

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO E CARATERIZAÇÃO FÍSICO,
QUÍMICA E BIOLÓGICA *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS
POLIMERICAS CONTENDO α - β AMIRINA.

SERAFIM FLORENTINO NETO

MANAUS
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

SERAFIM FLORENTINO NETO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO,
QUÍMICA E BIOLÓGICA *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS
POLIMERICAS CONTENDO α - β AMIRINA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Tatiane Pereira de Souza

MANAUS
2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F633d	Florentino Neto, Serafim Desenvolvimento e caracterização físico, química e biológica in vitro de nanopartículas polimericas contendo alfa e beta amirina. / Serafim Florentino Neto. 2018 90 f.: il.; 31 cm. Orientadora: Tatiane Pereira de Souza Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas. 1. Nanotecnologia. 2. Nanoestruturas. 3. Sistemas de Liberação de Medicamentos. 4. Nanopartículas. 5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. I. Souza, Tatiane Pereira de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título
-------	--

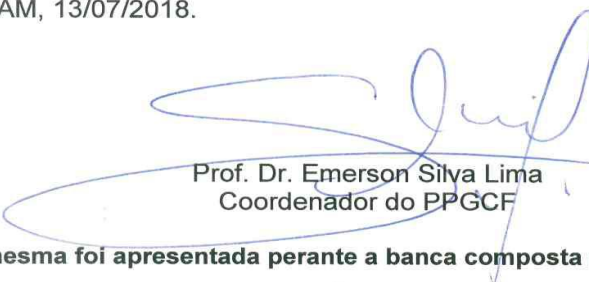
“Desenvolvimento e caracterização físico-química e biológica *in vitro* de nanopartículas poliméricas contendo α - β - amirina”.

DISCENTE: SERAFIM FLORENTINO NETO

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 13/07/2018.



Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



Profª. Drª. Tatiane Pereira de Souza
Orientador e presidente da banca



Profª. Drª. Maria Katherine Santos de Oliveira - Membro externo
Membro externo (CBA)



Profª. Drª. Maria de Meneses Pereira - Membro interno
Membro interno (UFAM)

Dedico as minhas queridas filhas Lavínia Laís Nunes Florentino e Laíse Nunes Florentino e aos meus pais e irmãos, pela compreensão,apoio, incentivo perenemente.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela superação constante aos obstáculos encontrados e a transposição de cada um deles com paz e serenidade.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Tatiane Pereira de Souza, por proporcionar condições favoráveis ao desenvolvimento desta pesquisa;

Ao Prof^o. Dr. Jesus Rafael Rodríguez Amado, pelo apoio continuo as atividade do laboratório e a contribuição intelectual para êxito deste trabalho;

A Prof^a Dr^a Fernanda Guilhaon Simplicio, pela contribuição em ceder as instalações e equipamentos do FITHOFAR, para extração, purificação e análise do material vegetal;

Ao Prof^o. Dr. Emerson Silva Lima, por permitir o uso das instalações do BIOFHAR, para realização de análises;

Ao Prof^o. Dr. Marco B. Machado - NMRLAB - Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear - RMN, por realizar a análise de RMN do material vegetal;

Ao Prof^o. Dr. Paulo José da Costa Couceiro - LABIV - Laboratório de Espectroscopia no Infravermelho - FT-IR, por realizar a análise de FT-IR do material vegetal;

Ao Prof^o. Dr Sergio Michielon - Lab Mat - Laboratório de Materiais - por realizar a análise de Difração de RX no material vegetal;

A Dr^a. Klenyce Iamaguchi, pela contribuição para sucesso desta pesquisa;

Ao Caro colega Leonard Domingo Acho, pelas contribuições para esta pesquisa;

Aos meus familiares (filhas, pais e irmãos), por me compreender nos momentos que estive ausente;

Aos amigos(as) do LIDETEF, Patrícia, Rodrigo, Fabrício, Camila, Deyse, Arine, Newton, Sayuri, pelo apoio diário as atividade de rotina no laboratório;

As colegas do FITHOFAR, Talita, Verônica, Carol, Janaina e Livia, pelo apoio diário as atividade de rotina no laboratório;

Ao caro amigo Erick, pelo apoio diário as atividade de rotina no laboratório;

Aos amigos da caserna, Quevedo, Jurenil, Denísio e Jules, pelo apoio a mim dispensado.

MUITO OBRIGADO!!!

Maior que a tristeza de não ter vencido é a vergonha de não ter lutado!

Rui Barbosa

RESUMO

Os triterpenos são um grupo de metabólitos que tem relatado ações farmacológicas como o efeito protetor hepático, ansiolíticos e antidepressivos, efeito antinocepcivo, atividade anti-inflamatória, atividade hipoglicemiante e hipolipemiante, dentre outras. Entre os triterpenos, a mistura isomérica de α - β amirina tem demonstrado utilidade farmacológica em diversos estudos in vitro e in vivo, mas sua baixa solubilidade aquosa têm se apresentado como limitante na administração por via oral. O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanopartículas carregadas com a mistura isomérica α - β amirina como uma via provável para sua utilização na terapêutica que poderia evitar o problema farmacocinético citado anteriormente. Primeiro, foi isolada e purificada a mistura isomérica de amirinas usando cromatografia de coluna. Segundo, a mistura foi caracterizada por métodos químico físicos (RX, FTIR, RMN- ^1H e RMN- ^{13}C , MEV). Terceiro, foram preparadas as nanopartículas usando diversos polímeros (Eudragit E100, Poly- ϵ -caprolactona e Kollicoat Mae100P) e dois tensioativos (Tween 80[®] na fase aquosa e Span 20[®] na fase orgânica) pelo método emulsificação e difusão do solvente. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas quanto a seu tamanho e distribuição de tamanho de partículas, potencial zeta, condutividade e foi quantificada a eficiência de encapsulação do processo de preparação. Foi validado o método por HPLC para a quantificação de amirinas no material purificado e nas nanopartículas. Também foi feito um estudo de estabilidade em prateleira, durante 90 dias, das principais propriedades das nanopartículas. Por último foram avaliadas as propriedades antioxidantes (DPPH $\cdot$ e ABTS $\cdot$), a capacidade de inibir as enzimas lipase pancreática e alfa glicosidase, assim como a citotoxicidade relativa em fibroblasto não neoplástico de pulmão humano. Foi isolada e purificada uma mistura de α - β amirina com um rendimento de 28% na extração. A mistura é um produto branco, leve e em forma de agulhas finas (observado por MEV). As análises de RX, FTIR, RMN-H e RMN- ^{13}C confirmaram presença da amirina, que foi avaliada por HPLC confirmando 99% de pureza. As nanopartículas da mistura de α - β amirina, apresentaram um tamanho de partícula de 128,80 nm, uma polidispersão de 0,107, potencial zeta de -35,63 mV e uma condutividade 0,149 $\mu\Omega\text{cm}^{-1}$. As nanopartículas apresentaram uma excelente estabilidade físico-química, em prateleira, até 90 dias após a preparação. Tanto a amirina pura como as nanopartículas de amirina apresentaram pobre atividade antioxidante, frente aos radicais DPPH $\cdot$ e ABTS $\cdot$. A amirina pura apresentou uma baixa atividade inibidora das enzimas lipase pancreática e α -glicosidase, diferente das nanopartículas que apresentaram uma excelente atividade inibidora de lipase pancreática (IC_{50} 15,40 $\mu\text{g/mL}$) e α -glicosidase (IC_{50} 44,40 $\mu\text{g/mL}$). Ambos os produtos (Amirina e nanopartículas de amirina) não apresentaram atividade inibidora da viabilidade celular de fibroblastos de pulmão humano não neoplástico, mostrando ausência de citotoxicidade nesse linhagem celular. Segundo os resultados obtidos neste estudo pode se sugerir que as nanopartículas carregadas com a mistura isomérica de α - β amirina são uma alternativa viável para seu uso no tratamento coadjuvante da diabetes e de pacientes diabéticos com complicações secundárias como a obesidade. No entanto outros estudos deverão ser conduzidos para comprovar a funcionalidade real das nanopartículas nessas condições de saúde.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Nanoestruturas; Sistemas de Liberação de Medicamentos; Nanopartículas; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; Triterpenos.

