

ELIGELCY AUGUSTA DE LIMA

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO
INIBIDOR DE EPÓXI-HIDROLASE (TPPU) VISANDO FUTURAS APLICAÇÕES
CLÍNICAS**

Sorocaba
2023

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências ambientais



ELIGECY AUGUSTA DE LIMA

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO
INIBIDOR DE EPÓXI-HIDROLASE (TPPU) VISANDO FUTURAS APLICAÇÕES
CLÍNICAS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestra em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na Área de Concentração Recursos Hídricos, Manejo e Monitoramento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Coorientadora: Dra. Nathalie Ferreira Silva de Melo

Sorocaba
2023

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências
ambientais



L732p Lima, Eligelcy Augusta de
Preparo e caracterização de nanopartículas contendo inibidor de epóxi-hidrolase (TPPU) visando futuras aplicações clínicas / Eligelcy Augusta de Lima. -- Sorocaba, 2023
52 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba
Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto
Coorientador: Nathalie Ferreira Silva de Melo

1. Nanotecnologia. 2. Óleos essenciais. 3. Zeína. 4. inflamação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Sorocaba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO INIBIDOR DE EPÓXI-HIDROLASE (TPPU) VISANDO FUTURAS APLICAÇÕES CLÍNICAS

AUTORA: ELIGELCY AUGUSTA DE LIMA

ORIENTADOR: LEONARDO FERNANDES FRACETO

COORIENTADORA: NATHALIE FERREIRA SILVA DE MELO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Ambientais, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO (Participação Virtual)
Engenharia Ambiental / Unesp Instituto de Ciencia e Tecnologia Campus Sorocaba

Prof. Dr. GERSON ARAÚJO DE MEDEIROS (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Ambiental / Unesp - Câmpus Sorocaba

Profª. Drª. DANIELE RIBEIRO DE ARAUJO (Participação Virtual)
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC

Sorocaba, 24 de fevereiro de 2023

Aos meus pais, Dorival e Nadir. As minhas
irmãs Cleucia (*in memorian*), Elicreia e a
Eliérিকা (*in memorian*). A minhas afilhadas
Larissa e Maria Isabelly. Ao meu companheiro
Erik. A minha filha amada Érika.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo e acima de tudo, sempre serei grata a Deus, que me fortalece dia a dia, e me ajudou a enfrentar os diversos desafios encontrados durante o desenvolvimento desta pesquisa. Foram muitas inseguranças, medos, fraquezas, perdas, mas o senhor ouviu minhas preces e me amparou, “obrigada senhor, pela sua grandiosidade!”.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Dr. Leonardo Fernandes Fraceto por todo compromisso, paciência e ensinamentos para a realização deste trabalho, “desejo ao senhor, tudo de melhor que Deus tem a lhe oferecer”.

À Secretaria de Saúde de Sorocaba e a Divisão de Educação em Saúde, pelas liberações do trabalho, para realização das aulas do mestrado e os ensaios de laboratório.

Ao meu companheiro Erik, por me incentivar a cada dia, e não me fazer desistir, “quando eu achei que não ia dar conta de levar a Residência em Saúde da Família, a pós-graduação em Farmácia Hospitalar, o mestrado, e ser mãe, você estava lá para dizer que eu dava conta, e hoje estou aqui graças a suas palavras e todo suporte emocional, obrigada por tudo.”

À minha filha amada Érika, que nasceu no andamento dessa pesquisa, “obrigada filha por ser essa menina de luz, que irradia sabedoria e nos encanta com o seu desenvolvimento, te amo infinitamente.”

Aos meus pais, Dorival e Nadir, por me apoiarem e entender as minhas ausências, “pai e mãe vocês são meus maiores exemplos de vida e de superação, criaram eu e minhas irmã na simplicidade, trabalhando muito na lavoura de café, quantas vezes contamos moedas para poder ir para outra cidade estudar, e graças ao esforço de vocês, me motivaram a cada dia a estudar mais, obrigada por tudo que me ensinaram a ser, amo vocês.

À minha irmã Elicreia Augusta de Lima, meu cunhado Cristiano José Pedroso e minha sobrinha e afilhada Larissa por sempre me apoiarem.

À minha sogra Marlene e meu sogro Natalino por cuidarem tão bem da Érika e me ajudarem tanto.

Aos meus amigos Josiana, Fabio Henrique, Daiane Carolina, Jaqueline Simões pelo incentivo, cuidado e felicidade proporcionada.

In memoriam da minha irmã Eliérika, que me deu forças para continuar, “sinto sua presença até hoje e sei que você está comigo em todas as horas, te amo infinitamente para sempre, infinitamente”.

Ao meu tio Valdemir (Bala), que infelizmente nos deixou a pouco tempo, e não conseguiu festejar o término da pesquisa comigo, “tio lembro de suas últimas palavras, obrigada por acreditar em mim, continue a cantar onde estejas, te amo”.

Agradeço todos os meus familiares, que sempre me recebem com carinho e afeto, minha avó Maria de Souza Lima, as minhas tias Marlene, Marli, Sônia, Aparecida, Leoni, Leonice, Melinda, Marilene aos meus tios Sergio, José Carlos, Natalício e Moacir, minhas primas e primos Carla, Camila, Maria Isabelly, Eloá Maria, Samuel, Vinicius, Nilseia, Aline, Néia “vocês são muito importante na minha vida, obrigada por tudo, amo vocês”

A todo o grupo de pesquisa do laboratório de Nanotecnologia Ambiental do Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba – UNESP, pelo bom convívio, companheirismo e aprendizado, em especial ao Dr. Anderson do Espírito Santo, Dr. Jhones Oliveira, Dra. Roberta Ranieri e Dra. Estefanía Baigorria pela paciência e cordialidade nos ensinamentos das técnicas e rotina do Laboratório.

Ao Dr. Marcelo Henrique Napimoga, e todo o seu grupo de pesquisa, pelas trocas e aprendizado, e doação do TPPU para formulações.

À Dra. Nathalie Ferreira Silva de Melo, pela contribuição na temática escolhida para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba – UNESP pela oportunidade e a todos os profissionais que ali trabalham por todo o suporte prestado.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, pela disponibilidade para avaliar e enriquecer o trabalho desenvolvido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida nos 6 últimos meses de conclusão deste trabalho.

Peça a Deus que abençoe os seus planos, e eles darão certo

(Provérbios -16:3)

RESUMO

Os medicamentos anti-inflamatórios são amplamente utilizados no Brasil, principalmente na forma de comprimidos e cápsulas via oral. O uso irracional dessa classe terapêutica pode provocar danos à saúde por seus diversos efeitos colaterais e ainda ser prejudicial ao meio ambiente. A nanotecnologia é uma tecnologia inovadora que pode possibilitar na criação de formulações com características peculiares, como, menores concentrações de ativo, menores eventos adversos, dando origem a suspensões mais seguras, levando maiores benefícios à saúde dos. Visto isso, essa pesquisa desenvolveu diferentes formulação nanoestruturadas contendo Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea (TPPU), e outros bioativos com características anti-inflamatórias, associada a um biopolimero naturais e avaliou sua eficiência de encapsulação e estabilidade, para possíveis aplicações clínicas futuras. Os resultados obtidos evidenciam que as nanoformulações desenvolvidas a base de Zeína (ZN) contendo TPPU, e ZN contendo TPPU + Cinamaldeído, e também as e PLGA contendo TPPU, e as revestidas com quitosana (CS), apresentaram ótima eficiência de encapsulamento (de 86 a 90%) e boas características coloidais, estabilidade em função do tempo e um perfil de liberação sustentada, o que pode promover uma maior atividade biológica e segurança do ativo TPPU.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Óleos essenciais. Zeína. Inflamação;

ABSTRACT

Anti-inflammatory drugs are widely used in Brazil, mainly in the form of oral tablets and capsules. The irrational use of this therapeutic class can cause damage to health due to its various side effects and be harmful to the environment. Nanotechnology is an innovative technology that can enable the creation of formulations with peculiar characteristics, such as lower active concentrations, lower adverse events, giving rise to safer suspensions, bringing greater benefits to the health of. Given this, this research developed different nanostructured formulations containing Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea (TPPU), and other bioactives with anti-inflammatory characteristics, associated with a natural biopolymer and evaluated its encapsulation efficiency and stability, for possible future clinical applications. The results show that the nanoformulations developed based on Zein (ZN) containing TPPU, and ZN containing TPPU + Cinnamaldehyde, and also those and PLGA containing TPPU, and those coated with chitosan (CS), showed excellent encapsulation efficiency (from 86 to 90%) and good colloidal characteristics, stability over time and a sustained release profile, which can promote greater biological activity and safety of the TPPU active.

Keywords: Nanotechnology. Essential oils, .Zein. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura química do 1-Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea (TPPU). 23
- Figura 2:** Estrutura química do cinamaldeído (trans-3-fenil-2-propenal)..... 26
- Figura 3:** Curva analítica do TPPU, e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica. 35
- Figura 4:** Caracterização físico-química das nanopartículas de zeína controle (ZN Controle), nanoparticles de zeína contendo TPPU (ZN + TPPU) e nanopartículas de zeína contendo TPPU e cinamaldeído (ZN + TPPU + Cinamaldeído). Os parâmetros analisados foram **a)** diâmetro médio medido (nm); **b)** índice de polidispersão e **c)** potencial zeta (mV). Os valores representam a média de três determinações. 37
- Figura 5:** Distribuição de tamanho das formulações de nanopartículas **a)** zeína e **b)** PLGA logo após o preparo das nanoformulações (tempo 0). 38
- Figura 6:** Caracterização físico-química das nanopartículas de PLGA controle (PLGA Controle), nanoparticles de PLGA contendo TPPU (PLGA + TPPU) e nanopartículas de PLGA contendo TPPU e revestidas com CS (PLGA + TPPU + CS). Os parâmetros analisados foram **a)** diâmetro médio medido (nm); **b)** índice de polidispersão e **c)** potencial zeta (mV). Os valores representam a média de três determinações. 40
- Figura 7:** Imagens de microscopia de força atômica das **a)** PLGA+TPPU+CS e **b)** ZN+TPPU. Da esquerda para a direita, imagem topográfica, representação 3D da imagem topográfica e distribuição de tamanho. Para distribuição de tamanho, foram medidas aproximadamente 100 partículas usando o software Image J. 42
- Figura 8:** Cinética de liberação in vitro do TPPU a partir das diferentes formulações em temperatura ambiente utilizando sistema de dois compartimentos. **A)** Liberação de TPPU a partir das formulações zeína e **B)** Liberação de TPPU a partir das formulações de PLGA. As análises foram realizadas em triplicatas e quantificadas por HPLC. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições cromatográficas utilizadas para validação de metodologia analítica.....	30
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIEs	Anti-inflamatórios Esteroidais
AINEs	Anti-Inflamatórios não Esteroidais
AUDA	Ácido dodecanóico
ATP	Adenosina trifosfato
BAX	Proteína intracelular BCL-2 associada a proteína X
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX	Ciclo-oxigenase
CLP	Cateteres de longa permanência
COP	Copaíba
DHET	Ácidos dihidroxeieicosatrienoicos
DSC	Differential scanning calorimetry
EETs	Epóxi-eicosatrienóico
EVA	Escala visual analógica
FAV	Fistula endovenosa
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GRAS	Biomaterial geralmente reconhecido como seguro
HBP	Hiperplasia benigna de próstata
HD	Hemodiálise
IR	Isquemia de reperfusão
NC	Nanocápsulas
NCP	Nanocompósitos
NE	Nanoemulsão
NP	Nanopartículas
NTA	Análise de Rastreamento de Nanopartículas
OE	Óleo essencial
Ofx	Ofloxacina
Pot. (ζ)	Potencial Zeta
sHE	Epóxido hidrolase solúvel
SEDDS	Sistemas de entrega de drogas auto-emulsionantes
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas

