

Talitha Caldas dos Santos

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMA  
FITOTERÁPICO NANOESTRUTURADO DE *Cecropia glaziovii*  
Snethyl PARA O TRATAMENTO DO HERPES LABIAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutora em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Angela Machado de Campos.

Coorientadora: Prof. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões.

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Talitha Caldas dos

Desenvolvimento e caracterização de sistema fitoterápico nanoestruturado de CECROPIA GLAZIOVII Snethl para o tratamento do herpes labial / Talitha Caldas dos Santos ; orientadora, Angela Machado de Campos ; coorientadora, Cláudia Maria Oliveira Simões. - Florianópolis, SC, 2016. 229 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. CECROPIA GLAZIOVII Snethl. 3. Nanopartículas poliméricas. 4. Atividade anti-herpética. 5. Nanocompósitos de quitosana. I. Campos, Angela Machado de. II. Simões, Cláudia Maria Oliveira. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Talitha Caldas dos Santos

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMA  
FITOTERÁPICO NANOESTRUTURADO DE *Cecropia glaziovii* Snethl  
PARA O TRATAMENTO DO HERPES LABIAL**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutora em Farmácia”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Farmácia.

Florianópolis, 29 de Setembro de 2016.

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Dra.  
Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Farmácia

Orientadora

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Angela Machado de Campos, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Coorientadora

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Cláudia Maria Oliveira Simões, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

**Banca Examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Betina Zanetti Ramos, Dra.  
Nanovetores

\_\_\_\_\_  
Prof. Helder Ferreira Teixeira, Dr.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Simone Gonçalves Cardoso, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Simone Quintana de Oliveira, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Prof. Thiago Caon, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



## AGRADECIMENTOS

O sentimento que me move neste momento é o de total agradecimento pela oportunidade de fazer parte deste trabalho com todos que me ajudaram e orientaram.

À Angela por me acolher e orientar, sou grata por tudo que fizemos, por sua amizade e confiança. Tenha certeza que suas orientações serviram para meu crescimento profissional e pessoal.

À Cláudia por aceitar fazer parte do meu trabalho, obrigada por compartilhar seus conhecimentos, seu tempo e colaboração, obrigada pelo seu “sim” e por fazer a diferença no meu trabalho. Foi uma experiência enriquecedora trabalhar com você!

Ao Flávio em especial pela colaboração, pelos incentivos e conselhos. Foi um prazer trabalhar com você e sua equipe!

Aos “NanoColegas” da farmacotécnica, os professores e técnicos pelos momentos de partilha e convivência diária. Aos colegas do LVA, que me receberam maravilhosamente bem, me acolheram e me ensinaram a rotina do laboratório. Aos colegas da Farmacognosia, por compartilharem comigo equipamentos, espaço, conhecimento, e muitos momentos alegres!! Desejo muito sucesso na carreira de cada um de vocês!!

A Carmen Mijangos por recibirme en su laboratorio, gracias por su paciencia, dedicación y motivación. Ha sido un privilegio poder pasar mi instancia en un sitio tan agradable.

A los colegas del ICTP que me han recibido con tanto cariño, agradezco todos los momentos juntos, los paseos, las clases de español, el momento “Taper Deluxe VIP”. Siempre me recordaré de vosotros!!! Muchas gracias!!!!

Muito especialmente às minhas amigas cecropianas, Caroline e Mariana, dividir a bancada com vocês foi enriquecedor, obrigada pelas partilhas, ajudas e apoios!!! E ao André pelo agradável tempo de convivência e amizade! Sucesso sempre para vocês!!

À minha família por exatamente tudo! Por sempre me apoiarem, me entenderem, me respeitarem e por estarem sempre ao meu lado, porque é isso que me faz ter forças e vontade de seguir em frente e fazer o que eu gosto! Amo vocês, pai, mãe, Elba e Caroline!!!!

Ao Cristian pela incansável paciência, por acreditar em mim, pelos conselhos e por me compreender. Muito obrigada por ser sempre meu fiel companheiro.



## RESUMO

Estudos utilizando folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl evidenciaram grande potencial anti-herpético relacionado, principalmente, aos compostos fenólicos presentes nesta espécie. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi aliar o potencial terapêutico desta planta associado a novas estratégias tecnológicas, tal qual desenvolvimento de nanopartículas (NPs) a serem empregadas na elaboração de um medicamento fitoterápico. Neste trabalho, o preparo de fração enriquecida em flavonoides (FEF-Cg) a partir desta planta foi padronizado. A avaliação da atividade antiviral contra o vírus HSV-1 da FEF-Cg evidenciou um índice de seletividade  $> 106,33$ . NPs de PLGA contendo a FEF-Cg, preparadas por dupla emulsão seguida da evaporação do solvente, apresentaram diâmetro médio de  $205,2 \pm 1,2$  nm, PDI  $0,15 \pm 5,44$ , potencial zeta de  $-35,59 \pm 5,33$  mV e valores de EE de  $64,65 \pm 3,09\%$ , com um teor de  $0,65 \pm 3,14\%$  em fração. Um estudo de estabilidade, realizado em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) por 60 dias, demonstrou maior estabilidade para o sistema contendo os surfactantes monooleato de sorbitano e poloxamer 188 nas fases orgânica e aquosa, respectivamente. Estudos do perfil de liberação e da degradação do polímero demonstraram uma liberação controlada da FEF-Cg através da matriz polimérica e uma redução significativa na massa molar do polímero durante 21 dias. Estas NPs não exibiram citotoxicidade em células Vero nas concentrações testadas e apresentaram um potencial efeito anti-herpético contra o vírus HSV-1. Filmes e hidrogéis termossensíveis de quitosana foram preparados com quatro concentrações de NPs de PLGA (1, 3, 5 e 10%, m/m) e caracterizados quanto a sua morfologia, propriedades químicas e mecânicas e citotoxicidade. Diferentes concentrações de  $\text{NaHCO}_3$  foram utilizadas na preparação de hidrogel de quitosana visando obter um hidrogel termossensível homogêneo. A caracterização das formulações mostrou que todos os hidrogéis exibiram propriedades termossensíveis alterando de um comportamento líquido à  $25^{\circ}\text{C}$  para um comportamento de gel à  $37^{\circ}\text{C}$ . Em resumo, os filmes e hidrogéis nanocompósitos demonstraram ser promissores como sistemas de liberação no tratamento de infecções por herpes.

**Palavras-chave:** Nanopartículas poliméricas. *Cecropia glaziovii* Snethl. Flavonoides C-glicosídeos. Atividade antiviral. Herpes Simplex Vírus, HSV-1. Filme de quitosana. Hidrogel termossensível de quitosana.





## ABSTRACT

Studies employing *Cecropia glaziovii* Snethl leaves have shown great potential regarding its antiherpes activity, mainly related to the phenolic compounds present in this species. Thus, the main goal of this work was to combine the therapeutic potential of this species to new technological strategies targeting at the development of an herbal nanoparticulate system (NPs) to be used in the preparation of a phytotherapeutic formulation. In this work the preparation procedures for the EFF-Cg were standardized. The antiviral activity was tested against HSV-1, the results for selectivity index values was  $> 106.33$ . PLGA NPs containing the EFF-Cg were prepared using the double-emulsion evaporation method and it presented a mean diameter of  $205.2 \pm 1.2$  nm, PDI of  $0.15 \pm 5.44$ , zeta potential of  $-35.59 \pm 5.33$  mV, EE value of  $64.65 \pm 3.09\%$  and EFF-Cg load of  $0.65 \pm 3.14\%$ . A stability study of the formulations performed in room temperature ( $25^{\circ}\text{C}$ ) for 60 days, demonstrated highest colloidal stability using the sorbitan monooleate and the poloxamer 188 surfactant in the organic and aqueous phases, respectively. Drug delivery study and polymer degradation demonstrated a controlled release of the drug through the polymer matrix and a significant reduction of molecular weight of the polymer at 21-day period. These NPs not exhibit cytotoxicity over Vero cells and presented a potential antiherpes effect against HSV-1 virus. The chitosan films and chitosan thermosensitive hydrogels were prepared with four different concentrations of PLGA NPs (1, 3, 5 and 10%, w/w) and were characterized in term of morphology, chemical, mechanical properties and cytotoxicity. Chitosan thermosensitive hydrogel was prepared with different  $\text{NaHCO}_3$  concentrations to choice the optimal condition to obtain homogeneous thermosensitive hydrogel. The formulations were characterized and the results showed that all hydrogels exhibited thermosensitive property, changing from liquid-like behavior at  $25^{\circ}\text{C}$  to gel-like behavior at  $37^{\circ}\text{C}$ . In summary, films and hydrogels nanocomposites demonstrated a promising system for the effective drug delivery in the treatment of herpes infections.

**Keywords:** Polymeric nanoparticles. *Cecropia glaziovii* Snethl. C-glycosylflavonoids. Antiviral activity. Herpes Simplex Virus, HSV-1. Chitosan film. Chitosan thermosensitive hydrogel.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Folhas e inflorescência de <i>Cecropia glaziovii</i> Sneath coletadas na Unidade de Conservação Ambiental Desterro.....	30
<b>Figura 2:</b> Compostos fenólicos majoritários presentes no extrato aquoso de <i>Cecropia glaziovii</i> . .....	32
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da estrutura básica do HSV-1, composta por um envelope lipídico (1), tegumento (2), nucleocapsídeo (capsídeo + ácido nucleico) (3), DNA de fita dupla (4), capsídeo icosaédrico (5) e glicoproteínas (6). .....	34
<b>Figura 4:</b> Seleção das regiões de acordo com a Organização Mundial da Saúde. ....	36
<b>Figura 5:</b> Esquema de preparação de nanopartículas poliméricas pela técnica de dupla emulsão. Onde FAI representa fase aquosa interna; FO, fase orgânica e FAE, fase aquosa externa. ....	39
<b>Figura 6:</b> Preparação de nanopartículas poliméricas pela técnica de nanoprecipitação. ....	40
<b>Figura 7:</b> Estrutura química da quitosana. ....	43
<b>Figura 8:</b> Estrutura de nanocompósito polimérico em formas farmacêuticas como filme e hidrogel. ....	45
<b>Figura 9:</b> Esquema de preparação de filme polimérico por evaporação do solvente ( <i>casting</i> ). ....	47
<b>Figura 10:</b> Curva do teste de tração do filme nanocompósito contendo 3% de nanopartículas (Ch-3% NP) (Capítulo 3). ....	51
<b>Figura 11:</b> Hidrogel termossensível de quitosana com NaHCO <sub>3</sub> antes da gelificação em temperatura ambiente (a) e depois da gelificação à 37°C (b). ....	56
<b>Figura 12:</b> Representação gráfica de um resultado típico de um teste de varredura de tensão, nos quais os módulos elástico e viscoso são representados em função da tensão/deformação aplicada. ....	60
<b>Figura 13:</b> Esquema representativo da obtenção da fração rica em flavonoides C-glicosídeos (FEF-Cg). ....	85
<b>Figura 14:</b> Valores médios para teores de ISOO (a) e ISOV (b) nas amostras de fração preparadas com diferentes condições de partição dos extratos aquoso e etanólico. ....	92
<b>Figura 15:</b> Cromatograma do extrato bruto etanólico de <i>C. glaziovii</i> . ....	95
<b>Figura 16:</b> Cromatograma da fração enriquecida de <i>C. glaziovii</i> . ....	95
<b>Figure 17:</b> Cumulative release of EFF-Cg from PLGA nanoparticles (dash line) and free EFF-Cg (solid line) in phosphate buffered saline pH 7.4 at 37°C during 24 h. ....	113

<b>Figure 18:</b> Isoorientin content on the supernatant of the formulations after 60 days of storage at room temperature .....	118
<b>Figure 19:</b> HPLC chromatograms of EFF-Cg present in the formulation supernatant (F1 formulation). .....	119
<b>Figure 20:</b> SEM images of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles obtained with different surfactants: (a) NP-PLU, (b) NP-PVA and (c) NP-CNC.....	142
<b>Figure 21:</b> Thermogravimetric profiles of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles prepared with PLU, PVA and CNC as surfactant .....	143
<b>Figure 22:</b> <i>In vitro</i> release of EFF-Cg from NP-PLU at 37°C. ....	144
<b>Figure 23:</b> Effect of change in molecular weight (MW) of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles (a), and gel permeation chromatography elution profiles of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles (b). ....	145
<b>Figure 24:</b> SEM images of EFF-Cg-loaded-nanoparticles morphology change during degradation in PBS at 37°C. (a) 7-day, (b) 14-day and (c) 21-day period. ....	146
<b>Figure 25:</b> Histogram representing the size distribution of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles. ....	162
<b>Figure 26:</b> Ch-pure (left) and Ch-10% NP nanocomposite (right).....	163
<b>Figure 27:</b> FTIR spectra of Ch-pure, Ch-1% NP, Ch-3% NP, Ch-5% NP, Ch-10% NP nanocomposites and EFF-Cg-loaded PLGA NPs.....	164
<b>Figure 28:</b> The panel presents the SEM image of criofracture of samples: (a) Ch -1% NP; (b) Ch-3% NP; (c and d) Ch-5% NP and inset shows a PLGA nanoparticle immerse in the chitosan matrix, (e) Ch-10% NP and (f) Ch-pure film. ....	166
<b>Figure 29:</b> Mechanical properties of Ch-pure, Ch-1% NP, Ch-3% NP, Ch-5% NP, Ch-10% NP nanocomposites; (a) Elastic modulus, (b) Tensile strength, (c) Elongation at break. ....	168
<b>Figure 30:</b> Storage modulus and $\tan \delta$ of (□) Ch-pure film, (●) Ch-1% NP, (▲) Ch-3% NP, (▼) Ch-5% NP and (■) Ch-10% NP films. ....	170
<b>Figure 31:</b> Cytotoxicity MTT assay performed with: Ch-pure and Ch-10% NP films (a) and EFF-Cg-loaded PLGA NPs (b) .....	171
<b>Figure 32:</b> Visual aspect of the chitosan solution/NaHCO <sub>3</sub> mixture after gelation time in oven at 37°C. ....	188
<b>Figure 33:</b> FT-IR spectra of chitosan powder and NaHCO <sub>3</sub> (a), and freeze-dried Ch-pure hydrogel, nanocomposite hydrogels and EFF-Cg-loaded nanoparticles (b). ....	191

<b>Figure 34:</b> SEM images of the freeze-dried samples: Ch-pure (a); Ch-1% NP (b); the Ch-3% NP (c) and PLGA NP immersed in the chitosan matrix hydrogel in Ch-10% NP (d).....	192
<b>Figure 35:</b> Elastic modulus ( $G'$ – hollow symbol) and viscous modulus ( $G''$ – solid symbol) as a function of strain for Ch-pure hydrogel (black line), Ch-1% NP (red line), Ch-3% NP (blue line), Ch-5% NP (green line) and Ch-10% NP (pink line) nanocomposite hydrogels.....	194
<b>Figure 36:</b> Elastic modulus ( $G'$ – hollow symbol) and viscous modulus ( $G''$ – solid symbol) as a function of frequency for Ch-pure hydrogel (black line), Ch-1% NP (red line), Ch-3% NP (blue line), Ch-5% NP (green line) and Ch-10% NP (pink line) nanocomposite hydrogels; and elastic modulus as a function of nanoparticles concentration (b).....	195
<b>Figure 37:</b> Elastic modulus ( $G'$ – hollow symbol) and viscous modulus ( $G''$ – solid symbol) as a function of temperature Ch-pure hydrogel (black line), Ch-1% NP (red line), Ch-3% NP (blue line), Ch-5% NP (green line) and Ch-10% NP (pink line) nanocomposite hydrogels....	198
<b>Figure 38:</b> Cytotoxicity evaluation of Ch-pure hydrogel (●) and Ch-10% NP nanocomposite hydrogel (■) on Vero cell line .....	199



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Teor dos marcadores ISOO e ISOV após tratamento com resinas de troca iônica XAD-2 e XAD-16.....	89
<b>Tabela 2:</b> Características físicas da área superficial, diâmetro de poro e volume de poro das resinas Amberlite® XAD-2 e XAD-16.....	90
<b>Tabela 3:</b> Comparação entre os tratamentos sem partição, partição com acetato etila/ <i>n</i> -butanol e partição com <i>n</i> -butanol dos extratos etanólico e aquoso. Significância dos resultados avaliados pelo teste ANOVA e comparação entre grupos pelo teste de Bonferroni. ....	93
<b>Tabela 4:</b> Concentração dos marcadores ISOO e ISOV em mg por gramas de extrato bruto após preparo da fração sem e com partição. ...	93
<b>Tabela 5:</b> Análise de Variância seguida de teste de Bonferroni para múltiplas comparações entre as amostras avaliadas na partição para padronização do preparo da FEF-Cg (SPSS Statistics 17.0). ....	94
<b>Table 6:</b> Formulations factors and parameter variations for stability study at room temperature. ....	110
<b>Table 7:</b> Properties of nanoparticles prepared by double emulsion (DE) and nanoprecipitation (NP) techniques containing 10, 20, 30 or 40 mg of EFF-Cg. ....	112
<b>Table 8:</b> Qualitative evaluation of PLGA nanoparticles after 60 days of storage at room temperature. ....	114
<b>Table 9:</b> Size, PDI and zeta potential values determined by dynamic light scattering and laser-Doppler anemometry, respectively, during the stability study under storage at room temperature. ....	116
<b>Table 10:</b> Size and PDI values evaluated by the laser diffraction technique after 60 days under storage at room temperature. ....	117
<b>Table 11:</b> Thermal gravimetric analysis properties of the pure chitosan film, nanocomposites films and PLGA nanoparticles. ....	164
<b>Table 12:</b> Factors and parameter of the formulations for chitosan hydrogel formation. ....	187
<b>Table 13:</b> Thermal gravimetric analysis properties of the chitosan power, pure chitosan hydrogel and nanocomposite hydrogels. ....	190
<b>Table 14:</b> Loss tangent ( $\tan \delta$ ) of formulations at different frequencies at 37°C. The values represents the mean $\pm$ standard deviation. ....	196





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CC<sub>50</sub>** – Cytotoxic concentration, concentration that reduce cell viability by 50%; concentração citotóxica, concentração capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%
- CI<sub>50</sub>** – Inhibitory concentration, concentration that reduce viral replication by 50%; concentração inibitória, concentração capaz de inibir 50% da replicação viral
- CNC** – Cellulose nanocrystal; celulose nanocristalina
- DMA** – Dynamic mechanical analysis, análise dinâmico-mecânica
- DMSO** – Dimethyl sulfoxide, dimetilsulfóxido
- EE** – Encapsulation efficiency, eficiência de encapsulação
- EFF-Cg** – Enriched flavonoid fraction of *Cecropia glaziovii* Snethl
- FEF-Cg** – Fração enriquecida em flavonoides de *Cecropia glaziovii* Snethl
- ISOO** – Isoorientin, isoorientina
- ISOV** – Isovitexin, isovitexina
- MEM** – Minimal Essential Medium, Meio Essencial Mínimo
- MTT** – brometo de [3 (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio], sal de tetrazólio
- MW** – Molecular weight; peso molecular
- NPs** – Nanoparticles, nanopartículas
- PDI** – Polydispersity index, índice de polidispersão
- PLA** – Polylactic acid, ácido poliláctico
- PGA** – polyglycolic acid, ácido poliglicólico
- PLGA** – Poly (lactic-co-glycolic acid), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
- PLU** – Poloxamer 188
- PVA** – Polyvinyl alcohol, álcool polivinílico
- SPAN 80** – Sorbitan monooleate, monooleato de sorbitano
- TGA** – Thermogravimetric analysis, análise termogravimétrica



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1. OBJETIVOS .....	27
1.1.1. Objetivo geral .....	27
1.1.2. Objetivos específicos .....	27
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
2.1. O GÊNERO <i>CECROPIA</i> .....	29
2.2. HERPES SIMPLES .....	33
2.3. SISTEMAS NANOESTRUTURADOS .....	37
2.4. QUITOSANA .....	42
2.5. NANOCOMPÓSITOS .....	45
2.5. FILMES .....	46
2.5.1. Espessura .....	49
2.5.2. Propriedades mecânicas .....	49
2.5.3. Análise dinâmico-mecânica .....	51
2.5.4. Absorção de água .....	52
2.5.5. Morfologia.....	52
2.6. HIDROGÊIS .....	53
<b>3. REFÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>

### CAPÍTULO 1

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>83</b>
<b>2. MÉTODOS</b> .....	<b>84</b>
2.1. PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FLAVONOIDES C-GLICOSÍDEOS .....	84
2.2. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	86
2.2.1. Ensaio colorimétrico por Sulforrodamina B.....	86
2.2.2. Método de exclusão do corante azul de tripano.....	87
2.3. AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL .....	87
2.3.1. Ensaio de redução do número de placas de lise .....	87
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	88
<b>3. RESULTADOS DE DISCUSSÃO</b> .....	<b>88</b>
3.1. PADRONIZAÇÃO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FLAVONOIDES C-GLICOSÍDEOS .....	88
3.1.1. Avaliação comparativa da eficiência de extração dos marcadores ISOO e ISOV pelas resinas de troca iônica Amberlite® XAD-2 e XAD-16 .....	89
3.1.2. Avaliação da influência da partição do extrato bruto na obtenção da FEF-Cg.....	91

3.2. AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	96
<b>3.2.1. Determinação da citotoxicidade.....</b>	<b>96</b>
<b>3.2.2. Ensaio de redução do número de placas de lise.....</b>	<b>97</b>
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>98</b>