ABSTRACT

Triterpenes are a group of metabolites having some important pharmacological effects like liver protective, anxiolytic, antidepressant, anti-inflammatory, hypoglycemic effects, and lipid-lowering, among others. The α and β amyirin are triterpenes showing several pharmacological use in vitro and in vivo, but its low aqueous solubility have been shown to be limiting in oral administration. The objective of this work was to develop α - β -amyirin loaded-nanoparticles as a probable route for its use in therapy, which could avoid or diminish the pharmacokinetic problems mentioned above. First, the isomeric mixture of amyirins was isolated and purified using a chromatographic column. Second, the mixture was characterized by physicochemical methods (RX, FTIR, ^1H -NMR and ^{13}C -NMR, MEV). Third, the nanoparticles were prepared by the emulsification-solvent diffusion method, using three different polymers (Eudragit E100, Poly- ϵ -caprolactone, and Kollicoat Mae100P), and two surfactants (Tween 80[®], in the aqueous phase and Span 20[®], in the organic phase). Nanoparticles were characterized by measuring the particle size, particle size distribution, potential zeta, conductivity and the encapsulation efficiency, of the preparation process. An HPLC method was validated for the quantification of amyirins in the purified material and in nanoparticles. A shelf life stability study of nanoparticles main properties was carried out. Finally, the antioxidant properties (DPPH[•] and ABTS[•]), the ability to inhibit pancreatic lipase and alpha-glucosidase enzymes, as well as relative cytotoxicity in human lung non-neoplastic fibroblast were evaluated. A mixture of α - β amyirin was extracted and purified with a yield of 28%. The isomeric mixture is a white, light and fine needle product (as observed by MEV). Analyzes of RX, FTIR, ^1H NMR and ^{13}C -NMR confirmed the presence of amyirin. A 99% of purity evaluated by an HPLC analytical method was confirmed. Nanoparticles showed a particle size of 128.80 nm, polydispersity 0.107, zeta potential -35.63 mV, and a conductivity of 0.149 $\mu\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$. Nanoparticles presented an excellent physicochemical shelf stability up to 90 days after preparation. Both the pure amyirin and the amyirin nanoparticles showed poor antioxidant activity against DPPH[•] and ABTS[•] radicals. The pure amyirin showed a low inhibitory effect of the pancreatic lipase and α -glucosidase enzymes. On the contrary, amyirin nanoparticles showed an excellent pancreatic lipase inhibitory effect (IC_{50} 15.40 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and α -glycosidase (IC_{50} 44.40 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Both products (amyirin and amyirin nanoparticles) showed no activity on the cellular viability of non-neoplastic human lung fibroblasts, showing the absence of cytotoxicity in this cell line. The results obtained suggest that amyirin-loaded nanoparticles are a viable alternative for their use as adjuvants on the diabetes treatment, and in diabetic patients with secondary complications such as obesity. However other studies should be conducted to prove the real functionality of nanoparticles in these health conditions.

Keywords Nanotechnology; Nanostructures; Medication Release Systems; Nanoparticles; High Performance Liquid Chromatography; Triterpenes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos triterpenos pentacíclicos, a) α amirina, b) β amirina e c) lupeol.....	19
Figura 2 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	25
Figura 3 - Representação esquemática de preparação de nanopartículas obtidas pelo método deposição do polímero pré-formado.	29
Figura 4 - Representação do método de Nanoprecipitação.....	30
Figura 5- Fluxograma da parte experimental	37
Figura 6 - Processo para obtenção e isolamento da mistura isomérica α,β -amirina a partir da resina do <i>Protium sp.</i> A) amostra de <i>Protium sp</i> comercial; B) processo de trituração; C) coluna cromatográfica utilizando a amostra diretamente na coluna e D) processo de rota-evaporação das frações com presença de α , β -amirina	38
Figura 7 - Preparação das nanopartículas - método emulsificação e difusão do solvente, adaptado de fessi 1989.	44
Figura 8 - Obtenção da $\alpha - \beta$ amirina: (A) coluna cromatográfica; (B e C) pó branco; (D) CCD das frações agrupadas e E) $\alpha - \beta$ amirina.	50
Figura 9 - Processo de obtenção: (A) $\alpha - \beta$ amirina purificada e (B) CCD do padrão e da amostra. .	51
Figura 10 – Cromatogramas obtidos por CLAE mostrando o pico cromatográfico e o tempo de retenção do padrão de amirina e da amostra (mistura α e β -amirina isolada e purificada neste trabalho).	52
Figura 11 - Espectroscopia de Infravermelho transformada de Fourier (FT-IR) amostra e padrão da $\alpha - \beta$ amirina.....	53
Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H da amirina (CDCl_3 , 500 MHz) padrão e amostra.....	55
Figura 13 – Espectro de RMN ^{13}C da amirina (CDCl_3 , 500 MHz) padrão e amostra.	56
Figura 14 - A, B e C - Correspondem as medidas de difração de raios x (DRX) do Padrão e da amostra: A) medida completas (de $2\theta=2^\circ$ a $2\theta=100^\circ$); B e C ampliação em duas regiões de importância.....	58

Figura 15- Corresponde as medidas de difração de raios-x (DRX) da amirina e do padrão (entre $2\theta=2^\circ$ e $2\theta=30^\circ$) As barras verticais (em azul) correspondem as posições das reflexões de Bragg versus intensidade relativa dos picos proveniente de cristais de α -amirina identificado junto a base de dados ICDD, cartão PDF 00-029-1517. os picos indicados pelos triângulos amarelos correspondem a outros tipos de cristais, provavelmente da β -amirina (estruturas similares)	59
Figura 16 – Microscopia eletrônica de varredura da mistura de α , β - amirina isolada e purificada nopresente trabalho	60
Figura 17 - Gráfico de linearidade (80-800 $\mu\text{g/mL}$) para a quantificação α e β -amirina por CLAE ...	62
Figura 18- Resíduos observados versus resíduos preditos	63
Figura 19 - Efeito do pH no tamanho de partícula e no potencial zeta das nanopartículas.....	69
Figura 20 - Efeito da temperatura na faixa de 10 a 70 ° C no tamanho e índice de polidispersão de partícula das NPs.....	70
Figura 21 - Comportamento da distribuição do tamanho de partícula e potencial zeta de F5 NPs dia 0 e 15.....	72
Figura 22 - Comportamento da distribuição do tamanho de partícula e potencial zeta de F5 NPs dia 30 a 90.....	73
Figura 23- Atividade citotóxica das nanopartículas de amirina e da amirina pura	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes nanotransportadores, aplicações, vantagens e limitações.	24
Tabela 2 – Exemplos de nano medicamentos comercializados nos Estados Unidos da America	27
Tabela 3 – Gradiente de eluição do sistema cromatográfico.....	41
Tabela 4 – Formulação das nanopartículas contendo α – β amirina	43
Tabela 5 - Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C de amirina.....	57
Tabela 6 - curva de regressão linear de α e β - amirina.	63
Tabela 7 - Ensaio de repetibilidade	64
Tabela 8 - Avaliação da exatidão (QE = quantificação experimental; QT = quantificação teórica).....	65
Tabela 9 - Propriedades das cinco formulações das nanopartículas. Todos os ensaios foram realizados com n=3.....	66
Tabela 10 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e condutividade da formulação F5, durante três meses de estudo.	71
Tabela 11 - Atividades antioxidantes pelo sequestro de radical livre	74
Tabela 12 - Atividade inibitória das NPs contendo mistura isomérica α , β - amirina sobre as enzimas α -glicosidase e lipase.....	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AcOEt - Acetato de Etila