TEM	Transmission electron microscopy,
TGA	Thermogravimetric c analysis
TPPU	1-trifluoromethoxyphenyl-3-(1- propionylpiperidin-4-yl) urea
US-FDA	United States Food and Drug Administration
XRD	X-ray diffraction
ZCPs	Nanopartícula zeína-pectina
ZN	Zeína
ZNP	Nanopartícula de zeína

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Importância dos fármacos na medicina	18
2.2 Fármacos anti-inflamatórios	18
2.3 Nanotecnologia	19
2.4 Zeína (ZN)	21
2.5 Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea (TPPU)	22
2.6 Óleos essenciais (OE)	24
2.6.1 Óleo essencial da canela (<i>Cinnamomum sp</i>)	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 Geral	28
3.2 Específicos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Material	29
4.2 Métodos	30
<i>4.2.1 Metodologia analítica para quantificação TPPU por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	30
<i>4.2.2 Preparo das formulações nanoestruturadas</i>	31
<i>4.2.2.1 Síntese de nanopartículas de zeína (ZN)</i>	31
<i>4.2.2.3 Síntese de nanocápsulas poliméricas com TPPU revestidas por quitosana (CS)</i>	31
<i>4.2.3 Avaliação, caracterização físico-química e morfológica das formulações nanoestruturadas</i>	32
<i>4.2.3.1 Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta</i>	32
<i>4.2.3.2 Rastreamento das nanopartículas (NP) e nanocápsulas (NC)</i>	32
<i>4.2.3.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)</i>	33
<i>4.2.4. Ensaio de liberação</i>	33
<i>4.2.5 Modelagem matemática</i>	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Metodologia analítica de quantificação do ativo TPPU	35
5.2 Caracterização e estabilidade	36

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

Os medicamentos são fundamentais para melhoria e manutenção da saúde dos indivíduos, podem ser utilizados para diagnóstico, cura, tratamento ou prevenção de doenças (VIEIRA, 2007). Dentre as classes de fármacos mais consumidas mundialmente, estão os analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos, psicotrópicos, reguladores lipídicos, anti-hipertensivos, contraceptivos hormonais, meios de contraste de raios-x, entre outros respectivamente (JIANG; ZHOU; SARMA, 2013).

No Brasil, os anti-inflamatórios, estão entre os mais prescritos por médicos e dentistas, conseqüentemente são os mais consumidos (KRAMER et al., 2015). Esses medicamentos são utilizados para tratamento de dores associadas a inflamações, e em casos específicos, como: pós-operatório, edemas, distúrbios musculoesqueléticos, entre outras alterações que afetam o estado de saúde de um organismo. (PINHEIRO e WANNMAACHER, 2019).

Contudo, o uso de anti-inflamatórios ao longo prazo pode ocasionar desconfortos, e levar a eventos adversos, dentre os mais relatados são alterações no aparelho gastrointestinal, e comumente sintomas como, são dor abdominal, azia, dispepsia, meteorismo e diarreia (OLIVEIRA et al., 2019).

Outra preocupação constante, é a contaminação dos sistemas aquáticos, não só por causa do uso indiscriminado de fármacos, mas também em por ser um produto que passa por descarte inadequado (KUMMERER, 2010). Além disso, as estruturas químicas dos medicamentos tendem a ser persistentes no ambiente (KASPRZYK-HORDERN, 2010). Esses podem ser rapidamente transformados, permanecer em sua forma inalterada ou ainda ser conjugados a outras moléculas polares, resultando em efeitos negativos (BISOGNIN; WOLFF; CASSIMIRI, 2018).

Devido o amplo uso e procura de substâncias para sanar patologias, como inflamações, pesquisadores buscam novas tecnologias para sintetizar substâncias com menos efeitos adversos (BARRETO et al., 2017). A nanotecnologia é um campo de aplicação científico multidisciplinar consideravelmente vasto (FIGUEIRA, COIMBRA e VEIGA, 2014). Com uso da nanotecnologia, associada a adição de produtos naturais em sua composição, como por exemplo biopolímeros como a zeína e ativos como óleos essenciais, podem ser uma alternativa promissora para o desenvolvimento de Formulações nanoestruturadas com características anti-inflamatórias (BEZERRA et al., 2022). Ademais, sua utilização, pode ser uma alternativa para

síntese de substâncias, com características específicas, sendo assim o uso de nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, nanocápsulas e de nanocompósitos são cada vez mais explorados como tecnologia inovadora (ROSSI e BERGMANN, 2008).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância dos fármacos na medicina

Fármacos, são substâncias importantes para a saúde em diversos aspectos, os quais podem ser indicados em diferentes situações, como por exemplo tratamento de patologias, sintomas, preparo de exames ou profilaxia (MELO et al., 2006). A Farmacopeia Brasileira define como fármaco toda “substância ou combinação das mesmas, de origem natural ou sintética, mineral, biológica ou de síntese, que tenham propriedade propriedades medicinais ou farmacológicas, para uso em seres humanos ou animais, destinada à prevenção, diagnóstico, cura, alívio de sintomas, tratamento de doenças ou para fins de modificação de atividades fisiológica (BRASIL, 2010)

A indústria farmacêutica ao longo dos anos vem desenvolvendo e aperfeiçoando novas técnicas para a produção de medicamentos, as quais buscam fármacos seguros, promova maior benefício a saúde, e ao mesmo tempo tenham menor número de eventos adversos (inocuidade) (SAHU et., 2021). Outra peculiaridade de interesse farmacêutico, é a criação de formulações que tenham em sua composição compostos de origem natural, isso se deu, devido a esses ativos naturais poder potencializar o efeito terapêutico, quando incorporados em doses adequadas as formulações, e diminuir os eventos adversos, em diversas situações de alteração da saúde (SCOTT et al., 2020).

2.2 Fármacos anti-inflamatórios

Os fármacos são imprescindíveis para o tratamento de determinadas enfermidades, dentre as principais classes de maior consumo mundial destacam-se analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos, drogas psiquiátricas, reguladores lipídicos, anti-hipertensivos, contraceptivos hormonais, meios de contraste de raios-x, entre outros (JIANG; ZHOU; SARMA, 2013).

Os anti-inflamatórios, é estão classificados em duas classes distintas: os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) denominados corticosteróides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) que se pode denominar grupos químicos heterogêneo e inclui a aspirina e outros inibidores da ciclo-oxigenase (COX), pode ser seletivo ou não (OLIVEIRA et al., 2019). Os anti-inflamatórios não hormonais (AINE's) são de natureza química muito variada, porém atuam praticamente pelo mesmo mecanismo de ação, inibindo a síntese do ácido araquidônico,

impedindo a formação de prostaglandinas e outros mediadores químicos em um processo que se denomina inflamação (BARRETO et al., 2017).

Devido ao seu mecanismo de ação possuem uma excelência e eficácia terapêutica na analgesia (dor), no entanto possuem muitos eventos adversos, principalmente relacionados a disfunções nos rins, coração, fígado, pele e trato gastrointestinal (GI), o que gera ao organismo (SHING, BORSE e NIVSAKAR, 2016). É importante ressaltar, que mesmo que a indústria farmacêutica crie tecnologias, como por exemplo o revestimento desses inflamatórios, os quais amenizam os principais eventos adversos mais comuns, é necessário pensar em novas técnicas que mesmo que o paciente faça seu uso ao longo prazo não traga uma série de prejuízos ao organismo, e substancialmente aos sistemas que o compõe (SARETO et al., 2023).

2.3 Nanotecnologia

A origem da nanotecnologia começou em 1959 em uma palestra proferida por Richard Fernman, esse que é denominado o pai da nanotecnologia, já em 1974 o engenheiro Norio Taniguchi foi responsável por utilizar do termo pela primeira vez no intuito de designar uma nova tecnologia que ia além do controle de materiais e da engenharia em microescala (SCHULZ, 2013). Desde então o termo nanotecnologia vem sendo utilizado para a designar a criação, manipulação e pesquisa de materiais com escala nanométrica (DIAS et al., 2021). A nanotecnologia é uma técnica bastante explorada em muitos campos de aplicação (CADIOLI e SALLA, 2015). Na medicina vem sendo uma opção a qual visa melhorar a qualidade dos métodos usados nos cuidados de saúde (SAHU et al., 2021).

No desenvolvimento de novos medicamentos, a nanotecnologia é uma alternativa para conduzir fármacos à tecidos ou células, minimizar a degradação de alguns ativos; possibilitar a criação de formulações inaláveis, entre outras benesses (KARUNAKARAN e SADANANDAN, 2022),

Formulação nanoestruturada tem a capacidade de liberar o princípio ativo de forma controlada, e/ou prolongada garantindo vantagens, como: redução da toxicidade; redução da resposta imune pelo sistema reticulo endotelial; proteção do composto encapsulado; incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto de substâncias lipofílicas; maior tempo de circulação in vivo, que leva a maior eficácia terapêutica, solubilização de substâncias acima do limite de solubilidade e redução da dose efetiva (CADIOLI e SALLA, 2015).

A nanotecnologia pode dar origem a diversos sistemas nanoestruturados, como por exemplo as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), nanoemulsões (NEs), nanocápsulas (NC), nanocompósitos (NCP) entre outros (ASSIS et al., 2012).

As SLN são sistemas de transporte coloidal empregados para encapsular, proteger e entregar componentes funcionais, sendo amplamente utilizadas do desenvolvimento de fórmulas farmacêuticas, devido sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, essas estruturas matriciais são compostas por lipídios sólidos biodegradáveis, estabilizados usando emulsificantes para dispersar os compostos ativos na matriz lipídica (MELO et al., 2018). As matérias-primas das SLN são basicamente lipídio (s) sólido (s), tensoativo (s) e água. O termo lipídeo refere-se a triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e ceras (OLIVEIRA, 2014).

A NE consiste em uma dispersão muito fina composta por uma fase de óleo e uma fase aquosa, com tamanho de gota, em escala nanométrica; em função do seu tamanho característico, podem ser transparentes ou translúcidas, e possuem estabilidade contra a sedimentação, as NEs não podem ser formadas espontaneamente, sendo necessária energia, a qual pode ser fornecida a partir de dispositivos mecânicos ou até mesmo do potencial químico dos componentes (ASSIS et al., 2012). Os métodos utilizados para formação de NE compreendem a utilização de homogeneizadores de alta pressão e geradores de ultrassom (KENTISH et al., 2008). Os homogeneizadores de alta pressão são muito utilizados para formar NE e geralmente trabalham com pressões entre 50 e 100 Mpa (ASSIS et al., 2012).

Já as NC são compostas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, no qual encontra-se o ativo, conferindo proteção contra o oxigênio, a água e/ou a luz; garantindo uma liberação controlada da substância e/ou previnem o contato com outros componentes em uma mistura, As combinações de bioativos incorporados podem ser protegidas contra degradação e melhorar a estabilidade e a solubilidade, pode-se citar como exemplo, solubilização de componentes hidrofílicos em matrizes hidrofóbicas e vice-versa (JAFARI et al., 2008). O principal objetivo da encapsulação é proteger uma substância sensível na cápsula ou na parede, isolando fisicamente o ingrediente do meio ambiente. Atualmente, os interesses essenciais são atribuídos ao encapsulamento de aromatizantes lipídeos e carotenoides, entre outros ingredientes; ressalta-se que, em função de um único agente encapsulante não possuir todas as propriedades do material de parede ideal, pesquisas recentes têm focado em misturas de carboidratos, gomas e proteínas como alternativa (ASSIS et al., 2012).

