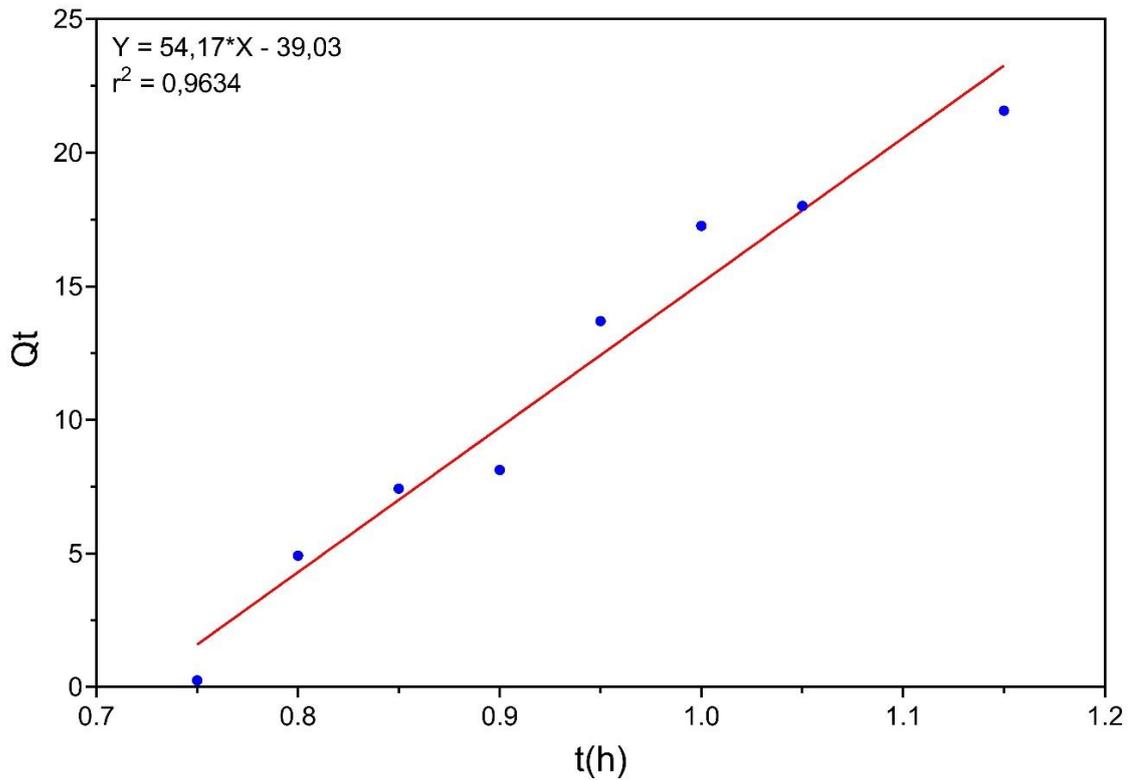
No pH 8,5 a cinética de liberação é complexa, sendo necessário vários modelos matemáticos para a sua descrição. Na Figura 37, é mostrado o perfil de liberação e as regiões do gráfico que foram tratadas.

Figura 37 – Perfil de liberação das nanopartículas de quitosana com fármaco no pH 8,5



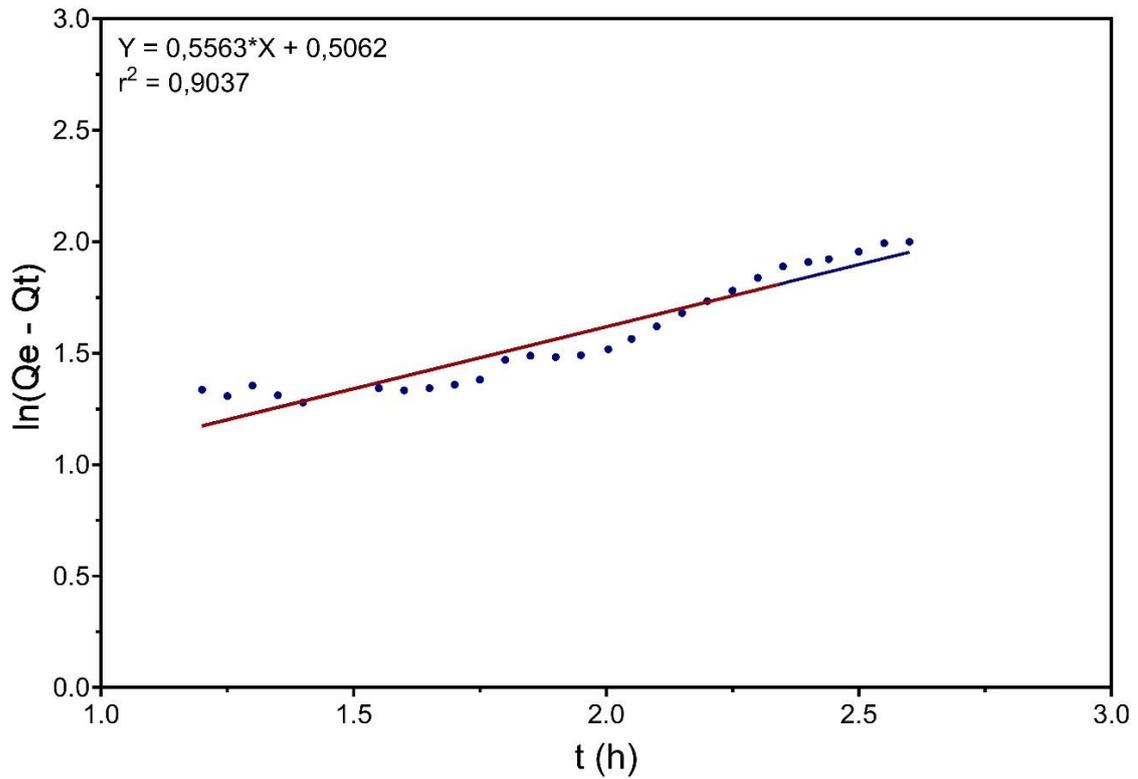
No intervalo de tempo de 0,0 a 0,7 horas, não ocorre a liberação do látex de eufol. No intervalo subsequente entre 0,7 e 1,2 horas a liberação apresenta um perfil cinético de ordem zero, com uma constante de velocidade de $5,42 \times 10^1 \text{ h}^{-1}$, conforme mostrado na Figura 38.