ALP - Fosfatase alcalina

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Aminotransferase

CCl₄ - Tetracloreto de Carbono

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

GABA-A - Ácido Gama-Aminobutírico

Hex - Hexano

IC₅₀ - Concentração de fármaco na qual 50% do seu alvo é inibido

IL 6 - Interleucinas -6

kN - kilonewton

LDH - Lactato Desidrogenase

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MRC-5 - Linhagem Fibroblástica de pulmão de feto humano

NCs – Nanocápsulas

NPs - Nanopartículas

NM – Nanômetro

PCL - Poli-ε-Caprolactona

PLA - Ácido Polilático

PLGA - Poli D, L - Ácido lático-co-Glicólico

PMMA - Poli Metil-Metacrilato

STZ - estreptozotocina

TNF α - Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 <i>Protium</i> (Burseraceae).....	18
2.2 Estrutura química dos triterpenos	18
2.3 Atividade Farmacológica da $\alpha - \beta$ amirina	19
2.4 Toxicidade da $\alpha - \beta$ amirina	22
2.5 Sistemas carreadores de fármacos	23
2.5.1 <i>Nanotecnologia e nanocarregadores</i>	23
2.5.2 <i>Nanopartículas poliméricas</i>	24
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 Materiais e Reagentes.....	35
4.2 Equipamentos	36
4.3 Procedimento Experimental	36
4.3.1 <i>Isolamento e Purificação da mistura isomérica ($\alpha - \beta$ amirina)</i>	37
4.4 Caracterização físico-química da $\alpha - \beta$ amirina obtida	39
4.4.1 <i>Espectroscopia de Infravermelho transformada de Fourier (FT-IR)</i>	39
4.4.2 <i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C)</i>	40
4.4.3 <i>Difração de raios-X (DRX)</i>	40
4.4.4 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	40

4.5 Validação do método analítico para quantificação da mistura isomérica de α - β amirina.	40
4.5.1 Condições cromatográficas (GUILHON-SIMPLICIO, 2017, após modificações).....	41
4.5.2 Validação do método analítico.....	41
4.6 Desenvolvimento das nanopartículas (NPs) contendo de α – β amirina	42
4.6.1 Método de preparação.....	42
4.7 Caracterização das NPs	44
4.7.1 Tamanho de partícula e Índice de polidispersão	44
4.7.2 Potencial zeta e condutividade	45
4.7.3 Eficiência de encapsulamento.....	45
4.7.4 Avaliação do efeito do pH.....	45
4.7.5 Efeito térmico	46
4.8 Avaliação da atividade biológica das nanopartículas	46
4.8.1 Atividade antioxidante: inibição do radical DPPH [•]	46
4.8.2 Atividade antioxidante: inibição do radical ABTS [•]	47
4.8.3 Atividade inibitória da lipase pancreática	47
4.8.4 Atividade inibitória da α -glicosidase	48
4.8.5 Ensaio de citotoxicidade.....	49
4.9 Análise Estatística	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Obtenção da mistura isomérica α – β amirina	50
5. 2 Caracterização físico-química da mistura isomérica α – β amirina.....	51
5.3 Validação do método analítico para quantificação da mistura isomérica de α - β amirina.	61
Precisão como repetibilidade.....	64
5.4 Obtenção das NPs – Seleção da melhor nanoformulação	66

5.5 Caracterização físico química das nanopartículas	68
<i>Avaliação da eficiência da encapsulação</i>	<i>68</i>
<i>Efeito do pH.....</i>	<i>68</i>
<i>Efeito térmico</i>	<i>69</i>
<i>Avaliação da estabilidade das nanopartículas.....</i>	<i>70</i>
5.6 Testes Biológicos.....	73
5.6.1 Atividade antioxidante: inibição dos radicais DPPH e ABTS	73
5.6.2 Atividade inibidora α -glicosidase de murino	74
5.6.3 Atividade inibitória da lipase	75
5.6.4 Citotoxicidade in vitro	76
6 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1 INTRODUÇÃO

Um dos gêneros da família *Burseraceae* mais disseminados pela floresta Amazônica é o *Protium*, cujas espécies produzem uma resina, normalmente utilizada pela indústria, principalmente, para a produção de verniz e repelente, podendo também ser usada com finalidade medicinal (ARAGÃO *et al.*, 2007; LANGENHEIM, 2003). Os principais constituintes desta resina pertencem a dois grupos essenciais, α amirina (ursano) e β amirina (oleano). A estes terpenos são atribuídas diversas ações terapêutica (SIANI *et al.*, 2012).

As amirinas são substâncias apolares, insolúveis em água, solúveis em solventes orgânicos como éter etílico, n-hexano, benzeno e clorofórmio (MAHATO; KUNDU, 1994). Alguns triterpenoides têm demonstrado atividades anti-inflamatória, anticancerígena, antileprótica, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antidiurética e giardicida. Também foi reportado que são inibidores da enzima acetilcolinesterase (AMARAL *et al.*, 2006; ARAGÃO *et al.*, 2006; AGRA *et al.*; 2007; MAHATO *et al.*, 1992; MAHATO, 1997). As α - β amirinas têm demonstrado atividade farmacológica no combate ao Diabetes Mellitus, à dislipidemia e também atividade hepatoprotetora em ratos.

Estudos das características físico-química das amirinas tem relatado sua alta lipofilicidade (Log P ~8) como um fator limitante para seu uso terapêutico. Apesar dos estudos mostrarem uma boa atividade farmacológica, sua baixa solubilidade aquosa têm se apresentado como inconveniente na administração por via oral (MALLAVADHANI *et al.*, 2004; FROTA, 2011). Assim, o desenvolvimento de um sistema nanoparticulado poderia ser uma alternativa para solucionar suas deficiências biofarmacêuticas e viabilizar seu uso na terapêutica.

Entre os diversos sistemas carreadores de fármacos, os sistemas nanoparticulados têm recebido especial atenção. Nanopartículas são sistemas carreadores que apresentam

dimensões inferiores a 1µm viabilizando atividades farmacológicas com concentrações muito baixas de princípio ativo (RODRIGUEZ *et al.*, 2017). Esses sistemas podem ser obtidos a partir de polímeros biodegradáveis que, devido as suas propriedades físico-químicas, têm despontado como uma opção tecnológica para a vetorização de agentes terapêuticos. O tamanho nanométrico, apresenta inúmeras vantagens para este tipo de sistema, destacando-se melhoria da solubilidade dos fármacos, aumento da estabilidade e, conseqüentemente, aumentando sua biodisponibilidade (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanopartículas têm especial utilidade para administração de fármacos pela via oral, protegendo os princípios ativos da ação degradante dos ácidos estomacais, levando-o intacto até o intestino e permitindo, também, a liberação controlada do fármaco.