## CAPÍTULO 2

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>105</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>106</b>
2.1. EXTRACTION AND PREPARATION OF ENRICHED FLAVONOIDS FRACTION OF <i>CECROPIA GLAZIOVII</i> SNETHL .....	107
2.2. HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYSIS .....	108
2.3. DETERMINATION OF EFF-Cg SOLUBILITY .....	108
2.4. DEVELOPMENT OF PLGA NANOPARTICLES .....	108
2.5. NANOPARTICLES CHARACTERIZATION .....	109
<b>2.5.1. Particles size, size distribution and zeta potential.....</b>	<b>109</b>
<b>2.5.2. Encapsulation efficiency (EE) and drug loading capacity....</b>	<b>109</b>
<b>2.5.3. <i>In vitro</i> drug release .....</b>	<b>109</b>
2.6. PLGA NANOPARTICLES STABILITY AT ROOM TEMPERATURE .....	110
2.7. STATISTICAL ANALYSIS.....	111
<b>3. RESULTS .....</b>	<b>111</b>
3.1. DETERMINATION OF EFF-Cg SOLUBILITY .....	111
3.2. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF PLGA NP	111
<b>3.2.1. Influence of the surfactants in the external aqueous phase..</b>	<b>112</b>
<b>3.2.2. <i>In vitro</i> drug release .....</b>	<b>113</b>
<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>119</b>
4.1. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF PLGA NANOPARTICLES .....	119
<b>4.1.1. Influence of the surfactants in the external aqueous phase..</b>	<b>121</b>
<b>4.1.2. <i>In vitro</i> drug release.....</b>	<b>122</b>
4.2. STUDY OF PLGA NANOPARTICLES STABILITY AT ROOM TEMPERATURE .....	122
<b>5. CONCLUSION .....</b>	<b>124</b>
<b>6. REFERENCES.....</b>	<b>125</b>

## CAPÍTULO 3

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>135</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>136</b>
2.1. MATERIALS .....	136
2.2. QUANTIFICATION OF THE EFF-Cg .....	137
2.3. PREPARATION OF PLGA NANOPARTICLES.....	137
2.4. DETERMINATION OF NANOPARTICLES SIZE, POLYDISPERSIVITY INDEX AND ZETA POTENTIAL.....	138
2.5. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY .....	138
2.6. THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS .....	138
2.7. ESTIMATION OF LOADING CAPACITY .....	138
2.8. PERCENT YIELD OF THE NPs FORMULATION .....	138
2.9. <i>IN VITRO</i> DRUG RELEASE.....	139
2.10. NANOPARTICLES DEGRADATION STUDY .....	139
2.11. CYTOTOXICITY ASSAY.....	139
2.12. ANTIHERPES ACTIVITY .....	140
2.13. STATISTICAL ANALYSIS .....	140
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>140</b>
3.1. PREPARATION OF PLGA NANOPARTICLES .....	140
3.2. CHARACTERIZATIONS OF THE NANOPARTICLES.....	141
3.2.1. Nanoparticles size, PDI, zeta potential, loading capacity and scanning electron microscopy.....	141
3.2.2. Thermal analysis .....	142
3.2.3. <i>In vitro</i> drug release and nanoparticles degradation study.	143
3.2.4. Cytotoxicity assay .....	146
3.2.5. Antih herpes activity .....	147
<b>4. CONCLUSION.....</b>	<b>148</b>
<b>5. REFERENCES .....</b>	<b>148</b>

## CAPÍTULO 4

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>157</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>158</b>
2.1. MATERIALS .....	158
2.2. PLGA NANOPARTICLES PREPARATION.....	158
2.3. CHITOSAN NANOCOMPOSITE PREPARATION .....	159
2.4. FILM CHARACTERIZATION .....	159
2.4.1. Fourier transform infrared .....	159
2.4.2. Thermogravimetric analysis.....	159

2.4.3. Scanning electron microscopy.....	160
2.4.4. Film thickness.....	160
2.4.5. pH determination.....	160
2.4.6. Water absorption test.....	160
2.4.7. Mechanical properties.....	160
2.4.8. Dynamic mechanical thermal analysis.....	161
2.4.9. Cytotoxicity assay.....	161
2.5. STATISTICAL ANALYSIS.....	161
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>162</b>
3.1. PLGA NPs PREPARATION AND CHARACTERIZATION.....	162
3.2. NANOCOMPOSITE CHARACTERIZATION.....	162
3.2.1. Fourier transform infrared.....	163
3.2.2. Thermogravimetric analysis.....	164
3.2.3. Scanning Electron Microscopy (SEM).....	165
3.2.4. Water absorption test.....	166
3.2.5. Mechanical properties: Tensile testing and dynamic mechanical thermal analysis.....	167
3.2.6. Cytotoxicity assay.....	170
<b>4. CONCLUSION.....</b>	<b>171</b>
<b>5. REFERENCES.....</b>	<b>172</b>

## CAPÍTULO 5

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>181</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>182</b>
2.1. MATERIALS.....	182
2.2. PREPARATION OF PLGA NANOPARTICLES.....	183
2.3. PREPARATION OF CHITOSAN HYDROGEL.....	183
2.4. PREPARATION OF NANOCOMPOSITES HYDROGELS.....	184
2.5. CHARACTERIZATION OF THE NANOCOMPOSITES HYDROGELS.....	184
2.5.1. Thermogravimetric analysis.....	184
2.5.2. Fourier transform infrared.....	184
2.5.3. Scanning electron microscopy.....	184
2.5.4. pH determination.....	185
2.5.5. Rheology.....	185
2.5.6. Cytotoxicity assay.....	185
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>186</b>
3.1. PLGA NANOPARTICLES PREPARATION AND CHARACTERIZATION.....	186

3.2. PREPARATION OF CHITOSAN PURE AND NANOCOMPOSITE HYDROGELS.....	186
3.3. THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS .....	189
3.4. FOURIER TRANSFORM INFRARED .....	190
3.5. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY .....	192
3.6. RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION .....	193
3.7. CYTOTOXICITY .....	198
<b>4. CONCLUSION.....</b>	<b>199</b>
<b>5. REFERENCES.....</b>	<b>200</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>207</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>219</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>223</b>
<b>APÊNDICE A – Artigo publicado na revista <i>Pharmaceutical Development and Technology</i>.....</b>	<b>227</b>
<b>APÊNDICE B – Informações suplementares do Capítulo 2 com fotos das formulações submetidas ao estudo de estabilidade em temperatura ambiente durante 60 dias. ....</b>	<b>228</b>





## 1. INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais é uma das mais antigas estratégias empregadas para o tratamento das enfermidades humanas e muito já se conhece a respeito de seu uso a partir do conhecimento advindo da sabedoria popular. Mesmo sendo relevante, o uso popular não é suficiente para validar a utilização de plantas medicinais como uma modalidade de tratamento segura e eficaz. Neste caso, as evidências devem ser fundamentadas e experimentalmente analisadas (LAPA et al., 2004). A conciliação da pesquisa científica e do conhecimento tradicional é uma grande oportunidade a ser explorada, pois estes recursos biológicos e genéticos apresentam grande potencial na descoberta de novas substâncias biologicamente ativas, servindo como fonte de novos fármacos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A busca por insumos e matérias-primas de origem natural tem despertado um interesse especial, tanto da comunidade científica quanto do setor produtivo. Este rápido crescimento do mercado está relacionado ao aumento do conhecimento e confiança dos consumidores em produtos naturais e/ou medicamentos fitoterápicos (OWEN et al., 2000; KRIS-ETHERTON et al., 2004; CHAN et al., 2010). Vários trabalhos têm demonstrado a utilização de plantas medicinais e seus subprodutos, utilizando técnicas que permitem preservar todas as suas características e eficácia (ZHANG; KOSARAJU, 2007; CHEN et al., 2009; HU et al., 2010; BHATIA et al., 2011).

As preparações fitoterápicas apresentam composição complexa e muitas vezes não há dados sobre sua segurança e interações com outras moléculas. Além disso, as formas farmacêuticas convencionais podem comprometer a eficácia devido, por exemplo, à instabilidade diante do pH ácido do estômago e ao efeito de primeira passagem no fígado (SHARMA; MITKARE; MOON, 2011). Diante destas considerações, o desenvolvimento de sistemas de liberação, que garantam a estabilidade e o efeito biológico torna-se uma alternativa importante e promissora na área de produtos naturais.

O emprego de novas tecnologias e inovações para garantir o efeito terapêutico das plantas medicinais na fabricação de medicamentos fitoterápicos é uma tendência na tecnologia farmacêutica (FELTRIN; CHORILLI, 2010). Da mesma maneira, o desenvolvimento de sistemas terapêuticos de liberação modificada representa uma alternativa na melhora da qualidade dos tratamentos (ROSINA; BARONI; CAVALCANTI, 2004).

Dentre esses sistemas terapêuticos, as nanopartículas poliméricas se destacam devido às suas vantagens tecnológicas, tais como maior estabilidade, possibilidade de encapsular substâncias de polaridades distintas, e viabilidade para diferentes vias de administração (TÜRK; BAYINDIR; BADILLI, 2009). O desenvolvimento desses sistemas pode viabilizar uma melhor biodisponibilidade dos compostos ativos e, conseqüentemente, reduzir a frequência de administração e promover a vetorização em sítios específicos (GUTERRES et al., 2010).

Pesquisas sugerem que o uso de biopolímeros de baixo custo como a quitosana podem ser alternativas viáveis para o desenvolvimento de biomateriais (ROSSI-BERGMANN, 2008). A quitosana apresenta aplicações diversificadas e demonstrou características promissoras como agente auxiliar em sistemas de liberação. Diferente de outros polímeros biodegradáveis, a quitosana é o único que apresenta um caráter catiônico tornando-a única. Este caráter catiônico deve-se a seus grupos amino primários que, por sua vez, são responsáveis por várias propriedades como mucoadesão, aumento na permeação, gelificação *in situ* (BERNKOP-SCHNÜRCH; DÜNNHAUPT, 2012). Estruturas tridimensionais de polímeros hidrofílicos, como os hidrogéis, são biomateriais que demonstraram um grande potencial em produtos farmacêuticos e aplicações biomédicas (DAS; BERA; MUKHERJEE, 2012). Além disso, outras estruturas vêm sendo desenvolvidas como materiais promissores para tratamento e veiculação de substâncias ativas, como é o caso dos filmes (MORALES; MCCONVILLE, 2011). Desta forma, os estudos neste trabalho direcionam-se na preparação e caracterização de hidrogéis e filmes de quitosana contendo nanopartículas de PLGA para obtenção de nanocompósitos.

Neste contexto, a finalidade do trabalho foi avaliar o potencial terapêutico anti-herpético da fração rica em flavonoides C-glicosídeos de *C. glaziovii* Snethl associado a um sistema nanoestruturado a ser empregado na elaboração de um medicamento fitoterápico, considerando que resultados antivirais promissores foram obtidos com esta fração (SILVA et al., 2010). Além das vantagens biofarmacêuticas, esse sistema terapêutico constitui uma inovação tecnológica, uma vez que as investigações científicas na literatura sobre a associação de produtos vegetais e sistemas nanoparticulados ainda são limitadas.

Este trabalho foi dividido em cinco capítulos, além da revisão bibliográfica. No capítulo 1 estão dispostos os resultados e discussão do trabalho de padronização da obtenção da fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos (FEF-Cg) a partir dos extratos padronizados por turboextração.

O capítulo 2 trata do estudo de desenvolvimento de nanopartículas de PLGA contendo a fração enriquecida. O sistema nanoestruturado foi avaliado quanto à técnica de preparação, concentração de fração e tipo e concentração do surfactante nas fases aquosa e orgânica. Além disso, um estudo de estabilidade em temperatura ambiente foi conduzido para avaliar a influência do tempo de estocagem nas propriedades das nanopartículas.

O capítulo 3 apresenta um estudo de obtenção e comparação das características físico-químicas de nanopartículas de PLGA utilizando poloxamer 188, álcool polivinílico e celulose nanocristalina como surfactantes. Posteriormente, foram avaliados o perfil de liberação e degradação do polímero das nanopartículas preparadas com poloxamer 188, o efeito citotóxico e sua atividade anti-herpética contra HSV-1.

No capítulo 4 serão apresentados os resultados de caracterização química, morfológica, térmica, mecânica e citotóxica de filmes de quitosana contendo diferentes concentrações de nanopartículas carregadas com a fração enriquecida.

O trabalho finaliza com o capítulo 5 que traz resultados da preparação e caracterização físico-química e reológica de hidrogéis termossensíveis de quitosana contendo nanopartículas carregadas com a fração enriquecida.

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Objetivo geral

Face ao exposto, o objetivo principal deste trabalho foi desenvolver e caracterizar sistemas fitoterápicos nanoestruturados capazes de aproveitar e melhorar o potencial terapêutico de *Cecropia glaziovii* no tratamento do herpes labial.

### 1.1.2. Objetivos específicos

- Preparar e padronizar a obtenção da fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos a partir de extratos padronizados;
- Identificar e quantificar os flavonoides através de uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência;
- Determinar a atividade anti-herpética do extrato bruto e da fração enriquecida frente ao vírus HSV-1 pelo ensaio de redução do número das placas de lise;
- Preparar e caracterizar nanopartículas de PLGA contendo a fração enriquecida de *C. glaziovii* utilizando as técnicas de dupla emulsão e nanoprecipitação;

- Avaliar a estabilidade das nanopartículas contendo a fração enriquecida em temperatura ambiente;
- Estudar a cinética de liberação *in vitro* do marcador químico a partir das nanopartículas e a degradação do polímero utilizando cromatografia de permeação em gel;
- Avaliar a citotoxicidade e atividade anti-herpética da fração enriquecida, nanopartículas contendo a fração enriquecida e nanopartículas brancas frente ao vírus HSV-1;
- Preparar filmes de quitosana contendo distintas concentrações de nanopartículas e caracterizar suas propriedades físico-químicas e avaliar sua citotoxicidade em células VERO;
- Preparar hidrogel termossensível de quitosana contendo diferentes concentrações de nanopartículas e caracterizar suas propriedades físico-químicas e citotoxicidade em células Vero.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O GÊNERO *Cecropia*

O gênero *Cecropia*, pertencente à família *Urticaceae* Juss, é formado por 75 espécies tropicais encontradas ao redor de florestas densas, lagos e áreas devastadas, distribuídas na região neotropical (BERG; ROSSELLI, 2005). Esta planta é considerada pioneira, distribuída com maior predomínio em áreas de clareiras naturais nas florestas primárias, regiões tropicais do Pacífico e floresta Amazônica (FRANCO-ROSSELLI; BERG, 1997). A maioria das espécies de *Cecropia* apresenta relação mutualística com formigas, particularmente do gênero *Azteca*. Estas formigas vivem nos caules ocos e ramos fistulosos e se alimentam dos tricomas conhecidos como corpúsculo de Müller que contem amido. As formigas agem como predadoras de lagartas e plantas trepadeiras que crescem sobre a árvore, além de fornecer nitrogênio através das fezes (WANDERLEY et al., 2012).

As espécies com ocorrência no Brasil são *Cecropia glaziovii* Snethl, *C. hololeuca* Miq, *C. pachystachya* Trécul, *C. purpurascens* C.C. Berg e *C. sciadophylla* Mart ( SANTOS, 2000; BOCCHESI et al., 2008), popularmente conhecidas por embaúba, imbaúba, umbaúba ou embaúva. Destas, apenas *Cecropia glaziovii* Snethl e *Cecropia pachystachya* Trécul são abundantes na região sul, em especial na zona da Mata Atlântica (BERG; ROSSELLI, 2005). A maior parte dos estudos químicos e farmacológicos presentes na literatura diz respeito às espécies *C. glaziovii*, *C. obtusifolia* e *C. lyratiloba* (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011).

De maneira geral, a composição química das espécies de *Cecropia* envolve a presença de terpenoides, esteroides e compostos fenólicos, tais como proantocianidinas e flavonoides (TANAE et al., 2007; COSTA et al., 2011). Os flavonoides são um grupo de compostos polifenólicos complexos, que apresentam uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). Estes compostos, uma das classes de polifenóis com maior destaque no gênero *Cecropia*, são moléculas potencialmente bioativas presentes com relativa abundância entre os metabólitos secundários. Geralmente estão presentes na dieta humana devido à sua ampla distribuição em frutas, legumes, grãos, plantas medicinais e vinho tinto (MIDDLETON; THEOHARIDES, 2000).

Nas espécies vegetais, os flavonoides podem apresentar-se no estado livre e na forma de glicosídeos, comumente ligados ao núcleo fundamental através de uma hidroxila (posições C3 ou C7), originando os chamados *O*-glicosídeos ou através de um átomo de carbono, em

especial nas posições C6 ou C8, originando os C-glicosídeos (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

O interesse crescente pela extração e isolamento de compostos C-glicosídeos a partir de diferentes espécies se destacam devido aos inúmeros efeitos farmacológicos detectados para esta classe, como por exemplo, atividades antioxidante (CHEEL et al., 2005), hepatoprotetora (PETRONILHO et al., 2012), anti-inflamatória (ZHU; CHEN; ZHOU, 2008), hipoglicemiante (FOLADOR et al., 2010) e antiviral contra os vírus herpéticos HSV-1 e HSV-2 (SILVA et al., 2010) e o Vírus Sincicial Respiratório (VSR), causador de infecções agudas do trato respiratório (WANG et al., 2012).

O objeto de estudo desta tese, *Cecropia glaziovii* Snethl é uma espécie endêmica do Brasil e ocorre nos Estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A árvore pode ter um tamanho que varia de 5 a 15 metros, apresenta copa ampla e ramificada e o tronco é reto e oco. As folhas são palmatilobadas, peltadas e rugosas com coloração verde escuro na parte superior. Esta espécie é conhecida por embaúba-vermelha devido a coloração de suas inflorescências, espículas apicais e nervuras das folhas serem de cor vermelha a vinácea. A figura 1 mostra fotos das folhas de *C. glaziovii* e de sua inflorescência com coloração característica da espécie (WANDERLEY et al., 2012).

**Figura 1:** Folhas e inflorescência de *Cecropia glaziovii* Snethl coletadas na Unidade de Conservação Ambiental Desterro, espaço natural protegido da Universidade Federal de Santa Catarina no município de Florianópolis.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

*Cecropia glaziovii* contém vários metabólitos secundários, destacando-se os compostos polifenólicos, tais como ácidos fenólicos, flavonoides, catequinas e procianidinas (COSTA et al., 2011;

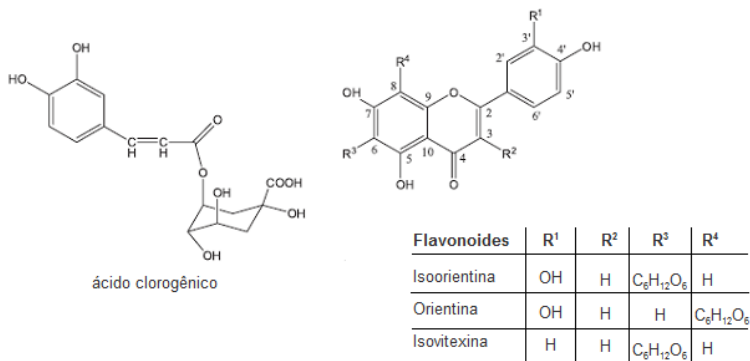
DELARCINA et al., 2007; LIMA-LANDMAN et al., 2007; TANAE et al., 2007). A presença de ácido cafeico foi confirmada em condições específicas de extração por maceração a partir de uma solução hidroetanólica a 20% (v/v) (AREND et al., 2011). Estudos farmacológicos desenvolvidos com as soluções extrativas desta espécie demonstraram atividades contra sintomas da asma (DELARCINA et al., 2007), com efeito ansiolítico (ROCHA; LAPA; DE LIMA, 2002), anti-hipertensivo (LIMA-LANDMAN et al., 2007), antidepressivo (ROCHA et al., 2007), antiácido e antiúlcera (SOUCCAR et al., 2008), anti-herpético contra os vírus HSV-1, HSV-2 (SILVA et al., 2010), contra uma cepa resistente ao aciclovir, hepatoprotetor (PETRONILHO et al., 2012) e também anti-inflamatório e antioxidante (MULLER et al., 2016).

Em estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa com *C. glaziovii* foram obtidas soluções extrativas utilizando-se como métodos de extração a maceração e a decocção (AREND et al., 2011). Os extratos obtidos por maceração apresentaram maior concentração de fenólicos totais comparado aos obtidos por decocção. Os extratos macerados com líquido extrator constituído de etanol a 20% (v/v) e concentração de droga vegetal de 5% (m/v) apresentaram ação na redução da glicemia em ratos hiperglicêmicos. Este resultado indica uma atividade hipoglicêmica dos extratos obtidos ainda não relatados para esta espécie (AREND et al., 2015). Além disso, todos os extratos obtidos pelos dois métodos apresentaram atividade vasorelaxante no ensaio de reatividade vascular *in vitro* em aorta torácica isolada de ratos. O extrato macerado foi mais potente do que aquele obtido por decocção para causar relaxamento vascular (AREND et al., 2015). Um segundo estudo teve como objetivo otimizar um extrato com concentração máxima de compostos fenólicos, representados pelos marcadores, ácido clorogênico e ácido cafeico. Esta otimização visou estabelecer parâmetros mais exatos de relação droga:solvente (18% de droga vegetal), teor etanólico do líquido extrator (27% m/m) e tempo de maceração (3 dias). Este extrato apresentou atividade sequestradora de radicais livres e significativa atividade vasorelaxante em concentrações muito baixas, o que foi considerado um excelente resultado por tratar-se de um extrato bruto não concentrado (SANTOS, 2012a).

Um estudo fitoquímico das espécies *C. glaziovii* e *C. pachystachya* foi realizado por Costa e colaboradores (2011), no qual quatro compostos fenólicos majoritários presentes nos extratos aquosos foram identificados e quantificados por CLAE. Os teores encontrados para *C. glaziovii* foram (em mg/g de planta seca): ácido clorogênico -

1,8; isoorientina - 0,4; orientina - 0,1; isovitexina - 0,9; e para *C. pachystachya*: ácido clorogênico - 3,4; isoorientina - 2,1; orientina - 2,2 e isovitexina - 0,9, representados na figura abaixo. Os flavonoides C-glicosídeos isolados da *C. glaziovii* foram identificados como isovitexina, isoorientina e isoquercitrina.

**Figura 2:** Compostos fenólicos majoritários presentes no extrato aquoso de *Cecropia glaziovii*.



Fonte: Adaptado de Costa et al. (2011).

Uma triagem anti-herpética do extrato bruto aquoso preparado por infusão das folhas de *C. glaziovii* e das frações *n*-butanólica e metanólica (fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos) e o resíduo aquoso foi realizada por Silva e colaboradores (2010) frente ao HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333) pelo ensaio de redução do número de placas de lise. A fração metanólica, além de não mostrar citotoxicidade nas concentrações testadas em células Vero, apresentou uma inibição relevante da replicação dos dois vírus. Estudos do mecanismo da atividade anti-herpética também foram realizados, sugerindo que a fração inibiu a replicação do HSV-1 em células Vero pela inibição da adsorção e da penetração dos vírus nas células, pela inibição da propagação viral entre as células, e pela redução da expressão das proteínas virais ICP27, gD e gE. No caso da inibição da replicação do HSV-2, em células GMK AH1, além de inibir a adsorção e a penetração dos vírus nas células e inibir a propagação dos mesmos entre elas, a fração metanólica foi capaz de reduzir a infecciosidade viral (ação virucida).