Figura 38 - Cinética no tempo da liberação 0,7 a 1,2 horas do látex de eufol pH 8,5



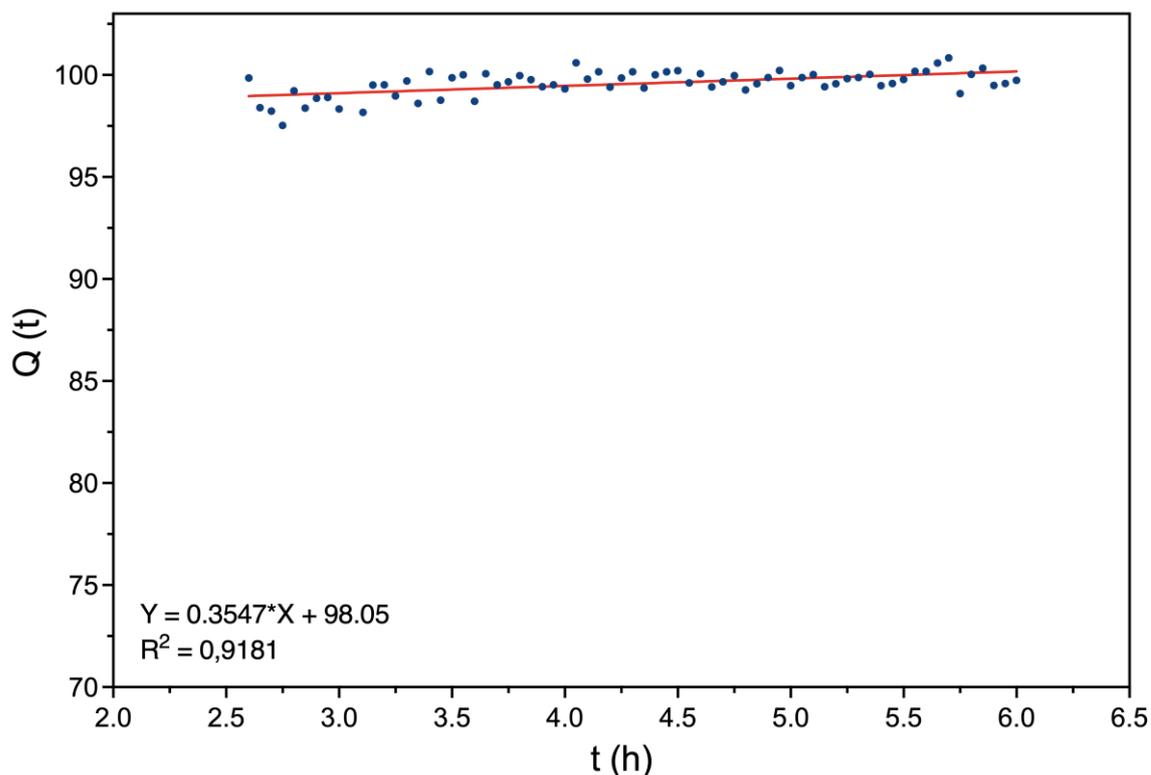
No intervalo entre 1,2 e 2,6 horas a cinética de liberação assume um perfil de pseudo primeira ordem, com uma constante de velocidade de $5,6 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$, como mostrado na Figura 39.

Figura 39 - Cinética no tempo 1,2 a 2,6 horas da liberação do látex de eufol pH 8,5



No intervalo de 2,6 até 6,0 horas as propriedades do polímero se alteram novamente, resultando em comportamento que se ajusta a um modelo cinético de ordem zero, com uma constante de velocidade de $3,5 \times 10^1 \text{ h}^{-1}$, como é mostrado na Figura 40.

Figura 40 - Cinética no tempo 2,6 a 6 horas da liberação do látex de eufol pH 8,5



As nanopartículas de quitosana com eufol nos diferentes pHs apresentaram 100 % do fármaco liberado.

No pH 2 apresentou uma liberação lenta e gradual de 100 % em 6 horas de análise. No pH 7,4 também apresentou liberação contínua e lenta com maior intensidade em 2 horas e liberação de 100% em 6 horas. No pH 8,5 também apresentou características liberação de 100 % do fármaco antes das 6 horas, em torno de 2 horas e meia com maior liberação do fármaco.

Para obter uma liberação no pH 8,5 mais prolongada, pode revestir as nanopartículas de quitosana com polímeros gastroresistentes, como ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (FHPMC), acetoftalato de celulose (ACT) e Eudragit L100, para liberação do fármaco no duodeno.

Tabela 6 - Comparação do perfil de liberação das nanopartículas em diferentes pHs

Nanopartículas	Tempo de liberação 100 % do fármaco
Nanopartículas pH 2	6 horas
Nanopartículas pH 7,4	6 horas
Nanopartículas pH 8,5	2 horas e meia

De acordo com Zare (174) e outros trabalhos, as propriedades mucoadesivas da quitosana aumentam o tempo de contato de um medicamento com o local de absorção, levando ao aumento da absorção, característico da interação entre a carga positiva da quitosana e a carga negativa da mucina no intestino (característica de pH básico), além da quitosana ter a possibilidade de afetar as junções estreitas e induzir sua abertura temporária, o que ajuda a aumentar a permeação de medicamentos pelo epitélio intestinal.

8. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo revelaram que as nanopartículas com eufol foram preparadas com sucesso usando tanto o método spray dryer e uma excelente eficiência de encapsulação, equivalente a 99 %. As características físico-químicas deste sistema de liberação, como diâmetro médio, potencial zeta e alta estabilidade física de até 37 °C, bem como a biocompatibilidade e a biodegradabilidade do polímero indica que as nanopartículas são adequadas para entrega por via oral, obtendo assim um excelente liberação e entrega do fármaco.

Os resultados do FTIR, perfil de liberação e estudo cinético comprovaram excelentes condições da síntese das nanopartículas e liberação do eufol, no qual pode sugerir estudos com diversas aplicações a partir do látex.

Dessa maneira, para uma melhor compreensão, análise e viabilidade do novo fármaco composto de nanopartículas a partir de quitosana com o látex contendo eufol se comportará dentro do corpo humano; ensaios *in vivo* são sugeridos para obtenção de novos dados e também comparação com as nanopartículas a partir do PLGA.