Assim, o presente trabalho visa desenvolver um sistema polimérico nanoparticulado (nanopartícula) contendo a mistura α - β amirina, como uma provável alternativa para corrigir problemas relacionados a sua solubilidade e biodisponibilidade, possibilitando assim, sua administração por via oral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Protium* (Burseraceae)

Este gênero botânico é amplamente distribuído na América do Sul e no Brasil pode ser encontrado desde a região Nordeste até a Amazônica. Popularmente é conhecido como breu branco, almécega do Brasil, goma-limão, almesca, almíscar e manguinha. São árvores que produzem uma resina em seu tronco, bastante utilizada pela população local para o tratamento de diversas enfermidades (LIMA; PIRANI, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2000), sendo indicada como analgésico, cicatrizante, expectorante, dermatites e úlceras gástricas. Estas resinas são também utilizadas em outras aplicações, como na produção de verniz, em embarcações (calafetagem) e em incenso (práticas religiosas) (ARAGÃO *et al.*, 2007; LANGENHEIM, 2003).

Os terpenos são substâncias majoritárias presentes na resina de *Protium sp*, possivelmente, o grupo químico mais abundante neste gênero vegetal, sendo encontrado com frequência em plantas produtoras de óleos. Esta classe de substância tem sua estrutura baseada em diversas unidades de isopreno (metilbuta-1,3-dieno ou hemiterpeno com 5 átomos de carbono). Isto permite uma classificação racional dos terpenos, dependendo do número de isopentano incorporadas no esqueleto molecular básico (ARAGÃO *et al.*, 2007). Dessa forma, e seguindo essa classificação, o gênero *Protium sp* tem como componentes principais os triterpenos pentacíclicos conhecidos por α – β amirina e lupeol (ARAGÃO *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

2.2 Estrutura química dos triterpenos

As α - β amirina são triterpenos pentacíclicos (figura 1) que podem ser divididos em três grupos: ursano, oleano e lupeol, e apresentam diferença básica na estrutura química,

apenas no anel aromático “E”, assim, quando o anel está posicionado no C 20 e contém duas metilas é chamado de β – amirina (oleano) e quando contém uma metila no C 20 e outra no C 19 é chamado de α – amirina (ursano) ambos com estereoquímica na forma cis entre os anéis “D” e “E”. Por outro lado, o lupeol apresenta estereoquímica na forma trans relacionados aos anéis “D” e “E”, e ainda anel “E” composto por cinco carbonos (BARROS *et al.*, 2011; HALDAR *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2005).

Os triterpenos apresentam esqueleto similar aos esteroides, hipótese pela qual se atribui diversas ações farmacológicas (BARROS *et al.*, 2011). Estes isômeros apresentam-se na forma de pó branco, com ligeiro odor, baixa solubilidade em água, e boa solubilidade em solventes orgânicos (ARAGÃO *et al.*, 2015).

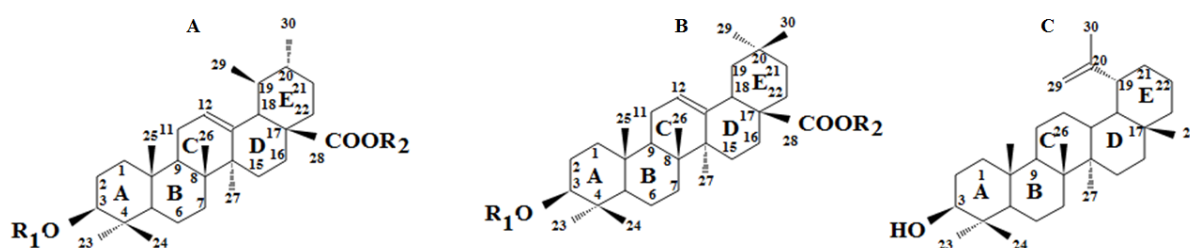


Figura 1 – Estrutura química dos triterpenos pentacíclicos, A) α amirina, B) β amirina e C) lupeol

2.3 Atividade Farmacológica da α – β amirina

Na literatura tem sido reportados estudos relatando os efeitos farmacológicos das amirinas extraídas da resina de *Protiumm sp.* Alguns deles têm relatado um grande potencial dessas substâncias nos tratamentos de diversas patologias (ARAGÃO *et al.*, 2007). Assim, tem sido evidenciado a utilidade das amirinas como protetoras da lesão hepática (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Também foi relatada as atividades ansiolítica e antidepressiva (ARAGÃO *et al.*, 2006), antinoceptiva (PINTO *et al.*, 2008; SOLDI *et al.*, 2008), anti-inflamatória (MELO *et al.*, 2011; THIRUPATHI *et al.* 2016), hipoglicemiante, hipolipemiante (SANTOS *et al.*,

2012), estimulante da proliferação de queratinócitos (BISKUP *et al.*, 2012), e anti convulsivante (ARAGÃO *et al.*, 2015). Outros efeitos citados foram para o combate da insônia (JEON *et al.*, 2015), como modulador do estresse oxidativo (SINGH., *et al.*, 2015), em doenças vasculares isquêmicas (ISHII., *et al.*, 2015), efeitos anti fibróticos, anti-apoptóticos (THIRUPATHI *et al.*, 2016), e para o tratamento da obesidade (CARVALHO *et al.*, 2016).

Oliveira *et al.*, (2005) demonstraram em um modelo de hepatotoxicidade em ratos, induzida por paracetamol, que a mistura dos isômeros $\alpha - \beta$ amirina produz um efeito protetor hepático dose dependente, ainda com diminuição dos marcadores séricos alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Nesse estudo, as amirinas produziram um elevado efeito anti-inflamatório, evitando a morte dos animais.

As amirinas também apresentaram atividade ansiolítica e antidepressiva em ratos usando o método do campo aberto e labirinto elevado (ARAGÃO *et al.*, 2006). Os resultados obtidos demonstraram interação da amirina com o recetor GABA-A, possivelmente, nos subtipos que provocam os efeitos dos benzo-diazepínicos, com atividade sedativas e hipnóticas. No teste de natação forçada foi possível evidenciar que o efeito antidepressivo decorre do aumento da atividade adrenérgica.

No modelo de dor visceral induzida com ácido acético por via intraperitoneal, o octonoato de $\alpha - \beta$ amirina mostrou uma ação cerca de 2.300 vezes maior que quando foi administrada por via oral. Esse resultado indica que provavelmente a lipofilia favorece a absorção da molécula o que poderia ser um fator determinante na potência destes triterpenos (SOLDI *et al.*, 2008). Um experimento de dor orofacial induzido por formalina e capsaïcina demonstrou que as amirinas não têm ação na dor neurogênica mediada por receptores opioides, mas sim na dor inflamatória mediada por cicloxigenases. Assim, as amirinas se apresentam como um fármaco promissor no tratamento da dor da cavidade oral e facial (PINTO *et al.*, 2008).