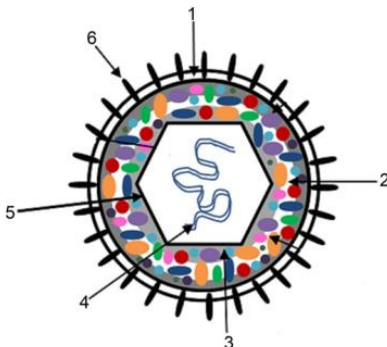


Tendo em vista a potencial atividade antiviral da fração metanólica, enriquecida em flavonoides C-glicosídeos, esta fração tornou-se um candidato promissor para o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado, uma vez que já foi evidenciado que extratos vegetais padronizados contendo principalmente compostos polares, como os flavonoides, quando administrados através de sistemas de liberação nanoparticulados mostraram melhor perfil de biodisponibilidade. Em consequência, a ação terapêutica tende a ser maior e mais prolongada, quando comparada a de outras formas de administração ou ao extrato livre (AJAZUDDIN; SARAF, 2010).

## 2.2. HERPES SIMPLEX

As pesquisas direcionadas à busca de alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções causadas pelo *Herpes Simplex Virus* dos tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2) ocorrem pelo fato deles terem uma participação expressiva nas doenças infectocontagiosas, sempre com graves consequências, especialmente em pacientes imunocomprometidos. O HSV-1 é classificado, de acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), como pertencente à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, sub-família  *$\alpha$ -Herpesvirinae* e gênero *Simplex Virus* (ICTV, 2014). O vírion ou partícula infecciosa apresenta um núcleo contendo DNA de fita dupla, envolvido pelo capsídeo icosaédrico. Em seu contorno, há uma camada preenchida com proteínas, denominada tegumento, que por sua vez é envolto por um envelope lipídico com espículas glicoproteicas em sua superfície (VERONESI; FOCACCIA; DIETZE, 1991; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). A figura 3 apresenta um esquema representativo da estrutura do HSV-1.

**Figura 3:** Representação esquemática da estrutura básica do HSV-1, composta por um envelope lipídico (1), tegumento (2), nucleocapsídeo (capsídeo + ácido nucleico) (3), DNA de fita dupla (4), capsídeo icosaédrico (5) e glicoproteínas (6).



Fonte: Figura modificada de Amen e Griffiths (2011).

Os vírus herpéticos têm afinidade, especialmente, pela pele e mucosas, e são associados a infecções do epitélio da mucosa dos órgãos genitais, cavidade oral, faringe, esôfago e olhos, dependendo do tipo do vírus envolvido. Eles são altamente contagiosos, sendo a principal forma de disseminação o contato direto com secreções infectadas. Após a infecção inicial em células epiteliais, os vírus estabelecem latência em gânglios sensoriais do hospedeiro (HSV-1 nos gânglios do nervo trigêmeo e HSV-2 nos gânglios sacrais próximos à coluna), podendo ser reativados em infecções recorrentes sintomáticas ou assintomáticas (VERONESI; FOCACCIA; DIETZE, 1991; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008; BRASIL, 2010).

Os vírus replicam-se nas células epiteliais após penetrarem na pele ou nas mucosas. O período de incubação pode variar de 1 a 26 dias, causando destruição celular e inflamação local, e resultando em lesões vesiculares eritematosas, que apresentam regressão espontânea. O período de transmissão varia de 4 a 12 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas (BRASIL, 2010). A infecção latente e crônica se estabelece por toda a vida do hospedeiro, variando o sítio de latência de acordo com o tipo de vírus. Fatores relacionados à redução da resposta imune do indivíduo, deficiências alimentares, fadiga, frio ou calor excessivos, alterações hormonais e estresse podem desencadear o processo de saída do estado de latência viral (VERONESI; FOCACCIA; DIETZE, 1991).

As principais manifestações clínicas do HSV-1 caracterizam-se por gengivomastites, faringotonsilites, ceratoconjuntivites, encefalites, infecções neonatais e herpes labial (predominantemente) ou genital (BRADY; BERNSTEIN, 2004). O herpes labial se caracteriza por uma condição bastante incômoda, com formação de vesículas, acompanhada de coceira e ardência no local, e das quais há extravasamento de líquido celular. Após o término desta fase, estas vesículas secam, restando no local um tecido lesado, altamente queratinizado, diferindo das características normais do tecido da pele ou mucosa oral (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007). De maneira geral, doenças infectocontagiosas crônicas, como o herpes simples, endêmicas em todo o mundo, são causas importantes de morbidade (BRASIL, 2010). Portanto, estas infecções são relevantes no contexto da saúde pública e precisam ser devidamente prevenidas e tratadas (CLEMENS; FARHAT, 2010).

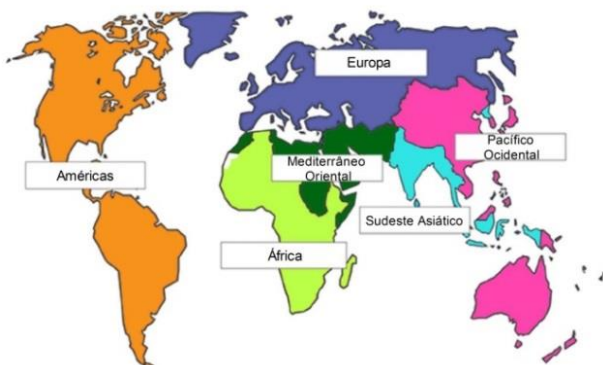
Em 2015, durante o evento anual da Organização Mundial da Saúde em Genebra - 68ª Assembleia Mundial da Saúde, cinco estratégias e ações prioritárias foram elencadas com respeito ao controle de doenças sexualmente transmissíveis, e dentre elas estavam a de acelerar o acesso às inovações através do desenvolvimento de testes diagnóstico e novas intervenções preventivas, como vacinas, agentes microbicidas, terapia supressiva para o vírus do herpes simples, prevenção do HIV e métodos de promoção da saúde (WHO, 2016).

Em 2016, na 69ª Assembleia Mundial da Saúde, foram apresentadas estratégias para serem cumpridas no período de 2016-2021, que visam acabar com as infecções sexualmente transmissíveis como uma ameaça à saúde pública na intenção de garantir uma vida saudável e promover o bem-estar para todos em todas as idades (WHO, 2016).

Nas propostas relacionadas à padronização de prestação de serviços foi sugerido o uso de novas tecnologias e abordagens para a prevenção de infecções sexualmente transmissíveis e gravidez não desejada. Em especial, tecnologias controladas pelas mulheres como preservativos masculinos e femininos com novos designs e materiais para aumentar a aceitabilidade e reduzir custos e desenvolver novos métodos de marketing para aumentar sua demanda e utilização. Foram sugeridas também abordagens mais eficazes de comportamento e comunicação para adolescentes, e uma maior gama de vacinas para prevenir a aquisição de infecções sexualmente transmissíveis, especialmente para o vírus herpes simplex (WHO, 2016).

As estratégias de prevenção e iniciativas propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) partiram dos dados publicados por Looker e colaboradores (2015) (LOOKER et al., 2015a, 2015b) sobre as mais recentes estimativas globais de prevalência e incidência do HSV-1 e HSV-2. O estudo levou em conta dados coletados da literatura entre os anos de 2000 a 2012 sobre a prevalência destes vírus no mundo e, em seguida, separados por regiões de acordo com a OMS (Figura 4).

**Figura 4:** Seleção das regiões de acordo com a Organização Mundial da Saúde.



Fonte: Figura adaptada de WHO (2016).

Estes autores observaram que a prevalência do HSV-1 foi de 3709 milhões de pessoas com idades entre 0 a 49 anos em 2012. Na faixa de idade de 15 a 49 anos foi estimada uma prevalência de 140 milhões de pessoas com infecção genital por HSV-1. Com relação aos novos casos para 2012, a incidência foi de 57 milhões para indivíduos do sexo feminino e 61 milhões para o sexo masculino (LOOKER et al., 2015b). Estima-se que em 2012 houve uma prevalência do HSV-2 em 417 milhões de pessoas com idade entre 15 a 49 anos, sendo que 267 milhões do sexo feminino. Além disso, foram previstos 19,2 milhões de novos casos (LOOKER et al., 2015a).

A forma de tratamento é selecionada considerando-se alguns fatores importantes, tais como a imunidade do paciente, o local da infecção, e se a infecção é primária ou recorrente. Entre os agentes anti-herpéticos disponíveis estão aciclovir, valaciclovir, penciclovir, fanciclovir, trifluoridina, vidarabina, foscarnet, cidofovir, docosanol, brivudina e ganciclovir, sendo o tratamento de primeira escolha para o herpes labial o uso tópico de formulações contendo aciclovir (BRADY;

BERNSTEIN, 2004). Em episódios clínicos primários e recorrentes, estes fármacos podem ser eficazes para o tratamento dos sinais e sintomas, mas uma terapia de longo prazo pode ser associada ao surgimento de cepas virais resistentes, especialmente em pacientes imunocomprometidos (DONALISIO et al., 2013).

Os produtos de origem vegetal têm sido avaliados devido à sua potencial eficácia como alternativa para os agentes antivirais disponíveis. Estudos demonstraram que diferentes compostos isolados a partir de fontes naturais, incluindo terpenos, compostos fenólicos, saponinas, polissacarídeos, cardenolídeos e alcaloides exibiram atividade anti-herpética (KHAN et al., 2005; GARRETT et al., 2012; BEHBAHANI et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2013; MALAGOLI et al., 2014). Acredita-se que estes compostos possam ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais (MUKHTAR et al., 2008).

### 2.3. SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

Sistemas nanocarreadores de fármacos incluem partículas com diâmetros que podem variar de 10 a 1000 nm. Comparado com as micropartículas, as nanopartículas proporcionam maior área superficial e um melhor potencial para aumentar a solubilidade, biodisponibilidade, melhorar o controle da liberação e permitir o direcionamento dos compostos encapsulados em maior concentração (MATHUR; VYAS, 2013).

O uso potencial deste tipo de sistema está relacionado à sua versatilidade e capacidade de veicular uma gama extensiva de substâncias ativas para diversas áreas do organismo, alterando sua distribuição para os tecidos alvos e melhorando a eficácia terapêutica. De maneira geral, estes sistemas têm sido planejados, principalmente, para administração parenteral, oral, tópica e oftálmica (SCHAFFAZICK et al., 2003; MOHANRAJ; CHEN; CHEN, 2006).

Os sistemas nanoestruturados são atrativos para a liberação tópica do fármaco por serem não irritativos (LV et al., 2009) e oferecerem vantagens sobre outras formulações tradicionais, despertando assim o interesse na indústria farmacêutica e pesquisas científicas (PUGLIA et al., 2008). Como consequência destas vantagens, diferentes tipos de partículas vêm sendo propostas especificamente para esta aplicação, entre as quais se destacam as nanopartículas de polissacarídeos, poliméricas e lipídicas (PUGLIA et al., 2008; ZHAO; BROWN; JONES, 2010).

A preparação de nanopartículas envolve preferencialmente materiais biodegradáveis como polímeros (naturais ou sintéticos), proteínas, polissacarídeos, lipídios ou fosfolipídios (MOHANRAJ; CHEN; CHEN, 2006; RAWAT et al., 2006). As nanopartículas poliméricas têm sido amplamente desenvolvidas por proporcionar uma alternativa promissora para liberação gradual ou prolongada de agentes terapêuticos (SANCHEZ, 2003; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

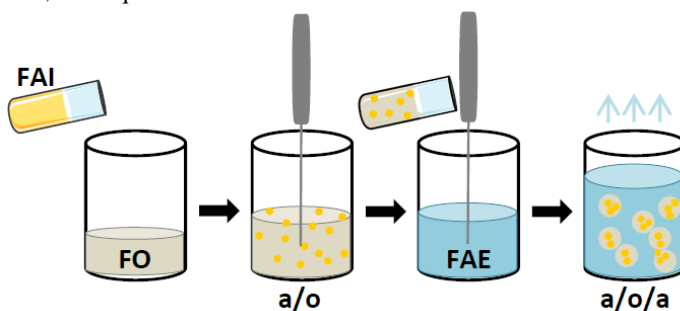
A seleção adequada do polímero para um sistema nanoparticulado é um dos fatores mais importantes para garantir o desenvolvimento de um sistema de liberação bem sucedido. Os polímeros são materiais com grande potencial tecnológico e podem ser utilizados como agente de revestimento, lubrificantes, adesivos, aditivos alimentares, produtos farmacêuticos, entre outros (DALNOKI-VERESS; DUTCHER; FORREST, 2003). Estes polímeros podem ser classificados quanto à origem, natural ou sintética, degradabilidade, biodegradável ou não biodegradável, e também quanto à solubilidade, hidrossolúveis e hidrofóbicos (KADAJJI; BETAGERI, 2011).

Dentre os polímeros biodegradáveis, os mais utilizados são PLA (ácido polilático), PGA (ácido poliglicólico) e seu copolímero PLGA (poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)), que apresentam como vantagem a degradação em meio fisiológico em pequenas moléculas facilmente metabolizadas via ciclo de Krebs (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). O PLGA é um poliéster sintético formado pela polimerização dos monômeros de ácidos láctico e glicólico. Este polímero é amplamente utilizado no desenvolvimento de sistemas micro- e nanoparticulados principalmente pelo fato de ser considerado biodegradável e biocompatível e ter seu uso clínico aprovado pelo *Food and Drug Administration* – FDA desde o ano de 2000 (GUSE et al., 2006; GITEAU et al., 2008; IBRIŠIMOVIĆ et al., 2010; KLOSE et al., 2010). O polímero utilizado neste estudo foi o PLGA 503H, que se caracteriza pela presença de ácido carboxílico como grupamento terminal. As características deste grupo terminal causam impacto na absorção de água e consequentemente na velocidade de degradação. O grupamento ácido carboxílico torna o polímero mais hidrofílico e suscetível à hidrólise (TRACY et al., 1999).

As nanopartículas podem ser desenvolvidas utilizando diferentes métodos de preparação que são selecionados de acordo com a via de administração a que se destina e as características físico-químicas da substância a ser encapsulada (PINTO REIS et al., 2006; COHEN-SELA et al., 2009). Em se tratando de um composto hidrofílico, a técnica mais utilizada é a dupla emulsão, uma modificação da técnica de

emulsificação e evaporação do solvente (DANHIER et al., 2012). Basicamente, esta técnica é composta por três fases que podem ser denominadas de fase aquosa interna (FAI), fase orgânica (FO) e fase aquosa externa (FAE). Durante a preparação, a solução aquosa contendo a substância ativa (FAI) é emulsionada, sob vigorosa agitação, com a solução composta pelo polímero e o solvente orgânico, normalmente diclorometano ou acetato de etila (FO), formando assim a primeira emulsão (a/o). Esta emulsão primária é dispersa em uma segunda solução aquosa contendo água ou um tensoativo hidrofílico (FAE) formando a segunda emulsão (a/o/a). Após preparação das nanopartículas, o solvente orgânico pode ser evaporado deixando a suspensão sob agitação magnética ou em rotaevaporador e a formulação é concentrada a um menor volume (YE; KIM; PARK, 2010). O esquema apresentado na figura 5 demonstra de maneira geral o passo a passo da preparação de nanopartículas utilizando o método de dupla emulsão.

**Figura 5:** Esquema de preparação de nanopartículas poliméricas pela técnica de dupla emulsão. Onde FAI representa fase aquosa interna; FO, fase orgânica e FAE, fase aquosa externa.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

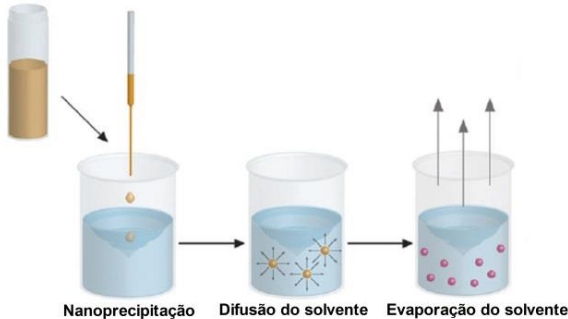
As nanopartículas poliméricas também podem ser preparadas pela técnica de nanoprecipitação ou deposição interfacial do polímero, desenvolvida e patenteada por Fessi e colaboradores (1989). Neste caso, o polímero e o composto a ser encapsulado são dissolvidos em um solvente miscível em água, normalmente acetona (FO) e, em seguida, dispersos sob agitação magnética em uma fase aquosa (FA), que pode ser água ou solução aquosa de tensoativo hidrofílico. A rápida difusão

do solvente pela fase aquosa favorece a precipitação do polímero em partículas de tamanho nanométrico.

A princípio esta técnica foi desenvolvida para encapsular com alta eficiência compostos de caráter hidrofóbico, pois compostos hidrofílicos dificilmente são encapsulados devido à migração rápida e consequente perda para a fase aquosa. No entanto, estudos vêm demonstrando que, com pequenas adaptações, a técnica de nanoprecipitação pode ser utilizada com sucesso para obtenção de nanopartículas poliméricas contendo compostos hidrofílicos (GOVENDER et al., 1999; BILATI; ALLÉMANN; DOELKER, 2005). A figura abaixo demonstra o passo a passo da preparação de nanopartículas por nanoprecipitação.

**Figura 6:** Preparação de nanopartículas poliméricas pela técnica de nanoprecipitação.

Fármaco/polímero/acetona



Fonte: Figura adaptada de Nicolas et al. (2013).

Sistemas nanoparticulados contendo extratos vegetais vêm tomando espaço na área farmacêutica e representam um grande potencial para melhorar a atividade e superar os problemas associados a compostos obtidos de plantas medicinais incluindo, principalmente, aumento da solubilidade, da estabilidade e da atividade farmacológica (AJAZUDDIN; SARAF, 2010). A incorporação de extratos vegetais em matrizes particuladas pode garantir efeitos interessantes como controle de liberação, ampliação do tempo de armazenamento, limitação de possíveis interações prematuras com outros compostos, resultando em um produto final de melhor qualidade. Desta forma, a nanoencapsulação pode ser uma ferramenta tecnológica útil para o desenvolvimento de



produtos fitoterápicos mais eficientes e seguros (CHAN et al., 2010; CHATURVEDI et al., 2011).

Durante o desenvolvimento de um sistema nanoparticulado é importante avaliar possíveis alterações do sistema em função do tempo, uma vez que instabilidades implicam em mudanças indesejáveis em suas propriedades. Estas alterações podem comprometer as características e a qualidade do sistema nanoparticulado, inviabilizando sua aplicação, e podem iniciar com uma simples agregação das nanopartículas formando uma massa maior. A capacidade destas nanopartículas para resistir a mudanças depende de como elas interagem com o meio onde estão dispersas (PEKCEVIK et al., 2012).

Uma das características mais destacadas nestes sistemas é a elevada área superficial em relação ao volume das partículas que, por sua vez, permite o aumento de sua atividade (CHATURVEDI; DAVE; SHAH, 2012). Normalmente a estabilização do sistema se dá pela adição de tensoativos, que evitam as interações indesejadas das partículas com o ambiente externo. Estas interações indesejadas incluem principalmente a agregação e fusão das partículas, reatividade química e reações de degradação por hidrólise (LEMOINE et al., 1996; ABDELWAHED et al., 2006).

A obtenção das nanopartículas é frequentemente na forma de suspensão aquosa e a permanência destas em meio aquoso provoca instabilidades químicas e físicas, principalmente durante longos períodos de armazenamento (FONTE; REIS; SARMENTO, 2016). Para assegurar a estabilidade máxima das partículas coloidais é necessário o uso de um tensoativo que se mantenha na superfície das nanopartículas, impedindo a agregação (ABDELWAHED et al., 2006). O balanço e o comportamento inter-partículas resultantes de forças intermoleculares e de superfície (forças de Wan der Waals, dupla camada eletrostática repulsiva e forças de atração estrutural) determinam a estabilidade das nanopartículas de uma suspensão aquosa (MOORE et al., 2015). A ineficiência do tensoativo expõe as superfícies altamente ativas das partículas (PEKCEVIK et al., 2012).

A estabilidade da suspensão de nanopartículas em meio aquoso varia de acordo com as características intrínsecas das partículas, como as propriedades de superfície, força iônica do meio, pH e concentração de nanopartículas (LABILLE; BRANT, 2010). A ação hidrolítica da água na matriz do polímero pode levar à liberação prematura do fármaco, impedir ou eliminar as propriedades de liberação prolongada e levar à formação de produtos de degradação indesejáveis (LEMOINE et al., 1996; SAEZ et al., 2000). Além disso, a suspensão está propensa ao

desenvolvimento e crescimento de microrganismos (WU; ZHANG; WATANABE, 2011). A alternativa para contornar estes problemas é a transformação da suspensão de nanopartículas em uma forma sólida, na tentativa de manter suas propriedades durante o armazenamento (FONTE; REIS; SARMENTO, 2016).

A liofilização vem sendo descrita como um dos métodos mais adequados para estabilizar e facilitar o manuseio dos sistemas nanoparticulados permitindo seu armazenamento por um período maior de tempo (SAEZ et al., 2000). A liofilização é uma operação de secagem na qual ocorre a remoção da água a partir da amostra, inicialmente por sublimação (secagem primária) e, em seguida, por dessorção (secagem secundária) (NIREESHA et al., 2013).