Dentre as várias possibilidades dentro da nanotecnologia, algumas alternativas como o uso de biopolímeros vêm sendo exploradas, de modo a minimizar danos aos seres vivos, e ao meio ambiente (ROSSI e BERGMANN, 2008). A ZN, é um biopolímero, bastante estudado, devido sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade em nanoformulações (DEMIR et al., 2017)

2.4 Zeína (ZN)

A busca por polímeros naturais é cada vez mais frequente, isso ocorre em virtude de possibilitarem características peculiares, como ajustes da funcionalidade biológica para aplicabilidade, e terem aspectos multifuncionais como excipiente, uma estratégia altamente necessária para o aprimoramento de sistemas de liberação (MASTROPIETRO; PARK e OMIDIAN, 2017).

A ZN é uma mistura de proteínas obtida do milho, essas proteínas são as prolaminas e correspondem a cerca de 60% do total de proteínas desse cereal, o grão de milho é formado por quatro estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta, estas estruturas diferem em composição química (LUO e WANG, 2014). O endosperma representa aproximadamente 83% do peso seco do grão, o qual é constituído principalmente de grânulos de amido, em média 88%, sendo classificado em dois tipos: farináceo e vítreo, é no endosperma vítreo encontra-se a maior concentração de ZN (ANDERSON e LAMSAL, 2011).

O grupo de proteínas presente no milho foi isolado pela primeira vez por Gorham (1821) em milho integral, onde foi utilizado solução aquosa de etanol, e a primeira patente para o método comercial de extração da ZN foi concedida a Osborne (1891). Desde então, diferentes procedimentos, e diversos solventes são utilizados para extrair proteínas de cereais, nos quais fatores como concentração, tipo de solvente, temperatura e tempo da extração variam com o intuito de aumentar a eficiência do processo (AGBOOLA e MILLS, 2005). A extração da ZN pode ocorrer por combinações químicas, com adição ou não de tratamento enzimático, sendo que alguns fatores contribuem para eficiência do processo, como por exemplo: tipo de solvente utilizado, temperatura, pH e tempo de extração (PAPILIA et al, 2015).

Proteínas como a ZN, pode ser caracterizada de acordo com sua similaridade em massa molecular, solubilidade em solventes e estruturas, as estruturas são divididas em quatro subclasses denominadas alfa, beta, gama e delta (PAPILIA e LONDERO, 2015). A alfa-zeína

geralmente está em maior concentração, mas isso não é uma regra para todas as variedades de milho, pois pode mudar de acordo com a composição em diferentes genótipos (OLIVEIRA et al., 2007).

A ZN é uma proteína vegetal, devido a essa característica é considerada um polímero natural, e pode ser utilizada em diversas aplicações, incluindo a agricultura, cosméticos, embalagens, produtos farmacêuticos e outros (PALIWAL e PALAKURTHI, 2014). Ela apresenta balanço de nitrogênio dietético negativo, ou seja, é deficiente em aminoácidos básicos e ácidos, ausente em triptofano e lisina. A combinação de perfil de aminoácidos desequilibrado e insolubilidade em água resulta em uma má qualidade nutricional, e isso torna o principal obstáculo para suas aplicações em produtos alimentícios para consumo humano, em contrapartida tem sido amplamente explorado como um biopolímero nativo para novas aplicações. no campo da ciência, principalmente no ramo farmacêutico e biomédico (LUO e WANG, 2014).

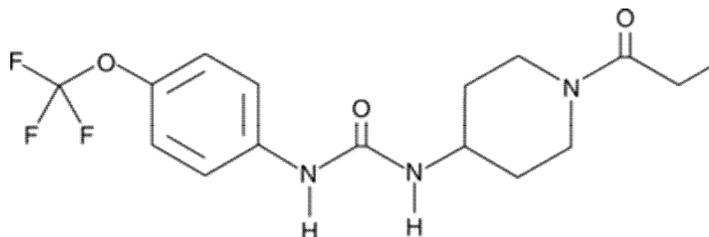
Essa proteína tem sido utilizada por vários pesquisadores para a melhoria dos sistemas de administração oral de medicamentos, tais como aumento da biodisponibilidade, preparação de formas de dosagem de liberação sustentada, direcionamento e proteção de medicamentos (RAZA, 2020). Por ser uma proteína a qual possui caráter hidrofóbico, que garante uma barreira resistente a água, pode ser utilizada como material de revestimento, dando origem a estruturas coloidais como nanopartículas (REBOREDO et al., 2021). Além disso, a zeína tem alta resistência térmica, ótimas propriedades de barreira ao oxigênio, que podem ser de interesse para o encapsulamento de compostos sensíveis à oxidação ou temperatura (PENALVA et al., 2017). Possui ainda segurança reconhecida e aprovada pela United States Food and Drug Administration (US-FDA), sendo reconhecida desde 1985 “biomaterial geralmente reconhecido como seguro (GRAS)” pelas suas características promissoras, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (LUO e WANG, 2014).

2.5 Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea (TPPU)

O trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl) urea (TPPU) (figura 1) é uma molécula desenvolvida e patenteada pelo Dr. Bruce D. Hammock da Universidade da Califórnia (EUA). Essa molécula é um potente inibidor da epóxido hidrolase solúvel (sEH), e vem sendo estudada por apresentar atividade anti-inflamatória no organismo, com diversos estudos para aplicações e tratamento no controle de inflamações (ROSE et al., 2010). A figura 1 mostra sua

estrutura química, cuja fórmula molecular é $C_{16}H_{20}F_3N_3O_3$ e seu aspecto é de um pó branco (MALTA, 2018).

Figura 1: Estrutura química do 1-Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea (TPPU).



Fonte: Malta (2018).

O TPPU demonstra segurança para uso e potencialidade, evidenciado por diversos trabalhos, os quais avaliaram sua farmacocinética, toxicologia e farmacodinâmica em diferentes modelos animais (roedores, galináceos e primatas). Esse composto é um inibidor do epóxi hidrolase solúvel (sEH) derivado de ácido dodecanóico (AUDA), que apresenta efeitos benéficos frente a quadros inflamatórios (ROSE et al., 2010). Em 2005 Morisseau e Hammock relata descoberta de atividade benéfica para tratamento em casos de pressão arterial, inflamação, progressão do câncer e o aparecimento de outras doenças. Além disso, este composto também foi testado em diferentes modelos, e apresentou excelente atividade analgésica, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, neuroprotetora e cardioprotetora (HARRIS et al., 2015; INCEOGLU et al., 2015; SASSO et al., 2015).

O tratamento com TPPU, acompanhado de níveis aumentados de ácidos epóxi-eicosatrienóico (EETs), melhorou acentuadamente a sobrevivência de camundongos sépticos induzidos pela cirurgia de cateteres de longa permanência (CLP), que foi associada a danos e disfunções de órgãos aliviados, desencadeados por resposta inflamatória sistêmica, o TPPU inibiu significativamente a resposta inflamatória sistêmica via inativação induzida por EETs da sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio devido à capacidade fagocítica macrófaga aprimorada e subsequentemente proliferação e disseminação bacteriana reduzidas e liberação de fatores inflamatórios (CHEN et al., 2020).

Outro estudo desenvolvido por Zhang et al. (2020) sugere que quando o TPPU é administrado início do acidente vascular cerebral (AVC) uma vez ao dia, ele pode proteger a barreira hematoencefálica e reduzir a apoptose do tecido cerebral causada pela isquemia além de proteger o cérebro contra a isquemia focal em ratos, devido a inibição da atividade do

epóxido hidrolase solúvel e das metaloproteases de matriz 2 e 9, reduzindo os níveis de ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHET), diminuiu o número de células apoptóticas pela regulação negativa das proteínas pró-apoptóticas BAX e Caspase-3, enquanto regulou positivamente a proteína anti-apoptótica BCL-2.

Bakhari et al. (2021) conduziu um estudo onde evidenciou o TPPU como um novo fármaco no controle de distúrbios cardiovasculares e metabólicos induzidos pela obesidade em ratos. Em seu experimento foi oferecido uma dieta rica em gordura, onde 60% de colesterol, 20% de carboidratos e 20% de proteínas e simultaneamente foi administrado uma única dose diária de placebo para um grupo, e 2 mg/kg de TPPU em pó para outro grupo, esses foram acompanhados por dois meses, onde eram avaliados peso corporal, pressão arterial e investigações bioquímicas.

Embora as potencialidades farmacológicas das aplicações do TPPUU seja vasta, encontra-se também limitações, relacionadas à sua baixa solubilidade aquosa (60 µg/mL), necessitando assim a utilização de sistemas co-solventes, como por exemplo o etanol e o polietilenoglicol 400, para alcançar uma biodisponibilidade adequada (MELO et al., 2018).

Diante do potencial uso deste inibidor da enzima epóxi hidrolase solúvel (sEH), acredita-se que os efeitos imuno farmacológicos deste novo inibidor da sEH possam ser melhorados uma vez que a liberação prolongada utilizando sistemas que poderá aumentar a biodisponibilidade do TPPU (devido ao aumento da solubilidade), levando a um maior tempo de ação, diminuição sua metabolização e utilização de menores concentrações de forma a produzir no mínimo o mesmo efeito terapêutico, porém com menor toxicidade, resultando em efeito benéfico para controle do processo inflamatório (MELO e NAPIMOGA, 2017)

2.6 Óleos essenciais (OE)

O uso dos óleos essenciais (OE) começou prevalentemente na medicina tradicional chinesa desde os primórdios e até hoje utilizada na medicina e nas indústrias farmacêutica e de cosméticos (COSTA, 2019).

Os OE podem ser obtidos a partir de diferentes partes das plantas, e são muitos utilizados para fins terapêuticos por terem efeitos positivos no tratamento de diversas patologias (FAUSTINO; ALMEIDA; ANDREATINI, 2010). Em geral, a maioria dos OE possui potente atividade antimicrobiana, antioxidante e funcional, esses efeitos são possíveis devido aos OE serem misturas complexas de compostos, como terpenos, fenólicos, cetonas, álcoois, ésteres,

aminas, amidas, etc. (KUMAR, 2020). Na literatura é possível encontrar o uso dos óleos essenciais na sua integridade ou compostos isolados (COSTA, 2019).

Apesar das evidências e promissoras aplicações em diferentes áreas, tais como na indústria de alimentos, cosmética, agrícola e farmacêutica, os óleos essenciais ainda possui alguns empecilhos para determinadas aplicações, consequência de algumas de suas propriedades, tais como: baixa solubilidade em água, alta volatilidade, baixa biodisponibilidade, e instabilidade em alguns sistemas, fazendo com que seja necessário o desenvolvimento de alguns sistemas de transporte e favorecendo sua ação e neutralizando esses empecilhos (COSTA, 2020).

Na atualidade novas tecnologias vêm sendo exploradas por pesquisadores, e a ciência tem ampliado a aplicabilidade dos óleos essenciais, os aliando à nanotecnologia e dando origem a sistemas diferenciados (TERROSO, 2014).