Santos *et al.*, (2012) investigaram o efeito hipoglicemiante causado pela mistura de α , β -amirina, em modelos de ratos com indução diabética pela Estreptozotocina (STZ). Neste estudo, os autores sustentam que a diminuição dos níveis glicêmicos pode ter sido causada pela redução da absorção de glicose entérica, inibição da glicogenólise e aumento de sua absorção pela musculatura e tecido adiposo. A ação anti-dislipidêmica poderia estar associada à melhora da sensibilidade da insulina, pois esta não regula só o metabolismo dos carboidratos, mas interfere também no metabolismo dos lipídeos e lipoproteínas, bem como triglicerídeos.

Em outro estudo conduzido por Aragão (2015), utilizando um modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol, foi verificado que a amirina produziu efeitos anticonvulsivantes significantes e que a indução convulsiva foi mediada por GABA, sustentando a hipótese que a amirina pode está associada com os receptores gabaérgicos. As amirinas, possivelmente, produzem um efeito neuroprotetor ao estimular a produção de taurina (um aminoácido com diversas funções fisiológicas ao nível cerebral). Outro estudo utilizando um modelo de sono induzido por pentobarbital foi sugerido que a β amirina age ativando o neurotransmissor gabaérgico resultando em melhora no estado geral do sono (JEON *et al.*, 2015).

O tetracloreto de carbono (CCl_4) é um potente agente hepatotóxico, reage com o Citocromo P-450, causando desalogenação, formando triclorometila que é altamente reativo e este pode se ligar as proteínas e os lipídeos, levando a peroxidação e a patogênese da doença. O uso de amirina diminuiu a elevação das lipoxigenases demonstrando efeito antioxidante e de eliminação de radicais livres, com isso reestabelece as biomembranas do parênquima hepático, neste sentido, as amirinas agem de forma curativa como modulador hepático (SINGH *et al.*, 2015).

A β amirina mostrou boa atividade anti-angiogênica, em doenças vasculares isquêmicas sugerindo que poderia ter utilidade nesses tipos de doenças (Ishii *et al.*, 2015).

Em um estudo realizado para verificar os efeitos anti-fibróticos, anti-apoptóticos em modelos de ratos intoxicados com dimetilnitrosamina, a utilização de β amirina mostrou diminuição das enzimas plasmáticas AST, ALT, ALP e LDH em relação ao valor normal, indicando estabilidade da membrana do hepatócito e, conseqüentemente, reparo da lesão hepática causada pela dimetilnitrosamina. A β amirina também mostrou atividade na regulação dos marcadores apoptóticos diminuindo significativamente as caspases 3 que é um marcador de fibrose hepática (THIRUPATHI *et al.*, 2016).

A obesidade tem sido um problema de dimensões mundiais e vários estudos têm sido realizados buscando soluções terapêuticas para esse problema. Nesse contexto destaca-se o trabalho executado por Carvalho *et al.*,(2016) que utilizando dieta rica em gorduras para camundongos avaliou o efeito anti-obesidade das amirinas. Os resultados mostraram que estes triterpenos reduzem os acúmulos de gordura induzida pela dieta no ganho de peso, adiposidade visceral e a esteatose hepática. O mecanismo de ação proposto pelos autores inclui inibição das amilases e lípases no sistema digestivo, melhora significativa na resistência à leptina (liberada da célula gordurosa em resposta ao aumento da massa gordurosa) e insulina, mantendo-a bem próximo dos parâmetros orgânicos.

2.4 Toxicidade da $\alpha - \beta$ amirina

Segundo Oliveira *et al.*,(2005), a resina de *Protium* e a mistura isomérica não demonstraram potencialidade tóxica quando administradas em camundongos por via intraperitoneal. Em um teste de toxicidade aguda realizado pelos autores foi administrado em ratos a mistura isomérica de $\alpha - \beta$ amirina por via oral, em dose de 5g/kg e por via intraperitoneal até 2g/kg sendo observado nenhuma intoxicação dos animais e nem óbito.

Ishii *et al.* (2015) incubou células endoteliais de veia umbilical humana cultivadas em

diferentes concentrações de β amirina em um intervalo de 24 a 72h. Não foi observado efeito citotóxico na viabilidade celular.

Uma outra pesquisa realizada por Thirupathi *et al.*,(2016), onde os ratos foram tratados com β amirina em doses 10 e 50 mg/kg durante 4 semanas não foi observado sinais de toxicidade, mas quando administrado doses superiores a 30mg/kg os animais apresentaram tremor, ataxia, aumento da respiração e letargia.

2.5 Sistemas carreadores de fármacos

2.5.1 Nanotecnologia e nanocarregadores

A nanotecnologia estuda as aplicações da tecnologia dos objetos e dispositivos que possuam pelos menos uma de suas dimensões físicas na escala nanométrica, ou seja, uma parte em 1 milhão, um nanômetro (1 nm) que corresponde a bilionésima parte do metro (PIMENTA; MELO, 2004). Pesquisas recentes tem-se desenvolvido com o objetivo de obter novos produtos capazes de oferecer vantagens, como: melhor solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade. Essas vantagens são atribuídas ao tamanho nanométrico, que pode produzir efeitos superiores as formulações, quando comparado ao fármaco usado na forma tradicional (DIMER, *et al.*, 2013).

Os materiais utilizados na produção dos sistemas nanométricos, principalmente quando carreadores de fármacos, obedece um critério rigoroso de qualidade e devem ser suscetível a biocompatibilidade, capacidade para funcionalização de superfície, conjugação, complexação e encapsulamento. Nesse contexto, os agentes terapêuticos podem ser encapsulados, ligados covalentemente, adsorvidos, solubilizados, retidos ou ainda conjugados as nanopartículas (MOGHIMI *et al.*, 2005).

Os nanocarreadores são estruturas capazes de transportar o fármaco partindo do local da administração até o ponto da efetiva ação terapêutica ou diagnóstica e, para alcançar este objetivo, as principais nanoestruturas usadas são: as nanopartículas lipídicas, as micelas, os lipossomas e as nanopartículas poliméricas. A tabela 1 mostra os diferentes nanotransportadores, aplicações, vantagens e limitações (ETHERIDGE *et al.*, 2013).

NT	Vantagens	Desvantagens	SA	Aplicação	Referência
NP	Capacidade de encapsular diferentes tipos de substâncias / Proteção da substância ativa	Citotoxicidade de alguns polímeros	Griseofulvina	Antifúngica	ZILI <i>et al.</i> , 2005
			Tretinoína	Tratamento Dérmico	OURIQUE <i>et al.</i> , 2008
			β -caroteno	Antioxidante	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2008
			Docetaxel	Anti-tumoral	TORRECILLA <i>et al.</i> , 2013
LIP	Baixa citotoxicidade / Biocompatibilidade / Encapsulação de SA hidrofílicas e hidrofóbicas/ Não imunogênicos	Estabilidade	2-Metoxiestradiol	Anti-tumoral	DU <i>et al.</i> , 2010
			5-Fluoruracilo/ Metotrexano	Anti-tumoral	CONCEIÇÃO <i>et al.</i> , 2009
NLC	Melhor capacidade de encapsulamento / Eficácia na incorporação da SA	Não referidas	Diclofenaco de sódio	Anti inflamatório	LIMA & OLIVEIRA, 2002
			Luteína	Dérmica	MITRI <i>et al.</i> , 2011
			ATRA	Anti-tumoral	CHINSRIWONGKUL <i>et al.</i> , 2011
			Vimopcetina	Tratamento neurológico	ZHUANG <i>et al.</i> , 2010

Tabela 1 – Diferentes nanotransportadores, aplicações, vantagens e limitações.