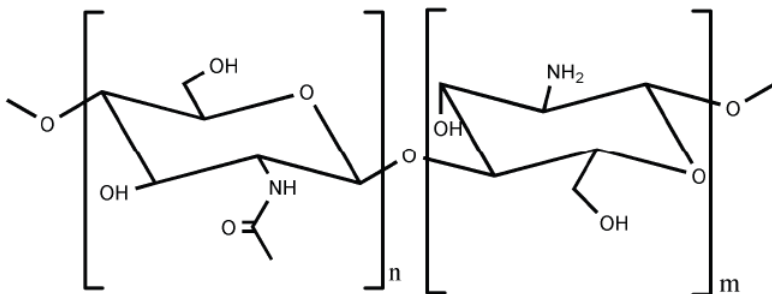
As etapas de congelamento e secagem às quais a amostra é submetida podem gerar momentos de estresse capazes de desestabilizar os sistemas nanoparticulados. Durante o congelamento há separação de fases resultando em (i) formação de gelo que pode exercer um esforço mecânico nas partículas resultando na desestabilização do sistema, e (ii) uma grande concentração de nanopartículas e dos outros componentes da formulação como tensoativo e fármaco livre. A concentração das nanopartículas pode favorecer a agregação e até mesmo a fusão irreversível das mesmas (DATE; SAMAD; DEVARAJAN, 2010). Por estas razões a adição de agente crioprotetores à suspensão de nanopartículas antes do congelamento pode proteger estes sistemas durante a etapa de secagem e também no armazenamento (ABDELWAHED et al., 2006).

Os crioprotetores mais descritos na literatura para inclusão em formulações de nanopartículas previamente à liofilização são açúcares como a trealose, sacarose, glicose e manitol (FONTE et al., 2012; SOARES et al., 2013). Os açúcares são conhecidos por atuar diminuindo a atividade osmótica de água e favorecer o estado vítreo da amostra congelada, impedir o contato entre nanopartículas, e interagir com os grupos polares dos tensoativos para manter uma camada de hidratação (MAJURU; OYEWUMI, 2009).

#### 2.4. QUITOSANA

A quitosana é um polímero catiônico natural produzido a partir da desacetilação em graus variados dos grupos acetamido da quitina na presença de soluções alcalinas (RINAUDO; 2006; SOGIAS; WILLIAMS; KHUTORYANSKIY, 2008). A figura 7 mostra a estrutura química da quitosana.

**Figura 7:** Estrutura química da quitosana.



Fonte: Aranz et al. (2014).

O grau de acetilação da quitosana é caracterizado pela fração molar de unidades de N-acetila ou como porcentagem de acetilação (MONTEBAULT et al., 2005). Já o grau de desacetilação determina a quantidade de grupos amino na cadeia polimérica (RAVI KUMAR, 2000). Desta forma, pode-se diferenciar a quitina da quitosana: quando o grau de desacetilação expresso em porcentagem molar é maior que 60%, o produto resultante é a quitosana, que é solúvel em soluções aquosas ácidas. Durante a desacetilação, além da remoção dos grupos acetila, ocorre uma despolimerização, que influencia diretamente no peso molecular da quitosana (MONTEBAULT et al., 2005).

Tanto grau de desacetilação quanto peso molecular são parâmetros que determinam as propriedades deste polímero e conseqüentemente suas aplicações (BERTH; DAUTZENBERG, 2002). A quitosana comercial possui grau de desacetilação em torno de 70 a 95%, e baixa e alta massa molar na faixa de  $10^4 - 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$  (CANELLA; GARCIA, 2001; BERTH; DAUTZENBERG, 2002).

O número de aplicações da quitosana em diferentes áreas como farmacêutica, biomedicina, cosmética e indústria alimentar está relacionado às suas propriedades como baixa toxicidade, boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade (MONTEBAULT et al., 2005; SOGIAS; WILLIAMS; KHUTORYANSKIY, 2008), além da alta solubilidade em meio aquoso devido aos grupos hidroxila, o grande número de grupamentos amino quimicamente ativos e por apresentar uma estrutura altamente flexível que o torna compatível com outros compostos (MOUSSOUT et al., 2016).

Quando em meio ácido, a quitosana é solubilizada devido à protonação da função  $-\text{NH}_2$  na posição C-2 da unidade de repetição de

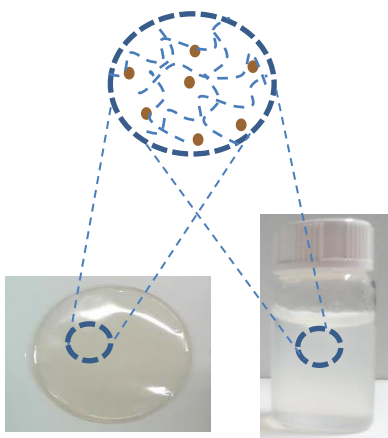
D-glucosamina (RINAUDO, 2006). A quitosana é o único polissacarídeo natural com carga positiva, quando protonado pode formar complexos com uma variedade de compostos como lipídeos, proteínas, DNA, polímeros carregados negativamente (CROISIER; JÉRÔME, 2013). Além disso, a quitosana apresenta propriedades intrínsecas como atividade antibacteriana (BENHABILES et al., 2012), antifúngica (ING et al., 2012), mucoadesiva (SOGIAS; WILLIAMS; KHUTORYANSKIY, 2008), analgésica (OKAMOTO et al., 2002) e hemostática (WEDMORE et al., 2006). Considerando todas estas características, a quitosana tem sido utilizada no desenvolvimento de formas farmacêuticas para diversas aplicações. Bavarsad e colaboradores (2015) desenvolveram um filme a partir da associação da quitosana e fosfatidilcolina contendo griseofulvina para tratamento tópico de infecções fúngicas. O filme com maior concentração de fosfatidilcolina facilitou a liberação do fármaco a partir da matriz polimérica e foi eficaz contra duas espécies de dermatófitos. Em outro estudo nanopartículas de sílica contendo um modelo do antígeno ovoalbumina foram incorporadas em um hidrogel termossensível de quitosana para atuar como um sistema de liberação de vacina. O hidrogel contendo as nanopartículas demonstrou maior habilidade em induzir proliferação das células T CD4+ comparado ao hidrogel contendo o antígeno livre, indicando uma potencial atividade para esses sistemas como vacina (GORDON et al., 2010).

A degradação da quitosana pode ocorrer através de enzimas que hidrolisam as ligações glucosamina-glucosamina, glucosamina-N-acetil-glucosamina e N-acetil-glucosamina-N-acetil-glucosamina. De maneira geral, em organismos vivos, a velocidade e extensão da biodegradação da quitosana estão relacionadas ao grau de desacetilação do polímero (KEAN; THANOU, 2010). Quanto maior o grau de desacetilação, menor a velocidade de degradação. Acredita-se que em um tempo e condições adequados a quitosana pode degradar e ser excretada. O grau de degradação da quitosana normalmente é avaliado por medida de viscosidade e/ou cromatografia de permeação em gel, que avalia a redução do peso molecular (KEAN; THANOU, 2010). Ren e colaboradores (2005) avaliaram a degradação *in vitro* por lisozima de matrizes de quitosana com diferentes graus de desacetilação. De acordo com os resultados, as matrizes com maior grau de desacetilação apresentaram menor velocidade de degradação, enquanto que em matrizes com menor grau de desacetilação foi observada uma degradação expressiva.

## 2.5. NANOCOMPÓSITOS

Nanocompósitos são definidos como materiais híbridos nos quais nanopartículas, orgânicas ou inorgânicas, estão dispersas em uma matriz polimérica de origem natural ou sintética. Devido à escala nanométrica e consequente grande área superficial das partículas, mesmo em baixas concentrações a mobilidade das cadeias poliméricas pode ser alterada, conferindo ao polímero puro propriedades únicas e frequentemente multifuncionais (HULE; POCHAN, 2007; HAMMING et al., 2009; DUFRESNE; THOMAS; POTHAN, 2013). Em uma estrutura típica de nanocompósito polimérico, as partículas normalmente estão distribuídas por toda a matriz do polímero, tal como ilustrado na Fig. 8.

**Figura 8:** Estrutura de nanocompósito polimérico em formas farmacêuticas como filme e hidrogel. Linhas tracejadas em azul representam a matriz polimérica e as esferas representam nanopartículas.



FONTE: Desenvolvido pelo autor.

O desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos é promissor para aplicação em diversas áreas que vão desde a eletrônica, computação, automobilística, biomateriais, engenharia de tecidos e liberação controlada de fármacos (SRIVASTAVA; SHIN; ARCHER, 2012). As múltiplas aplicações destes compósitos poliméricos requerem melhoras em suas propriedades para atender diferentes requisitos funcionais. Um fator crítico no desenvolvimento de nanocompósitos é alcançar dispersões uniformes e garantir a interação entre a matriz selecionada e as nanopartículas (HULE; POCHAN, 2007).

Muitos polímeros podem ser utilizados no desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos, desde polímeros naturais tais como polissacarídeos e proteínas (colágeno, fibrina), bem como polímeros sintéticos como poli (ácido láctico), poli ( $\epsilon$ -caprolactona), poli (ácido glicólico) e poli (hidroxibutirato). Além destes, polímeros solúveis em água como poli (etilenoglicol), álcool polivinílico, goma guar também são utilizados (ZARE; SHABANI, 2016).

Polissacarídeos como amido, quitina, quitosana, celulose e alginatos são polímeros naturais que existem tanto como polímeros lineares como ramificados (MALAFAYA; SILVA; REIS, 2007). As suas propriedades, incluem capacidade de gelificação, solubilidade em água e propriedades de superfície que dependem da composição do monossacarídeo. Características como a abundância na natureza, biocompatibilidade, biodegradabilidade, funcionalização e fácil isolamento a partir das suas fontes naturais têm conduzido sua utilização em várias aplicações. Dentre elas, na preparação de nanocompósitos como uma alternativa aos polímeros convencionais (DUFRESNE; THOMAS; POTHAN, 2013), despertando interesse no campo de biomateriais e liberação controlada de fármacos (SHELKE et al., 2014).

## 2.5. FILMES

Os filmes são películas finas e flexíveis de polímeros e apresentam características importantes para utilização como um sistema de liberação de fármaco. Comparado às formas farmacêuticas tradicionais, os filmes podem proporcionar melhor biodisponibilidade e adesão do paciente. Além disso, os filmes oferecem várias vantagens incluindo uma administração por diferentes vias (via oral, sublingual, ocular e dérmica), facilidade de manipulação pelo próprio paciente, bem como um custo-benefício favorável no desenvolvimento de formulações. Há uma grande variedade de polímeros considerados adequados para preparação e desenvolvimento de filmes (KARKI et al., 2016).

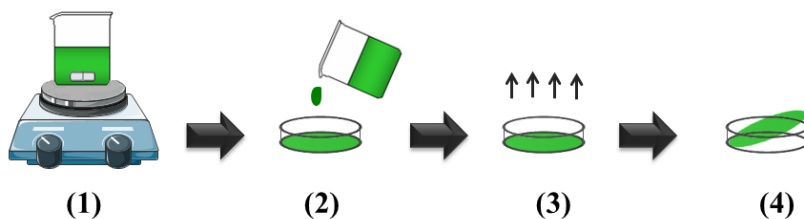
Os polímeros constituem a matriz principal dos filmes e muitos deles estão disponíveis para a preparação de filmes com distinta aplicabilidade. Os polímeros podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com outros polímeros e devem apresentar características como ausência de toxicidade e impurezas e não serem irritantes.

Polímeros solúveis em água têm inúmeras aplicações farmacêuticas e são bem utilizados como formadores de filmes com rápida desintegração, boa resistência mecânica, e bons efeitos sobre o mascaramento de sabor (KARKI et al., 2016). Ambos os polímeros naturais e sintéticos são utilizados para a preparação de filmes. Os

polímeros sintéticos que se destacam em aplicações farmacêuticas são polietilenoglicol, polivinilpirrolidona, álcool polivinílico, ácido poliacrílico, poli(acrilamidas e N-(2-hidroxipropil) metacrilamida. Dos polímeros naturais destacam-se goma xantana, pectina, dextrana, goma guar, éteres de celulose, ácido hialurônico, quitina e quitosana (KADAJJI; BETAGERI, 2011).

Entre as técnicas de preparação de filmes em escala laboratorial, a de evaporação do solvente (*casting*) é um método amplamente utilizado, principalmente devido à simplicidade e baixo custo (KARKI et al., 2016). O passo-a-passo da técnica pelo método de evaporação do solvente, juntamente com os parâmetros de controle de qualidade em cada etapa está ilustrado na Fig. 9. A etapa de preparação da solução do polímero (1) pode gerar bolhas de ar no líquido, desta forma é importante a desaeração da solução (com banho de gelo ou vácuo) para obter um filme de estrutura homogêneo. Após verter a solução em um molde adequado (2), a próxima etapa é a evaporação do solvente (3) resultando em uma película polimérica ao final do procedimento (4). A velocidade de secagem, a espessura do filme, a morfologia bem como a uniformidade do conteúdo dos filmes podem influenciar diretamente nas propriedades mecânicas desejadas (KARKI et al., 2016).

**Figura 9:** Esquema de preparação de filme polimérico por evaporação do solvente (*casting*).



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

O desenvolvimento e caracterização de filmes estão descritos na literatura para diversas aplicações. Bigucci e colaboradores (2015) descreveram o desenvolvimento de filmes transdérmicos a partir da mistura de quitosana e ácido hialurônico para melhorar a biodisponibilidade de tiocolchicósido, um relaxante muscular e analgésico. O objetivo foi desenvolver uma forma de dosagem flexível, capaz de permitir uma dose confiável e de fácil administração. A seleção dos polímeros foi adequada resultando em um produto com propriedades funcionais como a liberação do fármaco e permeação

através da pele, sugerindo que esta formulação pode ser usada como uma nova plataforma tecnológica para administração transdérmica de fármacos.

Um filme mucoadesivo de quitosana contendo ácido 5-aminolevulínico foi proposto por Costa e colaboradores (2014) com o objetivo de melhorar a retenção na mucosa oral para padronização da terapia fotodinâmica. O filme de quitosana com 10% de ácido 5-aminolevulínico foi sugerido como um sistema de liberação para o tratamento de tumores da cavidade oral por apresentar características adequadas de espessura, absorção de água, prolongado tempo de residência *in vitro*, além de favorecer a retenção do fármaco e mucoadesão para aplicação bucal. Um exemplo de filme para administração ocular foi relatado por Priya e colaboradores (2014), filmes de hidroxipropilmetilcelulose e polivinilpirrolidona contendo valaciclovir foram desenvolvidos para o tratamento de herpes ocular na tentativa de melhorar o efeito terapêutico do fármaco prolongando o tempo de contato com a superfície da córnea.

De maneira geral, o fato dos polímeros constituírem componentes essenciais no desenvolvimento e preparação de filmes, compreender as propriedades físico-químicas e as propriedades mecânicas dos mesmos é fundamental para direcionar as suas utilizações. A seleção do polímero apropriado, durante o desenvolvimento de filmes poliméricos pode ser crítico, desse modo, vários pontos devem ser considerados de acordo com os requisitos da via de administração e aplicação.

Neste contexto, filmes nanocompósitos de matriz polimérica geraram uma quantidade significativa de publicações na literatura recente. Estes compósitos podem produzir vantagens importantes nas propriedades mecânicas com a dispersão das nanopartículas na matriz polimérica (PAUL; ROBESON, 2008). Há uma ampla gama de nanopartículas que são usadas para o desenvolvimento de filmes nanocompósitos como nanopartículas inorgânicas (MARIE AROCKIANATHAN et al., 2012; JAYASURIYA; ARYAEI; JAYATISSA, 2013), poliméricas (RESCIGNANO et al., 2014), nanotubos de carbono (WU et al., 2011), nanopartículas lipídicas sólidas (LV et al., 2009), grafeno (VALENTINI et al., 2015).

De maneira geral, um filme deve dispor de uma flexibilidade adequada, suavidade, elasticidade e boa estabilidade físico-química. Portanto, todos estes parâmetros devem ser considerados durante o desenvolvimento de um filme para garantir o seu desempenho final. A caracterização do filme é um pré-requisito que pode incluir a avaliação de propriedades físicas tais como resistência mecânica, a hidratação,



propriedades físico-químicas e toxicidade. Abaixo segue a descrição de algumas técnicas importantes de caracterização para filmes.

### **2.5.1. Espessura**

A medida da espessura é um parâmetro importante e exerce influência sobre suas propriedades de tração, aderência, transmissão, absorção, resistência à abrasão e resistência química (HONG; GAN; WANG, 2011). Primeiramente, a espessura deve ser controlada para garantir a uniformidade do material durante a operação de secagem, uma vez que filmes preparados por *casting* podem apresentar problemas de homogeneidade dependendo do molde utilizado e condições de secagem. Além disso, a espessura define a uniformidade dos materiais e a repetibilidade das medidas (SANTOS, 2012b). Entende-se também que a espessura dos filmes poliméricos tem de ser controlada dentro de um intervalo razoável para evitar a perda de umidade, pois está correlacionada com a viabilidade de administração no local alvo (HONG; GAN; WANG, 2011).

### **2.5.2. Propriedades mecânicas**

As propriedades mecânicas de um filme são determinadas pelas características físicas e químicas das superfícies externas e internas, delimitando assim a potencialidade de aplicação tecnológica. Além disso, as propriedades mecânicas dos filmes são afetadas pelo método de preparo e composição da formulação. A concentração e os tipos de polímeros são em grande parte responsáveis pela produção de um filme com boa propriedade mecânica, resistência e integridade. Da mesma forma, a morfologia do filme pode alterar a força mecânica, por exemplo, por crescimento de cristais. Portanto, diferentes fatores tais como o tipo e concentração de polímero, a técnica de preparação, a espessura do filme tem que ser considerada com cuidado para controlar a resistência mecânica do filme. Os polímeros, por exemplo, são materiais viscoelásticos, e o seu comportamento mecânico está relacionado a muitos fatores, incluindo as condições ambientais (umidade e temperatura) e parâmetros experimentais (ASTM, 2002).

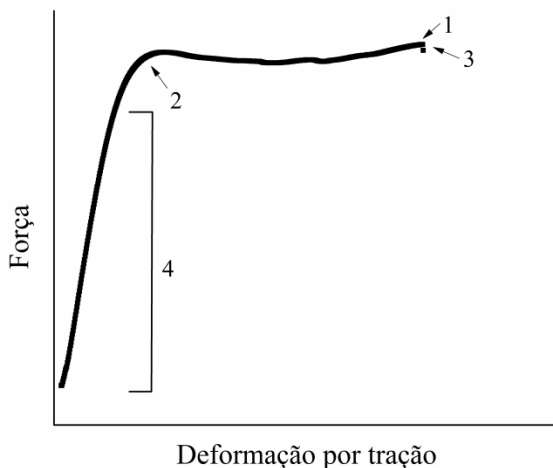
Testes de tração são testes mecânicos mais comuns e amplamente utilizados para filmes poliméricos. O ensaio de tração é prático, e a análise de seus dados é relativamente simples. O ensaio de tração dá uma indicação não apenas da elasticidade e resistência, mas também da dureza do filme (FELTON; O'DONNELL; MCGINITY, 2008).

De acordo com orientações da *American Society for Testing Materials* – ASTM, os dados de ensaio de tração podem ser

interpretados pela curva de tensão-deformação e as propriedades como o módulo de elasticidade, resistência à tração e alongamento na ruptura podem ser calculadas através dos resultados obtidos. O ensaio de determinação das propriedades mecânicas ou propriedades de tração de um filme envolve o estiramento da amostra (corpo-de-prova) com o auxílio de duas garras que prendem suas extremidades, em uma velocidade constante. Ao longo do experimento é registrada a força ou a resistência que o material oferece à deformação. A deformação é dada pelo alongamento relativo do corpo-de-prova em relação a seu comprimento original (ASTM, 2002; FELTON; O'DONNELL; MCGINITY, 2008).

O módulo de elasticidade também conhecido como módulo de Young é uma medida proporcional à rigidez do material sólido quando submetido a uma tensão de tração ou compressão. Este módulo é definido pela razão entre tensão exercida e a deformação sofrida pelo material. No gráfico da curva de tensão versus deformação, o módulo de elasticidade pode ser definido através da inclinação da região linear da curva. Um exemplo na figura 10 ilustra o teste de tração no filme de quitosana avaliado no estudo descrito no capítulo 3 desta tese. Na figura estão destacados os pontos de resistência máxima à tração (1), limite de escoamento (2), ruptura (3) e a região linear que compreende o intervalo como sendo a origem da curva até o ponto 2, de onde é calculado o módulo de elasticidade (4).

**Figura 10:** Curva do teste de tração do filme nanocompósito contendo 3% de nanopartículas (Ch-3% NP) (Capítulo 3).



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A resistência à tração é a tensão máxima aplicada que um material pode suportar ao ser esticado antes de ocorrer a ruptura do filme. A resistência à tração é indicada pelo ponto máximo de uma curva de tensão-deformação. A avaliação da resistência à tração por si só não é útil para prever o desempenho mecânico de filmes, porém, os valores mais elevados são indicativos de resistência à abrasão. Resistência à abrasão por sua vez, é a capacidade de um material resistir ao desgaste superficial gerado pela ação de outro material sólido ou fluido. No caso de filme de uso tópico é importante que o filme seja resistente à abrasão provocada pela roupa, por exemplo (LIN; LEE; LIN, 1995; SILVA et al., 2008).

Alongamento na ruptura é a relação entre o comprimento final e o comprimento inicial modificado após a ruptura do corpo-de-prova. Esta medida representa o grau de deformação plástica que um material suporta até a fratura (FELTON; O'DONNELL; MCGINITY, 2008).

### 2.5.3. Análise dinâmico-mecânica

A análise dinâmico-mecânica (DMA) é outra maneira de estudar as propriedades mecânicas dos filmes poliméricos. A técnica tem como objetivo relacionar as propriedades macroscópicas (propriedades mecânicas) às relaxações moleculares associadas a mudanças

conformacionais e a deformações geradas a partir de rearranjos moleculares. Neste teste, um corpo-de-prova é colocado entre duas garras, uma estacionária e a outra oscilatória. O filme é então deformado por oscilação de torção em função da temperatura e/ou frequência. O módulo de armazenamento, módulo de perda são determinados. DMA pode ser usado para determinar a temperatura de transição vítrea, que pode fornecer uma indicação da estrutura do polímero (CASSU; FELISBERTI, 2005; FELTON; O'DONNELL; MCGINITY, 2008).

#### **2.5.4. Absorção de água**

A avaliação da capacidade de absorção de água de um filme polimérico é conhecida por ser o passo fundamental necessária para a característica de bioadesão. O teste de absorção de água é feito para medir o inchamento ou grau de hidratação do filme polimérico, que por sua vez causam relaxamento e interpenetração das cadeias poliméricas. Por isso, este parâmetro pode influenciar diretamente no potencial bioadesivo ou mucoadesivo e de liberação de substâncias ativas.