O efeito anti-inflamatório do TPPU pode ser aliado a inserção de compostos bioativos, como os óleos essenciais em formulações nanoparticulada, é outra alternativa, que pode vir a possibilitar alguns benefícios, como ação da atividade terapêutica e diminuição da toxicidade (BATISTA, 2020)

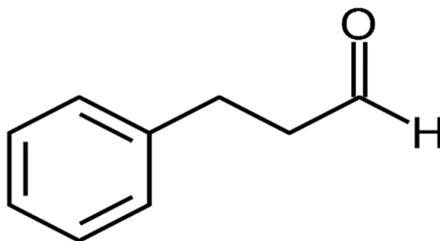
A incorporação de óleos essenciais em sistemas nanoestruturados é promissora, devido ao fato destes proporcionarem maior estabilidade ao ativo além de aumentar sua biodisponibilidade através da encapsulação em nanopartículas. O tamanho nanométrico destas nanopartículas melhora o perfil de distribuição do ativo em tecidos, devido à alta área superficial atrelada a estes sistemas, e também facilita a penetração no meio intracelular (GAMBIN, 2020).

Dentre os mais diferentes óleos essenciais e seus efeitos terapêuticos, neste trabalho iremos evidenciar o óleo essencial de canela (*Cinnamomum verum L.*) que possui cinamaldeído (C₆H₈O) como principal constituinte ativo, é evidenciado na literatura por ter efeito inflamatório e analgésico significativo, dessa forma pode-se potencializar esses efeitos junto ao TPPU nas formulações nanoparticuladas.

2.6.1 Óleo essencial da canela (*Cinnamomum sp*)

O ácido cinâmico ou cinamaldeído (trans-3-fenil-2-propenal) é o principal componente ativo do óleo essencial da canela (*Cinnamomum sp*), cerca de 60-75% da composição, vem sendo amplamente utilizado, devido sua atividade biológica e farmacológica, esse composto tem características fenólicas, garantindo um aroma amadeirado a planta (FIGUEIREDO et al., 2018). Dentre suas propriedades de ação farmacológica destaca-se, atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, analgésica, antidiabética, cicatrizante dentre outras (PONCIANO et al., 2020). Na figura 2 pode-se observar a estrutura química do cinamaldeído.

Figura 2: Estrutura química do cinamaldeído (trans-3-fenil-2-propenal)



Fonte: Syafiq; Sapuan; Zuhri (2021).

Em 2018 Kim et al. Conduziu um experimento inédito, onde avaliou a atividade anti-inflamatória do cinamaldeído em células macrófagos do tipo murinas 264.7 e verificou após os testes, que houve diminuição nas dosagens de óxido nítrico (NO) induzida por lipopolissacarídeo, a expressão do RNA mensageiro e a expressão da enzima iNOS em macrófagos estimulados também diminuiu. Além de uma redução no nível de expressão de RNA mensageiro e a secreção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo, comprovando efeito terapêutico do cinamaldeído contra a inflamação.

De acordo com estudo realizado por pesquisadores do Instituto de Pomologia de Shandong, Taian na China em parceria com departamento de ciência de alimentos de Rutgers, da Universidade de New Jersey nos EUA, é possível produzir uma emulsão Pickering de óleo essencial de canela (ZCCPEs) estabilizada por nanopartículas compostas de zeína-pectina (ZCPs), dando origem a um sistema antimicrobiano eficaz na proteção de alimentos, os pesquisadores elaboraram essas nanopartículas e verificaram se a influência da concentração de ZCPs influenciaria na estabilidade de ZCCPEs. Os resultados mostraram que 0,25% de ZCPs

podem reduzir a matéria bioorgânica em quatro vezes em comparação com 1% de ZCPs, mantendo uma boa estabilidade física. O efeito inibidor de ZCCPEs em dois microrganismos relacionados com foi avaliada por ensaio antimicrobiano. Além disso, dois modelos de fatias de maçã minimamente processadas foram construídos para avaliar sistematicamente o potencial de aplicação de ZCCPEs na preservação de alimentos. Devido à dispersibilidade do poço e capacidade de liberação sustentada, os ZCCPEs mostraram desempenho antibacteriano superior do que o óleo essencial puro (JIANG et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver diferentes técnicas para formulação de nanopartículas contendo TPPU e avaliar sua estabilidade, e possíveis aplicações clínicas.

3.2 Específicos

- Preparação de diferentes sistemas nanoparticulados contendo TPPU e caracterização físico-química dos sistemas coloidais através de medidas de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação do TPPU e rastreamento de nanopartículas;
- Caracterização físico-química e morfológica das suspensões por microscopia de força atômica e calorimetria exploratória diferencial;
- Avaliação do perfil de liberação do TPPU das formulações nanoestruturadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- TPPU (Disponibilizado pela Faculdade São Leopoldo Mandic de Campinas - doação da Universidade da Califórnia)
- Polímero PLGA (Poli-D,L-lactíco –co-glicólico) (65:35) (Sigma®)
- Zeína (Sigma®)
- Quitosana peso molecular 50000-190000 (Sigma®)
- Polissorbato (Tween) 20 e 80 (Sigma®)
- Monoestearato de sorbitano (Span 60) (Sigma®)
- Carvacrol - Sigma ®
- Acetona, ácido acético glacial, clorofórmio, hidróxido de sódio e sais para preparo de solução tampão (grau espectroscópico analítico)
- Acetonitrila (grau HPLC – Merck®)
- Dispositivos de ultrafiltração de celulose regenerada de 10 kDa (Amicon – Millipore®)
- Agitador magnético (Tecnal®)
- Microcentrífuga (MiniStar®)
- Evaporador rotativo AL-390 (American Lab®)
- Bomba à vácuo A12 (Symbol®)
- Potenciômetro (Tecnal®)
- Analisador de partículas ZetaSizer ZS 90 (Malvern®)
- Analisador de partículas NanoSight LM 10 (Malvern®)
- Agitador orbital de placas Kline 151 – (Cientec®)

- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ProStar (Varian®)
- Calorímetro diferencial de varredura Q20-1890 (TA Instruments®)
- Sistema de resfriamento RSC 40 (TA Instruments®)
- Microscópio de força atômica EasyScan 2 AFM (NanoSurf®)

4.2 Métodos

4.2.1 Metodologia analítica para quantificação TPPU por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A quantificação do TPPU presente nas diferentes formulações foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Neste sentido, as condições cromatográficas foram adequadas a fim de obter um pico simétrico correspondente ao TPPU através do preparo de soluções contendo diferentes concentrações deste. Para o método de quantificação do TPPU foi empregada a metodologia analítica desenvolvida por Mello et. (2016). As condições cromatográficas utilizadas durante o processo de desenvolvimento e validação do método estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições cromatográficas utilizadas para validação de metodologia analítica.

Amostra	TPPU em metanol/água (75/25, v/v)
Fase móvel	Metanol/água (75/25, v/v)
Volume de injeção	100 µL
Fluxo	0,8 mL/min
Detector (λ)	Ultravioleta (UV), λ = 241 nm
Coluna cromatográfica	Varian Microsorb, C ₁₈ fase reversa, 5µ 110A, 250 x 4,60mm

Fonte: Mello et al. 2016

Para a construção da curva analítica foram preparadas soluções estoque de TPPU na faixa de concentração de 0,05 a 0,1 µg/mL e as soluções foram submetidas a análise por CLAE de acordo com as condições descritas anteriormente (Tabela 1). Posteriormente foi plotado um gráfico da área do pico cromatográfico em função da concentração de TPPU e a

curva analítica foi obtida através da regressão linear desses dados. Foram preparadas três curvas analíticas em três dias consecutivos e a média dessas curvas foi empregada como padrão de análise quantitativa para o TPPU.

4.2.2 Preparo das formulações nanoestruturadas

4.2.2.1 Síntese de nanopartículas de zeína (ZN)

A preparação das ZN foi realizada conforme método de precipitação anti-solvente descrito por Park et al. (2015) com algumas modificações e ajustes necessários. Inicialmente, uma solução de ZN (2% m/v) foi preparada em solução hidroetanólica (85% v/v) e mantida sob agitação durante a noite (overnight). Posteriormente essa solução foi centrifugada durante 30 minutos a 4.500 rpm, após passou por tratamento térmico por 15 minutos em uma temperatura de 75 °C. Por final a solução foi filtrada utilizando-se filtros de seringa de 0,45 µm - Milipore. Separadamente foi preparado uma solução aquosa de polissorbato 20 (20 mg/mL). Na sequência, 5 mg de TPPU foi dissolvido em 10 mL da solução hidroetanólica ZN. Essa solução foi vertida, sob agitação magnética, em 10 mL de solução de polissorbato 20 para a formação das nanopartículas. O solvente foi removido através de evaporação sob pressão reduzida (Park et al., 2015) utilizando um rotaevaporador. A concentração final de TPPU foi de 0,25 mg/mL. Também foram preparadas nanopartículas contendo a mistura de TPPU e cinamaldeído, seguindo o mesmo procedimento descrito acima, apenas com a adição de 95 µL de cinamaldeído juntamente com o TPPU na solução hidroetanólica de zeína.

4.2.2.3 Síntese de nanocápsulas poliméricas com TPPU revestidas por quitosana (CS)

A preparação das NC foi realizada conforme método de deposição interfacial do polímero descrito por Fessi et al. (1989) e Grillo et al. (2014) com algumas modificações. Para as nanopartículas de PLGA com TPPU, foi dissolvido 100 mg de PLGA, 40 mg de monoestearato de sorbitano e 5mg de TPPU em 30 ml de acetona, que ficaram sob agitação magnética até completa homogeneização. Separadamente, em 30 ml de água deionizada foi diluído 60mg de polissorbato 80, e com auxílio de um funil a fase acética foi vertida sobre a fase aquosa e deixado em agitação por 20 minutos, após a formulação foi levada para rotaevaporador para retirada do solvente, a concentração final de TPPU foi de 0,25 mg/mL. Para o revestimento foi adicionado ao final do processo com auxílio de um funil, 10 ml de uma

solução aquosa de quitosana de acordo com a metodologia descrita por Calvo et al. (1997) com algumas modificações. A solução padrão de quitosana foi preparada na concentração de 500 µg/mL em solução acética (1 mol/L) (FESSI et al., 1989; GRILLO et al., 2013). a concentração final de TPPU foi de 0,25 mg/mL.

4.2.3 Avaliação, caracterização físico-química e morfológica das formulações nanoestruturadas

4.2.3.1 Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta

A técnica de espectroscopia de correlação de fótons foi utilizada para determinação do diâmetro médio e da distribuição de tamanho das nanopartículas (polidispersão). As avaliações do diâmetro médio e polidispersão foram realizadas diluindo-se as suspensões de nanopartículas com água deionizada 100 vezes e, utilizando-se um analisador de partículas ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern®) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25°C.

O valor de potencial zeta, dado em mV foi determinado através do equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). As análises foram realizadas através da diluição das formulações nanoparticuladas 100 vezes em água deionizada sem ajuste do pH, e os resultados expressos por médias de três determinações, como descrito por de Oliveira et al., 2015.

4.2.3.2 Rastreamento das nanopartículas (NP) e nanocápsulas (NC)

Para o rastreamento das NP e NC utilizou-se a técnica de Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA), para visualizá-las e analisá-las através do movimento Browniano e propriedades de dispersão de luz, essa técnica é utilizada para medir a concentração de NP e NC nas formulações, bem como a distribuição e tamanho. As análises foram feitas pela célula volumétrica NanoSight LM 10 contendo laser verde (532 nm) e uma câmera sCMOS, controlados pelo software NanoSight v.2.3 (Malvern® Instruments, UK). As amostras foram diluídas 1000 vezes em água deionizada sem ajuste de pH, e analisadas em triplicata injetando-se 1 mL na cela analítica e foram gravados 5 vídeos de 60 segundos individuais do movimento Browniano de cada replicata em temperatura ambiente (25°C). Os resultados alcançados foram avaliados de acordo com a concentração de partículas em função da distribuição de tamanho (ANDERSON et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2015).