Legenda: NT- Nanotransportadores; NP- Nanopartículas Poliméricas (Nanocápsulas/Nanoesferas); Lip- Lipossomas; NLC - Carregadores lipídicos nanoestruturados. ATRA - Ácido trans retinóico

Fonte: Retirado de DELGADO (2013)

2.5.2 Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas são estruturas coloidais que têm em sua composição polímeros de origens naturais, sintéticos ou semissintéticos e são biodegradáveis, estas estruturas poliméricas têm ampla utilização para liberação de fármacos podendo direcionar o agente terapêutico para locais específicos ou mesmo controlar sua cedência (RAWAT *et al.*, 2006). As nanopartículas podem ser divididas em duas categorias: nanoesferas e nanocápsulas e esta divisão depende da composição e organização estrutural (figura 2).

As nanocápsulas possuem um sistema tipo reservatório com núcleo líquido, que pode ser óleo ou água envolvido pelo material sólido (invólucro polimérico). Nesta situação, o fármaco pode estar dissolvido no núcleo e/ou incluído ou adsorvido na parede polimérica. Já as nanoesferas são estruturas formadas por matrizes poliméricas que, diferentemente das nanocápsulas o núcleo não se apresenta diferenciado (isento de óleo). Os fármacos neste tipo de estrutura estão distribuídos ou encapsulados de forma homogênea na matriz polimérica, e ainda, podem estar adsorvidos na superfície da nanoesferas. O processo de liberação do fármaco a partir deste tipo de nanoestrutura geralmente ocorre por difusão (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007; LETCHFORD; BURT, 2007; PARVEEN; *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2012; STEICHEN *et al.*, 2013).

A liberação dos fármacos presentes nas estruturas poliméricas para os líquidos biológicos é dependente: da dissolução e desintegração do polímero, da nanoestrutura e, também, da ocorrência da difusão destes mesmos líquidos na membrana polimérica. As características do fármaco, bem como as do polímero (biodegradação, distribuição de massa molecular e hidrofobicidade) exercem forte influência na liberação do princípio ativo e, conseqüentemente, uma elevada importância na obtenção de estruturas nanoparticuladas com finalidade de liberação controlada do fármaco (RIEUX *et al.*, 2006; TORCHILIN, 2006).

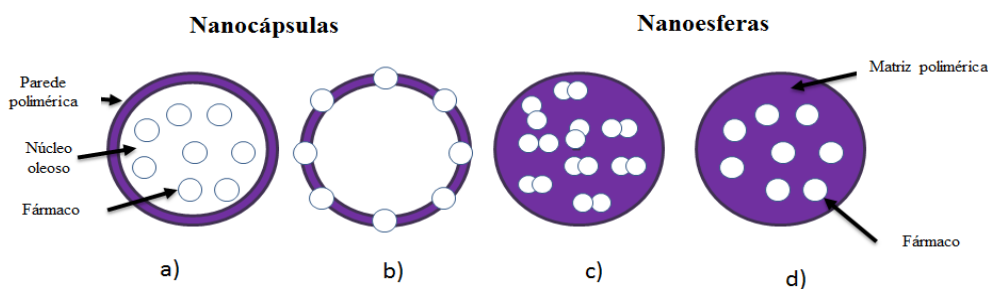


Figura 2 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas
 Legenda: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.
 Fonte: (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)

Estas estruturas têm sido desenvolvidas com finalidade de aplicações na terapêutica para administração de fármacos por diversas vias como oral, parenteral e oftalmológica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As pesquisas focam seus esforços, principalmente, na via de administração oral com objetivo de corrigir ou atenuar os efeitos indesejáveis como: 1) diminuição dos efeitos colaterais de alguns fármacos, exemplo, dos anti-inflamatórios não esteroidais (irritação na mucosa gástrica); 2) proteção de fármacos sensíveis aos líquidos entéricos (peptídeos, proteínas e hormônios) preservando sua biodisponibilidade. A oftalmologia, também, desperta grande interesse por estas formulações visando uma liberação controlada, redução de efeitos colaterais e melhora da absorção sistêmica quando da administração destas formulações pela via oftálmica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Segundo Guterres *et al.*, (2007), as nanocápsulas modificam a atividade terapêutica do fármaco através da alteração nas características físico-químicas das preparações, pela capacidade de manter o fármaco por mais tempo no local da aplicação, produzindo assim uma ação mais prolongada, além de se comportar como reservatório para fármacos lipófilo o que é útil no tratamento de enfermidades da pele, por exemplo, através da administração pela via cutânea.

Os sistemas nanoparticulados apresentam-se como uma estratégia consistente e promissora para indústria quando comparados aos sistemas convencionais são capazes de melhorar a biodisponibilidade, solubilidade e permeabilidade de vários fármacos facilitando assim, administração por via oral de algumas moléculas antes impossíveis de serem usadas por esta via, outro ganho com as nanopartículas é a redução da frequência de doses diárias e como consequência uma melhor adesão ao tratamento por parte do cliente. As nanopartículas minimizam problemas relacionados aos fármacos como: baixa solubilidade em água,

permeabilidade e menor biodisponibilidade e com isso conserva a estabilidade e mantém a estrutura da forma farmacêutica (KUMARI *et al*, 2010).

No mercado é possível encontrar uma diversidade de polímeros com diferentes características e funcionalidades, mas aqueles biodegradáveis são os de primeira escolha quando se quer desenvolver nanopartículas, devido sua fácil eliminação pelas vias de excreção do organismo e, também, por apresentar um maior controle e estabilidade da liberação dos fármacos, pois dependendo da escolha da formulação a degradação pode ser precoce ou perdurar por alguns dias. Os polímeros biodegradáveis podem ser de origem natural (albumina, celulose, alginato, colágeno e quitosano), ou ainda, sintética (ácido polilático (PLA), poli ϵ -caprolactona (PCL) e poli metil-metacrilato (PMMA), são alguns exemplos) (RIEUX *et al.*, 2006).

A tabela 2 ilustra alguns medicamentos obtidos através da nanotecnologia e conhecidos como “nanomedicamento”, disponíveis no mercado dos Estados Unidos, com aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA), de acordo com um levantamento realizado pela Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial em 2013.

Nano medicamento	Fármaco/carreador	Via de administração	Empresa	Indicação	Ano
Abelcet	Anfotericina B/ complexo lipídico	Intravenosa	Enzon	Infecções fúngicas	2004
Abraxane	Paclitaxel/nanopartículas de albumina (~130 nm)	Intravenosa	Abraxis Bio Science AstraZeneca	Câncer de mama metastático	2005
Ambisome	Anfotericina B/lipossomas	Intravenosa	Gilead (Foster City, CA, USA), Fujisawa Japan)	Infecções fúngicas	1995
Rapamune	Sirolimus/nanocristais	Comprimidos	Elan Drug Delivery, Wyeth Pharmaceutical	Imunossupressor	1999
Triglide	Fenofibrato/nanocristais	Comprimidos	SkyePharma, First Horizon Pharmaceutical	Lipidemias	2005

Tabela 2 – Exemplos de nano medicamentos comercializados nos Estados Unidos da America
Fonte: (BRASIL, 2013).