As propriedades de intumescimento dos filmes isto é, a capacidade de absorção de água é medida através da avaliação da porcentagem de hidratação. Em geral, a peça do filme é pesada ( $W_1$ ) e submergida em água ou algum fluido fisiológico simulado durante um tempo pré-determinado. Após esse tempo, a amostra é retirada, o excesso de líquido na superfície é retirado e em seguida é pesado novamente ( $W_2$ ). O cálculo é feito usando a seguinte fórmula expressa em porcentagem.

$$\text{Hidratação (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100$$

#### **2.5.5. Morfologia**

A avaliação da morfologia é importante, uma vez que permite observar se o filme apresenta aparência homogênea e contínua. O surgimento de aglomerados pode ocorrer durante a secagem devido às forças intermoleculares que resultam em uma superfície enrugada dos filmes. Além disso, a interação entre fármacos e polímeros, ou partículas e polímeros podem resultar na formação de superfície áspera nos filmes de maneira que a avaliação da morfologia da superfície e estrutura interna pode gerar resultados sobre a distribuição do fármaco ou partículas na matriz polimérica. Assim, características como textura de superfície (liso ou áspero), espessura e distribuição de fármaco ou partículas (agregados ou dispersos) do filme, além do tamanho, forma e

o número de poros podem ser observados usando microscopia eletrônica de varredura, por exemplo (KARKI et al., 2016).

## 2.6. HIDROGÉIS

Os hidrogéis são considerados uma das classes de biomateriais mais promissoras e vem despertando grande interesse em diferentes campos de produtos farmacêuticos e engenharia biomédica (DAS; GUPTA; NATH, 2012). Este interesse se dá por várias razões, incluindo principalmente a capacidade de manter a liberação controlada de uma substância ativa, aumento do tempo de permanência e permeabilidade da substância ativa no local alvo, propriedades bioadesivas, biocompatibilidade e biodegradabilidade (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010; OMIDIAN; PARK, 2012). Com relação às características essenciais para um sistema de liberação de fármaco, os hidrogéis precisam apresentar características como facilidade de produção, estabilidade, citocompatibilidade e flexibilidade (DAS; BERA; MUKHERJEE, 2012). Desta forma, podem ser utilizados por diferentes vias dependendo do objetivo de sua aplicação, como por exemplo, via oral (MUKHOPADHYAY et al., 2014), ocular (DERWENT; MIELER, 2008), nasal (NAZAR et al., 2011), transdérmica (SUN et al., 1997), subcutânea (RADIVOJŠA MATANOVIĆ et al., 2015), auricular (PAULSON et al., 2008), retal (EL-LEITHY et al., 2010), vaginal (DATE et al., 2012).

O termo gel representa um sistema coloidal semissólido em que a matriz polimérica é reticulada para formar uma rede tridimensional. Partindo desta teoria, o hidrogel é um gel com elevada capacidade de absorção de água. Os polímeros formadores de hidrogéis têm grupos funcionais hidrofílicos na sua estrutura polimérica tais como amina, hidroxila, amida e sulfato que, por sua vez, permitem uma maior capacidade de absorção de água e fluidos aquosos (JAGUR-GRODZINSKI, 2009; AHMADI et al., 2015).

Uma das características mais notáveis dos hidrogéis é apresentar uma estrutura altamente porosa, que funciona como um depósito mantendo a concentração da substância ativa no tecido alvo. Além disso, apresenta uma capacidade muito importante para um sistema de administração de fármaco à base de hidrogel que é o transporte de substâncias tanto de caráter hidrofílico quanto lipofílico. O comportamento de liberação de fármacos através da matriz do hidrogel pode ser regulado através da manipulação da densidade de reticulação na matriz e, assim, controlar a porosidade do hidrogel (ZHAO et al., 2015).

Devido a sua compatibilidade termodinâmica com a água que permite inchar em meio aquoso, os hidrogéis têm algumas propriedades físicas comuns aos tecidos vivos como consistência macia e elástica, alta porosidade e baixa tensão interfacial com fluídos biológicos exibindo boa biocompatibilidade (PEPPAS et al., 2000; DAS, 2013). Os hidrogéis apresentam-se como uma rede polimérica tridimensional com número elevado de grupos hidrofílicos capazes de absorver e reter quantidades significativas de água (ROSIK; YOSHII, 1999; BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010). Apesar da capacidade de retenção de água, são insolúveis devido à estrutura em rede formada por entrecruzamento das cadeias poliméricas também conhecido por *crosslinking* (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010; KALSHETTI et al., 2012; CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015). O caráter hidrofílico da rede polimérica deve-se à presença de grupos químicos como grupamentos hidroxílico (-OH), carboxílico (COOH), amídico (-CONH), amídico primário (-CONH<sub>2</sub>), sulfônico (-SO<sub>3</sub>H) (GANJI; VASHEGHANI-FARAHANI; VASHEGHANI-FARAHANI, 2010). O termo *crosslinking* pode ser entendido como o entrecruzamento intra- ou intermolecular, do polímero resultando em uma estrutura em rede. O entrecruzamento nos hidrogéis pode ocorrer por meio químico ou físico dependendo das propriedades do polímero utilizado e das condições experimentais (OMIDIAN; PARK, 2012) de duas maneiras, durante a preparação ou após aplicação em uma determinada localização do corpo humano (ULLAH et al., 2015).

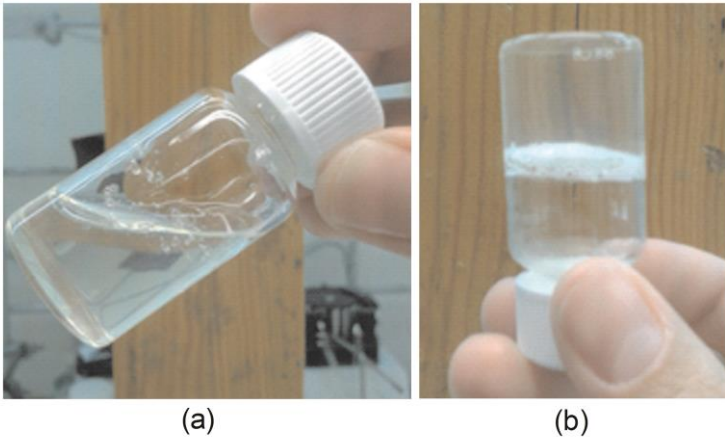
Nos chamados géis químicos ou permanentes, o entrecruzamento acontece pela substituição das ligações de hidrogênio por ligações covalentes fortes e estáveis através de um agente reticulante (HENNINK; VAN NOSTRUM, 2002). Desta maneira, são estruturas estáveis e não se dissolvem em solventes a menos que estas ligações sofram clivagem (EBARA et al., 2014). Agentes reticulantes ou *crosslinkers* são moléculas com grupos funcionais reativos que possibilitam a formação de ligações entre as cadeias do polímero (BERGER et al., 2004). Dos reagentes químicos empregados como agentes reticulantes da quitosana, destacam-se na literatura diferentes compostos, como formaldeído, glioxal, glutaraldeído, epicloridina, etilenoglicol, entre outros. Na quitosana estes agentes podem ligar em sítios diferentes na quitosana, como nos grupos -NH<sub>2</sub> ou nos grupos -OH (GINANI et al., 1999; GONSALVES et al., 2011).

Nos hidrogéis físicos ou reversíveis o entrecruzamento é mantido por envoltimentos moleculares e/ou forças secundárias, incluindo interação iônica, ligação de hidrogênio ou interações hidrofóbicas.

Todas estas interações são reversíveis e podem ser interrompidas por alterações nas condições físicas ou aplicação de tensão (ROSIÁK; YOSHII, 1999). Estes hidrogéis apresentam mais vantagens para preparações e aplicações farmacêuticas devido ao entrecruzamento ocorrer sem adição de um agente reticulante (EBARA et al., 2014).

No caso dos hidrogéis termossensíveis, a gelificação é induzida pelo calor. Uma solução aquosa do polímero sofre transição sol-gel quando a temperatura é alterada. Em particular, a transição sol-gel em temperatura fisiológica chamou a atenção para ser utilizada como sistema formador de gel *in situ* nas áreas biomédicas, bioengenharia, farmacêutica, química (MOON et al., 2012). A temperatura de gelificação de um polímero termossensível é a temperatura que induz a transição sol-gel. Desta forma ocorrem mudanças no equilíbrio de interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre as moléculas de água e do polímero. Abaixo desta temperatura, as moléculas de água hidratam as cadeias do polímero, permanecendo uma solução homogênea. Quando a temperatura é elevada, as interações entre os domínios hidrofóbicos das cadeias do polímero tornam-se predominantes resultando na gelificação da solução polimérica. A temperatura de gelificação pode sofrer modificações devido ao aumento da hidrofobicidade ou da hidrofília do polímero e também alterações da concentração iônica da solução do polímero (KLOUDA; MIKOS, 2008). Estes hidrogéis apresentam vantagens comparadas aos hidrogéis convencionais principalmente com relação à facilidade de manuseio, devido à sua natureza líquida em temperatura ambiente. O hidrogel termossensível pode ser espalhado uniformemente no local alvo e a gelificação ocorre à temperatura do corpo minimizando a possibilidade de vazamento do gel (ROY et al., 2001). A figura 11 mostra um exemplo de um hidrogel termossensível, que em temperatura ambiente se apresenta em forma líquida (Fig. 11a) e após armazenamento à 37°C, ocorreu a gelificação (Fig. 11b).

**Figura 11:** Hidrogel termossensível de quitosana com  $\text{NaHCO}_3$  antes da gelificação em temperatura ambiente (a) e depois da gelificação à  $37^\circ\text{C}$  (b).



Fonte: Registro do autor.

Polímeros naturais como o colágeno, ácido hialurônico, celulose, quitosana e agarose podem ser usados no desenvolvimento de hidrogéis termossensíveis. Devido a características como boa biocompatibilidade, estes polímeros são candidatos preferenciais para a preparação de sistemas de liberação de fármacos. No entanto, há uma menor versatilidade para a modificação quando comparado aos polímeros sintéticos. Em contrapartida, polímeros termossensíveis sintéticos (poliacrilamida, polietilenoglicol, poloxamer) são fáceis de modificar. As suas propriedades podem ser facilmente adaptadas para controlar o perfil de liberação do fármaco (LI; GUAN, 2011; ZHAO et al., 2015).

Abordagens para melhorar as propriedades de hidrogéis incluem a incorporação de nanopartículas nas matrizes poliméricas resultando em um material com maior diversidade estrutural. Tais alterações de propriedades foram o principal foco de pesquisas em hidrogéis nanocompósitos que resultou na melhoria da resistência mecânica e na funcionalidade superior para o material com aplicações em diversos campos (THONIYOT et al., 2015; ZHAO et al., 2015). Bazzaz e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de um hidrogel preparado com diferentes concentrações de nanopartículas de prata. O nanocompósito foi desenvolvido para preparar lentes de contato que apresentem efeito antimicrobiano adequado para reduzir o risco de eventos adversos em usuários de lente. Nanocompósitos de hidrogel de



gelatina contendo nanopartículas de PLGA foram desenvolvidos como um sistema de liberação de fármacos. Neste contexto, diferentes concentrações de nanopartículas foram incorporadas ao hidrogel, e foi observado que concentrações a partir de 5% de nanopartículas influenciaram negativamente o módulo de elasticidade dos hidrogéis (SAMBA et al., 2015). Além disso, um estudo avaliou um hidrogel com maior elasticidade combinando polietilenoglicol e nanopartículas de hidroxiapatita para aplicação na engenharia de tecidos. A aplicação se deu por injeção no local alvo seguido de gelificação por fotopolimerização. O nanocompósito apresentou maior extensibilidade, resistência à compressão e resistência à fratura comparada ao hidrogel sem nanopartículas. Além de apresentar melhora da adesão celular e osteoblastos, sendo indicado como um material em potencial para liberação de fármacos e reparação de tecidos, especialmente em aplicações ortopédicas (GAHARWAR et al., 2011). Date e colaboradores (2012) demonstraram o potencial antirretroviral de nanopartículas de PLGA contendo a combinação de raltegravir e efavirenz em um hidrogel termossensível. O hidrogel foi preparado a partir de uma associação entre poloxamer F127 e poloxamer F68 com temperatura de gelificação a partir de 32,5°C. O objetivo foi desenvolver um material com propriedades para uso na profilaxia contra HIV através da administração vaginal, a possibilidade da gelificação *in situ* resultou em um maior tempo de permanência do gel no local de ação. Outro estudo semelhante foi publicado por Ramyadevi e colaboradores (2016) onde foi desenvolvido e caracterizado um gel termossensível contendo nanopartículas poliméricas de aciclovir em uma concentração 10 vezes menor que a usada no tratamento convencional para tratamento do herpes genital. A formulação foi avaliada quanto a sua biodisponibilidade e biodistribuição através de administração intravaginal em modelo de ratos. As nanopartículas presentes no gel mantiveram um nível terapêutico no plasma durante 24 h. Comparado ao fármaco livre incorporado ao gel, o gel nanocompósito melhorou o tempo de residência médio do fármaco, apresentando um aumento de duas vezes na biodisponibilidade relativa e de 2 a 3 vezes maior na distribuição nos tecidos.

As propriedades mecânicas dos hidrogéis dependem da sua composição e estrutura. Em geral, os géis poliméricos são muito fracos, isto é, são macios e quebradiços, e não resistem a grandes deformações. Estas características devem-se principalmente ao fato de que os entrecruzamentos das redes poliméricas dos géis não estão estabelecidos totalmente e apresenta-se como uma matriz heterogênea. O desempenho

mecânico de hidrogéis convencionais pode ser expresso através do módulo de elasticidade. As propriedades mecânicas normalmente são avaliadas por cisalhamento ou por compressão. Estas propriedades são influenciadas pela composição e tipo de polímero, densidade de reticulação das cadeias poliméricas, grau de absorção de água e condições de polimerização no caso de hidrogéis químicos. Os testes de compressão são semelhantes aos ensaios de tração, porém ao invés da amostra ser puxada pelas extremidades por duas pinças, ela sofre compressão. Os hidrogéis são geralmente preparados em moldes redondos, e os testes de compressão são realizados para traçar as curvas de tensão-deformação. Em teoria, os valores do módulo de elasticidade obtidos a partir de ensaios de tração e de compressão para um hidrogel em particular devem ser os mesmos. No entanto, os valores podem apresentar diferenças devido às diferenças no preparo das amostras como, por exemplo, a espessura.

O estudo das propriedades de deformação e fluxo da matéria é definido pela reologia (AULTON, 2005). O dispositivo que mede tanto a viscosidade e limite de elasticidade do material é conhecido como reômetro. Em medidas oscilatórias de cisalhamento, o módulo de elasticidade ( $G'$ ), módulo de viscosidade ( $G''$ ) e fator de perda ( $\tan \delta$ ) são os parâmetros monitorados em relação ao tempo, frequência e deformação. O fator de perda é definido como  $G''/G'$ . O módulo de elasticidade avalia a energia de deformação armazenada durante o processo de cisalhamento de um material (relacionado à rigidez do material) e módulo viscoso representa a energia dissipada durante o cisalhamento (ou seja, representa o fluxo ou resposta do tipo líquido do material). Se  $G'' > G'$  ( $\tan \delta > 1$ ), a amostra se comporta mais como um líquido viscoso, por outro lado, quando  $G' > G''$ , e, assim,  $\tan \delta < 1$ , a amostra se comporta como um sólido elástico (YAN; POCHAN, 2010).

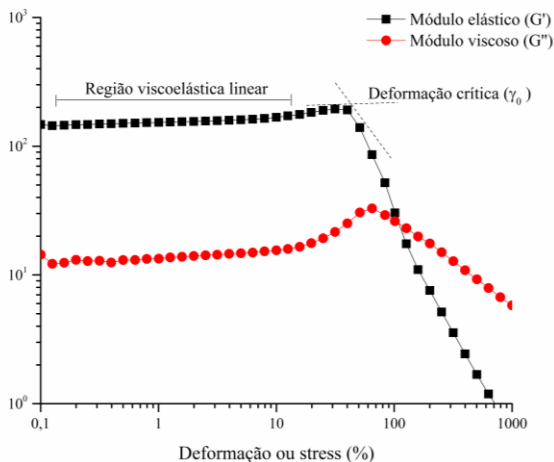
A região viscoelástica linear refere-se à relação entre o estresse e a deformação de um material próximo do equilíbrio, normalmente, quando a deformação é pequena. O termo linear significa que a relação entre o estresse e a deformação é linear (KUMARAN, 2010). Em geral, a natureza elástica de um material está associada à uma microestrutura de equilíbrio no material. Quando esta microestrutura sofre uma deformação, as forças termodinâmicas tendem a restaurar o equilíbrio. A energia associada a este processo de restauração é a energia elástica que é "armazenada" durante o processo de deformação. Porém, como os polímeros não são materiais elásticos ideais, durante a deformação há também uma reação à deformação dissipativa, que é a dissipação viscosa (SUNTHAR, 2010). Desta forma, o material é deformado até o

ponto em que as ligações internas entre as moléculas são destruídas e grande parte da energia do sistema é irreversivelmente perdida na forma de calor. A partir deste ponto é possível determinar a deformação crítica, ou seja, o valor da tensão a partir do qual os módulos elástico e viscoso são dependentes da tensão aplicada (MOURA, 2014).

A região viscoelástica linear representa o momento de equilíbrio do sistema, portanto, testes de reologia realizados nestas condições são importantes por duas razões: (i) em primeiro lugar, estes ensaios são mais fáceis de realizar e compreender que as medições na região não-linear, e os parâmetros obtidos a partir de medições viscoelásticas lineares são um reflexo fiável do estado do sistema; (ii) estas medidas também podem ser usadas no controle de qualidade, e qualquer variação pode ser facilmente detectada (KUMARAN, 2010).

O estudo reológico realizado neste trabalho foi por teste oscilatório em regime dinâmico e a região viscoelástica linear foi determinada por varredura de tensão/deformação. A resposta típica de um material polimérico em forma de gel a este teste é representado na Fig. 12. Os símbolos utilizados aqui são  $\gamma_o$  para deformação crítica,  $G'$  representando o módulo elástico e  $G''$  módulo viscoso. Nesta região,  $G'$  é sempre maior do que  $G''$ .

**Figura 12:** Representação gráfica de um resultado típico de um teste de varredura de tensão, nos quais os módulos elástico e viscoso são representados em função da tensão/deformação aplicada. Amostra hidrogel de quitosana puro avaliado no Capítulo 5.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Muitas técnicas podem ser utilizadas para caracterizar os hidrogéis. A avaliação das propriedades de superfície destes sistemas pode incluir a microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho e microscopia de força atômica. A espectroscopia de infravermelho é uma técnica útil para a identificação da estrutura química de uma substância. Esta técnica é amplamente utilizada para investigar o arranjo estrutural num hidrogel em comparação com os materiais de partida. A microscopia eletrônica de varredura pode ser usada para proporcionar informações sobre a topografia da superfície da amostra, e a estrutura interna a partir de criofraturas realizadas na amostra. Esta é uma técnica amplamente usada para visualizar a característica de "rede" nos hidrogéis. As informações obtidas por estes métodos podem ser usada para monitorar e assegurar a reprodutibilidade da superfície e explorar a interação dos hidrogéis com sistemas vivos (EBARA et al., 2014).

### 3. REFÊNCIAS

- ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688–1713, 2006.
- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 2, p. 87–94, 2006.
- AHMADI, F. et al. Chitosan based hydrogels: Characteristics and pharmaceutical applications. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2015.
- AJAZUDDIN; SARAF, S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 680–689, 2010.
- AKSUNGUR, P. et al. Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: Cellular toxicity, uptake, and kinetic studies. **Journal of Controlled Release**, v. 151, n. 3, p. 286–294, 2011.
- AMEN, M. A.; GRIFFITHS, A. Packaging of non-coding RNAs into herpesvirus virions: Comparisons to coding RNAs. **Frontiers in Genetics**, v. 2, n. 17, p. 1–5, 2011.
- ARANAZ, I. et al. Preparation of Chitosan Nanocomposites with a Macroporous Structure by Unidirectional Freezing and Subsequent Freeze-Drying. In: SASHIWA, H.; HARDING, D. **Advances in Marine Chitin and Chitosan**. Basel/Beijing/Wuhan: MDPI AG, p. 43–68, 2015.
- AREND, D. P. et al. Experimental design as a tool to evaluate chlorogenic and caffeic acids extracted from *Cecropia glaziovii* Sneth. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 1, p. 58–68, 2011.
- AREND, D. P. et al. *In vivo* potential hypoglycemic and *in vitro* vasorelaxant effects of *Cecropia glaziovii* standardized extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 5, p. 473–484, 2015.
- ARPICCO, S. et al. Recent studies on the delivery of hydrophilic drugs in nanoparticulate systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 298–312, 2015.
- ASSAAD, E.; MAIRE, M.; LEROUGE, S. Injectable thermosensitive chitosan hydrogels with controlled gelation kinetics and enhanced mechanical resistance. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 87–96, 2015.

- ASTM D882-02. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **ASTM International**, West Conshohocken, PA, 2002.
- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Porto Alegre: Artimed; 2005.
- BALA, I.; HARIHARAN, S.; KUMAR, M. N. V. R. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. **Crit Rev in Ther Drug Carr Syst**, v. 21, n. 5, p. 387–422, 2004.
- BALOGLU, E. et al. Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 16, n. 6, p. 627–636, 2011.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. DA S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- BAVARSAID, N. et al. Preparation, Characterization and Evaluation of Antifungal Efficacy of Chitosan/Soy Phosphatidylcholine Topical Films Containing Griseofulvin. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 10, n. 2, 2015.
- BEHBAHANI, M. et al. Evaluation of anti-herpetic activity of methanol seed extract and fractions of *Securigera securidaca* *in vitro*. **Journal of Antivirals and Antiretrovirals**, v. 5, n. 4, p. 72–76, 2013.
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A. et al. Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 1094–1101, 2011.
- BENHABLES, M. S. et al. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 1, p. 48–56, 2012.
- BERG, C. C.; ROSSELLI, P. F. **Cecropia: Flora Neotropica**. New York: New York Botanical Garden, 2005.
- BERGER, J. et al. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. v. 57, p. 19–34, 2004.
- BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; DÜNNHAUPT, S. Chitosan-based drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 463–469, 2012.
- BERTH, G.; DAUTZENBERG, H. The degree of acetylation of chitosan and its effect on the chain conformation in aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 39–51, 2002.