4.2.3.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A morfologia das nanopartículas foi avaliada através da técnica de microscopia de força atômica (AFM). Para o preparo das amostras, estas foram previamente diluídas 1000 vezes em água deionizada sem ajuste de pH e depositadas em superfície de sílica. Após a secagem do material, as amostras foram analisadas no microscópio de força atômica Nanosurf Easy Scan 2 Basic AFM – padrão BT02217 em modo de contato intermitente. Foram utilizados cantilever comercial Contr 10, a velocidade de varredura utilizada é proporcional ao tamanho da área e da frequência (0,6 Hz) (CLEMENTE-NAPIMOGA et al., 2012)

4.2.4. Ensaio de liberação

Para todas as formulações, foram executados ensaios de liberação *in vitro* para avaliar a cinética, os quais utilizou-se sistemas de dois compartimentos para observar a liberação do fármaco livre e quando associados a sistemas carreadores. Os ensaios de liberação de TPPU livre e associado às suspensões nanoparticuladas (PLGA+TPPU; PLGA+TPPU+CS; ZN+TPPU; ZN+TPPU+Cinamaldeído) foram realizadas através de um sistema composto por dois compartimentos, sendo um compartimento doador (3 mL) e outro acceptor (100 mL, solução 5% de polissorbato 20) separados por uma membrana de celulose, mantidos sob agitação leve constante e condições *sink*, onde o volume do meio de dissolução é grande o suficiente para que a concentração da substância presente não chegue a exceder 10% do valor de sua concentração de saturação (Paavola et al., 1995). Aliquotas foram retiradas triplicatas do compartimento acceptor por um período de 120 horas (tempo 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 48, 72, 96 e 120h) e quantificadas pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em triplicata.

4.2.5 Modelagem matemática

A avaliação quantitativa dos eventos envolvidos pode auxiliar a entender os mecanismos envolvidos na liberação de fármaco, como refere Siepmann, (2012), para isso é utilizado o modelo matemático de Baker-Lonsdale, o qual descreve a liberação de fármacos, esse modelo foi desenvolvido a partir do modelo de Higuchi e descreve a liberação de um fármaco a partir de uma matriz esférica, e vem sendo aplicado aos estudos para linearizar resultados de ensaios

de liberação de micropartículas e para nanopartículas (WASHINGTON 1990). A equação conhecida como equação de Baker-Lonsdale (Equação 1) pode ser vista a seguir:

Equação 1: Equação de Baker-Lonsdale

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt$$

onde M_t e M_∞ se referem à quantidade de fármaco liberado no tempo “ t ” e no tempo infinito e k à constante de liberação (Siepmann and Siepmann, 2008).

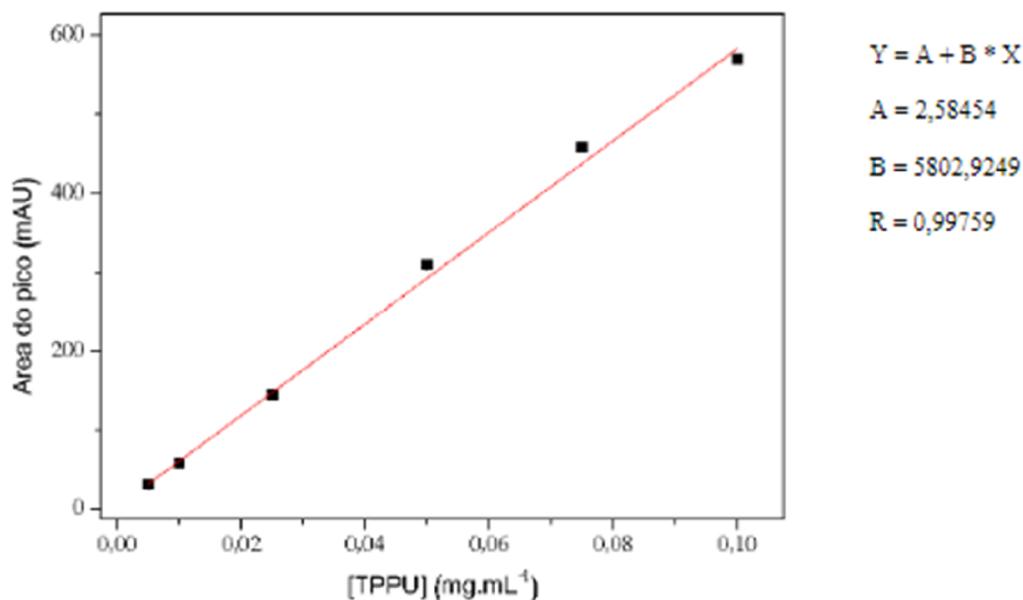
Para análise de desempenho de liberação do TPPU das formulações nanoparticuladas, foi empregado o modelo de Baker-Lonsdale para liberação de fármacos (Melo et al., 2014; Melo et al., 2021).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Metodologia analítica de quantificação do ativo TPPU

A quantificação de TPPU presente nas nanopartículas foi realizada em CLAE, utilizando-se um equipamento HPLC Varian Pro Star, bomba PS 210, detector UV-Vis PS 210, auto injetor PS 210; os cromatogramas foram determinados através do programa Galaxy Workstation. A linearidade da metodologia foi avaliada a partir da regressão linear da curva analítica realizada com concentrações entre 0,05 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3). O coeficiente de correlação (r) foi de **0,99759**. Esse r é um parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, sendo que quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 e todos os nossos valores de correlação linear estão acima deste valor preconizado pela ANVISA, sendo o método, portanto, considerado linear (Brasil, 2003).

Figura 3: Curva analítica do TPPU, e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.



Fonte: Mello et al. (2016)

As condições cromatográficas utilizadas foram consideradas adequadas, pois foi obtido um pico simétrico do ativo, pois as corridas cromatográficas ocorreram em tempos de 6

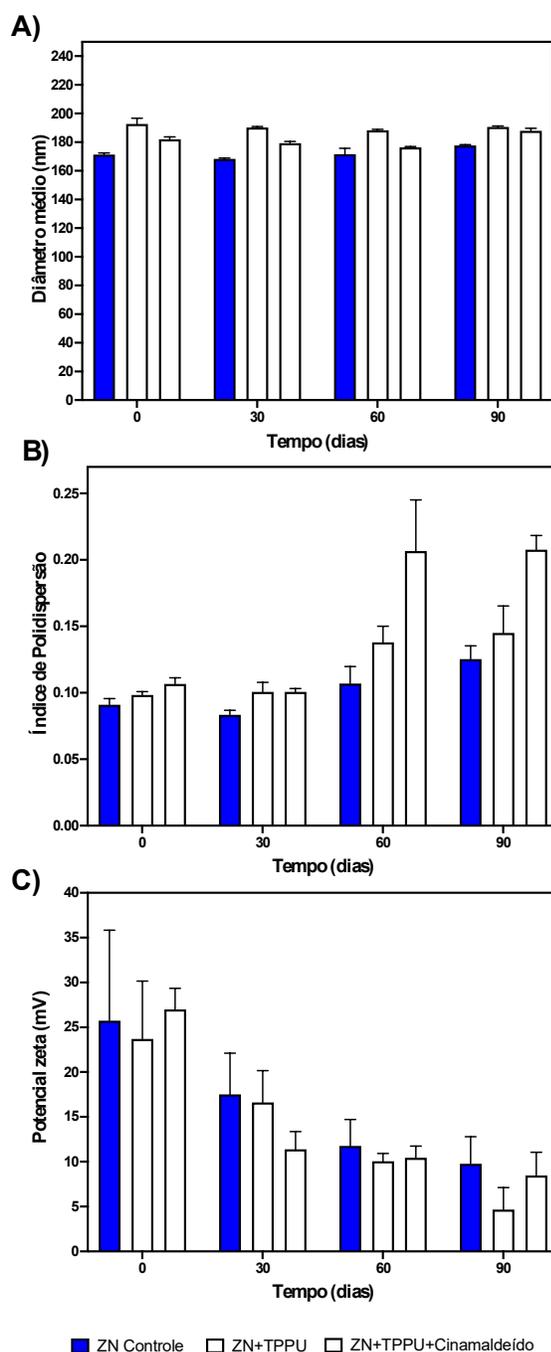
minutos. Dessa forma, o método apresenta especificidade e linearidade, dentro do intervalo de concentração entre 0,05 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de TPPU, sendo aplicável a ensaios de determinação de teor de TPPU em nanopartículas.

5.2 Caracterização e estabilidade

Sistemas de liberação baseados em nanotecnologia tem sido extensivamente estudado afim de melhorar as propriedades físico-química das moléculas, melhorar seu perfil farmacocinético, bem como diminuir a toxicidade. Neste trabalho foram desenvolvidos sistemas de liberação baseados em PLGA e ZN para o carreamento de TPPU. As propriedades físico-químicas, bem como a estabilidade coloidal (até 90 dias) foram avaliadas. Parâmetros físico-químicos como diâmetro médio (nm), índice de polidispersão, potencial zeta (mV) e eficiência de encapsulação (%) foram avaliados.

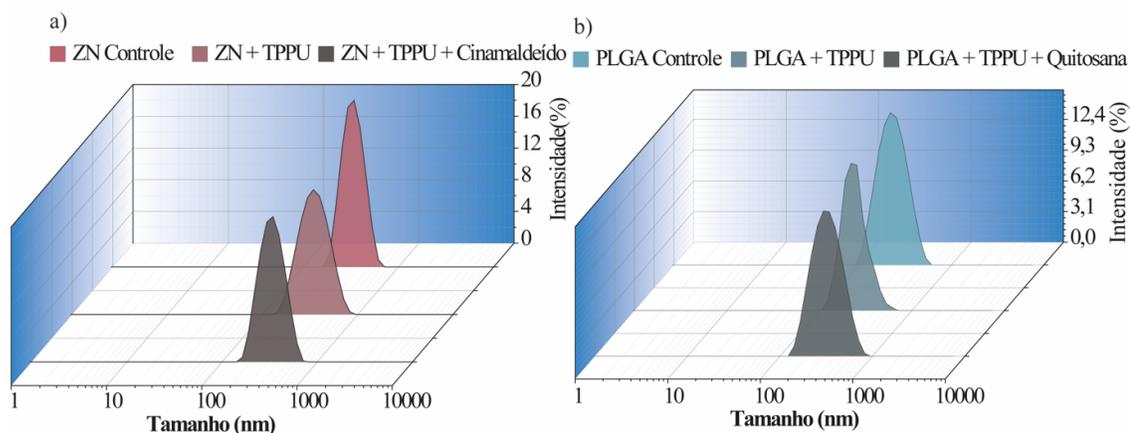
O diâmetro médio inicial das nanopartículas de zeína medidas por espectroscopia de correlação de fótons (Figure 4A) foi de 171 ± 1 nm para as ZN Controle, 192 ± 4 nm para ZN + TPPU e 182 ± 1 nm para ZN + TPPU + Cinamaldeído. Para todos os sistemas estudadas, foram observadas pequenas alterações (não-significativa) no diâmetro médio em função do tempo de armazenamento, o que pode ser atribuídos ao rearranjo dos aminoácidos da cadeia da zeína. As nanopartículas contendo TPPU apresentaram um diâmetro médio ligeiramente maior, quando comparado com as nanopartículas controle, sugerindo que houve uma reorganização das nanopartículas quando o ingrediente ativo foi incorporado.

Figura 4: Caracterização físico-química das nanopartículas de zeína controle (ZN Controle), nanopartículas de zeína contendo TPPU (ZN + TPPU) e nanopartículas de zeína contendo TPPU e cinamaldeído (ZN + TPPU + Cinamaldeído). Os parâmetros analisados foram **a)** diâmetro médio medido (nm); **b)** índice de polidispersão e **c)** potencial zeta (mV). Os valores representam a média de três determinações.