Considerando a nanotecnologia como recurso farmacotécnico para obtenção de medicamentos, as propriedades dos princípios ativos bem como dos polímeros e demais excipientes que compõem a formulação exercem influência fundamental nos processos de liberação do(s) princípio(s) ativo(s), bem como para atingir o sítio alvo de atividade farmacológica. Geralmente, os polímeros de origem natural apresentam características de liberação mais intensa por serem biodegradáveis por natureza; em contrapartida os sintéticos possuem a capacidade de prolongar um pouco mais a liberação dos agentes terapêuticos, podendo se alongar a dias e até mesmo semanas, o que é ideal quando se pretende desenvolver um medicamento de liberação sustentada (RIEUX *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; TORCHILIN, 2006).

2.5.2.1 Métodos de obtenção

Há relatos na literatura de diversos métodos de preparação de nanopartículas poliméricas, os quais em linhas gerais são divididos em dois grupos: os baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilatos de alquila) e os fundamentados na precipitação de polímeros pré-formados, cujos principais são os, poli ácido lático (PLA), poli ácido-co-ácido glicólico (PLGA), poli ϵ caprolactona (PCL), kollicoat, eudragit e, também, os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico (GUTERRES *et al.*; 2007; DASHEVSKY *et al.*, 2004; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Dentre todas as técnicas descritas na literatura para obtenção de nanopartículas, destaca-se o método proposto por Fessi *et al.* (1989) baseado na deposição de um polímero pré-formado e biodegradável, também conhecido como nanoprecipitação, é um método que elimina a presença indesejável de monômeros e oligômeros residuais, que são produzidos pelo processo de polimerização *in situ* e, também, evita a possibilidade de reação cruzada entre o monômero e o agente terapêutico. Esta técnica consiste na dissolução do polímero em um

solvente orgânico (acetona ou etanol, por exemplo) associado com o óleo (quando presente, e necessário), o tensoativo lipofílico e o agente terapêutico. Esta fase, chamada de fase oleosa, é adicionada lentamente sobre a fase aquosa, composta de água e tensoativo hidrofílico. O resultado desta mistura é a formação espontaneamente, de nanocápsulas (quando há presença de óleo) e ou de nanoesfera (quando há ausência de óleo), apresentando tamanhos que variam, geralmente, de 200 a 500 nm (figura 3).

Características importantes das nanoestruturas obtidas através desta técnica é a estabilidade, a elevada taxa de encapsulação em especial para agentes terapêuticos lipofílicos (SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003; GUTERRES, *et al.*, 2007;).

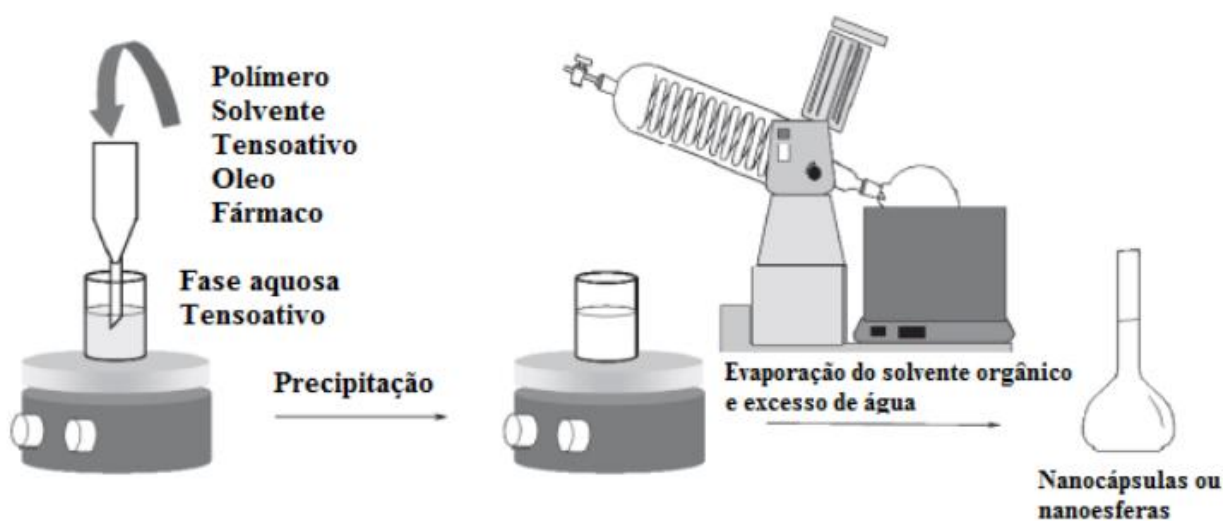


Figura 3 - Representação esquemática de preparação de nanopartículas obtidas pelo método deposição do polímero pré-formado.

Fonte: retirado de GUTERRES *et al.*, 2007.

O método de nanoprecipitação seguido de evaporação do solvente é um processo relativamente simples. A fase orgânica é constituída de um polímero dissolvido num solvente orgânico, como exemplo acetona ou álcool etílico, onde estará dissolvido o fármaco. O uso de um tensoativo inserido na fase orgânica como por exemplo, fosfolipídio é adequado para prevenir a coalescência das nano gotículas. A fase aquosa é composta por água e um tensoativo do tipo o/a, por exemplo, tween 80[®]. A fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa,

sobre agitação constante. Assim ocorre uma emulsificação espontânea formando um sistema opalescente, devido a miscibilidade das fases. O solvente orgânico é retirado sob pressão reduzida para a formação das nanopartículas (QUINTANAR-GUERRERO, *et al.*, 1998; LEGRAND, *et al.*, 2007; MOHAMMADI, *et al.*, 2010).

Para o desenvolvimento de nanocápsulas, a escolha do óleo usado na fase orgânica deve obedecer os seguintes critérios: ausência de toxicidade, compatibilidade com o agente terapêutico, miscibilidade no solvente orgânico e ausência de risco de degradação do polímero (BLOUZA *et al.*, 2006). Dessa forma, o método de nanoprecipitação atende de preferência ao encapsulamento de substância lipofílicas por conta da miscibilidade do solvente com a fase aquosa, sendo pouco eficiente para fármacos hidrossolúveis. Esquematicamente, a figura 4 mostra o processo de preparação de nanopartículas poliméricas com base no método de deposição interfacial do polímero pré-formado (REIS *et al.*, 2006).