9. REFERÊNCIAS

1. Silva RAO, Santos MRdMC, Santos Filho FC, Cunha MC, de Oliveira GAL, Silva MdGO, et al. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE FITOTERÁPICO (Euphorbia Tirucalli L.) UTILIZADO NO TRATAMENTO DE NEOPLASIAS E OUTRAS DOENÇAS. *Cadernos de Prospecção*. 2014;6(4):490.
2. Maia¹ MCM, Rocha CM, Santos TE, Maia JTLS, Queiroz PR, Oliveira JPG. *Revista Agrária Acadêmica*.
3. Dong S, Bi H, Zheng D, Li Y, Zhao Y, Peng W. Bioactive constituents and biodrugs from Euphorbia tirucalli stene. *Journal of Environmental Biology*. 2019;40(3):524-35.
4. Toro AM, Munhões RAC, Camilo BG, Vale E, Baldini R, Pasa MC. LEVANTAMENTO ETNOBÔTANICO DA PLANTA MEDICINAL Aloe vera L. NA COMUNIDADE SÃO GONÇALO BEIRA RIO, CUIABÁ, MT. *Biodiversidade*. 2018;17(1).
5. Ozioma E-OJ, Chinwe OANJHm. Herbal medicines in African traditional medicine. 2019;10:191-214.
6. DE OLIVEIRA BM, COIMBRA CCBE. Euphorbia tirucalli: No tratamento complementar do câncer. *Revista Uningá Review*. 2014;20(3).
7. Silva VA, Rosa MN, Miranda-Gonçalves V, Costa AM, Tansini A, Evangelista AF, et al. Euphol, a tetracyclic triterpene, from Euphorbia tirucalli induces autophagy and sensitizes temozolomide cytotoxicity on glioblastoma cells. *Investigational new drugs*. 2018:1-15.
8. de Souza LS, Puziol LC, Tosta CL, Bittencourt ML, Santa Ardisson J, Kitagawa RR, et al. Analytical methods to access the chemical composition of an Euphorbia tirucalli anticancer latex from traditional Brazilian medicine. *Journal of ethnopharmacology*. 2019;237:255-65.
9. Song X, Zhao Y, Hou S, Xu F, Zhao R, He J, et al. Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. 2008;69(2):445-53.
10. Mesas C, Martínez R, Ortíz R, Galisteo M, López-Jurado M, Cabeza L, et al. Antitumor Effect of the Ethanolic Extract from Seeds of Euphorbia lathyris in Colorectal Cancer. 2021;13(2):566.
11. Ibrahim EH, Shaker KH, Kilany M, Ghramh HAJAJfS, Engineering. Cytokines/chemokines profile in rats treated with Euphorbia tirucalli extract. 2018;43(7):3443-51.
12. Prabha M, Ramesh C, Kuppast I, Mankani K. Studies on anti-inflammatory and analgesic activities of Euphorbia tirucalli L. latex. *Int J Chem Sci*. 2008;6(4):1781-7.
13. Abreu CM, Price SL, Shirk EN, Cunha RD, Pianowski LF, Clements JE, et al. Dual role of novel ingenol derivatives from Euphorbia tirucalli in HIV replication: inhibition of de novo infection and activation of viral LTR. *PloS one*. 2014;9(5):e97257.
14. Palit P, Mukherjee D, Mahanta P, Shadab M, Ali N, Roychoudhury S, et al. Attenuation of nociceptive pain and inflammatory disorders by total steroid and terpenoid fraction of Euphorbia tirucalli Linn root in experimental in vitro and in vivo model. *Inflammopharmacology*. 2018;26(1):235-50.

15. SHARMA T, DASH P, DAS D, GHOSH G. KINETIC AND THERMODYNAMIC STUDIES OF PURIFIED PROTEIN ISOLATED FROM EUPHORBIA TIRUCALLI LATEX. *Asian J Pharm Clin Res.* 2014;7(5):275-8.
16. Waczuk EP, Pereira KB, Machado MM, de Oliveira LFS. ASPECTOS ETNOBOTÂNICOS, FITOQUÍMICOS, TOXICOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS DA *Euphorbia Tirucalli* L.: DOS RISCOS ÀS POSSIBILIDADES. *Revista Acta Ambiental Catarinense.* 2014;9(1/2):35-64.
17. Dutra RC, de Souza PRdC, Bento AF, Marcon R, Bicca MA, Pianowski LF, et al. Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: evidence for the underlying mechanisms. *Biochemical pharmacology.* 2012;83(4):531-42.
18. Wal A. Medicinal value of *Euphorbia tirucalli*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive.* 2013;4(1).
19. Passos GF, Medeiros R, Marcon R, Nascimento AF, Calixto JB, Pianowski LFJEjop. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. 2013;698(1-3):413-20.
20. Dutra R, Bicca M, Segat G, Silva K, Motta E, Pianowski L, et al. The antinociceptive effects of the tetracyclic triterpene euphol in inflammatory and neuropathic pain models: The potential role of PKC ϵ . *Neuroscience.* 2015;303:126-37.
21. Passos GF, Medeiros R, Marcon R, Nascimento AF, Calixto JB, Pianowski LF. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. *European journal of pharmacology.* 2013;698(1):413-20.
22. Gonçalves EC, Baldasso GM, Bicca MA, Paes RS, Capasso R, Dutra RCJM. Terpenoids, cannabimimetic ligands, beyond the cannabis plant. 2020;25(7):1567.
23. Bani S, Kaul A, Khan B, Gupta VK, Satti NK, Suri KA, et al. Anti-arthritic activity of a biopolymeric fraction from *Euphorbia tirucalli*. 2007;110(1):92-8.
24. Shatkin JA. *Nanotechnology: health and environmental risks*: Crc Press; 2017.
25. Shapira P, Youtie J. The economic contributions of nanotechnology to green and sustainable growth. *Green processes for nanotechnology*: Springer; 2015. p. 409-34.
26. Sbalqueiro G, Balvedi L, Bettiato R, Ribas J. Uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de fármacos. *Revista Saúde e Desenvolvimento.* 2018;12(10):242-52.
27. Ferreira M, de Lima Leite F, de Oliveira Jr O, da Roz AL. *Grandes áreas da nanociência e suas aplicações*: Elsevier Brasil; 2016.
28. Bonifácio BV, da Silva PB, dos Santos Ramos MA, Negri KMS, Bauab TM, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *International journal of nanomedicine.* 2014;9:1.
29. Bonifácio BV, da Silva PB, dos Santos Ramos MA, Negri KMS, Bauab TM, Chorilli MJljon. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. 2014;9:1.
30. Machado LC, Gnoatto SA, Klüppel MLWJEdB. Lipossomas aplicados em farmacologia: uma revisão da literatura. 2007;29(67).
31. Patil RY, Patil SA, Chivate ND, Patil YN. Herbal Drug Nanoparticles: Advancements in Herbal Treatment. *Research Journal of Pharmacy and Technology.* 2018;11(1):421-6.
32. Ocsoy I, Tasdemir D, Mazicioglu S, Tan W. *Nanotechnology in Plants.* 2018.