Outro parâmetro analisado foi o índice de polidispersão (PDI) (Figure 4B), o qual indica a distribuição de tamanho das nanopartículas, valores de $PDI \leq 0,2$ indicam sistemas coloidais com distribuição de tamanho homogênea enquanto que valores acima de 0,2 são característicos para sistemas com distribuição de tamanho heterôgena ou mesmo a existência de diferentes populações de partículas. O valor de PDI foi de $0,09 \pm 0,004$ para ZN Controle, $0,09 \pm 0,002$ para ZN + TPPU e $0,106 \pm 0,004$ para ZN + TPPU + Cinamaldeído e apresentaram distribuição de tamanho monomodal (Figure 5A). Não houveram alterações significativas nos valores de PDI para as ZN Controle durante os 90 dias de armazenamento, enquanto que as para ZN + TPPU e ZN + TPPU + Cinamaldeído houveram aumento significativo ($p < 0,05$) do PDI após 30 dias de armazenamento quando comparados com o tempo inicial de cada formulação. Embora não tenha sido observado alterações significativas no diâmetro médio das nanopartículas, aumentos no índice de polidispersão podem estar associados a formação de agregados ou de subpopulações de nanopartículas em função do tempo de armazenamento.

Figura 5: Distribuição de tamanho das formulações de nanopartículas a) zeína e b) PLGA logo após o preparo das nanoformulações (tempo 0).



Fonte: Autoria Própria

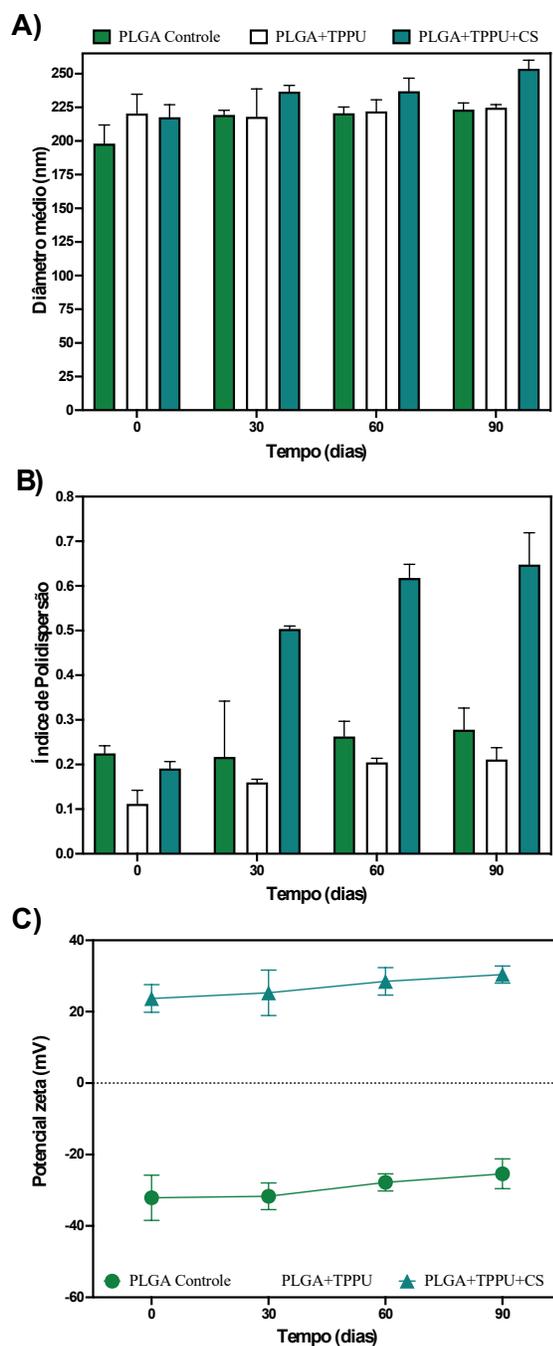
O potencial zeta das nanopartículas de zeína foram positivos, 25 ± 10 , 23 ± 6 e 26 ± 2 , para ZN Controle, ZN + TPPU e ZN + TPPU + Cinamaldeído, respectivamente. Os positivos de potencial zeta podem ser atribuídos às porções de aminoácidos carregados positivamente presentes na estrutura zeína. Para todas as formulações analisadas foram observadas diminuições significativas ($p < 0,05$) nos valores de potencial zeta após 30 dias de

armazenamento. Diminuições nos valores de potencial zeta podem levar a desestabilização dos sistemas coloidais, uma vez que a repulsão eletrostática estará reduzida. Entretanto, as nanopartículas de zeína foram preparadas com surfactante Tween 20, o qual oferece estabilização por impedimento estérico. Desta forma, a estabilização por repulsão eletrostática não é o principal mecanismo de estabilização dos sistemas coloidais produzidos.

Altos valores de eficiência de encapsulação (EE) para o TPPU foram observados para ambas as formulações analisadas, sendo de 86 ± 1 para ZN + TPPU e 87 ± 1.3 para ZN + TPPU + Cinamaldeído. Não houveram diferenças significativas na EE de quando comparado as nanopartículas produzidas com o sem cinamaldeído, o que indica que o TPPU apresentou uma alta afinidade/interação com aminoácidos hidrofóbicos da zeína.

Além das nanopartículas de zeína, também foram preparadas nanopartículas de PLGA contendo TPPU revestidas ou não com quitosana (CS) e os dados de caracterização e estabilidade físico-química estão sumarizados na Figura 6. O diâmetro médio das nanopartículas de PLGA (Figure 6A) no tempo inicial foi de 198 ± 13 , 220 ± 14 e 217 ± 9 para PLGA Controle, PLGA + TPPU e PLGA + TPPU + CS, respectivamente. Assim como observado para as nanopartículas de zeína, as nanopartículas de PLGA apresentaram um ligeiro aumento no diâmetro médio quando o TPPU foi encapsulado quando comparado com as nanopartículas controle. Para todas as formulações de PLGA produzidas, o diâmetro médio permaneceu praticamente estável durante todo o tempo de armazenamento (90 dias), exceto para as nanopartículas PLGA + TPPU + CS, que apresentaram um aumento significativo do diâmetro médio ($p < 0,05$) quando comparado com o diâmetro médio inicial. As nanopartículas de PLGA também apresentaram distribuição de tamanho homogênea (monomodal) sem o aparecimento de subpopulações de partículas (Figura 5B).

Figura 6: Caracterização físico-química das nanopartículas de PLGA controle (PLGA Controle), nanoparticles de PLGA contendo TPPU (PLGA + TPPU) e nanopartículas de PLGA contendo TPPU e revestidas com CS (PLGA + TPPU + CS). Os parâmetros analisados foram **a)** diâmetro médio medido (nm); **b)** índice de polidispersão e **c)** potencial zeta (mV). Os valores representam a média de três determinações.

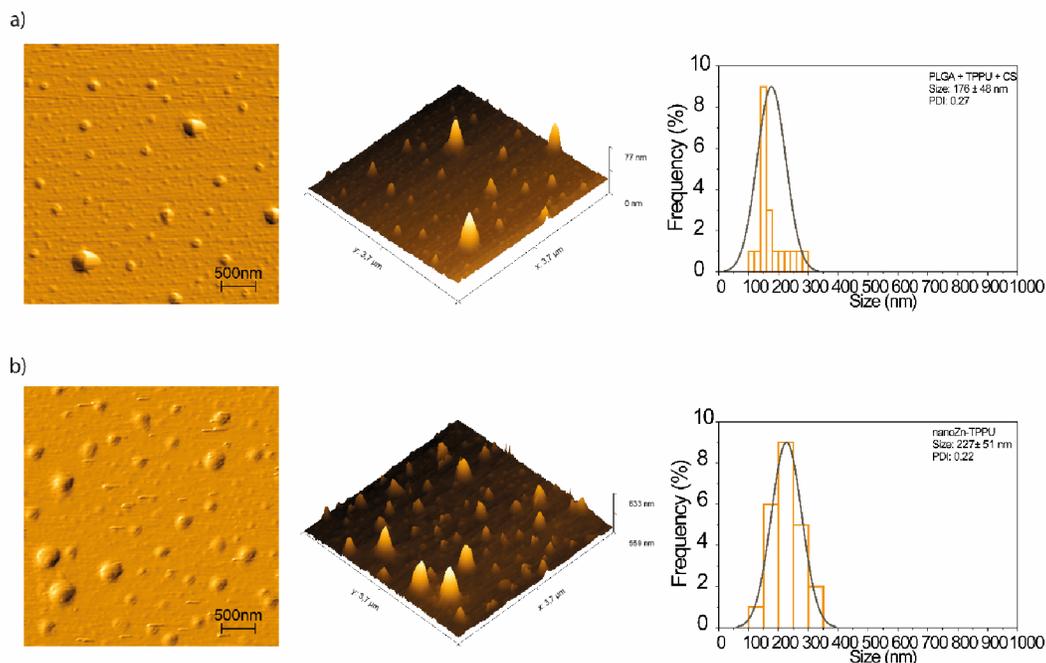


Fonte: Autoria Própria

Em relação ao índice de polidispersão das nanopartículas de PLGA (Figura 6B) todos os sistemas apresentaram um valor de PDI em torno de 0,2 e foram razoavelmente estáveis em função do tempo de armazenamento, exceto para as ZN+TPP+CS, a qual teve um aumento significativo deste parâmetro após 30 dias de armazenamento. Esse aumento do índice de polidispersão para as nanopartículas recoberta com CS podem estar associados ao recobrimento com o polímero que pode levar uma diminuição da estabilização estérica conferida pelo surfactante usado no processo de preparo das nanopartículas. O aumento do índice de PDI corrobora com os dados de diâmetro médio, onde também foram observados aumentos significativos em função do tempo de armazenamento. O potencial zeta (Figure 6C) das nanopartículas de PLGA foram negativos, -32 ± 6 mV e -35 ± 7 mV para PLGA Controle e PLGA + TPPU, respectivamente. O potencial zeta negativo é atribuído aos grupos carboxílicos das moléculas de PLGA, que estão localizados nas superfícies das nanopartículas. Quando as nanopartículas de PLGA contendo TPPU foram revestidas com CS, o valor de potencial zeta foi de $+23 \pm 3$ mV, indicando que as nanopartículas de PLGA foram revestidas com sucesso pelas moléculas de CS. Ambas as nanopartículas de PLGA recobertas ou não com quitosana apresentaram alta eficiência de encapsulação, sendo de $90 \pm 1.4\%$ e $86 \pm 2.4\%$ para as PLGA + TPPU e PLGA + TPPU + CS, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Lu et al. (2019) os quais preparam nanopartículas de PLGA para a liberação de paclitaxel e obtiveram nanopartículas com diâmetro médio de $132,8 \pm 1,5$, PDI de $0,155 \pm 0,03$ e potencial zeta negativo ($-20,8 \pm 1,1$ mV) e após o recobrimento com a quitosana as nanopartículas apresentaram diâmetro de $172,7 \pm 3,2$, PDI de $0,144 \pm 0,06$ e zeta potencial de $+25,6 \pm 0,6$ mV.

Além da caracterização físico-química acima apresentados, também foi realizada a avaliação da morfologia e da distribuição de tamanho das nanopartículas secas por microscopia de força atômica (AFM)

Figura 7: Imagens de microscopia de força atômica das a) PLGA+TPPU+CS e b) ZN+TPPU. Da esquerda para a direita, imagem topográfica, representação 3D da imagem topográfica e distribuição de tamanho. Para distribuição de tamanho, foram medidas aproximadamente 100 partículas usando o software Image J.



