

DESENVOLVIMENTO, SÍNTESE, E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS REVESTIDAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO CONTENDO *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. GRAY

Fernanda Arriel Pedrozo Rezende (IC) e Marcelo Guimarães (Orientador)

Apoio: PIBIC Mackenzie

RESUMO

As nanopartículas são classificadas como qualquer material ou partícula coloidal, farmacologicamente ativo ou inerte, com a capacidade de veicular agentes terapêuticos, que se encontrem no intervalo nanométrico de 10 a 1000 nm (1 μm), as nanopartículas têm sido utilizadas no setor farmacêutico para várias aplicações, obtendo um significativo avanço na liberação de fármacos em sítios específicos. Observa-se uma notável melhora na solubilidade e estabilidade dos princípios ativos incorporados, assim como da velocidade de distribuição. Este trabalho apresenta o processo de desenvolvimento de nanopartículas poliméricas revestidas com ácido hialurônico, contendo o extrato alcóolico da planta *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. O objetivo da pesquisa focou o oferecimento de subsídios nanotecnológicos para aplicações futuras, viabilizando a melhoria da estabilidade do princípio ativo e possivelmente da sua ação terapêutica. A síntese das nanopartículas ocorreu através do processo de polimerização por emulsão, onde foram adicionados a uma solução aquosa de HCl 0,01M (pH 2,5), o monômero *n*-butil-cianoacrilato (BCA), juntamente com Dextran®, com posterior incorporação do extrato vegetal e neutralização do meio. O nanossistema obtido foi avaliado por diferentes métodos físico-químicos que incluíram a avaliação da estabilidade física das nanopartículas pela Espectroscopia (IV), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Os resultados das análises a que as amostras foram submetidas apresentam indicativos que sugerem sucesso na obtenção de um nanossistema de liberação de fármacos estável e inovador, bem como uma efetividade do ácido hialurônico em relação ao objetivo proposto, evidenciada nos resultados obtidos pela Espectroscopia (IV), pela MEV, DSC e também pela TG.

Palavras-chave: Nanopartículas poliméricas. Ácido hialurônico. *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray.

ABSTRACT

Nanoparticles are classified as any colloidal material or particle, pharmacologically active or inert, with the ability to deliver therapeutic agents, that meets in the nanometer range from 10 to 1000 nm (1µm). Nanoparticles have been used in the pharmaceutical industry for various applications, obtaining a significant advance in the drugs release at specific places. A remarkable improvement in the solubility and stability of the incorporated active principles, as well as the distribution speed, can be observed. This work presents the process of polymeric development nanoparticles coated with hyaluronic acid, containing the alcoholic extract of the plant *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. The goal of the research focused on the provision of nanotechnology subsidies for future applications, making possible the improvement of the stability of the active principle and possibly its therapeutic action. The synthesis of the nanoparticles occurred through the emulsion polymerization process, in which n-butyl-cyanoacrylate monomer (BCA), together with Dextran®, was added to an aqueous solution of HCl 0,01M (pH 2,5), incorporation of the plant extract and neutralization of the reactional media. The obtained nanosystem was evaluated by different physicochemical methods that included the evaluation of the physical stability of the nanoparticles by Spectroscopy (IV), Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermogravimetry (TG) and Differential Exploration Calorimetry (DSC). The results of the analyzes to which the samples were subjected present indicatives that suggest success in obtaining a stable and innovative drug delivery nanosystem , as well as an effectiveness of the hyaluronic acid in relation to the proposed objective, evidenced in the results obtained by Spectroscopy (IV), by SEM, DSC and also TG.

Keywords: Polymer nanoparticles. Hyaluronic acid. *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray.

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência que tem se desenvolvido sob vários domínios científicos. Dentre um amplo espectro de estudos, é possível citar inúmeras pesquisas nas áreas de Farmácia, Biologia, Química e Engenharia, entre outras.

Na área das Ciências Farmacêuticas, são vários os estudos realizados por diferentes grupos de investigação em todo o mundo, tendo como um dos objetivos o desenvolvimento de sistemas para o encapsulamento de fármacos, no intuito de permitir o direcionamento e controlar a liberação de princípios ativos. Atualmente são desenvolvidos sistemas à escala nanométrica e micrométrica, que têm contribuído para a melhoria da biodisponibilidade de alguns fármacos, com a redução das doses terapêuticas e toxicidade nos respectivos tratamentos à que são submetidos os pacientes. As nanopartículas são sistemas desenvolvidos com intuito de funcionarem como ferramenta de diagnóstico e terapia, que se realiza em escala nanométrica (10-1000 nm), além de apresentarem características físico-químicas que permitem serem aplicadas em diferentes áreas. São classificadas em diferentes categorias: nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), vetores lipídicos nanoestruturados, conjugados fármaco-lipídico, nanoesferas, nanocápsulas, nanoemulsões, lipossomas, complexos de inclusão, quantum dots e nanopartículas magnéticas (FRANCO, 2013).

Nos últimos anos verificou-se uma grande quantidade de pesquisas de vetores que consigam controlar a liberação de fármacos em sítios específicos de ação, melhorando tanto a velocidade de distribuição como o controle dessa liberação. De acordo com Akagi e colaboradores (2007), os principais sistemas visados com estas finalidades têm sido as nanopartículas, as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e etossomas).

Sabe-se que as nanoestruturas podem melhorar a solubilidade e a estabilidade dos princípios ativos, aumentar a eficácia de uma formulação e combinar com sucesso substâncias ativas de diferentes graus de hidrofília/lipofília. Esta tecnologia pode, ainda, ser empregada para se conseguir a distribuição de uma substância para tecidos ou órgãos específicos (SINTOV & SHAPIRO, 2004; CUNHA *et al.*, 2003).

1.1 JUSTIFICATIVA

Os processos nanotecnológicos envolvendo plantas têm sido alvos de muitas pesquisas, resultando no desenvolvimento de muitos sistemas de liberação inovadores, incluindo as nanopartículas poliméricas.