33. Rodrigues ML. A nanotecnologia no desenvolvimento tecnológico para o setor saúde. In: UERN/BC, editor. *Ecossistema de pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica em saúde*. 01. Mossoró, RN: UERN/BC; 2022. p. 14.
34. Lima JS, La Reza D, Teixeira S, Costa C. Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas. *Revista da SOCERJ*. 2003;16(4):225-33.
35. Silva-Caldeira PP, Vilas-Boas AT, Machado BP, Carvalho DÉ, Silva KN. Liberação controlada do fármaco mebendazol a partir de uma matriz polimérica natural. *Iniciação Científica Cesumar*. 2019;20(2).
36. Duan Y, Dhar A, Patel C, Khimani M, Neogi S, Sharma P, et al. A brief review on solid lipid nanoparticles: Part and parcel of contemporary drug delivery systems. 2020;10(45):26777-91.
37. Langer R. Drug delivery and targeting. *NATURE-LONDON*. 1998:5-10.
38. Chen C, Yao W, Sun W, Guo T, Lv H, Wang X, et al. A self-targeting and controllable drug delivery system constituting mesoporous silica nanoparticles fabricated with a multi-stimuli responsive chitosan-based thin film layer. *International journal of biological macromolecules*. 2019;122:1090-9.
39. Rensen PC, de Vruh RL, Kuiper J, Bijsterbosch MK, Biessen EA, van Berkel TJJ. Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting. 2001;47(2-3):251-76.
40. Kong WH, Park K, Lee M-Y, Lee H, Sung DK, Hahn SK. Cationic solid lipid nanoparticles derived from apolipoprotein-free LDLs for target specific systemic treatment of liver fibrosis. *Biomaterials*. 2013;34(2):542-51.
41. Lunardi CN, Siqueira F, Leal F, Siqueira J, Souza IAd, Gomes AdJ. Production of gallocyanine nanogel as drug delivery system for tauopathies. 2018.
42. da Costa AO. Nanopartículas de PLGA contendo clorambucil e funcionalizadas com O-estearoil manose: síntese, caracterização e avaliação da ação citotóxica em células tumorais: Editora Dialética; 2022.
43. Mu C, Wu X, Zhou X, Wolfram J, Shen J, Zhang D, et al. Chemotherapy sensitizes therapy-resistant cells to mild hyperthermia by suppressing heat shock protein 27 expression in triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(19):4900-12.
44. Chulpanova DS, Kitaeva KV, James V, Rizvanov AA, Solovyeva VV. Therapeutic prospects of extracellular vesicles in cancer treatment. *Frontiers in immunology*. 2018;9.
45. Li R, Zheng K, Yuan C, Chen Z, Huang M. Be active or not: the relative contribution of active and passive tumor targeting of nanomaterials. *Nanotheranostics*. 2017;1(4):346.
46. Shen H, Hu X, Szymusiak M, Wang ZJ, Liu Y. Orally administered nanocurcumin to attenuate morphine tolerance: comparison between negatively charged PLGA and partially and fully PEGylated nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*. 2013;10(12):4546-51.
47. Allan J, Belz S, Hoeveler A, Hugas M, Okuda H, Patri A, et al. Regulatory landscape of nanotechnology and nanoplastics from a global perspective. 2021;122:104885.
48. Neves MM, Nouws HP, Delerue-Matos C, Martín-Yerga DJCOiE. Electrochemical detection and characterization of nanoparticles: a potential tool for environmental purposes. 2020.
49. Sastry SJJow, Nanotechnology E. Green Synthesis and Characterization of Silver Nano Particles. 2020;5(1):81-91.

50. Hodoroaba V-D, Unger W, Shard A. Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles: Elsevier; 2019.
51. Jelvehgari M, Barar J, Valizadeh H, Shadrou S, Nokhodchi AJPD, Technology. Formulation, characterization and in vitro evaluation of theophylline-loaded Eudragit RS 100 microspheres prepared by an emulsion-solvent diffusion/evaporation technique. 2011;16(6):637-44.
52. Singh P, Srivastava S, Singh SKJABS, Engineering. Nanosilica: Recent progress in synthesis, functionalization, biocompatibility, and biomedical applications. 2019;5(10):4882-98.
53. Yassin MT, Mostafa AA-F, Al-Askar AA, Al-Otibi FOJC. Synergistic antibacterial activity of green synthesized silver nanomaterials with colistin antibiotic against multidrug-resistant bacterial pathogens. 2022;12(8):1057.
54. Gholami-Shabani M, Sotoodehnejadnematalahi F, Shams-Ghahfarokhi M, Eslamifar A, Razzaghi-Abyaneh MJIn. Physicochemical properties, anticancer and antimicrobial activities of metallic nanoparticles green synthesized by *Aspergillus kambarensis*. 2022;16(1):1-13.
55. Aldeen TS, Mohamed HEA, Maaza MJJoP, Solids Co. ZnO nanoparticles prepared via a green synthesis approach: Physical properties, photocatalytic and antibacterial activity. 2022;160:110313.
56. Saleh TAJET, Innovation. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. 2020:101067.
57. Begum R, Farooqi ZH, Naseem K, Ali F, Batool M, Xiao J, et al. Applications of UV/Vis spectroscopy in characterization and catalytic activity of noble metal nanoparticles fabricated in responsive polymer microgels: a review. 2018;48(6):503-16.
58. Chen Z, Deutsch TG, Dinh HN, Domen K, Emery K, Forman AJ, et al. UV-vis Spectroscopy. Photoelectrochemical Water Splitting: Springer; 2013. p. 49-62.
59. Pompeu LD, Pinton AP, Finger MG, Cadó RG, de Avila Severo V, Pinheiro L, et al. Evaluation of stability of aqueous dispersions using zeta potential data. 2018;19(3):381-8.
60. Lunardi CN, Gomes AJ, Rocha FS, De Tommaso J, Patience GSJTCJoCE. Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential.
61. Alan BO, Barisik M, Ozcelik HGJTJoPCC. Roughness Effects on the Surface Charge Properties of Silica Nanoparticles. 2020;124(13):7274-86.
62. Tomkelski ML, Scremin G, Fagan SBJC, Educação. Ensino de Nanociência e Nanotecnologia: perspectivas manifestadas por professores da educação básica e superior. 2019;25(3):665-83.
63. Tang J, Daiyan R, Ghasemian MB, Idrus-Saidi SA, Zavabeti A, Daeneke T, et al. Advantages of eutectic alloys for creating catalysts in the realm of nanotechnology-enabled metallurgy. 2019;10(1):1-14.
64. Caputo F, Arnould A, Bacia M, Ling WL, Rustique E, Texier I, et al. Measuring particle size distribution by asymmetric flow field flow fractionation: a powerful method for the preclinical characterization of lipid-based nanoparticles. 2019;16(2):756-67.
65. Manosalva N, Tortella G, Diez MC, Schalchli H, Seabra AB, Durán N, et al. Green synthesis of silver nanoparticles: effect of synthesis reaction parameters on antimicrobial activity. 2019;35(6):88.
66. Jandt KD, Watts DCJDM. Nanotechnology in dentistry: Present and future perspectives on dental nanomaterials. 2020.