Fonte: Autoria Própria

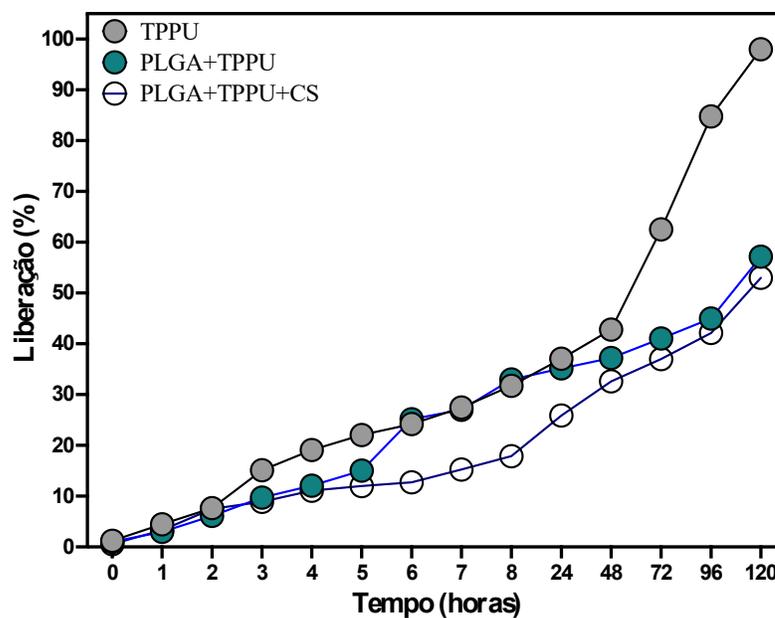
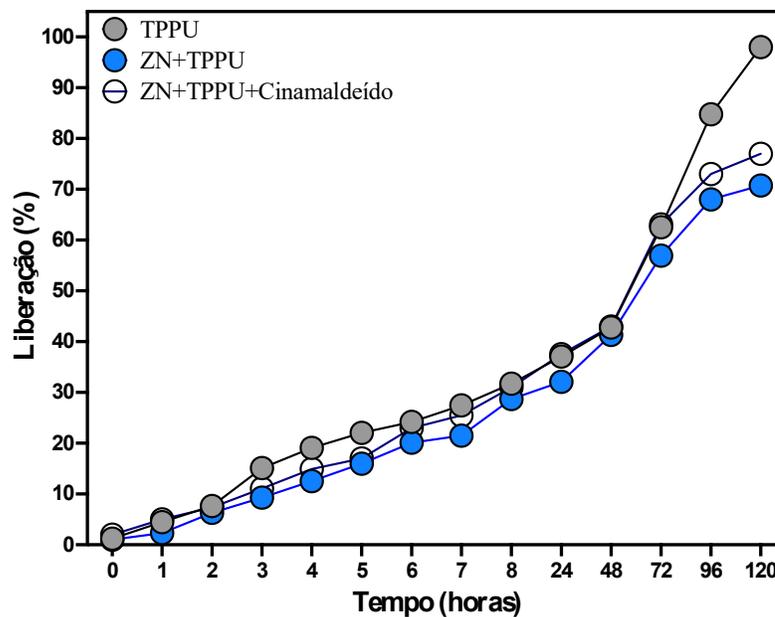
As imagens de AFM das nanopartículas PLGA+TPPU+CS (Figure 7A) e ZN+TPPU (Figure 7B) mostrou quem ambos os sistemas apresentaram morfologia esférica e superfície lisa. De acordo com os gráficos de distribuição de tamanho, PLGA+TPPU+CS e ZN+TPPU mostraram um diâmetro médio de $176 \pm 48 \text{ nm}$ e $227 \pm 51 \text{ nm}$, respectivamente. Os dados de distribuição de tamanho por AFM, ficaram bem similares aos valores de distribuição de tamanho determinados por DLS para ambas as partículas analisadas. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Luis et al. (2020), que relataram nanopartículas esféricas de zeína carregando eugenol e óleo de alho, usando análise AFM.

5.3 Ensaio de liberação

O perfil de liberação do TPPU foi avaliado a partir das suspensões de nanopartículas de zeína e nanopartículas de PLGA em temperatura ambiente. Os dados de liberação do TPPU das

diferentes formulações estão sumarizados na Figura 8. Considerando-se a liberação de TPPU não-encapsulado (bola cinza) é possível observar que houve uma liberação gradual em função do tempo e após 5 dias (120 h) 98% do TPPU foi liberado para o compartimento aceptor. Quando esse composto foi associado as nanopartículas de ZN (Figure 8A - bola azul escura), foi possível observar um retardo na liberação deste composto, significativamente diferente ($p < 0.05$) do composto não encapsulado, em todos os pontos analisados, após 5 dias (120 h) houve uma liberação de aproximadamente 70% do TPPU associado as nanopartículas. Já para as ZN+TPPU+Cinamaldeído (Figure 8A- bola azul clara) não houve diferença significativa da liberação do TPPU quando comparado com o composto não-encapsulado, exceto nos últimos pontos analisados (96 e 120 h). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre o perfil de liberação do TPPU a partir das duas nanopartículas produzidas em nenhum dos tempos estudados. Para as nanopartículas que houve o co-encapsulamento de TPPU e cinamaldeído, a maior liberação do TPPU pode estar relacionada a diminuição da interação deste composto com a matriz polimérica, uma vez que há uma “competição” entre os compostos pela interação com a matriz.

Figura 8: Cinética de liberação in vitro do TPPU a partir das diferentes formulações em temperatura ambiente utilizando sistema de dois compartimentos. **A)** Liberação de TPPU a partir das formulações zeína e **B)** Liberação de TPPU a partir das formulações de PLGA. As análises foram realizadas em triplicatas e quantificadas por HPLC.



Fonte: Autoria Própria

Também foi avaliada a liberação do TPPU a partir das nanopartículas de PLGA (Figure 8B). Ambas as nanopartículas mostraram uma redução significativa da liberação do TPPU quando comparados com o composto não encapsulado, logo nas primeiras horas de experimento. Após 5 horas de experimento foi observada uma liberação de 22%, 15% e 12% para TPPU não-encapsulado, PGA+TPPU e PLGA+TPPU+CS, respectivamente. Diferenças significativas foram observadas na liberação do TPPU a partir das diferentes nanopartículas no período de 6 a 24 horas, onde as nanopartículas recobertas com a CS demonstraram uma liberação mais lenta do que as nanopartículas sem o recobrimento. Após 5 dias, a liberação do TPPU foi de 57% e 52% para PGA+TPPU e PLGA+TPPU+CS, respectivamente.

Para análise do mecanismo de liberação do TPPU presente nas diferentes formulações nanoparticuladas foi utilizado o modelo teórico descrito por Baker-Lonsdale, como mencionado na metodologia. De acordo com este modelo, obteve-se uma linearização dos dados do perfil de liberação. O resultado da regressão linear para as nanopartículas de PLGA+TPPU mostrou um valor de coeficiente de correlação (r) de 0.963 e uma constante de taxa de liberação (k) de $0.347 \times 10^{-2} (\pm 0.002) \text{ min}^{-1}$, para PLGA +TPPU+CS apresentou $r = 0.971$ e uma k de $0.432 \times 10^{-2} (\pm 0.002) \text{ min}^{-1}$. Já para as NP de ZN+TPPU, o r foi de 0,937 e uma k de $0.228 \times 10^{-2} (\pm 0.003)$ e para NP de ZN+TPPU+Cinamaldeído foi $r = 0,887$ e uma k de $0,198 \text{ min}^{-1} \times 10^{-2} (\pm 0.002)$. Os perfis de liberação foram ajustados conforme o modelo de Baker-Lonsdale, derivado do modelo de Higuchi, e que segundo Costa e Souza Lobo (2001) denomina esse mecanismo envolvido na liberação como difusão baseada na Lei de Fick. Com relação aos valores de constante de liberação, o perfil de liberação do fármaco presente nas NC de PLGA foi mais lento comparado as NP de zeína. Estes dados corroboram com os dados de eficiência de encapsulação obtidos para as nanopartículas. Assim, a maior quantidade de fármaco encapsulado faz com que o perfil de liberação seja mais lento (Siepmann and Siepmann, 2008).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As nanoformulações desenvolvidas neste trabalho apresentaram boas características coloidais e estabilidade em função do tempo. Os resultados de microscopia mostram que ambos os sistemas possuem morfologia esférica e diâmetro médio em torno de 200 nm, o que é desejável segundo a literatura. Em relação a eficiência de encapsulação, todos os sistemas mostraram ser hábeis a encapsular o TPPU (entre 86 a 90%). O ensaio de liberação mostrou que há um perfil de liberação sustentada pelos sistemas carreadores em função do tempo, sendo que as nanopartículas de PLGA revestida ou não com CS apresentam uma liberação mais lenta em comparação às nanopartículas de ZN+TPPU e ZN+TPPU+cinamaldeído. Em suma, as nanoformulações desenvolvidas neste trabalho mostram ser uma alternativa para o carreamento do TPPU, com ótimas perspectivas para aplicação farmacêutica, uma vez que, possuem excelentes características coloidais, estabilidade em função do tempo e um perfil de liberação sustentada, o que pode promover uma maior atividade biológica do ativo TPPU.

Devido a afinidade e biocompatibilidade e estrutura química que as diferentes formulações nano estruturadas, as mesmas podem ser utilizadas para tratamento de inflamações distintas, dessa forma como perspectiva de aplicações as NPs de ZN+TPPU+cinamaldeído podem ser destinadas a aplicação de inflamações cutâneas devido a grande afinidade permeável, já as NC de PLGA +TPPU+CS podem ser destinadas a tratamento de inflamações articulares.

Como este trabalho focou na síntese e caracterização dos sistemas nanoparticulado desenvolvidos, é viável outros estudos e métodos de análise para avaliar a segurança, bem como a efetividade terapêutica das mesmas, pois é através desses ensaios que pode-se avaliar taxa de metabolização em um organismo vivo, além da utilização de menores concentrações, de forma a produzir efeito terapêutico, porém com menor toxicidade, resultando em efeito benéfico para controle de quadros inflamatórios.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. C. L.; FURTADO, P. S.; HONORIO, T. S.; HOSSY, B. H.; PÁDUA, M.; DOMINGOS, T. S. F.; CARMO, F. A.; MIGUEL, N. C. A.; RODRIGUES, C. R.; DE SOUSA, P. S.; SATHLER, P. C.; CABRAL, L. M. A synergistic nanoformulation of babassu and copaiba oils as natural alternative for prevention of benign prostatic hyperplasia. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.47, p.67–175, 2018.

ANDERSON, W.; KOZAK, D.; COLEMAN, V. A.; JÄMTING, Å. K.; TRAU, M. A. Comparative Study of Submicron Particle Sizing Platforms: Accuracy, Precision and Resolution Analysis of Polydisperse Particle Size Distributions. **J. Colloid Interface Sci**, v. 405, p. 322–330, 2013.

ASSIS, L.M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technologi**. Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012

BARRETO, R.C.; DINIZ, M.F.F.M.; PEREIRA, G.A.S.; CELANI, H.R.B. Anti inflamatórios Não Hormonais Na Clínica Médica-Odontológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 21, n.1, p. 97-102, 2017.

BEZERRA, T.P.W.; BANDEIRA, A.R.G.; LIMA, S.H.P. de.; ANDRADE, P.L. de. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de fármacos: uma revisão integrativa da literatura. **Investigação, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 11, n. 14, p. e99111436115, 2022.