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos e que possuem diâmetro inferior a 1µm. Esses sistemas são desenvolvidos e planejados visando diversas aplicações terapêuticas (SCHAFFAZICK et al., 2003). Tais nanopartículas poliméricas são materiais feitos de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis e também representam uma opção para liberação controlada dos fármacos. São sistemas coloidais que funcionam como vetores para controlar a liberação dos princípios ativos, direcionando-o para localizações específicas.

Comparadas com formulações convencionais, as nanopartículas poliméricas são capazes de aumentar a solubilidade dos constituintes, reduzir a dose terapêutica e melhorar a absorção dos componentes ativos. Além disso, as nanopartículas, quando circulam na corrente sanguínea, possuem as vantagens de serem estáveis, não tóxicas, não trombogênicas, não imunogênicas, não inflamatórias (BONIFÁCIO et al., 2014).

Considerando tais pontos, presume-se que a potencialização da ação dos extratos de plantas medicinais é possível através da combinação com um sistema de nanoestruturas, reduzindo assim a administração do número e quantidade de doses dos extratos vegetais que atuam como princípios ativos. As nanopartículas aperfeiçoariam o processo de absorção, reduzindo ou até mesmo eliminando possíveis efeitos colaterais. Os nanossistemas levam a substância ativa, em concentração suficiente, atingindo o local desejado durante todo o processo do tratamento.

Com o objetivo de aumentar a estabilidade das nanopartículas, utiliza-se nesta pesquisa, a alternativa do revestimento com ácido hialurônico¹, e, conseqüentemente, aumenta-se a eficácia do complexo que é veiculado por meio deste nanossistema.

1.2 OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa visa o desenvolvimento, síntese e caracterização de nanopartículas poliméricas a partir do extrato alcoólico da planta *Thitonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray², com utilização do ácido hialurônico como meio de revestimento.

¹ [...] o ácido hialurônico, um polissacarídeo de estrutura linear carregado negativamente e que consiste em duas unidades alternadas de D-ácido glicurônico e N-acetil-D-glicosamina. Devido ao fato de ser biocompatível e apresentar as características citadas, o ácido hialurônico é considerado um bom agente de revestimento de nanopartículas, além de contribuir para a estabilidade desses nanocarreadores (HE, et al. 2009; YENICE, et al., 2008 apud. GUIMARÃES, 2015)

² A *Thitonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray é originária da América Central. É uma planta herbácea pertencente à família *Asteraceae*, conhecida popularmente como margaridão, girassol-mexicano. É muito utilizada como cerca viva para paisagismo devido à suas belas flores e exuberância peculiar. Possui algumas propriedades farmacológicas que podem ser utilizadas para tratar a malária, além de ser antiinflamatória, antidiarreica, antiamebíca, antimicrobiana e atividade espasmolítica [grifo meu] (IX CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 2015)

Em termos mais específicos, trata-se de uma pesquisa, que tem como objetivo propor e testar o melhoramento da estabilidade físico-química do nanossistema a partir do revestimento proposto. De maneira prática, o trabalho visa oferecer subsídios nanotecnológicos relacionados à efetividade das possíveis aplicações, que tem como pano de fundo geral a garantia dos benefícios que geralmente se buscam na utilização de um tratamento veicular do princípio ativo por meio de nanopartículas poliméricas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

São vários os métodos conhecidos empregados para a síntese das nanopartículas poliméricas, sendo os principais: polimerização *in situ* (com monômeros dispersos) e método de precipitação dos polímeros pré-formados. Independentemente do método escolhido, os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas, que podem também ser chamadas de microemulsões. “A microemulsão é uma emulsão transparente, onde um óleo é disperso em um veículo aquoso ou vice-versa e que contém um tensoativo, com ou sem a presença de um co-tensoativo apropriado. Isso gera um sistema termodinamicamente estável” (BONIFÁCIO *et al.*, 2014).

A ação pretendida, o tipo de fármaco que se pretende veicular, e a via de administração, são importantes para definir a utilização de um sistema de nanopartículas. Estes fatores podem influenciar na escolha de excipientes adequados para veicular um fármaco e, por sua vez, o fármaco vai afetar as características físicas do sistema e a sua estabilidade. O desenvolvimento de sistemas para veiculação de fármacos envolve um planejamento extensivo e muitos estudos de estabilidade e compatibilidade, assim como estudos do perfil farmacocinético (BAE e LEE, 2012).

A síntese de nanopartículas biodegradáveis baseadas em reações de polimerização utiliza monômeros de alquil cianoacrilato formando, dessa maneira, os polímeros denominados polialquilcianoacrilatos (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

A polimerização dos alquil cianoacrilatos é baseada em três fases, tendo início pela *nucleação* na qual o monômero é ativado e assim gera os carbânions reativos, que dão prosseguimento a segunda fase, que é a *propagação*, na qual, após a formação de oligômeros, continua com crescimento e aumento da sua massa molar. A última fase ocorre quando uma parte reativa da molécula não consegue reagir com outra, ou quando é adicionado um inibidor de reação, neste caso, um ácido, que neutraliza a carga negativa do carbânion reativo (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

Existem alguns métodos para o preparo de nanopartículas poliméricas baseados na polimerização *in situ* de monômeros (cianoacrilatos de alquila), precipitação de polímeros

pré-formados, como poli ácidos (ácido láctico, ácido láctico-co-glicólico), poli (ε-caprolactona) e copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico.

Através da polimerização por emulsão, cianoacrilatos podem gerar nanoesferas, ou por polimerização interfacial, as nanocápsulas. O método baseado em polímeros pré-formados originam nanoesferas ou nanocápsulas, sendo a metodologia por emulsificação-difusão uma possibilidade para a síntese de nanopartículas a partir dos polímeros pré-formados (GUTERRES *et al.*, 2012).