67. Abdel-Mageed HM, Fouad SA, Teaima MH, Abdel-Aty AM, Fahmy AS, Shaker DS, et al. Optimization of nano spray drying parameters for production of α -amylase nanopowder for biotherapeutic applications using factorial design. 2019;37(16):2152-60.
68. Asquieri ER, Nishi ACF, Batista RD, Asquieri EMdARJR, Society, Development. Secagem do extrato de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) por Spray Dryer: efeito dos diferentes agentes carreadores e avaliação dos teores de frutooligossacarídeos e compostos fenólicos. 2020;9(7):e591974521-e.
69. Meyer-Déru L, David G, Auvergne RJCP. Chitosan chemistry review for living organisms encapsulation. 2022:119877.
70. Khan I, Apostolou M, Bnyan R, Houacine C, Elhissi A, Yousaf SSJJoP. Paclitaxel-loaded micro or nano transfersome formulation into novel tablets for pulmonary drug delivery via nebulization. 2020;575:118919.
71. Hadidi M, Rostamabadi H, Moreno A, Jafari SMJFC. Nanoencapsulation of essential oils from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products into alfalfa protein nanoparticles. 2022;386:132765.
72. Lechanteur A, Evrard BJP. Influence of Composition and Spray-Drying Process Parameters on Carrier-Free DPI Properties and Behaviors in the Lung: A review. 2020;12(1):55.
73. Doherty J, Cinque G, Gardner PJASR. Single-cell analysis using Fourier transform infrared microspectroscopy. 2017;52(6):560-87.
74. Valand R, Tanna S, Lawson G, Bengtström LJFA, A CP. A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations. 2020;37(1):19-38.
75. Bukit N, Ginting EM, Hutagalung EA, Sidebang E, Frida E, Bukit BFJRoAMS. Preparation and characterization of oil palm ash from boiler to nanoparticle. 2019;58(1):195-200.
76. Naseer K, Ali S, Qazi JJASR. ATR-FTIR spectroscopy as the future of diagnostics: a systematic review of the approach using bio-fluids. 2020:1-13.
77. Maghsoudi S, Shahraki BT, Rabiee N, Fatahi Y, Dinarvand R, Tavakolizadeh M, et al. Burgeoning polymer nano blends for improved controlled drug release: a review. 2020;15:4363.
78. Majidinia M, Mirza-Aghazadeh-Attari M, Rahimi M, Mihanfar A, Karimian A, Safa A, et al. Overcoming multidrug resistance in cancer: Recent progress in nanotechnology and new horizons. 2020;72(5):855-71.
79. Culpi T, Pasqualim P, Fin M, Sasso D, Kaminski G, Fujiwara G, et al. Importância de parâmetros de controle na elaboração de micropartículas de Ca^{2+} -alginato. 2020;11(1).
80. Kumar PJJJoP, Phytochemistry. Role of nanotechnology in slow release of herbicide and season long weed control: A review. 2020;9(5):1882-7.
81. Deb A, Vimala RJJobm. Natural and synthetic polymer for graphene oxide mediated anticancer drug delivery—A comparative study. 2018;107:2320-33.
82. Mu W, Chu Q, Liu Y, Zhang NJN-ML. A Review on Nano-Based Drug Delivery System for Cancer Chemoimmunotherapy. 2020;12(1):1-24.
83. Yoo J, Won Y-YJABS, Engineering. Phenomenology of the Initial Burst Release of Drugs from PLGA Microparticles. 2020.
84. Garakani SS, Davachi SM, Bagher Z, Esfahani AH, Jenabi N, Atoufi Z, et al. Fabrication of chitosan/polyvinylpyrrolidone hydrogel scaffolds containing PLGA microparticles loaded with dexamethasone for biomedical applications. 2020;164:356-70.