BISOGNIN, R. P.; WOLFF, D. B.; CASSIMIRI; E. Revisão sobre fármacos no ambiente. **Revista DAE**. v. 66, n.210, p. 78-95, 2018.

BOGER, B.; TONIN, F. S.; ZAMORA, P. G. P.; WAGNER, R.; GOMES, E. C. Micropoluentes emergentes de origem farmacêutica em matrizes aquosas do Brasil: uma revisão sistemática. **Ciência e Natureza**, v.37, n.3, p.725-739, 2015.

BUKHARI, I.A.; MOHAMED, O.Y.; MAHMOOD, A.; ALFADDA, A.A.; ALMOTREFI, A.A.; 1-trifluoromethoxyphenyl-3(1-propionylpiperidin-4-yl) urea (TPPU), a soluble epoxide hydrolase inhibitor attenuates high fat diet-induced cardiovascular and metabolic disorders in rats. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v.25, n.10, p.3835-3847, 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

CADIOLI, L.P.; SALLA, L.D. Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia. **Revista de Ciências Exatas e Tecnologia**, v. 1, n.1, p. 98-105, 2015.

CARDOSO, A. C. A. **Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas contendo óleo de copaíba (*Copaifera spp.*) e avaliação da atividade cicatrizante *in vivo***. Universidade Federal Fluminense, Niterói – Rio de Janeiro, 85f, 2015.

CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; MOREIRA, J. A.; GRILLO, R.; DE MELO, N. F. S.; FRACETO, L. F.; NAPIMOGA, M. H. 15d-PGJ2-Loaded in Nanocapsules Enhance the Antinociceptive Properties into Rat Temporomandibular Hypernociception. **Life Sci**, v. 90, n.23, p.944–949, 2012.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123–133, 2001.

DIAS, B. P.; RIBEIRO, E. M. C.; GONÇALVES, R. SL.; OLIVEIRA, D. S.; FERREIRA, T. H.; SILVA, B. M. A nanotecnologia no Brasil e o desenvolvimento de produtos com atividade antimicrobiana. **Quim. Nova**, v.44, n.8, p.1084-1092, 2021.

FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B.; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v.32, n.4, 2010.

FIGUEIREDO, C. S. S. S.; OLIVEIRA, P. V.; SAMINEZ, W. F. S.; DINIZ, R. M.; RODRIGUES, J. F. S.; DA SILVA, M. S. M.; DA SILVA, L. C. N.; GRISOTTO, M. A. G. Óleo essencial da Canela (Cinamaldeído) e suas aplicações biológicas. **Revista de Investigação Biomédica**, v.9, n.2, p.192-197, 2017.

FITARONI, L. B.; PESSOA, C. L. E. Filmes de amido/argila sepiolita e nanopartículas de prata com propriedades de barreiras aprimoradas. **Brazilian Journal of Development**. v.7, n.6, p.61882-61898, 2021.

GADE, H. A.; EL-RAHMAN, A. A.; HAMDY, G. M. Chamomile oil loaded solid lipid nanoparticles: A naturally formulated remedy to enhance the wound healing. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.50, p.329-338, 2019.

GALUCIO, C. S. **Valoração do óleo-resina de copaíba a partir da destilação Molecular**. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade De Engenharia Química, Campinas – São Paulo, 103p, 2016.

GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules Carrying the Herbicide Atrazine: Effect of Chitosan-Coating Agent on Physico-Chemical Stability and Herbicide Release Profile. **Int. J. Environ. Sci. Technol**, v. 11, n. 6, p. 1691–1700, 2013.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; BHANDARI, B.; HE, Y. Nanoparticle encapsulation of fish oil by spray drying. **Food Research International, Amsterdam**, v. 41, n. 2, p. 172-183, 2008.

JIANG, W.; WANG, D.; DAPENG, F, L.; HUANG, L. Q. Cinnamon essential oil Pickering emulsion stabilized by zein-pectin composite nanoparticles: Characterization, antimicrobial effect and advantages in storage application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.148, n.1, p.1280-1289, 2020.

JIANG, J.; ZHOU, Z.; SHARMA, V. K. Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water - A review from global views. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 292-300, 2013.

KIM, M.E.; NA, J.Y.; LEE, J.S. Anti-inflammatory effects of trans-cinnamaldehyde on lipopolysaccharide-stimulated macrophage activation via MAPKs pathway regulation. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v.40. n.3, p.219-224, 2018.

KLADNIEW, B. R.; MONTOTO, S. S.; SBARAGLINI, M. L.; DI IANNI, M.; RUIZ, M. E.; TALEVI, E.; ALVAREZ, V. A.; DURÁN, N.; CASTRO, G. R.; ISLAN, G. A. Hybrid Ofloxacin/eugenol co-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced and targetable antimicrobial properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v.569, p.1-13, 2019.

KUMAR, A.; SINGH, P.; GUPTA, V.; PRAKASH, B. **Application of nanotechnology to boost the functional and preservative properties of essential oils**. Functional and Preservative Properties of Phytochemicals, cap.8, p.241-267, 2020.

KUMMERER, K. Pharmaceuticals in the Environment. **Annu. Rev. Environ. Resour.**, v. 35, p. 57-75, 2010.

LU, B.; LV, X.; LE, Y. Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles for Control-Released Drug Delivery. **Polymers**, v.11, n.2, p.304, 2019.

LUIS, A. I. S.; CAMPOS, E. V. R.; OLIVEIRA, J. L.; GUILGER-CASAGRANDE, M.; LIMA, R.; CASTANHA, R. F.; CASTRO, V. L. S. S.; FRACETO, L. F. Zein Nanoparticles Impregnated with Eugenol and Garlic Essential Oils for Treating Fish Pathogens. **ACS Omega**, v.5, n.25, p.15557–15566, 2020.

MAGHBOOL, M.; KHOSRAVI, T.; VOJDANI, S.; CHAIJAN, M. R.; ESMAEILE, S.; AMANIF, A.; REZAYAT, F.; AZGOMI, R. N. D.; MEHRABAN, S. S.; HASHEMPUR, M. H. The effects of eugenol nanoemulsion on pain caused by arteriovenous fistula cannulation in hemodialysis patients: A randomized double-blinded controlled cross-over trial.

Complementary Therapies in Medicine, v.52, p.1-6, 2020.

MAHBOOB, T.; NAWAZ, M.; DE LOURDES, P. M. *TIAN-CHIE, T.; SAMUD, C.; SEKARAN, S. D.; WIART, C.; NISSAPATORN, V.* Nanopartículas de PLGA carregadas com ácido gálico - um constituinte de *Leea indica* contra *Acanthamoeba triangularis*. **Scientific Reports**, v.10, n.8954, p.1-12, 2020.

MELO, N. F. S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; PACHECO, M. J.; HAMMOCK, B.D.; NAPIMOGA, M. H.; FRACELO, L. F.; SANTO, A. E.; LIMA, E. A. Nanostructured Mucoadhesive Systems Containing Soluble Epoxy Hydrolase Inhibitor (TPPU) for Buccal Use. **Frontiers in Pharmacology**, 2021.

MELO, N. F. S.; CAMPOS, E. V. R.; MONTAN, M. F.; DE PAULA, E.; DA SILVA, C. M. G.; MARUYAMA, C. R.; STIGLIANI, T. P.; DE LIMA, R.; DE ARAUJO, D. R.; FRACETO, L. F. Characterization of Articaine-Loaded PCL-NC and Solid Lipid Nanoparticles in Hydrogels for Topical Formulations. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, p. 4428–4438, 2018.

MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B. D. EPOXIDE HYDROLASES: Mechanisms, Inhibitor Designs, and Biological Roles. **Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, n. 1, p. 311–333, 2005.

OLIVEIRA, J. P.; CHAVES, L. J.; DUARTE, J. B.; BRASIL, E. M.; JUNIOT, L. T. F.; RIBEIRO, K. O. Teor de proteína no grão em populações de milho de alta qualidade e seus cruzamentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 34, n. 1, p. 45–51, 2007.

OLIVEIRA, M. M. C.; DA SILVA, M. M.; MOREIRA, T. L. M.; COUTO, V. F.; COELHO, Y. N.; NUNES, C. P. O uso crônico de anti-inflamatórios não esteroidais e seus efeitos adversos. **Revista Caderno de Medicina**, v. 2, n.2, p. 90-100, 2019.

PARK, C.-E.; PARK, D.-J.; KIM, B.-K. Effects of a Chitosan Coating on Properties of Retinol-Encapsulated Zein Nanoparticles. **Food Sci. Biotechnol**, v.24, n.5, p.1725–1733, 2015.

PONCIANO, R. C. S.; MARTINS, G. R.; IULIANELLI, G. C. V.; TAVARES, M. I.B. estudo do extrato da canela por nmr em solução/study of cinnamon extract by nmr in solution. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.7, p.43763-43772, 2020.

ROSSI - BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciências e Cultura**, São Paulo, v.60, n.2, 2008.

SANTANA, S. R.; IANCHINI-PONTUSCHKA, R.; HURTADO, F. B.; DE OLIVEIRA1, C. A.; MELO, L. P. R.; SANTOS, G. J. Uso medicinal do óleo de copaíba (*Copaifera sp.*) por pessoas da melhor idade no município de Presidente Médici, Rondônia, Brasil. **Revista Acta Agronômica**, v.63, n.4, p.361-366, 2014.

SAHU, T.; RATRE, Y. K.; CHAUHAN, S.; BHASKAR, L. V. K. S.; NAIR, M. P.; VERMA, H. K. Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.63, p. 1-15, 2021.

SARETO, P.; SOBIESZCZANSKA, B.; WYSOKINSKA, E.; GASIOR-GLOGOWSKA, M.; KALAS, W.; PODBIELSKA, H.; WAWRZYNSKA, M.; KOPACZYNSKA, M. In vitro examinations of the anti-inflammatory interleukin functionalized polydopamine based biomaterial as a potential coating for cardiovascular stents. **Biocybernetics and Biomedical Engineering**, v.43, N.1, p.369-385, 2023.

SCOTT, K. A.; QURESHI, M. H.; COX, P. B.; MARSHALL, C. M.; BELLAIRE, B. C.; WILCOX, M.; STUART, B. A. R.; NJARDARSON, J. T. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.63, n.24, p.15449-15482, 2020.

SCHULZ, P. A. Nanomateriais e a interface entre nanotecnologia e ambiente. **Vigil Sanit Debate**, v.1, n.4, p53-58, 2013.

SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata Thunb.*). **Revista Ceres**, v. 57, n.5, p. 589-594, 2010.

SINGH, D. P. BORSE, S. P. NIVSARKAR, M. Clinical importance of nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy: the relevance of tumor necrosis factor as a promising target. **Translational Research**, v.175, p.76-91, 2016.

SYAFIQ, R.; SAPUANA, S.M.; ZUHRI, M. R. M. Antimicrobial activity, physical, mechanical and barrier properties of sugar palm based nanocellulose/starch biocomposite films incorporated with cinnamon essential oil. **Journal of Materials Research and Technology**, v.11, p.144-157, 2021.

VIEIRA, F. S. Possibilidades de contribuição do farmacêutico para a promoção da saúde. **Ciênc. saúde coletiva**, v.12, n.1, p.213-220,2007.

ZHANG, L.; XU, S.; WU, X.; MUSE, F. M.; CHEN, M.; CAO, Y.; UAN, J.; CHENG, Z.; YI, X.; HAN, Z. Protective Effects of the Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor 1-Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-Propionylpiperidin-4-yl) Urea in a Rat Model of Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 182-193, 2020

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**. p.1-12, 1990.