O método mais empregado para o preparo de nanoesferas, segundo a literatura pertinente, é o de polimerização por emulsão. Baseia-se em um método simples onde não se é aplicado solvente orgânico, tem um período de duração relativamente curto, possui poucas etapas, alto rendimento, fornece partículas estáveis e apresenta uma quantidade de fármaco encapsulado satisfatória. Para a utilização deste método é necessário o controle de certos fatores como: o pH do meio reacional, o tempo e a velocidade de agitação e o emprego de estabilizantes. (ALYAUDIN, *et al.*, 1997; BEHAN, *et al.*, 2001).

A caracterização físico-química das nanopartículas pode ser realizada através de diversos métodos, tais como:

- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).
- Microscopia de varredura (MEV): é avaliada sua morfologia;
- Calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Termogravimetria (TG).

3. METODOLOGIA

3.1 PREPARO DO EXTRATO ALCOÓLICO DA PLANTA *THITONIA DIVERSIFOLIA* (HEMSL.) A. GRAY

Para o preparo do extrato alcoólico da planta *Thitonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray foram adquiridas amostras de suas flores. Em seguida, foram processadas por meio de secagem utilizando uma câmara de ar quente à aproximadamente 50°C, durante uma semana. Após este procedimento, as flores foram reduzidas por um moinho, sob etanol a 100%, agitação e à temperatura constante durante 24 horas. A próxima etapa foi a filtração, sendo concentrado o extrato em um evaporador rotativo, ligado a uma bomba de vácuo até concentração de 0,1g/mL (ARMANDO-JÚNIOR, 2014).

3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

A solução de ácido clorídrico (HCl) e solução de hidróxido de sódio (NaOH) foram previamente preparadas para a síntese das nanopartículas. A solução de HCl ideal deve ter um potencial hidrogeniônico (pH) próximo a 2,5, pois a polimerização é pH dependente, ocorrendo melhor em meio ácido, e a solução de NaOH é básica, capaz de neutralizar o pH ácido do meio reacional e assim interromper a reação de polimerização (SCHAFFAZIK *et al.*, 2003; VAUTHIER *et al.*, 2003).

3.3 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS DE PBCA³

3.3.1 POLIMERIZAÇÃO

Para o preparo das nanopartículas brancas (PBCA – Branco), ou seja, aquelas que contêm apenas o polímero, utilizou-se a solução de HCl 0,01 M previamente preparada, verificando se o pH da mesma encontrava-se em um valor de 2,5, com necessário ajuste. Com o auxílio de uma pipeta graduada, adicionou-se 10mL da solução de HCl 0,01M (pH 2,5) em um erlenmeyer de 125 mL. Posicionou-se uma barra magnética revestida de vidro dentro do erlenmeyer, colocando-o no agitador magnético. Para preservação da barra magnética, aumentou-se a velocidade cuidadosamente até atingir 800 rpm. Adiciona-se à solução aquosa de HCl, 100mg (0,01g) do emulsionante/estabilizante Dextran®, que havia sido previamente pesado em balança analítica antes da inicialização do preparo, com acompanhamento da completa dissolução do produto. Com auxílio de uma micropipeta, foram adicionados 100µL do monômero *n*-butil cianoacrilato (Histoacryl® - Aesculap AG®) ao erlenmeyer.

Após o período de uma hora de agitação contínua, com auxílio de uma micropipeta (de 1000µL) retirou-se 1mL da nano branca PBCA, que foi armazenada em microtubo de Eppendorf® graduado neutro de 1,5mL sob refrigeração, para posterior análise: microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de absorção na região do infra-vermelho, termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial

Em seguida, adicionou-se 1 mL de extrato alcóolico da *Thitonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray ao erlenmeyer.

Após um período de quatro horas de agitação, finalizou-se este processo de polimerização por meio da adição de solução aquosa de NaOH 0,1 M, até atingir a neutralidade (pH = 7,0 ± 0,3).

Procede-se a filtração com auxílio de funil de vidro e papel filtro em um béquer de vidro (Figura 1). Após a coleta de duas amostras em microtubo de Eppendorf®, foram

³ polli (*n*-butil-cianoacrilato)

transferidos 5 mL do filtrado para um erlenmeyer de 125 mL. Com auxílio da barra magnética e agitador, submeteu-se o filtrado à agitação, com velocidade aproximada de 400 rpm.

Figura 1 – Processo de Filtração



Fonte: A autora (2018)

3.3.2 REVESTIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO

O revestimento foi realizado baseando-se no trabalho de HE e colaboradores (2009). Primeiramente foi preparada uma dispersão de ácido hialurônico a 1% (p/v) utilizando-se água purificada sob agitação magnética. Em seguida a dispersão foi adicionada sob gotejamento e agitação durante 60 minutos (GUIMARÃES, 2015).

Utilizando pipeta graduada procedeu-se a separação de 10 mL de água destilada em um béquer de vidro, onde foi adicionado 0,1 g de ácido hialurônico, previamente pesado em balança analítica. Procedeu-se a dissolução do conteúdo com o auxílio de um bastão de vidro.

A dispersão de ácido hialurônico foi adicionada aos poucos no filtrado sob a agitação de 800 rpm. Após um período de uma hora, duas amostras da solução foram coletadas em microtubos de Eppendorf® para serem liofilizados posteriormente.

Para se tornar possível a caracterização das nanopartículas, foi necessário liofilizar as amostras para efetuar as análises de espectroscopia de absorção na região do infravermelho e microscopia eletrônica de varredura. Cada uma das amostras foi disposta em dois frascos de Eppendorf® e foram enumeradas (I- Nano Branca; II- Nano com extrato e sem revestimento; III- Nano com extrato e com revestimento) para a realização da liofilização.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULASESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)

A espectroscopia fornece informações sobre a concentração de compostos específicos e sua estrutura química e morfológica.