85. Yavuz B, Chambre L, Kaplan DLJEoodd. Extended release formulations using silk proteins for controlled delivery of therapeutics. 2019;16(7):741-56.
86. Azevedo V, Chaves S, Bezerra D, Lia Fook M, Costa A. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. Revista eletrônica de Materiais e processos. 2007;2(3):27-34.
87. Costa DMAd, Silva LAd, Lima MTJd. Caracterização de blendas de amido de feijão macáçar, quitosana e glicerol. Holos Environment. 2018;18(2):207-26.
88. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. Progress in polymer science. 2006;31(7):603-32.
89. Dal Pozzo A, Vanini L, Fagnoni M, Guerrini M, De Benedittis A, Muzzarelli R. Preparation and characterization of poly (ethylene glycol)-crosslinked reacylated chitosans. Carbohydrate Polymers. 2000;42(2):201-6.
90. Elgadir MA, Uddin MS, Ferdosh S, Adam A, Chowdhury AJK, Sarker MZI. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. Journal of food and drug analysis. 2015;23(4):619-29.
91. Hamed I, Özogul F, Regenstein JM. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. Trends in Food Science & Technology. 2016;48:40-50.
92. Zhang L, Zeng Y, Cheng Z. Removal of heavy metal ions using chitosan and modified chitosan: A review. Journal of Molecular Liquids. 2016;214:175-91.
93. Jabbal-Gill I, Watts P, Smith A. Chitosan-based delivery systems for mucosal vaccines. Expert opinion on drug delivery. 2012;9(9):1051-67.
94. Cheung R, Ng T, Wong J, Chan W. Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. Marine drugs. 2015;13(8):5156-86.
95. Alexandrino TTdB. Síntese e caracterização de nanopartículas de quitosana-tripolifosfato e seu potencial como antifúngico natural para aplicação por aspersão em frutas frescas. 2020.
96. Liang J, Yan H, Puligundla P, Gao X, Zhou Y, Wan X. Applications of chitosan nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of tea polyphenols: A review. Food Hydrocolloids. 2017;69:286-92.
97. Marquez JO. A dor e os seus aspectos multidimensionais. Ciência e Cultura. 2011;63(2):28-32.
98. Guerrero-Solano JA, Jaramillo-Morales OA, Velázquez-González C, la O-Arciniega D, Castañeda-Ovando A, Betanzos-Cabrera G, et al. Pomegranate as a Potential Alternative of Pain Management: A Review. 2020;9(4):419.
99. Dol EJDol. Dol 219. 2018;1(219):1-.
100. Chimenti RL, Frey-Law LA, Sluka KA. A mechanism-based approach to physical therapist management of pain. Physical therapy. 2018;98(5):302-14.
101. de Oliveira Alves JE, Silveira MD, Vieira EMP, de Moura Vidal LW. Mecanismos fisiopatológicos da nocicepção e bases da analgesia perioperatória em pequenos animais. Acta Biomedica Brasiliensia. 2017;8(1):56-68.
102. Sanchez AD, Andrade ALMd, Parizotto NA. Eficácia da terapia a laser de baixa intensidade no controle da dor neuropática em camundongos %J Fisioterapia e Pesquisa. 2018;25:20-7.
103. Ladder WPR. Pain Relief: The Pharmacology of Analgesics and Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs).
104. Guimarães FdPG, de Souza Júnior EC, Júnior CAM, Nascimento JWLJBJoHR. Política de proibição da dipirona: uma reflexão. 2021;4(3):11007-19.

105. Lloyd DP. Neuron patterns controlling transmission of ipsilateral hind limb reflexes in cat. *Journal of Neurophysiology*. 1943;6(4):293-315.
106. Kobayashi Y, Kiguchi N, Maeda T, Ozaki M, Kishioka S. The critical role of spinal ceramide in the development of partial sciatic nerve ligation-induced neuropathic pain in mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;421(2):318-22.
107. Peraza GG, Rodrigues ST, Medeiros SHL, Baisch ALM. O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. *VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde*. 2007;19(1):35-44.
108. Barrett JEJ*et al.* The pain of pain: challenges of animal behavior models. 2015;753:183-90.
109. Basu P, Tongkhuya SA, Harris TL, Riley AR, Maier C, Granger J, et al. *Euphorbia bicolor* (Euphorbiaceae) Latex Phytochemicals Induce Long-lasting Non-Opioid Peripheral Analgesia in a Rat Model of Inflammatory Pain. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10:958.
110. Seidi S, Sanâti SEJMA. Nickel-iron layered double hydroxide nanostructures for micro solid phase extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, followed by quantitation by HPLC-UV. 2019;186(5):297.
111. Assis DB, Aragão Neto HdC, da Fonsêca DV, de Andrade HHN, Braga RM, Badr N, et al. Antinociceptive Activity of Chemical Components of Essential Oils That Involves Docking Studies: A Review. 2020;11:777.
112. Zhang T, Liu R, Chang M, Jin Q, Zhang H, Wang XJF, et al. Health benefits of 4, 4-dimethyl phytosterols: An exploration beyond 4-desmethyl phytosterols. 2020;11(1):93-110.
113. Hong JF, Song YF, Liu Z, Zheng ZC, Chen HJ, Wang SSJM*et al.* Anticancer activity of taraxerol acetate in human glioblastoma cells and a mouse xenograft model via induction of autophagy and apoptotic cell death, cell cycle arrest and inhibition of cell migration. 2016;13(6):4541-8.
114. Dutra RC, Claudino RF, Bento AF, Marcon R, Schmidt ÉC, Bouzon ZL, et al. Preventive and therapeutic euphol treatment attenuates experimental colitis in mice. 2011;6(11):e27122.
115. Heslinga MJ, Mastria EM, Eniola-Adefeso O. Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*. 2009;138(3):235-42.
116. Feng S, Lu F, Wang Y, Suo J. Comparison of the degradation and release behaviors of poly (lactide-co-glycolide)–methoxypoly (ethylene glycol) microspheres prepared with single-and double-emulsion evaporation methods. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015;132(19).
117. Holz JP. Preparação de micro e nanoesferas de PLGA com mentol. 2012.
118. Lee T-I, Kao Y-H, Chen Y-C, Tsai W-C, Chung C-C, Chen Y-JJ*et al.* Cardiac metabolism, inflammation, and peroxisome proliferator-activated receptors modulated by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in diabetic rats. 2014;176(1):151-7.
119. Funez MI, Ferrari LF, Duarte DB, Sachs D, Cunha FQ, Lorenzetti BB, et al. Teleantagonism: A pharmacodynamic property of the primary nociceptive neuron. 2008;105(49):19038-43.
120. Zimmermann MJP. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. 1983;16(2):109-10.
121. CONCEA %J Ministério da Ciência Tel. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. 2013.