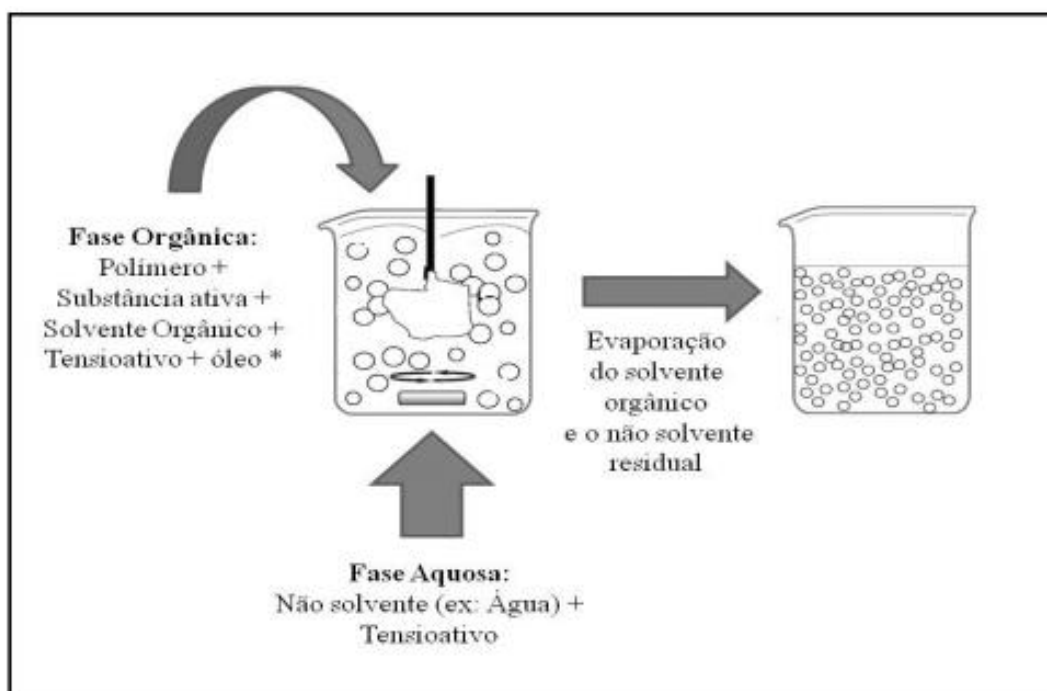


Figura 4 - Representação do método de Nanoprecipitação

Legenda: * O óleo é usado apenas quando da formação de nanocápsulas, na formação de nanoesferas este componente está ausente

Fonte: retirado de REIS *et al.*, 2006

Para obtenção de nanocápsulas pelo método da deposição interfacial de polímeros pré-formados, os componentes indispensáveis são: o polímero, o óleo e os tensoativos (ANGELI, 2007; FESSI *et al.*, 1989), sendo o componente oleoso imprescindível pois, é nele que se dá a solubilização da substância que se deseja encapsular, e a lipossolubilidade do agente terapêutico é um fator preponderante para encapsulação. Os compostos oleosos mais usados são os ésteres etílicos de ácidos graxos saturados, misturas de triglicerídeos de ácidos graxos saturados de cadeia longa e Miglyol 80[®] e 812[®] (FESSI *et al.*, 1989). Os tensoativos, também, são componentes importantes para estas preparações, sendo necessário, geralmente, um de elevado Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (exemplo Symperonic PEF 80[®] ou Tween 80[®]) e outro de baixo valor de Equilíbrio Hidrofilo Lipofilo, exemplo monoestearato de sorbitan (Epikuron 170[®]). Quando o solvente é evaporado, os tensoativos agem aumentando a viscosidade do sistema, e conseqüentemente aumenta a estabilidade e evita a coalescência e a agregação entre as partículas. (FESSI *et al.*, 1989; PUISIEUX., *et al* 1994).

A encapsulação de fármacos ou de agentes cosméticos utilizando polímeros representa uma opção de interesse para mascarar as propriedades físico-químicas intrínsecas de várias substâncias, melhorar a interação com membranas biológicas e melhorar sua absorção, penetração cutânea ou fixar o produto mais tempo no local da aplicação (GUTERRES *et al*, 2007).

As formas farmacêuticas de liberação prolongada devem possuir características de cedência específicas para as condições do sistema digestório. Os polímeros como Eudragit®, acetato de polivinilo, Kollicoat MAE etc, produzem liberação do fármaco que depende do pH. Muitos fármacos são ionizáveis e por isso, a liberação do fármaco ocorre dependendo do pH do meio. Os fármacos com características básicas que tendem a solubilizar em pH baixo, podem ser liberados ao nível estomacal (DASHEVSKY *et al*, 2004). Estudos toxicológicos

asseguram que estes polímeros quando degradados produzem monômeros biocompatíveis e não oferecem risco para a saúde, pois a via de metabolização está bem estabelecida (MELO *et al.*, 2012).

2.5.2.2 Caracterização das suspensões de NPs

A caracterização das nanopartículas podem ser realizada pela união de várias técnicas tais como: a análise morfológica, distribuição de tamanho, determinação do potencial zeta e do pH, bem como a determinação da concentração de agente terapêutico ligado às nanoestruturas (taxa de encapsulamento) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) é bastante utilizada na busca de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas. A MET possibilita também diferenciar estas nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas), podendo, inclusive, determinar a espessura da parede das nanocápsulas. Outra técnica é a criofratura que também têm sido usada no auxílio da análise morfológica destas nanoestruturas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; DEDAVID, 2007; PORTO, 2015).

A avaliação quanto ao tamanho e distribuição do tamanho da partícula da formulação é de fundamental importância, pois um dos principais problemas na armazenagem é a sedimentação das nanopartículas que leva agregação e perda da estabilidade (ANGELI, 2007). Outro ensaio relevante é a medição do potencial zeta que fornece informações importantíssima para caracterizar a superfície das nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O potencial elétrico no plano de corte, pode ser definido como a distância da superfície da partícula a um ponto no fluido da suspensão, os íons de carga elétrica diferente permanece fortemente unidos a partícula quando esta se move no campo elétrico. É possível calcular esta mobilidade através da corrida eletroforética das partículas num campo elétrico

(MALVERN, 2014). O potencial zeta reflete uma medição indireta da estabilidade física das partículas, quanto maior o valor modular do potencia zeta, maior a estabilidade dos sistemas nanoparticulados. As partículas que apresentarem um potencial zeta elevado (positivo ou negativo), repelem-se com muita força, evitando a agregação e coalescência (TAMJIDI, *et al.* 2013).

O monitoramento do pH de uma suspensão em função do tempo, oferece informações relevantes pois, uma variação neste parâmetro pode indicar degradação do polímero e alteração da estabilidade da suspensão, por tanto quando o pH diminui num período de tempo bem estreito, pode ser devido a ionização de grupos carboxílicos contidos no polímero como também à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do poliéster (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 1995).

Mensurar o fármaco presente em uma nanopartícula é essencial. Não é uma tarefa fácil pois tem dificuldade em separar principio ativo livre da aquele carregado no interior da nanopartícula. A técnica amplamente utilizada é a ultracentrifugação. O fármaco livre é medido no sobrenadante e o fármaco total é determinado após completa dissolução das nanopartículas em solvente adequado. A quantidade do fármaco encapsulado é mensurado em função da diferença entre o total do fármaco presente na suspensão e a quantidade de fármaco livre na suspensão, sendo determinada após a separação das fases por ultrafiltração/centrifugação (ANGELI, 2007; FESSI *et al.*, 1989).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar a atividade biológica *in vitro* de nanopartículas poliméricas carregadas com a mistura isomérica α - β amirina.

3.2 Objetivos Específicos

1. Obter e caracterizar físico-quimicamente uma mistura isomérica de α - β amirina;
2. Validar método analítico por CLAE para quantificação da mistura isomérica de α - β amirina.
3. Desenvolver uma suspensão de nanopartículas polimérica contendo a mistura isomérica de α - β amirina;
4. Avaliar a eficiência de encapsulação de mistura isomérica de α - β amirina na suspensão de nanopartículas;
5. Avaliar a estabilidade, em prateleira, durante 90 dias da suspensão de nanopartículas obtidas;
6. Avaliar a atividade antioxidante da suspensão de nanopartículas;
7. Avaliar a atividade inibitória de alfa-glicosidase e lipase da suspensão de nanopartículas;
8. Avaliar a citotoxicidade relativa da suspensão de nanopartículas em fibroblasto não neoplásico de pulmão humano.