As amostras da nano branca (PBCA), nano com extrato sem revestimento e nano com extrato e com revestimento, foram submetidas à análise de espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Para isso as amostras foram transformadas em pastilhas de KBr para leitura no aparelho de Espectrômetro Vibracional, modelo IRAffinity-1. Os espectros de absorção na região do infravermelho das amostras foram realizados na região 4000-400 cm^{-1} , à temperatura ambiente em pastilhas contendo mistura de 1,0 de amostra e 200 mg.

A técnica tem como base a observação de que as ligações químicas apresentam frequências específicas que vibram a níveis de energia bem definidos. Consiste na irradiação de raios infravermelhos em uma amostra, induzindo-a emitir transições rotacionais e vibracionais. As deformações vibro-rotacionais resultantes são medidas pelo espectrofotômetro e determinadas pela forma da molécula, massa dos átomos que a constituem e pelos seus níveis de energia. Para um fármaco com baixa hidrossolubilidade interagir com um microcarreador hidrossolúvel formam-se interações fracas como, pontes de hidrogênio ou Van der Waals, que emitem deformações vibro-rotacionais particulares resultantes desta interação, que serão visualizadas pela espectrofotometria no IV.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras também foram submetidas à microscopia de varredura. Este tipo de análise tem sido muito empregado para a avaliação das estruturas das nanopartículas, como sua forma e tamanho e dependendo da sua formulação, podem ser verificadas diferenças entre o tamanho médio das partículas, bem como os efeitos gerais da presença do fármaco no meio reacional (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As amostras foram acondicionadas em frascos Eppendorf® e, em seguida, foram então analisadas empregando aumentos que variam de 30x a 5000x com posterior seleção das imagens para a inserção neste trabalho. O aparelho utilizado para a realização das análises foi o microscópio JEOL, modelo JSM, série 6510LV.

3.6 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Foram analisadas amostras de nanopartículas de PBCA (brancas), nanopartículas com extrato de *Thitonia diversifolia* (Hemsl) A. GRAY, nanopartículas brancas revestidas com ácido hialurônico e nanopartículas com extrato de *Thitonia diversifolia* (Hemsl) A. GRAY revestidas com ácido hialurônico. As análises foram realizadas em um calorímetro de varredura DSC 7020 (Exstar, SII Nano Technology Inc., Japão), no intervalo de temperatura de 25 a 400°C, com massa de amostras de aproximadamente 2 mg, razão de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 ml/min.

3.7 TERMOGRAVIMETRIA (TG)

Foram analisadas amostras de nanopartículas de PBCA (brancas), nanopartículas com extrato de *Thitonia diversifolia* (Hemsl) A. GRAY, nanopartículas brancas revestidas com ácido hialurônico e nanopartículas com extrato de *Thitonia diversifolia* (Hemsl) A. GRAY revestidas com ácido hialurônico. As curvas foram obtidas por meio TG/DTA 7200 (Extar, SII Nano Technology Inc., Japão), no intervalo de 25 a 600°C, com a utilização de cápsulas de alumínio, com massa de amostras de aproximadamente 2,0mg, razão de aquecimento de 10°C/min. A Termogravimetria é uma técnica termoanalítica empregada para avaliar a variação de massa da amostra em função do tempo e temperatura.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

No final do processo, a emulsão nanoparticulada apresentou uma coloração esbranquiçada de aspecto leitoso (Figura 2), mesmo que, no momento de adição do extrato alcoólico tenha adquirido uma cor um pouco amarelada proveniente deste último, mas que se alterou posteriormente, voltando à tonalidade esbranquiçada.

Figura 2: Emulsão nanoparticulada

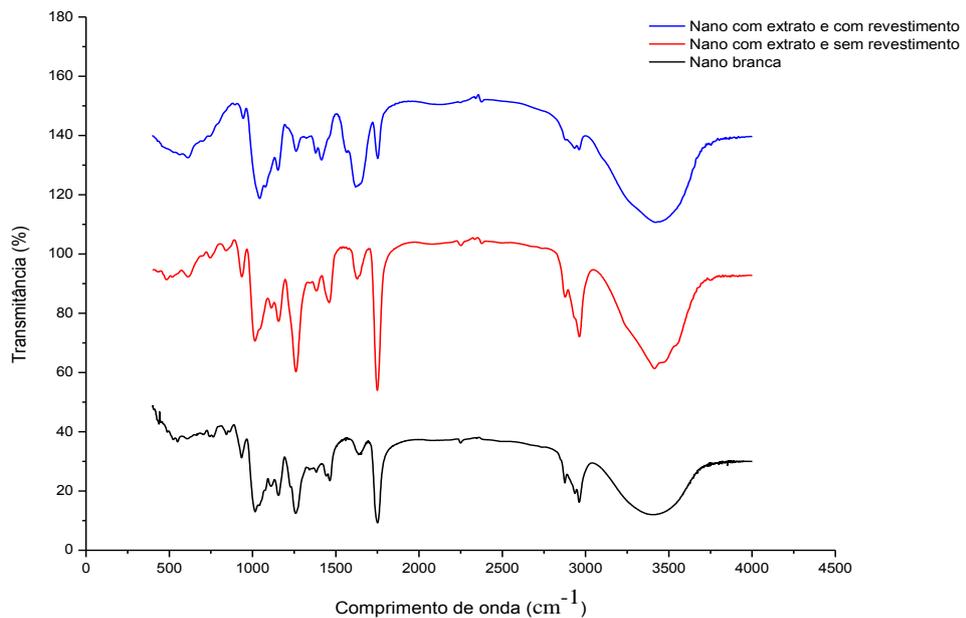


Fonte: A autora (2018)

Além das análises e acompanhamento da emulsão nanoparticulada, foi possível a realização da caracterização das nanopartículas pelos seguintes métodos de análise: Espectroscopia de Absorção na Região do infravermelho (IV), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), e Termogravimetria (TG).