- BHATIA, A. et al. Chitosan nanoparticles as Carrier of Immunorestoratory plant extract: Synthesis, characterization and Immunorestoratory efficacy. **International Journal of Drug Delivery**, v. 1, n. 2, p. 381–385, 2011.
- BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 83–99, 2010.
- BIGUCCI, F. et al. Development and characterization of chitosan/hyaluronan film for transdermal delivery of thiocolchicoside. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 32–40, 2015.
- BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 67–75, 2005.
- BOCCHESI, R. A. et al. Germinação de sementes de *Cecropia pachystachya* Trécul (Cecropiaceae) em padrões anteriores e posteriores à passagem pelo trato digestório de aves dispersoras de sementes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 2, p. 19–26, 2008.
- BORZACCHIELLO, A.; AMBROSIO, L. Structure-Property Relationships in Hydrogels. In: BARBUCCI, R. **Hydrogels: Biological Properties and Applications**. Milan: Springer Milan, 2009. p. 9–20.
- BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v. 61, p. 73–81, 2004.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso**. 8 ed. Brasília: 2010.
- CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels : A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252–267, 2015.
- CANELLA, K. M. N. DE C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13–17, 2001.
- CASSU, S. N.; FELISBERTI, M. I. Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 255–263, 2005.
- CHAN, E. S. et al. Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 2-3, p. 195–201, 2010.
- CHATURVEDI, M. et al. Recent development in novel drug delivery systems of herbal drugs. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 5, n. 2, p. 87–94, 2011.

- CHATURVEDI, S.; DAVE, P. N.; SHAH, N. K. Applications of nanocatalyst in new era. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 16, n. 3, p. 307–325, 2012.
- CHAUDHARY, B.; VERMA, S. Preparation and Evaluation of Novel In Situ Gels Containing Acyclovir for the Treatment of Oral Herpes Simplex Virus Infections. **The Scientific World Journal**, p. 1–7, 2014.
- CHEEL, J. et al. Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2511–2517, 2005.
- CHEN, Y. et al. Study of artemisinin nanocapsules as anticancer drug delivery systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 5, n. 3, p. 316–322, 2009.
- CHOI, B. et al. Introduction to In Situ Forming Hydrogels for Biomedical Applications. In: LOH, X. J. **In-Situ Gelling Polymers**. Singapore: Springer Singapore, 2015. p. 5–35.
- CHU, K. S. et al. Nanoparticle drug loading as a design parameter to improve docetaxel pharmacokinetics and efficacy. **Biomaterials**, v. 34, n. 33, p. 8424–8429, 2013.
- CLEMENS, S. A. C.; FARHAT, C. K. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 4, p. 726–734, 2010.
- COHEN-SELA, E. et al. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 133, n. 2, p. 90–95, 2009.
- CONTADO, C. et al. Influence of secondary preparative parameters and aging effects on PLGA particle size distribution: A sedimentation field flow fractionation investigation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 2-3, p. 703–711, 2013.
- COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1096–1102, 2011.
- COSTA, G. M.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. **Natural product communications**, v. 6, n. 6, p. 913–20, 2011.
- COSTA, I. DOS S. M. et al. Chitosan-based mucoadhesive films containing 5-aminolevulinic acid for buccal cancer's treatment. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 140, p. 266–275, 2014.
- CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780–792, 2013.



- DALNOKI-VERESS, K.; DUTCHER, J. R.; FORREST, J. A. Dynamics and Pattern Formation in Thin Polymer Films. **Physics in Canada**, 2003.
- DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 505–522, 2012.
- DAS, A.; GUPTA, P. B. K.; NATH, B. Mucoadhesive Polymeric Hydrogels for Nasal Delivery of Penciclovir. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 12, p. 158–166, 2012.
- DAS, N. Preparation methods and properties of hydrogel : A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 112–117, 2013.
- DAS, N.; BERA, T.; MUKHERJEE, A. Biomaterial hydrogels for different biomedical applications. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3, n. 3, p. 586–597, 2012.
- DASH, S. et al. Review: Kinetic Modeling on Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.
- DATE, P. V; SAMAD, A.; DEVARAJAN, P. V. Freeze thaw: a simple approach for prediction of optimal cryoprotectant for freeze drying. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 304–13, 2010.
- DATE, A. A. et al. Development and evaluation of a thermosensitive vaginal gel containing raltegravir+efavirenz loaded nanoparticles for HIV prophylaxis. **Antiviral Research**, v. 96, n. 3, p. 430–436, 2012.
- DELARCINA, S. et al. Inhibition of histamine-induced bronchospasm in guinea pigs treated with *Cecropia glaziovii* Sneth and correlation with the *in vitro* activity in tracheal muscles. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 328–332, 2007.
- DERWENT, J. J. K.; MIELER, W. F. Thermoresponsive hydrogels as a new ocular drug delivery platform to the posterior segment of the eye. **Trans Am Ophthalmol Soc**, v. 106, p. 206–214, 2008.
- DESAI, N. Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. **The AAPS journal**, v. 14, n. 2, p. 282–95, 2012.
- DOMINGUES, G. S. et al. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1966–1972, 2008.
- DONALISIO, M. et al. *In vitro* anti-Herpes simplex virus activity of crude extract of the roots of *Nauclea latifolia* Smith (Rubiaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 266, p. 1–8, 2013.

- DONG, W. et al. Superior mechanical properties of double-network hydrogels reinforced by carbon nanotubes without organic modification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 22380–22394, 2013.
- DUFRESNE, A.; THOMAS, S.; POTHAN, L. A. Bionanocomposites: State of the Art, Challenges, and Opportunities. In: **Biopolymer Nanocomposites**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p. 1–10.
- DUTCHER, B.; FAN, M.; LEONARD, B. Use of multifunctional nanoporous  $\text{TiO}(\text{OH})_2$  for catalytic  $\text{NaHCO}_3$  decomposition-eventually for  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  based  $\text{CO}_2$  separation technology. **Separation and Purification Technology**, v. 80, n. 2, p. 364–374, 2011.
- EBARA, M. et al. Smart Hydrogels. In: **Smart Biomaterials**. Japan: Springer Japan, 2014. p. 9–65.
- EIDI, H. et al. Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, n. 1-2, p. 156–165, 2010.
- EL-LEITHY, E. S. et al. Evaluation of Mucoadhesive Hydrogels Loaded with Diclofenac Sodium–Chitosan Microspheres for Rectal Administration. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 4, p. 1695–1702, 2010.
- FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R. A. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, n. 5, p. 737–763, 2007.
- FAZLY BAZZAZ, B. S. et al. Preparation, characterization and antimicrobial study of a hydrogel (soft contact lens) material impregnated with silver nanoparticles. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 37, n. 3, p. 149–152, 2014.
- FELTON, L. A.; O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Mechanical Properties of Polymeric Films Prepared from Aqueous Dispersions. In: **Aqueous Polymeric Coating for Pharmaceutical Dosage Forms**. 3. ed. CIDADE: Taylor & Francis, 2008. p. 475.
- FELTRIN, E. P.; CHORILLI, M. Extratos Secos Padronizados: Tendência Atual em Fitoterapia. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologia da Saúde**, v. 7, n. 1, p. 109–115, 2010.
- FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.
- FOLADOR, P. et al. Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin isolated from *Wilbrandia ebracteata* roots in non-diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1180–1187, 2010.

- FRONTE, P. et al. Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying. **Biomater**, v. 2, n. 4, p. 329–339, 2012.
- FRONTE, P.; REIS, S.; SARMENTO, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 225, p. 75–86, 2016.
- FRANCO-ROSSELLI, P.; BERG, C. C. Distributional patterns of Cecropia (Cecropiaceae): a panbiogeographic analysis. **Caldasia**, v. 19, n. 1-2, p. 285–296, 1997.
- GAHARWAR, A. K. et al. Highly Extensible, Tough, and Elastomeric Nanocomposite Hydrogels from Poly (ethylene glycol) and Hydroxyapatite Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 1641–1650, 2011.
- GANJI, F.; VASHEGHANI-FARAHANI, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. **Iranian Polymer Journal**, v. 19, n. 5, p. 375–398, 2010.
- GARRETT, R. et al. Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 2, p. 306–313, 2012.
- GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1–9, 2008.
- GINANI, Marconi F et al. Influence of crosslinking and organic additives on the behavior of chitosan gels. **Quimica Nova**, v. 22, n. 6, p. 801–804, 1999.
- GITEAU, A. et al. How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, n. 1-2, p. 14–26, 2008.
- GOLDBERG, M.; LANGER, R.; JIA, X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 18, n. 3, p. 241–68, 2007.
- GONSALVES, A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.
- GORDON, S. et al. *In vitro* and *in vivo* investigation of thermosensitive chitosan hydrogels containing silica nanoparticles for vaccine delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 360–368, 2010.
- GOVENDER T, STOLNIK S, GARNETT MC, ILLUM L, D. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Control Release**, v. 57, p. 171–185, 1999.

- GRABOWSKI, N. et al. Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 2, p. 686–694, 2013.
- GUSE, C. et al. Programmable implants-From pulsatile to controlled release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 2, p. 161–169, 2006.
- GUTERRES, S. S. et al. Polymeric Nanocapsules for Drug Delivery: An overview. In: **Colloids in Drug Delivery**, Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010, p. 71–98.
- HAMMING, L. M. et al. Effects of dispersion and interfacial modification on the macroscale properties of TiO<sub>2</sub> polymer-matrix nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 69, n. 11-12, p. 1880–1886, 2009.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481–504, 2000.
- HENNINK, W. E.; VAN NOSTRUM, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 13–36, 2002.
- HERNÁNDEZ, R. et al. Influence of iron oxide nanoparticles on the rheological properties of hybrid chitosan ferrogels. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 339, n. 1, p. 53–59, 2009.
- HONARY, S. et al. Doxorubicin-Loaded Albumin Nanoparticles: Formulation and Characterization. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 11, p. 7752–7757, 2010.
- HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265 – 273, 2013.
- HONG, X.; GAN, Y.; WANG, Y. Facile measurement of polymer film thickness ranging from nanometer to micrometer scale using atomic force microscopy. **Surface and Interface Analysis**, v. 43, n. 10, p. 1299–1303, 2011.
- HU, L. et al. Preparation and enhanced oral bioavailability of cryptotanshinone-loaded solid lipid nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 582–587, 2010.
- HUANG, Z. et al. Modification of an injectable chitosan scaffold by blending with NaHCO<sub>3</sub> to improve cytocompatibility. **Polymers and Polymer Composites**, v. 19, n. 9, p. 781–787, 2011.
- HULE, R. A.; POCHAN, D. J. Polymer Nanocomposites for Biomedical. **Mrs Bulletin**, v. 32, p. 354–358, 2007.

- IBRIŠIMOVIC, N. et al. Quantification of biodegradable PLGA nanoparticles for drug targeting. **Acta Medica Academica**, v. 39, p. 118–131, 2010.
- ICTV, **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Current Taxonomy Release. Disponível em: <<http://ictvonline.org>>. Acesso em: 12fev. 2015.
- IKEDA, S.; NISHINARI, K. “ Weak Gel ” -Type Rheological Properties of Aqueous Dispersions of Nonaggregated K -Carrageenan Helices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4436–4441, 2001.
- ING, L. Y. et al. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, 2012.
- ISLAM, A.; RIAZ, M.; YASIN, T. Structural and viscoelastic properties of chitosan-based hydrogel and its drug delivery application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 119–124, 2013.
- JAGUR-GRODZINSKI, J. Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. **Polymers Advances Technologies**, v. 21, p. 27–47, 2009.
- JAYASURIYA, A. C.; ARYAEI, A.; JAYATISSA, A. H. ZnO nanoparticles induced effects on nanomechanical behavior and cell viability of chitosan films. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 7, p. 3688–3696, 2013.
- KADAJJI, V. G.; BETAGERI, G. V. Water soluble polymers for pharmaceutical applications. **Polymers**, v. 3, n. 4, p. 1972–2009, 2011.
- KALSHETTI, P. P. et al. Hydrogels as a drug delivery system and applications: A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2012.
- KARKI, S. et al. Thin films as an emerging platform for drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2016.
- KASHI, T. S. J. et al. Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 221–34, 2012.
- KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3–11, 2010.
- KERLETA. Pluronic® F-68 Enhances the Nanoparticle-Cell Interaction. **Scientia Pharmaceutica**, v. 77, n. 1, p. 179–179, 2009.

- KHAN, M. T. H. et al. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 67, n. 2, p. 107–119, 2005.
- KLOSE, D. et al. Drug release from PLGA-based microparticles: Effects of the “microparticle:bulk fluid” ratio. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1-2, p. 123–131, 2010.
- KLOUDA, L.; MIKOS, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 1, p. 34–45, 2008.
- KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: The Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Flavonoids on Atherosclerosis. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 511–538, 2004.
- KUMARAN, V. Fundamentals of Rheology. In: **Rheology of Complex Fluids**. New York, NY: Springer New York, 2010. v. 53p. 35–65.
- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.
- LABILLE, J.; BRANT, J. Stability of nanoparticles in water. **Nanomedicine**, v. 5, n. 6, p. 985–998, 2010.
- LAPA, A. J. et al. Farmacologia e Toxicologia de produtos naturais. In: **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora UFSC/Editora UFRGS, 2004. p. 247–262.
- LEE, D. et al. Comparisons of particle size measurement method for colloidal silica. **Journal of Ceramic Processing Research**, v. 14, n. 2, p. 274–278, 2013.
- LEMOINE, D. et al. Stability study of nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v. 17, n. 22, p. 2191–2197, 1996.
- LEPELTIER, E.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 71, p. 86–97, 2014.
- LI, D.; KANER, R. B. Shape and aggregation control of nanoparticles: Not shaken, not stirred. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 3, p. 968–975, 2006.
- LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 26–39, 2008.

- LI, Z.; GUAN, J. Thermosensitive hydrogels for drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 8, n. 8, p. 991–1007, 2011.
- LIMA-LANDMAN, M. T. R. et al. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An *in vivo* approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 314–320, 2007.
- LIN, S. Y.; LEE, C. J.; LIN, Y. Y. Drug-polymer interaction affecting the mechanical properties, adhesion strength and release kinetics of piroxicam-loaded Eudragit E films plasticized with different plasticizers. **Journal of Controlled Release**, v. 33, n. 3, p. 375–381, 1995.
- LIU, L. et al. Smart gelation of chitosan solution in the presence of NaHCO<sub>3</sub> for injectable drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n. 1-2, p. 6–15, 2011.
- LOOKER, K. J. et al. Global Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in 2012. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–23, 2015a.
- LOOKER, K. J. et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2015b.
- LV, Q. et al. Development and evaluation of penciclovir-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1-2, p. 191–198, 2009.
- MADSEN, F.; EBERTH, K.; SMART, J. D. A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: The effect of mucoadhesive type and concentration. **Journal of Controlled Release**, v. 50, n. 1-3, p. 167–178, 1998.
- MAJURU, S.; OYEWUMI, M. O. Nanotechnology in Drug Development and Life Cycle Management. In: **Nanotechnology in Drug Delivery**. New York: Springer AAPS PRESS, 2009. p. 597.
- MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, v. 3, n. 4, p. 1377–1397, 2011.
- MALAFAYA, P. B.; SILVA, G. A.; REIS, R. L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 4-5, p. 207–233, 2007.
- MALAGOLI, B. G. et al. Chemical characterization and antiherpes activity of sulfated polysaccharides from *Lithothamnion muelleri*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 66, p. 332–337, 2014.

- MARIE AROCKIANATHAN, P. et al. Preparation, characterization and evaluation of biocomposite films containing chitosan and sago starch impregnated with silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 4, p. 939–946, 2012.
- MARTÍN BANDERAS, L. et al. Cannabinoid Derivate Loaded PLGA Nanocarriers for Oral Administration: Formulation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5793–5806, 2012.
- MATHUR, M.; VYAS, G. Role of nanoparticles for production of smart herbal drug-an overview. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 4, n. 4, p. 329–338, 2013.
- MIDDLETON E THEOHARIDES TC, K. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 673–751, 2000.
- MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 9–24, 2010.
- MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y.; CHEN, M. &. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 561–573, 2006.
- MONTEBAULT, A. et al. Rheometric Study of the Gelation of Chitosan in Aqueous Solution without Cross-Linking Agent. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 653–662, 2005.
- MOON, H. J. et al. Temperature-responsive compounds as in situ gelling biomedical materials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 14, p. 4860–4883, 2012.
- MOORE, T. L. et al. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. **Chemical Society reviews**, v. 44, p. 6287–6305, 2015.
- MORALES, J. O.; MCCONVILLE, J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 187–199, 2011.
- MOURA, M. J. C. DE. **Preparação e Caracterização de Hidrogéis de Quitosano para Administração por Via Injetável**. 2014. 261p. Tese (doutorado) - Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.



- MOUSSOUT, H. et al. Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. **Polymer Degradation and Stability**, v. 130, p. 1–9, 2016.
- MUKHOPADHYAY, P. et al. PH sensitive N-succinyl chitosan grafted polyacrylamide hydrogel for oral insulin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 627–637, 2014.
- MUKHTAR, M. et al. Antiviral potentials of medicinal plants. **Virus Research**, v. 131, n. 2, p. 111–120, 2008.
- MULLER, S. D. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract of *Cecropia glaziovii* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 185, p. 255–262, 2016.
- MURA, S. et al. Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2591, 2011.
- NAIR, M. B. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Composite hydrogel of chitosan – poly (hydroxybutyrate- co -valerate) with chondroitin sulfate nanoparticles for nucleus pulposus tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 84–92, 2015.
- NARITA, Y.; INOUYE, K. Degradation Kinetics of Chlorogenic Acid at Various pH Values and. **Journal of agricultural and food chemistry**, p. 966–972, 2013.
- NAZAR, H. et al. Thermosensitive hydrogels for nasal drug delivery: The formulation and characterisation of systems based on N-trimethyl chitosan chloride. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 225–232, 2011.
- NICOLAS, J. et al. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 3, p. 1147–235, 2013.
- NIREESHA, G. R. et al. Lyophilization / Freeze Drying - An Review. **International Journal Of novel Trends in pharmaceutical sciences**, v. 3, n. 4, p. 87–98, 2013.
- NKABINDE, L. A. et al. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: Uptake by epithelial cells and cytotoxicity. **Express Polymer Letters**, v. 8, n. 3, p. 197–206, 2014.
- O'REGAN, J.; MULVIHILL, D. M. Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 224–231, 2010.
- OKAMOTO, Y. et al. Analgesic effects of chitin and chitosan. v. 49, p. 249–252, 2002.

- OMIDIAN, H.; PARK, K. Hydrogels. In: **Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery**. Boston, MA: Springer US, 2012. p. 75–105.
- ONWULATA, C. I. Encapsulation of New Active Ingredients. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 183–202, 2012.
- OWEN, R. W. et al. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 10, p. 1235–1247, 2000.
- PAUL, D. R.; ROBESON, L. M. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. **Polymer**, v. 49, n. 15, p. 3187–3204, 2008.
- PAULSON, D. P. et al. A novel controlled local drug delivery system for inner ear disease. **The Laryngoscope**, v. 118, n. 4, p. 706–711, 2008.
- PEKCEVIK, I. C. et al. **Determining the Stability of Nanoparticles in Solution and Implications for Using these Materials**, 2012.
- Disponível em:  
<[http://www.wcb.ns.ca/Portals/wcb/Gates\\_StabilityNanoparticles.pdf](http://www.wcb.ns.ca/Portals/wcb/Gates_StabilityNanoparticles.pdf)>
- PEPPAS, N. A. et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.
- PETRONILHO, F. et al. Hepatoprotective effects and HSV-1 activity of the hydroethanolic extract of *Cecropia glaziovii* (embauba-vermelha) against acyclovir-resistant strain. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 7, p. 911–918, 2012.
- PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.
- PUGLIA, C. et al. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An *in vitro* and *in vivo* investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 357, n. 1-2, p. 295–304, 2008.
- QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113–1128, 1998.
- RADIOVJŠA MATANOVIĆ, M. et al. Prolonged subcutaneous delivery of low molecular weight heparin based on thermoresponsive hydrogels with chitosan nanocomplexes: Design, *in vitro* evaluation, and cytotoxicity studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 488, n. 1-2, p. 127–135, 2015.

RAMOS ALMEIDA, R. et al. Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in Wistar rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 1-2, p. 109–113, 2006.

RAMYADEVI, D. et al. Heterogeneous polymer composite nanoparticles loaded in situ gel for controlled release intra-vaginal therapy of genital herpes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 260–270, 2016.

RANJAN, A. P. et al. Scale up, optimization and stability analysis of Curcumin C3 complex-loaded nanoparticles for cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 38, 2012.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

RAVI KUMAR, M. N. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

RAWAT, M. et al. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790–1798, 2006.

REGAN, J. O.; MULVIHILL, D. M. Water soluble inner aqueous phase markers as indicators of the encapsulation properties of water-in-oil-in-water emulsions stabilized with sodium caseinate. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2339–2345, 2009.

REN, D. et al. The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 15, p. 2403–2410, 2005.

RESCIGNANO, N. et al. Protein encapsulation in biodegradable polymeric nanoparticles: Morphology, fluorescence behaviour and stem cell uptake. **Macromolecular Bioscience**, v. 13, n. 9, p. 1204–1212, 2013.

RESCIGNANO, N. et al. PVA bio-nanocomposites: A new take-off using cellulose nanocrystals and PLGA nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 47–58, 2014.

RESCIGNANO, N. et al. Use of alginate, chitosan and cellulose nanocrystals as emulsion stabilizers in the synthesis of biodegradable polymeric nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 445, p. 31–39, 2015.