122. Costa MS. Apigenina reduz hipernocicepção inflamatória em camundongos. 2019.
123. Vivancos G, Verri Jr W, Cunha T, Schivo I, Parada C, Cunha F, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. 2004;37:391-9.
124. Medida Dinâmica da Sensibilidade Plantar Dynamic Plantar Aesthesiometer | Teste Von Frey. Ugo Basile Brasil. 2021.
125. DOL. Métodos experimentais para o estudo da dor 2021 [Available from: <http://www.dol.inf.br/html/MetodosExperimentais.html>].
126. Cesário FRAS, de Albuquerque TR, de Lacerda GM, de Oliveira MRC, da Silva BAF, Rodrigues LB, et al. Chemical fingerprint, acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract of leaves from *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum. 2019;26(5):873-80.
127. Souza CÂ, dos Santos GG, Farias FH, Júnior EÁS, Parada CA. Avaliação do sobrenadante da cultura de queratinócitos ou fibroblastos em modelo de hiperalgesia inflamatória.
128. Dutra RC, da Silva KABS, Bento AF, Marcon R, Paszcuk AF, Meotti FC, et al. Euphol, a tetracyclic triterpene produces antinociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain: The involvement of cannabinoid system. 2012;63(4):593-605.
129. Narang J, Malhotra N, Chauhan N, Singh S, Singh G, Pundir CJAML. Development and validation of biosensing method for acetaminophen drug monitoring. 2015;6(3):209-16.
130. Quintans JS, Antonioli AR, Almeida JR, Santana-Filho VJ, Quintans-Júnior LJJB, Pharmacology C, et al. Natural products evaluated in neuropathic pain models-a systematic review. 2014;114(6):442-50.
131. Nomura DA, Enoki TA, Goldman C, Lamy MT. Espalhamento dinâmico de luz. Apostila para a 2a Escola de Colóides da USP. 2014:1-18.
132. Langevin D, Lozano O, Salvati A, Kestens V, Monopoli M, Raspaud E, et al. Inter-laboratory comparison of nanoparticle size measurements using dynamic light scattering and differential centrifugal sedimentation. *NanoImpact*. 2018;10:97-107.
133. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12(2):255-64.
134. Lunardi CN, Gomes AJ, Rocha FS, De Tommaso J, Patience GSJTCJoCE. Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. 2021;99(3):627-39.
135. Oliveira JPd, Barroso LA, Júlio A, Caparica R, Macedo MJ, Silva FN, et al. Preparation and characterization of microparticles loaded with seed oil of Caatinga passion fruit obtained by spray drying. 2019.
136. Zhang Z, Feng S-S. The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly (lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. *Biomaterials*. 2006;27(21):4025-33.
137. Rocha FS, Gomes AJ, Lunardi CN, Kaliaguine S, Patience GSJTCJoCE. Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis. 2018;96(12):2512-7.
138. Manadas R, Pina ME, Veiga F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2002;38(4):375-99.
139. Barrozo S, Benedetti AV. COMPREENSÃO MATEMÁTICA DA DIFUSÃO NO CONTEXTO ELETROQUÍMICO. *Química Nova*. 2016;39:356-70.
140. Ramteke K, Dighe P, Kharat A, Patil S. Mathematical models of drug dissolution: a review. *Sch Acad J Pharm*. 2014;3(5):388-96.

141. Lopes CM, Lobo JMS, Costa P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005;41(2):143-54.
142. Araújo P, Garcia T, Bezerra Junior A, Colaço R, Sousa W, Barbosa R, et al. Matrizes de quitosana/gelatina para liberação de Etonogestrel. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. 2017;12(2):138-45.
143. Pezzini BR, Silva MAS, Ferraz HG. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007;43(4):491-502.
144. Barzegar-Jalali M, Adibkia K, Valizadeh H, Shadbad MRS, Nokhodchi A, Omidi Y, et al. Kinetic analysis of drug release from nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2008;11(1):167-77.
145. Gujarati DN, Porter DC. *Econometria Básica-5*: Amgh Editora; 2011.
146. Franses PH. A note on the mean absolute scaled error. *International Journal of Forecasting*. 2016;32(1):20-2.
147. NCBI. NCfBI-. Euphol, CID=441678. PubChem Database [Internet]. 2019. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Euphol>.
148. Schafroth N, Arpagaus C, Jadhav UY, Makne S, Douroumis D. Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012;90:8-15.
149. Jayaprakash P, Maudhuit A, Gaiani C, Desobry SJJofE. Encapsulation of bioactive compounds using competitive emerging techniques: Electro spraying, nano spray drying, and electrostatic spray drying. 2022:111260.
150. Brasil. Regulamento técnico sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências (Resolução-RDC nº 166, de 24 de julho de 2017). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. 2017.
151. Bao B, Yang Z, Liu Y, Xu Y, Gu B, Chen J, et al. Two-photon semiconducting polymer nanoparticles as a new platform for imaging of intracellular pH variation. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019;126:129-35.
152. Ahuja M, Yadav M, Kumar S. Application of response surface methodology to formulation of ionotropically gelled gum cordia/gellan beads. *Carbohydrate Polymers*. 2010;80(1):161-7.
153. Brasil RR. nº 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasília, DF*. 2003.
154. Gomes AJ, Barbizan OA, Lessa CC, Campos TA, Muller HS, Martins VP, et al. Multidrug core-shell bead: a system for bacterial infection treatment in fish. 2019;27(11):2395-407.
155. Holkem AT, Codevilla CF, da Silva CdB, de Menezes CR. Técnicas de preparação de sistemas nanotecnológicos aplicados a alimentos. *Ciência e Natura*. 2015;37(5):87-96.
156. Torres MA, Vieira RS, Beppu MM, Santana CC. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. *Polímeros: ciência e Tecnologia*. 2005;15(4):306-12.
157. Santos OJd, Carvalho-Júnior FFd, Sauaia-Filho EN, Santos RHP, Santos RAP, Barbalho WG. Cicatrização gástrica com uso do extrato da *Euphorbia Tirucalli* L.: estudo em ratos %J ABCD. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. 2013;26:256-9.
158. Hellen KS, Monika PT, Silva M, Laranjeira M, de Qualidade L. Desenvolvimento, Avaliação e Caracterização Físico Química de Micropartículas