A Figura 3 mostra o comportamento da amostra na Espectroscopia (IV):

Figura 3: Gráfico de Espectroscopia de absorção na região do infravermelho da síntese de nanopartículas



Fonte: A autora (2018)

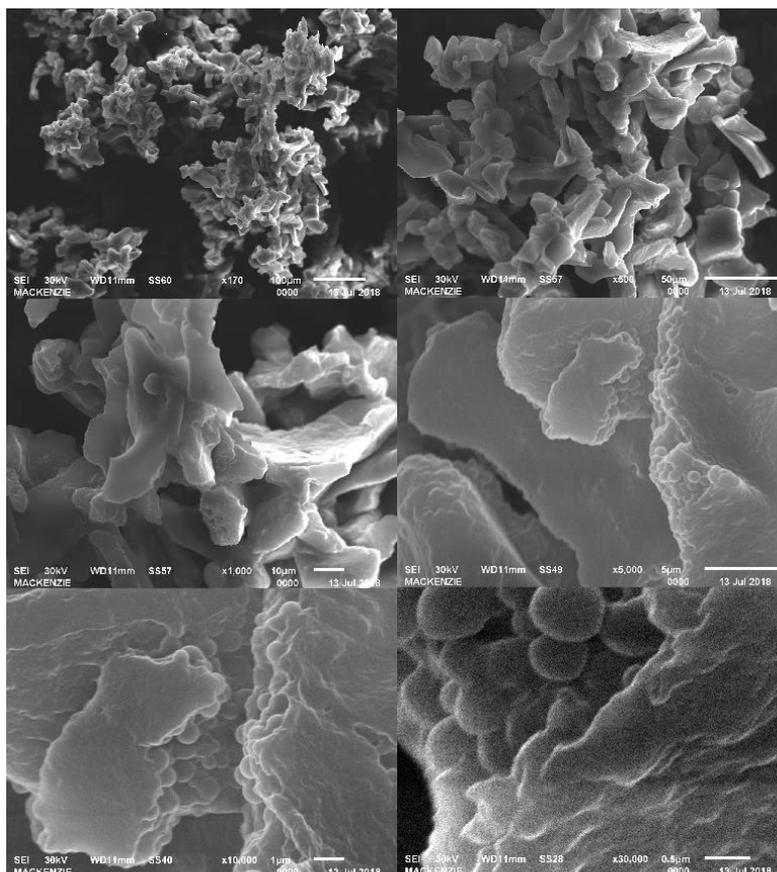
Os resultados demonstraram pequena diferença de transmitância. No gráfico acima, pode-se perceber um comportamento relativamente similar entre as três amostras. No entanto, é importantíssimo que se perceba que a amostra que revelou maior instabilidade no que tange às curvas de transmitância, evidenciada pelos picos significantes na onda de transmitância, como pode-se perceber na amostra representada pela coloração vermelha no gráfico, que se trata da nano já adicionada do extrato, mas sem o revestimento, resultado que confirma a atuação do ácido hialurônico no processo de revestimento e estabilização das nanopartículas poliméricas, por diminuir os picos nas curvas de transmitância, como pode ser observado no gráfico na onda representada com a cor preta. A similaridade de estabilidade mais acentuada entre a nano branca e a nano com revestimento, revelam que a ausência do revestimento torna as nanopartículas já adicionadas do extrato, menos instáveis, dado ao fato de que o extrato naturalmente modifica o comportamento das

nanopartículas, por esse motivo ressalta-se a observação de comportamento similar entre a nano branca e a nano com extrato e com revestimento.

Outra análise importante que foi realizada foi a Caracterização das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), conforme as imagens a seguir

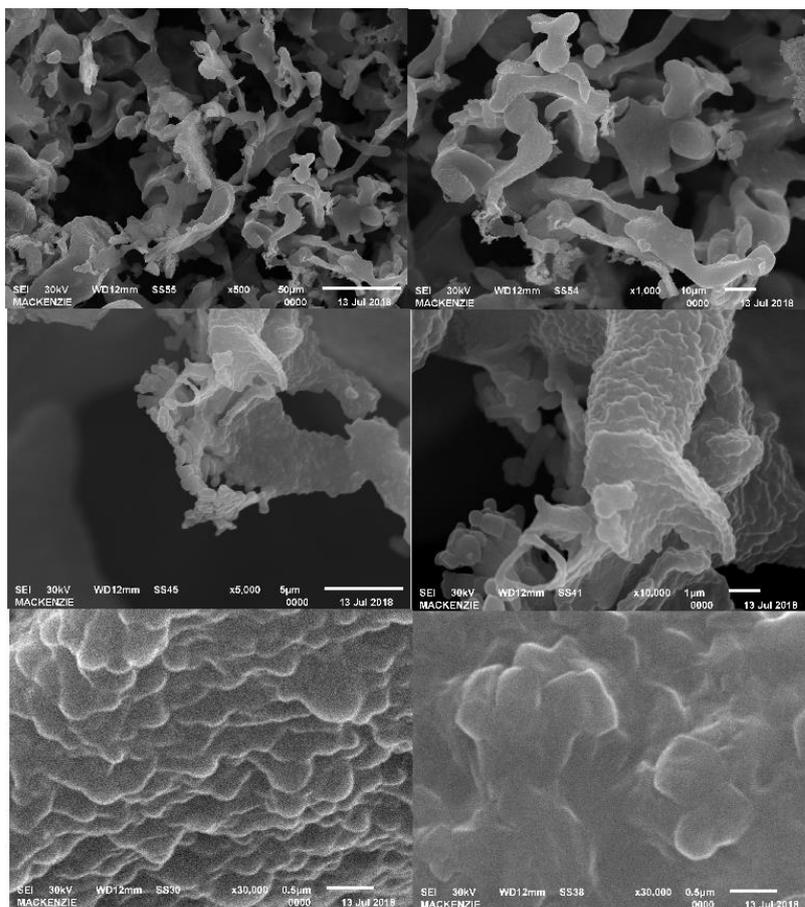
:

Figura 4: Imagens das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das amostras de nanopartículas brancas (PBCA)