RINAUDO, M.; Ã, M. R. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

- ROCHA, F. F. et al. Antidepressant-like effect of *Cecropia glazioui* Sneth and its constituents - *In vivo* and *in vitro* characterization of the underlying mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, n. 6, p. 396–402, 2007.
- ROCHA, F. F.; LAPA, A. J.; DE LIMA, T. C. M. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glazioui* Sneth in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 1-2, p. 183–190, 2002.
- ROSIK, J. M.; YOSHII, F. Hydrogels and their medical applications. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 151, n. 1-4, p. 56–64, 1999.
- ROSINA, C. R.; BARONI, S.; CAVALCANTI, O. A. Avaliação das propriedades de intumescimento e permeabilidade de filmes isolados de polimetacrilato contendo polissacarídeo da raiz de Lótus (*Nelumbo nucifera*). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 425–431, 2004.
- ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54–57, 2008.
- ROY, S. et al. Thermoreversible Gel Formulations Containing Sodium Lauryl Sulfate or n-Lauroylsarcosine as Potential Topical Microbicides against Sexually Transmitted Diseases Thermoreversible Gel Formulations Containing Sodium Lauryl Sulfate or n-Lauroylsarcosine as P. **Society**, v. 45, n. 6, p. 1671–1681, 2001.
- SAEZ, A. et al. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 3, p. 379–387, 2000.
- SAMBA, I. et al. Nanocomposite hydrogels based on embedded PLGA nanoparticles in gelatin. **Nanocomposites**, v. 1, n. 1, p. 46–50, 2015.
- SANCHEZ, A. Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, p. 221–229, 2003.
- SANTANDER-ORTEGA, M. J. et al. Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 302, n. 2, p. 522–529, 2006.

SANTOS, T. C. Dos. **Microesferas contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* Snethl para o tratamento da hipertensão arterial.** 2012. 139p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012a.

SANTOS, C. G. **Desenvolvimento, caracterização física e avaliação do potencial cicatrizante de filmes de colágeno contendo ácidos graxos essenciais.** 2012. 100p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes. Aracajú, 2012b.

SANTOS, F. A M. Growth and leaf demography of two *Cecropia* species. **Revta brasil. Bot.**, v. 23, n. 2, p. 133–141, 2000.

SANTOS, N. S. DE O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D.

**Introdução à Virologia Humana.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCUDIERO, D. A et al. Evaluation of a Soluble Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. **Cancer research**, v. 48, p. 4827–4833, 1988.

SHARMA, A. T.; MITKARE, S. S.; MOON, R. S. Multicomponent Herbal Therapy: A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 6, n. 2, p. 185–187, 2011.

SHELKE, N. B. et al. Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 25, n. 5, p. 448–460, 2014.

SILVA, C. L. et al. Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization. **Journal of Membrane Science**, v. 320, n. 1-2, p. 268–279, 2008.

SILVA, I. T. et al. *In vitro* antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 143–148, 2010.

SINGH, R.; W., L. J. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 86, n. 3, p. 215–223, 2009.

SOARES, S. et al. Effect of freeze drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 2, p. 370–381, 2013.

- SOGIAS, I. A.; WILLIAMS, A. C.; KHUTORYANSKIY, V. V. Why is chitosan mucoadhesive? **Biomacromolecules**, v. 9, n. 7, p. 1837–1842, 2008.
- SOUCCAR, C. et al. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. **Phytomedicine**, v. 15, n. 6-7, p. 462–469, 2008.
- SRIVASTAVA, S.; SHIN, J. H.; ARCHER, L. A. Structure and rheology of nanoparticle–polymer suspensions. **Soft Matter**, v. 8, n. 15, p. 4097–4108, 2012.
- SUN, Y. et al. Composite poly (2-hydroxyethyl methacrylate ) membranes as rate- controlling barriers for transdermal applications. **Biomaterials**, v. 18, n. 7, p. 527–533, 1997.
- SUNTHAR, P. Polymer Rheology. In: **Rheology of Complex Fluids**. New York: Springer New York, 2010. p. 171–191.
- SZYMAŃSKA, E. et al. The effect of  $\beta$ -glycerophosphate crosslinking on chitosan cytotoxicity and properties of hydrogels for vaginal application. **Polymers**, v. 7, n. 11, p. 2223–2244, 2015.
- TALHI, O.; SILVA, A. M. S. Advances in C -glycosylflavonoid Research. **Current Organic Chemistry**, v. 16, p. 859–896, 2012.
- TANAE, M. M. et al. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 309–313, 2007.
- THONIYOT, P. et al. Nanoparticle-Hydrogel Composites: Concept, Design, and Applications of These Promising, Multi-Functional Materials. **Advanced Science**, v. 2, n. 1-2, p. 1-13, 2015.
- TRACY, M. A. et al. Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres *in vivo* and *in vitro*. **Biomaterials**, v. 20, p. 1057–1062, 1999.
- TÜRK, C. T. Ş.; BAYINDIR, Z. S.; BADILLI, U. Preparation of Polymeric Nanoparticles Using Different Stabilizing Agents. v. 38, n. 4, p. 257–268, 2009.
- ULLAH, F. et al. Classification , processing and application of hydrogels: A review. **Materials Science & Engineering C**, v. 57, p. 414–433, 2015.
- VALENTINI, L. et al. Preparation of Alginate/Graphene oxide hybrid films and their integration in triboelectric generators. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2015, n. 7, p. 1192–1197, 2015.
- VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA\ nanoparticles: a factorial design study. **Int. J. Pharm.**, v. 238, p. 77–92, 2002.

- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R.; DIETZE, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- VINEETH, P. et al. Influence of organic solvents on nanoparticle formation and surfactants on release behaviour in-vitro using costunolide as model anticancer agent. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 638–645, 2014.
- WANDERLEY, M. et al. **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2012. v. 7, p. 393. Disponível em: <[http://botanica.sp.gov.br/files/2016/06/FFESP-Volume-VII\\_06\\_24.pdf](http://botanica.sp.gov.br/files/2016/06/FFESP-Volume-VII_06_24.pdf)>.
- WANG, S.; GUO, S. Disodium norcantharidate-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres. II. Modification of morphology and release behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1-2, p. 15–20, 2008.
- WANG, Y. et al. Flavone C-glycosides from the Leaves of *Lophatherum gracile* and Their *In Vitro* Antiviral Activity. **Planta Medica**, v. 78, n. 01, p. 46–51, 2012.
- WANG, Y.-C. et al. Surfactant-free formulation of poly(lactic/glycolic) acid nanoparticles encapsulating functional polypeptide: a technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, p. 1263–1267, 2009.
- WEDMORE, I. et al. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. **The Journal of trauma**, v. 60, n. 3, p. 655–658, 2006.
- WHO, **World Health Organization**. Draft global health sector strategies: Sexually transmitted infections, 2016–2021, 2016. Disponível em: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA69/A69\\_33-en.pdf?ua=1](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA69/A69_33-en.pdf?ua=1). Acesso em: 08jun. 2016.
- WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456–469, 2011.
- WU, T. et al. Preparation and properties of chitosan nanocomposite films reinforced by poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate) treated carbon nanotubes. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 3, p. 932–938, 2011.
- YAMAMOTO, K. A. et al. Antiherpetic activity of an *Agaricus brasiliensis* polysaccharide, its sulfated derivative and fractions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, n. 1, p. 9–13, 2013.

- YAN, C.; POCHAN, D. J. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 9, p. 3528, 2010.
- YE, M.; KIM, S.; PARK, K. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 2, p. 241–260, 2010.
- ZAMBAUX, M. F. et al. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. v. 50, p. 31–40, 1998.
- ZARE, Y.; SHABANI, I. Polymer/metal nanocomposites for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 60, n. 04, p. 195–203, 2016.
- ZARZYCKI, R. et al. New Chitosan Structures in the Form of the Thermosensitive Gels. **Progress on chemistry and applications of chitin**, v. XIII, p. 35–42, 2008.
- ZHANG, L.; KOSARAJU, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 7, p. 2956–2966, 2007.
- ZHAO, F. et al. Composites of Polymer Hydrogels and Nanoparticulate Systems for Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Nanomaterials**, v. 5, n. 4, p. 2054–2130, 2015.
- ZHAO, Y.; BROWN, M. B.; JONES, S. A. Pharmaceutical foams: are they the answer to the dilemma of topical nanoparticles? **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 227–236, 2010.
- ZHU, T. M.; CHEN, K. L.; ZHOU, W. B. A new flavone glycoside from *Selaginella moellendorffii* Hieron. **Chinese Chemical Letters**, v. 19, n. 12, p. 1456–1458, 2008.
- ZOLNIK, B. S.; BURGESS, D. J. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. **Journal of Controlled Release**, v. 122, n. 3, p. 338–344, 2007.
- ZU, Y. et al. Preparation and characterization of chitosan-polyvinyl alcohol blend hydrogels for the controlled release of nano-insulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 82–87, 2012.
- ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora UFSC/Editora UFRGS, 2004. p. 577–614.



# **Capítulo 1**

*Padronização da obtenção da fração rica em flavonoides C-glicosídeos a partir do extrato bruto de *Cecropia glaziovii*, avaliação da citotoxicidade e do efeito anti-herpético*

---



## 1. INTRODUÇÃO

Devido à composição complexa do material vegetal, a padronização dos extratos e frações por processos tecnológicos é um passo crucial na manutenção dos seus ativos. Assim como para os produtos farmacêuticos, um método padronizado pode auxiliar no controle da estabilidade das plantas e preparações à base de plantas durante a manipulação e armazenamento. A combinação de padronização química com ensaios biológicos pode proporcionar novos conhecimentos sobre os efeitos terapêuticos da planta medicinal. A padronização química de extratos de plantas possibilita a melhora da qualidade dos produtos e oferece maior credibilidade para o desenvolvimento de fitoterápicos (ONG et al. 2004).

Diversos trabalhos têm demonstrado que plantas medicinais e seus subprodutos podem ser beneficiados pelo emprego de técnicas que permitam preservar suas características, como o fracionamento e isolamento das substâncias de interesse. Os processos de fracionamento da solução extrativa com objetivo de isolar um grupo de substâncias ativas podem ser uma boa alternativa para avaliar a atividade biológica. A tendência destes estudos é o monitoramento das frações obtidas por diferentes técnicas de identificação, como cromatografia líquida de alta eficiência, que possibilita direcionar as operações de fracionamento para o isolamento dos compostos de interesse (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004).

Um extrato vegetal pode ser parcialmente purificado visando aumentar sua concentração nas substâncias responsáveis pelo efeito terapêutico. A obtenção de uma fração enriquecida com substâncias de interesse é menos dispendiosa comparada às técnicas de isolamento de substâncias. Uma preparação de produtos fitoterápicos utilizando uma fração apresenta menor teor dos constituintes não ativos quando comparado ao extrato bruto, o que pode reduzir fatores de instabilidade tanto do extrato como da preparação farmacêutica que o contenha, além de facilitar as análises quali-quantitativas (LUENGAS-CAICEDO, 2005).

O preparo de uma fração rica em determinados compostos pode ser possível através de técnicas de pré-isolamento ou enriquecimento, garantindo, desta forma, uma maior concentração destes compostos. Inúmeras técnicas foram descritas nos últimos anos para purificação de um extrato, incluindo a partição por solventes, adsorção, cromatografia de baixa pressão e cristalização. Normalmente estas técnicas são muito eficientes quando utilizadas em combinação com outras. Para moléculas pequenas com polaridade variada, a partição com solventes e a adsorção

podem ser técnicas muito eficientes no enriquecimento do extrato (XIAO et al., 2013).

Este capítulo descreve a padronização da metodologia de obtenção de fração rica em flavonoides *C*-glicosídeos de *Cecropia glaziovii* Snethl, baseada em estudos realizados anteriormente por Costa e colaboradores (2011). O rendimento de extração dos marcadores químicos, isoorientina e isovitexina, foram comparados utilizando as resinas poliméricas Amberlite® XAD-2 e XAD-16. Em seguida, avaliou-se a importância da partição na etapa de obtenção da fração, testando diferentes condições como a ausência de partição, uma partição com acetato de etila seguida de partição com *n*-butanol e partição com *n*-butanol. Além disso, foram avaliadas a citotoxicidade e a potencial atividade antiviral do extrato bruto e da fração enriquecida.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FLAVONOIDES *C*-GLICOSÍDEOS

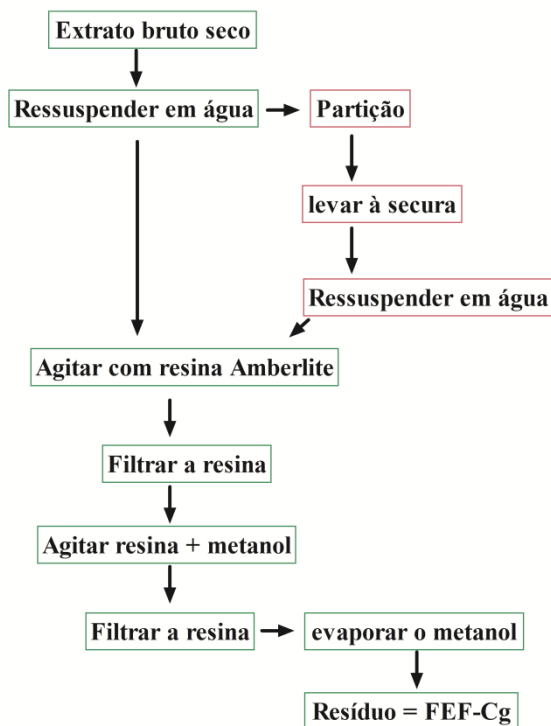
A fração enriquecida em flavonoides *C*-glicosídeos (FEF-Cg) foi preparada tendo como base a metodologia descrita por Costa et. al. (2011) com alterações. Inicialmente, extratos brutos foram preparados por turboextração com água ou etanol 20% (v/v) como líquidos extratores mantendo uma proporção planta:solvente de 5% (m:v). As condições de extração por turboextração foram estabelecidas em estudos prévios como sendo tempo de extração de 5 minutos e velocidade de agitação de 9500 rpm (dados não mostrados). A seguir, os extratos preparados foram secos por nebulização nas seguintes condições: temperatura de entrada de 140°C, velocidade máxima da bomba peristáltica de 5% e fluxo de ar de 583 L/min.

Em um primeiro momento, duas resinas de troca iônica, Amberlite® XAD-2 e XAD-16, foram comparadas com objetivo de avaliar o rendimento e a eficiência de extração dos marcadores, isoorientina (ISOO) e isovitexina (ISOV) a partir de um extrato aquoso.

Além disso, a obtenção da fração foi testada a partir de três diferentes condições: sem partição (1), partição com solventes de polaridade crescente (acetato de etila e *n*-butanol) (2) e partição com *n*-butanol (3), a fim de comparar o teor dos marcadores no produto final a partir de um extrato aquoso e um hidroetanólico (20%, v,v). Em resumo, a sequência estabelecida para a obtenção da fração foi: ressuspensão do extrato bruto seco em água, partição nas condições descritas e, em seguida, evaporação do solvente em evaporador rotatório a 40°C. O resíduo seco foi ressuspendido em água e tratado com resina de troca

iônica na proporção fração:Amberlite®:água de 1:20:200 (m/m/v) durante 1 hora, sob agitação magnética. Os compostos adsorvidos à resina foram extraídos com metanol. O metanol foi eliminado em evaporador rotatório e o resíduo resultante representou na fração enriquecida em flavonoides *C*-glicosídeos. As etapas de obtenção da fração estão dispostas na figura abaixo:

**Figura 13:** Esquema representativo da obtenção da fração rica em flavonoides *C*-glicosídeos (FEF-Cg).



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

O teor dos marcadores foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência a partir de metodologia validada por Costa e colaboradores (2011). A fase estacionária utilizada foi uma coluna Brownlee® Choice C18 (150 × 4,6 mm i.d.; 5µm) e a fase móvel consistiu em um gradiente combinando acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido acético 1% (pH= 3) (B) nas seguintes condições: 0-30 min gradiente linear de A-B (5:95 v/v) para A-B (20:80 v/v); 30-40 min,

isocrático A-B (20:80), com fluxo constante de 1 mL/min. Os cromatogramas foram adquiridos no comprimento de onda de 340 nm. O extrato bruto foi analisado na concentração de 1 mg/mL para todas as amostras, enquanto a fração enriquecida foi analisada na concentração de 0,5 mg/mL.

## 2.2. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e da FEF-Cg foi realizada através do ensaio colorimétrico *in vitro* de sulforrodamina B e pelo método de exclusão do corante azul de tripano.

### 2.2.1. Ensaio colorimétrico por Sulforrodamina B

Uma alíquota de 100  $\mu$ L de suspensão de células Vero contendo aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células/mL foi distribuída em placas de 96 cavidades (100  $\mu$ L/cavidade). A placa foi incubada por 24 h, a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> até confluência. O meio (MEM) foi substituído por 200  $\mu$ L de diferentes concentrações das amostras e a placa foi incubada por 48 h, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera. Sem remover o sobrenadante, as células foram fixadas com 100  $\mu$ L/cavidade de solução aquosa de ácido tricloroacético a 10% (m/v), e a placa foi incubada por 1 h à 4°C. Após esse período, as cavidades foram lavadas quatro vezes cuidadosamente com água destilada e mantidas em temperatura ambiente para secar (24 h). As células fixadas foram coradas com 100  $\mu$ L de solução ácida de sulforrodamina B (0,057%, m/v) por 30 min. O excesso de corante foi removido com solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) em quatro lavagens sucessivas e novamente a placa foi mantida em temperatura ambiente. Para extração do corante ligado às proteínas utilizou-se 100  $\mu$ L/cavidade de solução tampão Tris-Base 10 mM, pH 10,5. A placa foi agitada por 10 min. até que todo corante fosse dissolvido e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 510 nm (Spectra Max M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

Os valores de absorbância de cada concentração testada foram transformados em percentuais de viabilidade, em relação ao controle celular, o qual é considerado 100% viável, através da fórmula, onde DO = densidade óptica:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \text{DO}_{\text{amostra}} \times 100 / \text{DO}_{\text{controle celular}}$$

Em seguida, os percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos num gráfico e por análise de regressão, foi possível calcular a CC<sub>50</sub>, ou seja, concentração de cada

amostra capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular. Os valores de  $CC_{50}$  calculados representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

### **2.2.2. Método de exclusão do corante azul de tripano**

A suspensão de células Vero foi distribuída em placas de 24 cavidades contendo aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células/mL. Após 24 h de incubação, a  $37^\circ\text{C}$ , em estufa de  $\text{CO}_2$ , foram adicionadas as diferentes concentrações de extrato bruto e fração enriquecida (7,81; 62,5; 500; 1000 e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Após tratamento de 48 h, as células foram lavadas com PBS e dissociadas com 150  $\mu\text{L}$  de tripsina. A inativação da tripsina foi realizada pela adição de 2 mL de MEM contendo 5% de soro fetal bovino, a suspensão celular foi transferida para tubo de centrífuga e a cavidade foi lavada com mais 1 mL de meio. A suspensão celular (3 mL) foi centrifugada à 1500 rpm por 2 min e em seguida 2 mL do sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de meio. A contagem de células viáveis foi em contador automático onde 10  $\mu\text{L}$  de suspensão celular foram adicionados à 10  $\mu\text{L}$  de corante azul de tripano. A  $CC_{50}$  de cada amostra foi estimada a partir da porcentagem das células viáveis em relação ao número total de células distribuídas na placa de leitura.

## **2.3. AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL**

### **2.3.1. Ensaio de redução do número de placas de lise**

A avaliação da atividade anti-herpética do extrato bruto e da FEF-Cg foi realizada utilizando-se o vírus HSV-1 (cepa KOS), através do ensaio de placas de lise e seguiu o procedimento proposto por Silva e colaboradores (2010). Além das amostras, foi usado como controle positivo aciclovir (ACV/Sigma Aldrich) e cada ensaio continha controle viral (células infectadas e não tratadas com as amostras) e controle celular (células não infectadas e nem tratadas). Células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$ /cavidade/0,75 mL) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  até a confluência (24 h). Após esse tempo, o meio foi aspirado, a monocamada celular foi lavada 3X com PBS e 400  $\mu\text{L}$  das suspensões virais foram adicionados, na concentração de 100 UFP/cavidade, por 1 h a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Após a adsorção viral, as células foram lavadas com tampão fosfato PBS e foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de diferentes concentrações de amostra (1,95 - 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em uma solução de carboximetilcelulose 1,5% dissolvida em MEM 2x (1:1, v/v) por 48 h, a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Por fim, o meio foi aspirado, as células foram coradas com 200  $\mu\text{L}$  de preto de naftaleno. Após 40 min, à

temperatura ambiente e em agitador horizontal, o corante foi aspirado e as placas formadas foram contadas através da visualização em microscópio estereoscópio. A porcentagem de inibição da replicação viral de cada amostra, com relação aos controles virais, foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 1 - [\text{n}^\circ \text{ placas amostra} / \text{n}^\circ \text{ placas controle viral}] \times 100$$

Os percentuais calculados foram inseridos em gráficos, e através da análise de regressão, foi possível calcular os valores de  $CI_{50}$ , concentração de cada amostra que inibiu 50% a infecção viral. Os valores de  $CI_{50}$  representam a média de, no mínimo, três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Com posse dos valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  foi possível calcular o índice de seletividade ( $IS = CC_{50}/CI_{50}$ ) de cada amostra, em relação à cepa viral utilizada.

Os valores de IS indicam o quanto a atividade antiviral de cada material testado pode ser promissor, ou seja, quanto maior for o valor do IS, mais seletivo será o material-teste ao vírus e não à célula hospedeira (COS et al., 2006).

#### 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). A diferença estatística entre os grupos de amostras foram testados quanto à sua significância estatística utilizando o teste ANOVA para dados paramétricos e teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, para comparação entre os grupos foi utilizado o teste de Bonferroni. O nível de significância foi fixado em  $p \leq 0,05$ . Todos os parâmetros medidos e calculados são relatados como média aritmética e desvio padrão (média  $\pm$  DP).

### 3. RESULTADOS DE DISCUSSÃO

#### 3.1. PADRONIZAÇÃO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FLAVONOIDES C-GLICOSÍDEOS

Com objetivo de padronizar a metodologia de obtenção de fração rica em flavonoides C-glicosídeos de *Cecropia glaziovii* Snethl, baseado em estudos realizados anteriormente por Costa et al. (2011), este trabalho comparou o rendimento de extração destes compostos utilizando as resinas poliméricas Amberlite® XAD-2 e XAD-16. Em seguida, a relevância da realização e das condições de partição foi avaliada, testando a ausência de partição, a partição combinando acetato de etila e *n*-butanol e partição utilizando somente *n*-butanol.