- Constituídas de Aciclovir/Quitosana Desenvolvidas pela Técnica de Spray-drying. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2007;26(6):866-71.
159. Liang J, Yan H, Wang X, Zhou Y, Gao X, Puligundla P, et al. Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems. *Food chemistry*. 2017;231:19-24.
160. Kumar LR, Chatterjee N, Tejpal C, Vishnu K, Anas K, Asha K, et al. Evaluation of chitosan as a wall material for microencapsulation of squalene by spray drying: Characterization and oxidative stability studies. *International journal of biological macromolecules*. 2017;104:1986-95.
161. Collado A, Hernández G, Morejón V, Coll F, Peniche C. Encapsulation of a bioactive steroid in a polymer matrix (micro-encapsulation of DI-31 in chitosan by spray drying for various purposes). 2017.
162. Khafagy E-S, Morishita M, Onuki Y, Takayama K. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(15):1521-46.
163. Liu H, Chen B, Mao Z, Gao C. Chitosan nanoparticles for loading of toothpaste actives and adhesion on tooth analogs. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007;106(6):4248-56.
164. Wang S-L, Hiep ĐM, Luong PM, Vui NT, Đinh TM, Dzung NA. Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity. *Research on Chemical Intermediates*. 2014;40(6):2165-75.
165. Zhang Y, Chen Y, Westerhoff P, Hristovski K, Crittenden JC. Stability of commercial metal oxide nanoparticles in water. *Water research*. 2008;42(8-9):2204-12.
166. Lunardi CN, Barros MP, Rodrigues ML, Gomes AJ. Synthesis of gold nanoparticles using *Euphorbia tirucalli* latex and the microwave method. *Gold Bulletin*. 2018;51(4):131-7.
167. Corazzari I, Nisticò R, Turci F, Faga MG, Franzoso F, Tabasso S, et al. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polymer Degradation and Stability*. 2015;112:1-9.
168. Branca C, D'Angelo G, Crupi C, Khouzami K, Rifici S, Ruello G, et al. Role of the OH and NH vibrational groups in polysaccharide-nanocomposite interactions: A FTIR-ATR study on chitosan and chitosan/clay films. *Polymer*. 2016;99:614-22.
169. BRASIL MS. Farmacopéia brasileira. 6 ed. Sanitária ANdV, editor2019.
170. Elbially NS. Preparation and Characterization of Curcumin Loaded Dextrin Sulfate-Chitosan Nanoparticles for Promoting Curcumin Anticancer Activity. 2019.
171. Qin C, Zhou J, Zhang Z, Chen W, Hu Q, Wang Y. Convenient one-step approach based on stimuli-responsive sol-gel transition properties to directly build chitosan-alginate core-shell beads. *Food hydrocolloids*. 2019;87:253-9.
172. Costa P, Lobo JMS. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2001;13(2):123-33.
173. Singhvi G, Singh MJJPSR. In-vitro drug release characterization models. 2011;2(1):77-84.
174. Zare M, Samani SM, Sobhani Z. Enhanced Intestinal Permeation of Doxorubicin using Chitosan Nanoparticles. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2018;8(3):411.

10. ANEXOS

10.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 21 de agosto de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “ESTUDO DO POSSÍVEL EFEITO ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO LÁTEX DA EUPHORBIA TIRUCALLI EM SUA FORMA LIVRE E NANOESTRUTURADA.” Protocolo n.º 58/2019, sob responsabilidade da Professora Dr^a Claire Nain Lunardi foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus norvegicus* Linhagem Wistar (120 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/07/2019 a 01/12/2021.



Dr. José Luiz Jivago de Paula Rólo
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

10.2 COMPROVANTE DE CADASTRO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AA980BC

A atividade de acesso ao Conhecimento Tradicional Associado, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: AA980BC
Usuário: Universidade de Brasília
CPF/CNPJ: 00.038.174/0001-43
Objeto do Acesso: Conhecimento Tradicional Associado
Finalidade do Acesso: Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

latex

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: Uso de latex de euphorbia tirucalli na produção de nanopartículas metálicas e poliméricas

Equipe

Anderson de Jesus Gomes	UnB
Mirella Paula de Freitas Barros	UnB
Marina Lima Rodrigues	UnB

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: <https://doi.org/10.1007/s13404-018-0231-6>

Data do Cadastro: 29/10/2018 10:27:42
Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 10:42 de 29/10/2018.



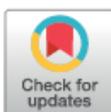
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

RESEARCH ARTICLE

Euphorbia tirucalli latex loaded polymer nanoparticles: Synthesis, characterization, *in vitro* release and *in vivo* antinociceptive actionMarina Lima Rodrigues^{1,2*}, Anderson de Jesus Gomes^{1,2,3*}, Mani Indiana Funez^{3*}, Mariane Aparecida da Silva Marques^{3*}, Claire Nain Lunardi^{1,2,3*} 

1 Laboratory of Photochemistry and Nanobiotechnology, University of Brasilia, Campus Ceilandia, Brasilia, Federal District, Brazil, **2** Program in Nanoscience and Nanobiotechnology, University of Brasilia, Brasilia, Federal District, Brazil, **3** Sciences and Technologies in Health Program, University of Brasilia, Campus Ceilandia, Brasilia, Federal District, Brazil

* These authors contributed equally to this work.

* clunardi@unb.br OPEN ACCESS

Citation: Rodrigues ML, Gomes AdJ, Funez MI, Marques MAoS, Lunardi CN (2022) *Euphorbia tirucalli* latex loaded polymer nanoparticles: Synthesis, characterization, *in vitro* release and *in vivo* antinociceptive action. PLoS ONE 17(11): e0274432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274432>

Editor: Vineet Kumar Rai, Siksha O Anusandhan University School of Pharmaceutical Sciences, INDIA

Received: May 31, 2021

Accepted: August 28, 2022

Published: November 29, 2022

Copyright: © 2022 Rodrigues et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This study was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) [001] and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [001] in the form of funds to MLR, and by the Foundation Support Research Federal District (FAPDF) in the form of funds to

Abstract

The encapsulation of drugs in micro and nanocarriers has helped to resolve mechanisms of cellular resistance and decrease drug side effects as well. In this study, poly(D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) was used to encapsulate the Euphol active substance-containing latex from *Euphorbia tirucalli* (E-latex). The nanoparticles (NP) were prepared using the solvent evaporation method and the physical and chemical properties were evaluated using spectrophotometric techniques. FTIR was used to prove the formation of the ester bond between the E-latex and PLGA-NP. The UV-Vis spectroscopic technique was used to show that more than 75% of the latex was encapsulated; the same technique was used to determine the release profile of the compound at different pH values, as well as determining the speed with which the process occurs through kinetic models, and it was observed that the best adjustments occurred for the Korsmeyer-Peppas model and the Higuchi model. The DLS technique was used to determine the diameter of the particles produced as well as their zeta potential (ZP). The sizes of the particles varied from 497 to 764 nm, and it was observed that the increase in E-latex concentration causes a reduction in the diameter of the NP and an increase in the ZP (-1.44 to -22.7 mV), due to more functional groups from latex film being adsorbed to the NPs surfaces. The thermogravimetric experiments exhibit the glass transition temperatures (T_g) that is appropriate for the use of formulated NPs as a stable drug delivery device before use. The *in vivo* activity of E-NPs (30 and 100 mg/Kg/p.o.) was tested against carrageenan-induced mechanical hypernociception. The data demonstrated a significantly antinociceptive effect for E-NPs, suggesting that E-latex nanoencapsulation preserved its desired properties.

Introduction

Several uses of *Euphorbia* latex (E-latex) include as an antitumor [1], immunodulator [2], antimicrobial [3], antitumoral [4], as well as molluscic activity [5] and a potential source of biofuel