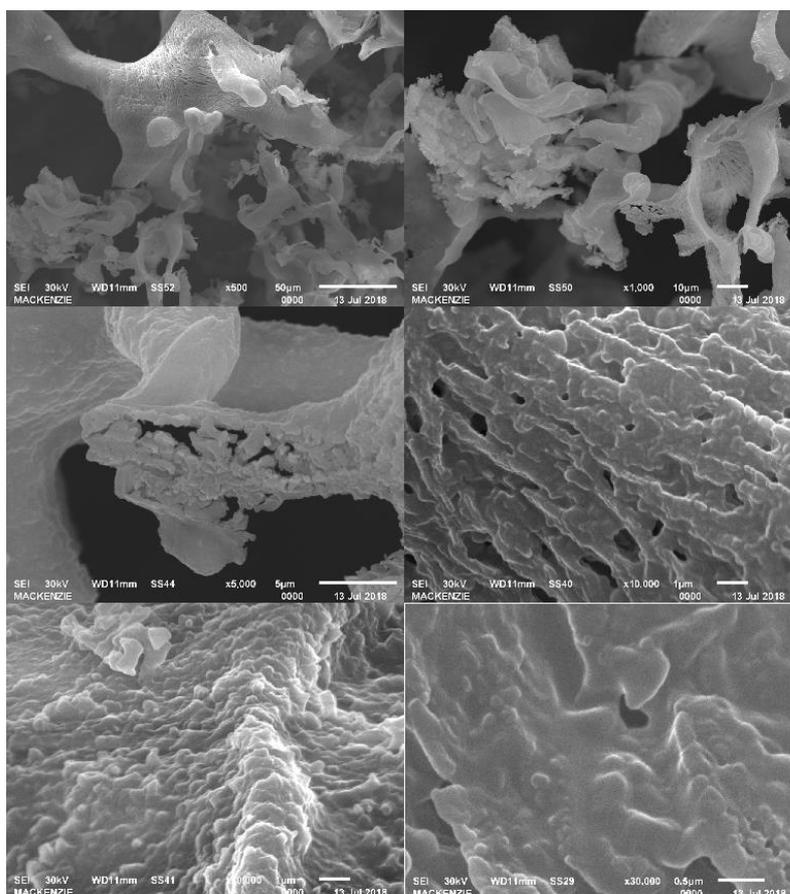
Fonte: A autora (2018)

Figura 5: Imagens das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das amostras de nanopartículas contendo extrato vegetal e sem revestimento.



Fonte: A autora (2018)

Figura 6: Imagens das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das amostras de nanopartículas contendo extrato vegetal e com revestimento.



Fonte: A autora (2018)

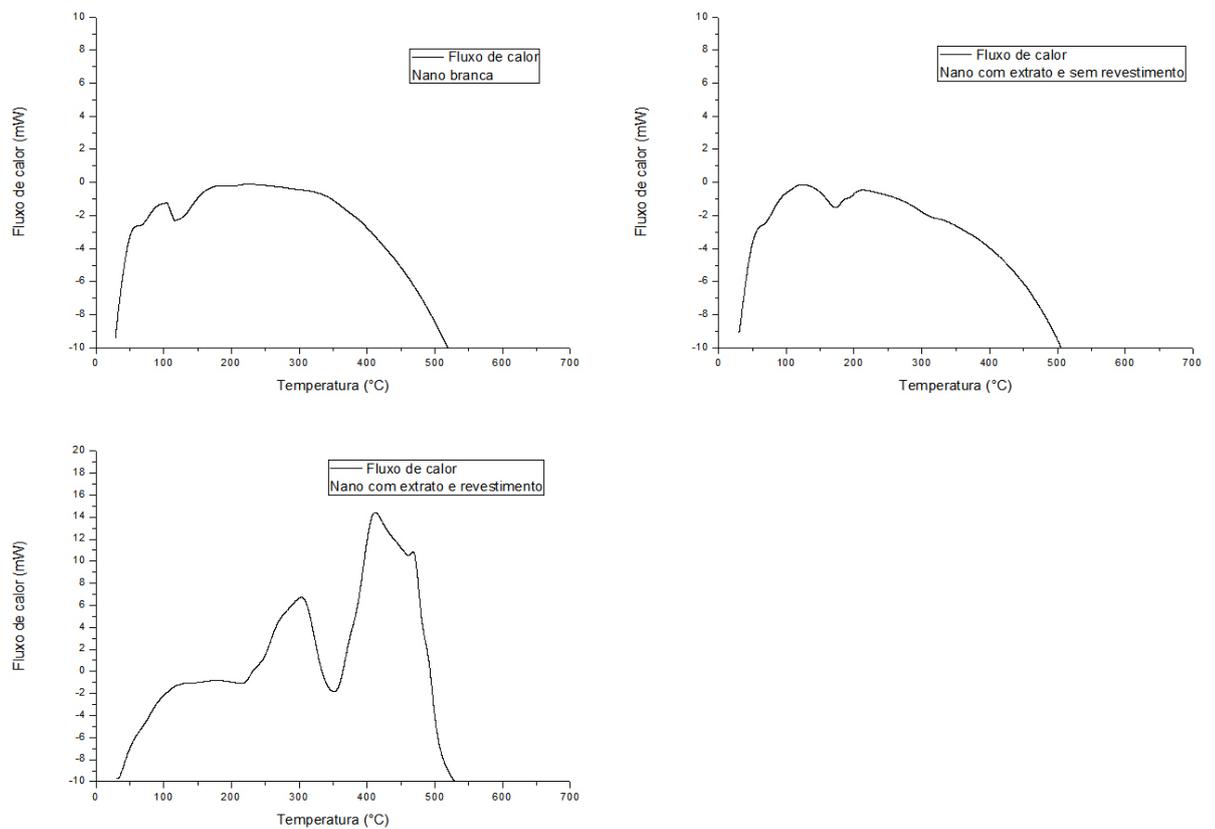
Em relação às imagens fornecidas pela MEV, a primeira observação importante a ser pontuada refere-se ao formato das nanopartículas, que não se apresentaram completamente esféricas, mas com formato variado em todas as amostras submetidas à referida análise (Figuras 4, 5 e 6). Outro ponto importante, é que embora não se perceba uma alteração do tamanho das nanopartículas após a adição do extrato, é possível perceber que houve uma mudança no estado de aglomeração, especialmente representada por uma maior dispersão das nanopartículas, que se apresentavam em maior aglomeração antes da adição do extrato. Essa diferença no comportamento das nanopartículas em relação ao seu estado de aglomeração pode ter sido causada pela presença do extrato vegetal em seu interior, que indiscutivelmente tende a provocar mudanças no comportamento das nanopartículas na formulação (Figura 5).

Pode-se também perceber características superficiais diferentes nas nanopartículas submetidas ao revestimento. Estas nanopartículas apresentam claras diferenças em sua superfície em relação às outras duas amostras. É possível perceber a presença de um

padrão superficial esponjoso representado por poros superficiais facilmente identificados nas imagens da Figura 6.

Outras análises que também foram realizadas são as de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e de Termogravimetria (TG), que ofereceram resultados importantes relacionados à estabilidade térmica das nanopartículas.

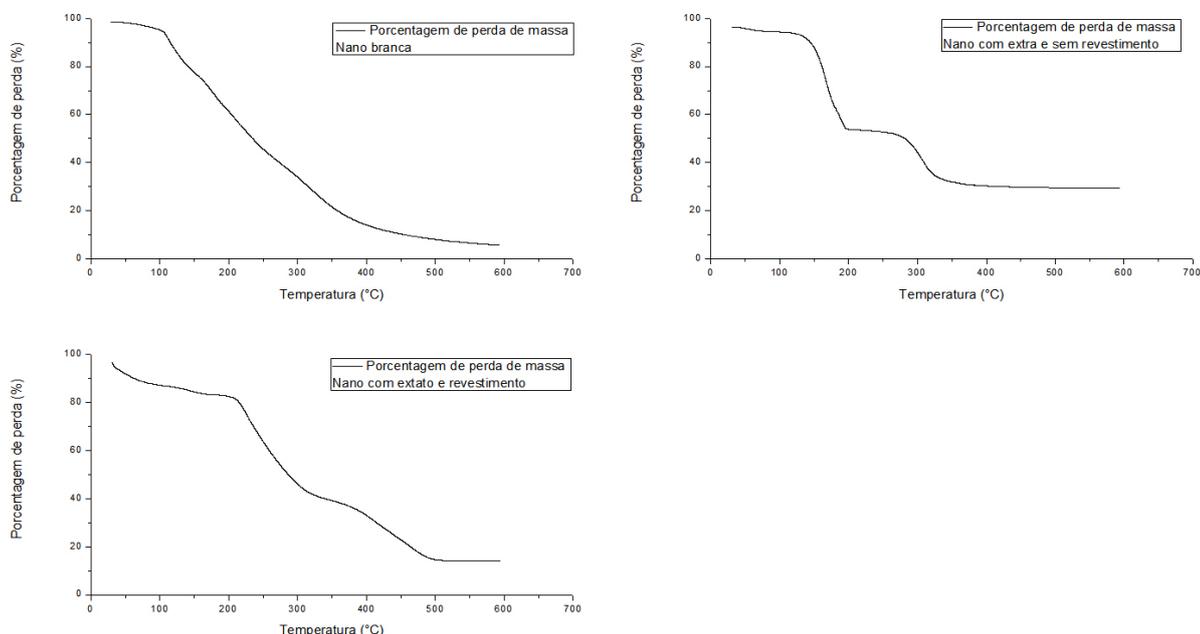
Figura 7: Curvas referentes às análises de DSC de nanopartículas brancas, nanopartículas contendo extrato vegetal e sem revestimento e nanopartículas com extrato e com revestimento, obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, razão de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50mL/minuto.



Fonte: A autora (2018)

A curva da análise de DSC (Figura 7) obtida para a nanopartícula contendo o extrato vegetal e o revestimento apresenta um pico endotérmico na faixa de 300-450°C que, devido ao seu perfil largo, é característico de eventos simultâneos e/ou subsequentes. Presume-se que esse evento ocorreu devido à perda de umidade durante a análise. O início do processo de degradação da estrutura polimérica referente à amostra com extrato e com revestimento se dá aproximadamente após 200°C.

Figura 8: Curvas referentes às análises de TG de nanopartículas branca, nanopartículas contendo extrato vegetal e sem revestimento e nanopartículas contendo extrato vegetal e com revestimento, obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, razão de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100mL/minuto.



Fonte: A autora (2018)

Ao analisarmos as curvas obtidas referentes às análises de TG, foi verificada a ausência de pico exotérmico para a principal formulação desenvolvida (nanopartículas contendo extrato vegetal e com revestimento). Esse fato pode evidenciar a presença do revestimento, uma vez que não foi possível observar o evento referente à degradação das nanopartículas. Possivelmente, o ácido hialurônico adsorvido à superfície das partículas, seja capaz de protegê-las frente à degradação. Além disso, os eventos endotérmicos, característicos das amostras de nanopartículas contendo extrato vegetal e revestimento aparecem mais largos e/ou deslocados, indicando possíveis interações entre essa substância e as nanopartículas. Essa observação pode também reforçar evidência da ocorrência do revestimento.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os objetivos deste trabalho, pode-se afirmar que o desenvolvimento das nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) permitiu a adição do extrato alcoólico da planta *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray, bem como a utilização do ácido hialurônico como meio de revestimento. Esse processo gerou uma nanoemulsão que foi submetida à análise e acompanhamento, bem como amostras que igualmente foram analisadas, tendo seus resultados expostos no corpo deste artigo. Quanto ao comportamento da emulsão

nanoparticulada obtida em processo laboratorial controlado, foi possível demonstrar que a mesma permaneceu estável quanto às suas características físicas.

No seu caráter de pesquisa qualitativa que visava testar o melhoramento da estabilidade físico-química do nanossistema a partir do revestimento com o ácido hialurônico, o resultado das análises a que foram submetidas, as amostras apresentam indicativos que parecem demonstrar uma efetividade da substância em relação ao objetivo proposto, evidenciada nos resultados obtidos pela Espectroscopia (IV), pela MEV, DSC e também pela TG.

Devido à limitação de condições de rotina, técnica e estrutural do espaço laboratorial disponível para realização deste trabalho, não foi possível proceder a determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e distribuição de tamanhos das nanopartículas pelo método de espalhamento de luz dinâmica. Da mesma forma, também não foi possível determinar o Potencial Zeta, importante para medir a estabilidade das nanopartículas, uma vez que o potencial zeta forneceria uma medida indireta da carga superficial da partícula e o seu valor permitiria inferir se as partículas estão mais dispersas, ou seja, mais afastadas umas das outras, evitando a aglomeração. Trabalhos futuros que incluam estas referidas análises poderão se somar ao conjunto de subsídios nanotecnológicos para a área farmacêutica obtidos através deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

AKAGI, T; BABA, M; AKASHI, M. *Polymer* 2007, 48, 6729. [CrossRef]. www.crossref.org, último acesso em 8/05/2015.

ALYAUTDIN, R.N.; PETROV, V.E.; LANGER, K.; BERTHOLD, A.; KHARKEVICH, D.A.; KREUTER, J. **Delivery of loperamide across the blood brain barrier with polyssorbate 80coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles.** *Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 3, p. 325328, 1997.

ARMANDO-JÚNIOR, J. **Avaliação do efeito do extrato etanólico das flores secas de *Thitonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. veiculado em emulsão no processo de reparação tecidual induzido na pele de ratos wistar.** Faculdade de Medicina do ABC. 2014.

Bae Younsoo., Lee Hyon Jin. **Pharmaceutical differences between Block Copolymer SelfAssembled and Cross-Linked Nanoassemblies as Carriers for Tunable Drug Release.** 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11095-012-0893-3>>. Acesso em: 14 jul. 2018.

BEHAN, N.; BIRKINSHAW, C.; CLARKE, N. **Poly nbutyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanism study of polymerization and particle formation.** *Biomaterials*, v.22, p. 1335-1344, 2001.

BONIFÁCIO BV; SILVA PB; RAMOS MAS; NEGRI KMS; BAUAB T M; CHORILLI M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9: 1–15. Disponível em: <<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3862741/>>> Acesso em: 17 de jul. 2018.

CUNHA ASC, JR, FIALHO SL, CARNEIRO LB, ORÉFICE F. **Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica.** *Arq Bras Oftamol.* 2003;66(3):385–391.

DELGADO, Jorge Miguel Ferreira. **Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa.** 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia Biomédica, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal, 2013. Disponível em: <<https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/9219/1/Jorge%20Delgado.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2018.

FRANCO, Nuno Araújo. **Nanopartículas e suas Aplicações em Ciências Farmacêuticas: O Estado da Arte.** 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Fernando Pessoa, Portugal, 2013. Disponível em: <<https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4180/1/TM-24086.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2018.

GAMA, R. M. ; **GUIMARÃES, M.** ; ABREU, L. C. ; ARMANDO-JÚNIOR, J. . **Phytochemical screening and antioxidant activity of ethanol extract of Tithonia diversifolia (Hemsl) A. Gray dry flowers.** *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 4, p. 823-825, 2014.

GUIMARÃES, Marcelo. **Desenvolvimento de nanopartículas de poli (n-butil-cianoacrilato) com zidovudina revestidas por ácido hialurônico para veiculação em gel de uso transdérmico.** 2015. 149 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Produção e Controle Farmacêuticos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

GUTERRES, S.S.; BNVENUTTI, E.V.; POHLMANN, A.R. Nanopartículas poliméricas para administração de fármacos. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, C.P. (eds), **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.** 2 ed. Artliber Editora. São Paulo, 2012.

IX CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA. **Estudos preliminares sobre a propagação vegetativa de Tithonia diversifolia.** Embrapa: Belém, 2015.

RADAIC, Allan et al . **COMO ESTUDAR INTERAÇÕES ENTRE NANOPARTÍCULAS E SISTEMAS BIOLÓGICOS**. Quím. Nova, São Paulo , v. 39, n. 10, p. 1236-1244, Dec. 2016 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422016001001236&lng=en&nrm=iso>. Access on 25 Mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160146>.,

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende et al. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos**. Química Nova, Porto Alegre, v. 5, n. 26, p.726-737, mar. 2003.

SIMEONOVA, M.; IVANOVA, G.; ENCHEV, V.; MARKOVA, N.; KAMBUROV, M.; PETKOV, C.; DEVERY, A.; O'CONNOR, R.; BROUGHAM, D. **Physicochemical characterization and in vitro behavior of daunorubicin-loaded poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles**. Acta Biomaterialia, v. 5, p. 2109–2121, 2009.

SINTOV AC, SHAPIRO L. **New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo**. J Control Release. 2004;95(2):173–183.

SOUTO, Eliana B.; SEVERINO, Patrícia; SANTANA, Maria Helena A.. **Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros: parte I. Polímeros**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.96-100, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-14282012005000006>.

TAVARES, Guilherme Diniz. Nanopartículas de plo (n-butil-cuaniacrilato) revestidas com N,N,N-trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade in vitro. 2013. 191 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Contatos: fernanda_arriel@yahoo.com.br e marcelo.guimaraes@mackenzie.br (Orientador)

Agradecimentos: Agradecemos ao Prof. Dr. José Armando Júnior (FMABC – Faculdade de Medicina do ABC), pelo fornecimento do extrato vegetal utilizado e pela parceria na pesquisa.