### 3.1.1. Avaliação comparativa da eficiência de extração dos marcadores ISOO e ISOV pelas resinas de troca iônica Amberlite® XAD-2 e XAD-16

Como primeira etapa da padronização da obtenção de uma fração rica em flavonoides C-glicosídeos, a eficiência das resinas Amberlite® XAD-2 e XAD-16 foi avaliada. Extratos foram preparados por turboextração utilizando água como líquido extrator e uma relação planta:solvente de 10% (m:v), mantendo as condições previamente estabelecidas descritas em Materiais e Métodos, e o rendimento em massa da fração (mg) e teor dos marcadores ISOO e ISOV (mg/g) foram determinados. No parâmetro rendimento em massa de fração, a resina XAD-16 proporcionou um rendimento quase cinco vezes superior à XAD-2, de  $38,49 \pm 0,00$  mg e  $8,14 \pm 0,00$  mg, respectivamente. Quanto aos teores dos marcadores presentes nas frações preparadas com as diferentes resinas, a análise de variância (ISOO,  $p = 0,008$  e ISOV,  $p = 0,000$ ) demonstrou que houve diferença na capacidade de extração. Os resultados expressos na tabela 1 evidenciam que XAD-2 foi mais eficiente que XAD-16 para a extração dos dois marcadores.

**Tabela 1:** Teor dos marcadores ISOO e ISOV após tratamento com resinas de troca iônica XAD-2 e XAD-16.

Marcadores	XAD-2	XAD-16
Isoorientina (mg/g)	$51,24 \pm 2,21$	$42,38 \pm 2,16$
Isovitexina (mg/g)	$28,44 \pm 1,23$	$20,92 \pm 0,17$

\*mg/g = mg de marcador por g de fração

A extração de flavonoides a partir de extratos vegetais utilizando resinas poliméricas como as amberlites XAD é uma técnica comum e praticada há bastante tempo (TOMÁS-BARBERÁN et al., 1992). Estudos mostram que a extração de flavonoides em diferentes matrizes, principalmente extratos vegetais ricos em compostos polares que não são de interesse, pode ser contornado pelo fracionamento destes compostos através da etapa de adsorção pela resina (ROSLER; GOODWIN, 1984; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1992; COSTA et al., 2011). Um estudo comparando a eficiência de extração de três resinas de poliestireno (XAD-2, XAD-4 e XAD-16) e duas resinas de poliacrílico (XAD-7 e XAD-8) mostrou que as de poliestireno foram mais eficientes na extração dos flavonoides quercetina, naringenina, rutina, naringina e tangeretina (TOMÁS-BARBERÁN et al., 1992).

As resinas Amberlite® XAD são esferas poliméricas porosas que variam entre si a composição química, porosidade, área superficial e

grau de polaridade (VOLPÉ; MALLETT, 1979). XAD-2 e XAD-16 são resinas apolares utilizadas normalmente para adsorção de substâncias orgânicas a partir de soluções aquosas com peso molecular acima de 20000 e 40000, respectivamente. Apresentam características físicas diferentes (tabela 2), o que diferencia o comportamento de adsorção entre elas. De uma maneira geral, a capacidade de adsorver um composto pode ser diretamente influenciada pelo momento dipolo, tamanho de poro e área superficial apresentado pela resina (SIGMA-ALDRICH, 1998).

**Tabela 2:** Características físicas da área superficial, diâmetro de poro e volume de poro das resinas Amberlite® XAD-2 e XAD-16 (HUBBARD; FINCH; DARLING, 1998).

<b>Resina</b>	<b>Área superficial (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>Diâmetro (nm)</b>	<b>Volume (mL/g)</b>
XAD-2	300	9	0,65
XAD-16	800	10	1,82

Os marcadores ISOO e ISOV apresentam peso molecular de 448,38 e 432,38 g/mol, o que possibilita a adsorção pelas duas resinas. Tendo em vista os valores da tabela 2, pode-se considerar que a fração preparada com XAD-16 apresentou maior quantidade em massa devido à extensa área superficial, conferindo a esta resina melhor capacidade de adsorção por ter maior diâmetro e volume de poro.

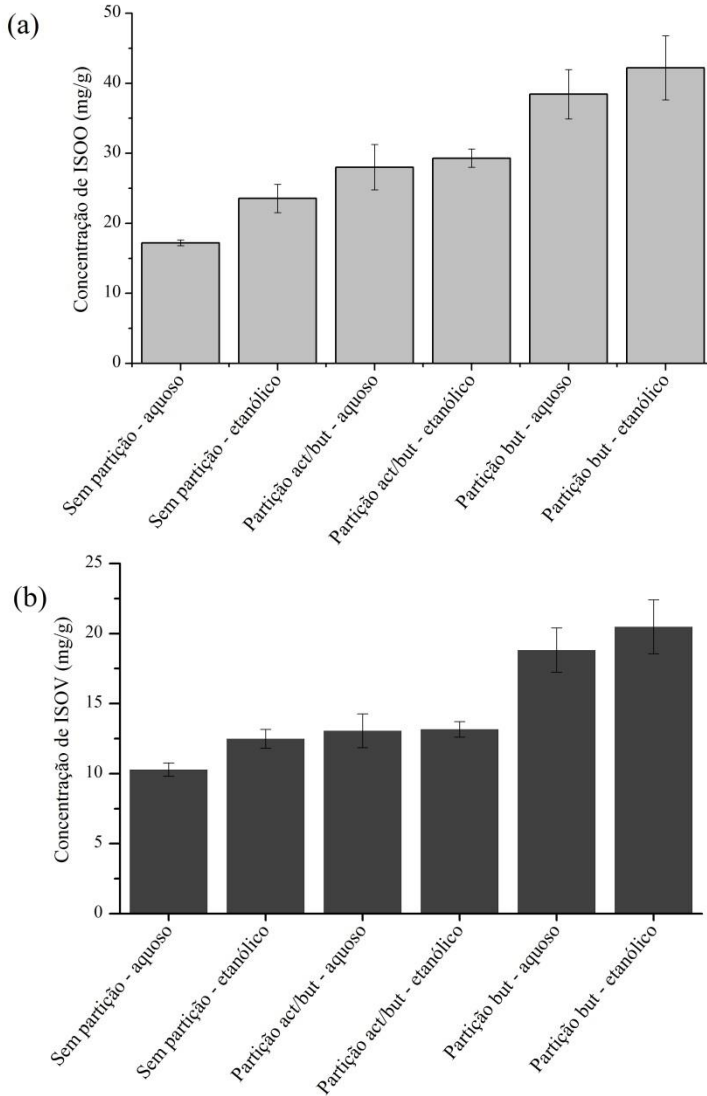
Com esses resultados, mesmo a resina XAD-2 apresentando maior relevância na extração dos marcadores, os valores de rendimento influenciaram diretamente na escolha da resina para dar continuidade à padronização de preparo da fração. Desta forma, os experimentos para avaliação da influência da partição do extrato bruto tiveram continuidade utilizando a resina XAD-16 para a adsorção dos flavonoides C-glicosídeos.

### **3.1.2. Avaliação da influência da partição do extrato bruto na obtenção da FEF-Cg**

A influência de partição prévia à extração com a resina Amberlite® para obtenção da FEF-Cg foi testada comparando os teores dos marcadores químicos de extratos preparados com água e etanol 20% como líquido extrator. A ausência (1) e diferentes condições de partição (partição com acetato de etila/*n*-butanol (2) e partição com *n*-butanol (3)) foram avaliadas.

Os resultados da análise de variância mostraram que houve diferença significativa entre os teores dos marcadores nas três condições de obtenção da fração com valor de  $p = 0,000$  para diferença entre os grupos tanto para teor de ISOO quanto para teor de ISOV. Além disso, os extratos preparados com etanol 20% apresentaram maiores teores dos marcadores comparados aos extratos aquosos (Figura 14), porém esta diferença não é significativa como podemos observar pelos valores de  $p > 0,05$  dispostos na Tabela 3. Ou seja, o líquido extrator, água ou etanol 20%, não influenciou na extração dos marcadores.

**Figura 14:** Valores médios para teores de ISOO (a) e ISOV (b) nas amostras de fração preparadas com diferentes condições de partição dos extratos aquoso e etanólico.



Fonte: Análise estatística resultados do Programa SPSS Statistics 17.0.

**Tabela 3:** Comparação entre os tratamentos sem partição, partição com acetato etila/*n*-butanol e partição com *n*-butanol dos extratos etanólico e aquoso. Significância dos resultados avaliados pelo teste ANOVA e comparação entre grupos pelo teste de Bonferroni.

Extrato etanólico	Extrato aquoso	<i>p</i> value	
		Teor ISOO	Teor ISOV
Sem partição	Sem partição	0,295	0,668
Partição acetato etila/ <i>n</i> -butanol	Partição acetato etila/ <i>n</i> -butanol	1,000	1,000
Partição <i>n</i> -butanol	Partição <i>n</i> -butanol	1,000	1,000

Os resultados ainda mostraram que a partição é uma etapa essencial na obtenção da fração e que a partição com *n*-butanol foi mais eficiente comparada à partição combinada com acetato de etila/*n*-butanol. Isto se deve ao fato da partição com *n*-butanol concentrar melhor compostos polares (WAN et al., 2011; ZUCOLOTTI et al., 2011; XIAO et al., 2013). Para ISOO o teor foi maior quando o extrato foi particionado, principalmente com *n*-butanol, resultando em valores estatisticamente diferentes nas condições partição *n*-butanol > partição acetato etila/*n*-butanol > sem partição. Já os teores de ISOV só apresentaram diferença estatística na partição com *n*-butanol. A partição com aceto de etila/*n*-butanol não demonstrou diferença significativa comparada às condições sem partição (tabela 5). Os resultados dos teores dos marcadores e da análise de variância (*p* value) estão descritos na tabela 4 e 5, respectivamente. A análise de variância indicou a relevância dos fatores em cada resposta de teor por valores de *p* iguais ou inferiores a 0,05.

**Tabela 4:** Concentração dos marcadores ISOO e ISOV em mg por gramas de extrato bruto após preparo da fração sem e com partição.

Extrato	Tratamento	ISOO (mg/g)	ISOV (mg/g)
Etanólico	Sem partição	23,56 ± 2,03	12,49 ± 0,67
	Partição acetato etila/ <i>n</i> -butanol	29,30 ± 1,31	13,16 ± 0,56
	Partição <i>n</i> -butanol	42,20 ± 4,59	20,48 ± 1,92
Aquoso	Sem partição	17,22 ± 0,41	10,29 ± 0,47
	Partição acetato etila/ <i>n</i> -butanol	28,02 ± 3,24	13,06 ± 1,21
	Partição <i>n</i> -butanol	38,44 ± 3,53	18,82 ± 1,58

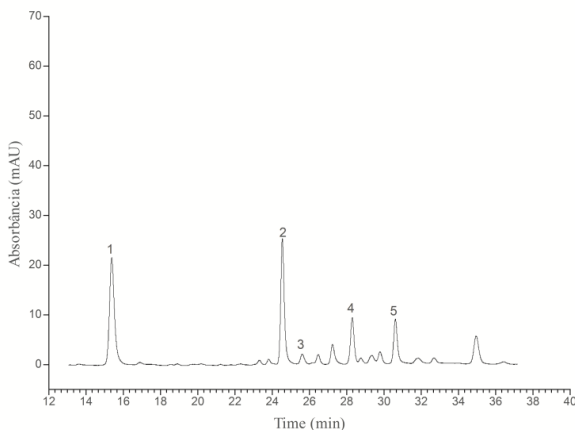
**Tabela 5:** Análise de Variância seguida de teste de Bonferroni para múltiplas comparações entre as amostras avaliadas na partição para padronização do preparo da FEF-Cg (SPSS Statistics 17.0).

		<i>p value</i>	<i>p value</i>
		<b>Teor</b>	<b>Teor</b>
		<b>ISOO</b>	<b>ISOV</b>
Extrato aquoso sem partição	Extrato etanólico sem partição	0,295	0,668
	Extrato aquoso partição act/but	0,010	0,232
	Extrato etanólico partição act/but	0,004	0,191
	Extrato aquoso partição <i>n</i> -butanol	0,000	0,000
	Extrato etanólico partição <i>n</i> -butanol	0,000	0,000
Extrato etanólico sem partição	Extrato aquoso sem partição	0,295	0,668
	Extrato aquoso partição act/but	1,000	1,000
	Extrato etanólico partição act/but	0,475	1,000
	Extrato aquoso partição <i>n</i> -butanol	0,001	0,000
	Extrato etanólico partição <i>n</i> -butanol	0,000	0,000
Extrato aquoso partição act/but	Extrato aquoso sem partição	0,010	0,232
	Extrato etanólico sem partição	1,000	1,000
	Extrato etanólico partição act/but	1,000	1,000
	Extrato aquoso partição <i>n</i> -butanol	0,013	0,001
	Extrato etanólico partição <i>n</i> -butanol	0,001	0,000
Extrato etanólico partição act/but			0,191
	Extrato aquoso sem partição	0,004	1,000
	Extrato etanólico sem partição	0,475	1,000
	Extrato aquoso partição act/but	1,000	0,001
	Extrato aquoso partição <i>n</i> -butanol	0,033	0,000
Extrato aquoso partição <i>n</i> -butanol	Extrato etanólico partição <i>n</i> -butanol	0,002	0,000
	Extrato aquoso sem partição	0,000	0,000
	Extrato etanólico sem partição	0,001	0,000
	Extrato aquoso partição act/but	0,013	0,001
	Extrato etanólico partição act/but	0,033	0,001
Extrato etanólico partição <i>n</i> -butanol	Extrato etanólico partição <i>n</i> -butanol	1,000	1,000
	Extrato aquoso sem partição	0,000	0,000
	Extrato etanólico sem partição	0,000	0,000
	Extrato aquoso partição act/but	0,001	0,000
	Extrato etanólico partição act/but	0,002	0,000
	Extrato aquoso partição <i>n</i> -butanol	1,000	1,000

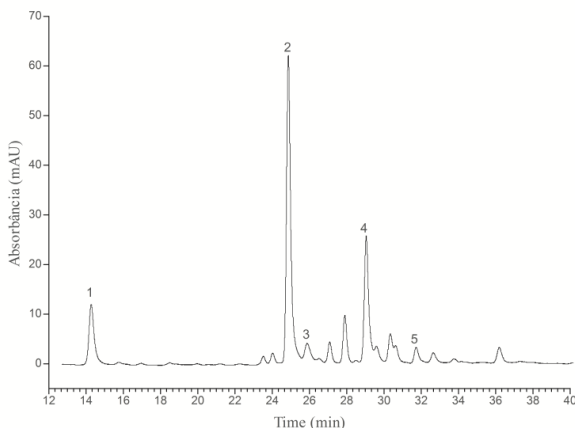
act/but: acetato de etila/*n*-butanol

As figuras 15 e 16 mostram os cromatogramas do extrato bruto etanólico e fração enriquecida e seus respectivos marcadores.

**Figura 15:** Cromatograma do extrato bruto etanólico ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) de *C. glaziovii*. 1. Ácido clorogênico; 2. isoorientina; 3. orientina; 4. isovitexina; 5. isoquercitrina. Condições cromatográficas: fase estacionária coluna Brownlee® Choice C18 ( $150 \times 4,6 \text{ mm i.d.}$ ;  $5\mu\text{m}$ ); fase móvel: gradiente combinando acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido acético 1% (pH= 3) (B) nas seguintes condições: 0-30 min gradiente linear de A-B (5:95 v/v) para A-B (20:80 v/v); 30-40 min, isocrático A-B (20:80); vazão:  $1 \text{ mL/min}$ ; detecção:  $340 \text{ nm}$ .



**Figura 16:** Cromatograma da fração enriquecida ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) de *C. glaziovii*. 1. Ácido clorogênico; 2. isoorientina; 3. orientina; 4. isovitexina; 5. isoquercitrina. Condições cromatográficas: igual Fig. 15.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Desta forma, as condições padronizadas para obtenção da fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos de *C. glaziovii* foram partição do extrato bruto com *n*-butanol seguida de tratamento com resina de troca iônica Amberlite® XAD-16.

### 3.2. AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL

Como citado anteriormente, a detecção da atividade antiviral contra os vírus HSV-1 e HSV-2 de extratos preparados com folhas de *C. glaziovii* foi tema da dissertação de Mestrado (PGFAR, UFSC) de Silva (2009) e os resultados já foram publicados em Silva et al. (2010). A atividade detectada foi atribuída, especialmente, aos flavonoides C-glicosídeos, uma vez que a fração enriquecida nesses flavonoides apresentou melhor atividade, quando comparada à do extrato bruto obtido por infusão. Além disso, Petronilho e colaboradores (2012) também evidenciaram a atividade antiviral de *C. glaziovii* de um extrato hidroetanólico (etanol 40°GL) preparado por refluxo à 90°C contra uma cepa de HSV-1 resistente ao aciclovir (29-R). Neste caso, a atividade foi atribuída aos compostos fenólicos presentes em maior concentração no extrato vegetal.

Sendo assim, pelo ponto de vista tecnológico, esta fração é um candidato promissor para o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado que possibilite uma maior permanência dos ativos no local de ação, além de uma concentração maior dos mesmos, garantindo sua biodisponibilidade (MOHANRAJ; CHEN, 2006). Após a padronização de preparo da FEF-Cg o próximo passo foi determinar sua citotoxicidade em células VERO e avaliar sua atividade antiviral utilizando o vírus Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1) cepa KOS.

#### 3.2.1. Determinação da citotoxicidade

Para avaliação da atividade antiviral do extrato, primeiramente foi determinada a concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular (CC<sub>50</sub>). A linhagem celular Vero é usada extensivamente para estudos de replicação de vírus e ensaios de placas de lise, uma vez que apresenta boa susceptibilidade à infecção pelo HSV-1, possibilitando sua multiplicação com demonstração de efeito citopático visível ao microscópio invertido (HU; HSIUNG, 1989).

Tendo em vista que o ensaio da sulforrodamina B é colorimétrico e a taxa de viabilidade celular é medida indiretamente pela intensidade de coloração, decidiu-se usar um segundo método como contra-prova para a avaliação dos resultados de citotoxicidade das amostras. O ensaio da sulforrodamina B possibilita a quantificação da biomassa celular total



devido à ligação do corante aos componentes proteicos das células (SKEHAN et al., 1990; VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Já a avaliação da viabilidade celular pelo teste de exclusão com o azul de tripano quantifica as células que não permitiram a penetração do corante. Este fenômeno de permeabilidade da membrana celular permite estimar indiretamente o grau de integridade da mesma, e o percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular (WANG et al., 2012).

As amostras do extrato bruto e da FEF-Cg foram avaliadas em diferentes concentrações (4,88 – 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), porém foi observada a presença de uma fina camada do extrato bruto, depositada na superfície da monocamada celular, nas concentrações mais elevadas, dificultando a visualização microscópica da morfologia das mesmas. Além disso, sua coloração escura influenciou no aumento da absorvância durante a leitura espectrofotométrica com a sulforrodamina B e na contagem de células com o azul de tripano. Desta forma, reduziu-se a concentração máxima para 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e obteve-se um valor de  $\text{CC}_{50} > 2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para ambas as amostras. Assim, pôde-se confirmar que tanto o extrato bruto quanto a FEF-Cg, nas condições experimentais testadas, não apresentaram efeitos citotóxicos visíveis para esta linhagem celular.

### **3.2.2. Ensaio de redução do número de placas de lise**

Na avaliação do potencial efeito anti-herpético de diferentes concentrações do extrato bruto e da FEF-Cg (5 – 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), pôde-se observar que a concentração de 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ambas as amostras inibiu 100% da replicação do HSV-1. A partir destes resultados, foi calculada a concentração em que cada amostra inibiu 50% a infecção viral ( $\text{CI}_{50}$ ). Os valores de  $\text{CI}_{50}$  para o extrato bruto etanólico e a fração enriquecida foram de  $48,41 \pm 8,43 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $18,81 \pm 2,74 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Estes resultados demonstram que a fração enriquecida é mais potente, quando comparada ao extrato bruto, uma vez que uma concentração menor foi capaz de inibir 50% da replicação do vírus HSV-1. Este perfil é condizente com dados da literatura, que relatam que extratos brutos exercem frequentemente efeitos farmacológicos potentes; porém, a partição de extratos brutos com solventes de diferentes polaridades costuma ser mais potente quando comparados com o extrato bruto que lhes deu origem (OSADEBE; OKOYE, 2003; RAMOS ALMEIDA et al., 2006; KUETE et al., 2007; TONGPOOTHORN et al., 2012).

De posse dos valores de  $\text{CC}_{50}$  e  $\text{CI}_{50}$  das amostras testadas foi possível calcular os valores de índice de seletividade (IS), utilizado como um critério de avaliação da atividade antiviral expressa pela razão

entre  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  (FDA, 2006). Para o extrato bruto e a FEF-Cg, os valores de IS foram  $> 41,31$  e  $> 106,33$ , respectivamente. Quanto maior for o valor de IS mais promissor será o composto em questão. Lyu, Rhim e Park (2005) consideram que valores de IS  $> 4$  indicam que uma amostra em estudo possui efeito antiviral. Tendo em vista que a fração enriquecida foi preparada para a realização deste trabalho de maneira similar àquela usada por Silva (2009), pode-se aqui confirmar a ação anti-herpética anteriormente detectada, onde o valor de IS obtido para fração foi bastante semelhante:  $> 130,9$ .

#### 4. REFERÊNCIAS

- COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* “proof-of-concept”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290–302, 2006.
- COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1096–1102, 2011.
- FALKENBERG, M. DE B.; SANTOS, R. I. DOS; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Florianópolis/Porto Alegre: p. 229–246.
- FDA, **Food and Drug Administration**. Guidance for Industry Antiviral Product Development — Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency. Disponível em:  
<<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/05d-0183-gdl0002-01.pdf>>.
- HU, J. M.; HSIUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents : I. *In vitro* perspectives. **Antiviral Research**, v. 11, p. 217–232, 1989.
- HUBBARD, K. L.; FINCH, J. A.; DARLING, G. D. Polymers with pendant vinyl groups, including poly(divinylbenzene-co-ethylvinylbenzene). **Reactive & Functional Polymers**, v. 36, n. 1, p. 1–16, 1998.
- LUENGAS-CAICEDO, P. E. **Contribuição para a padronização de extratos de folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl.: Estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonóides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vasorelaxante**. 2005. 292p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2005.

- LYU, S.-Y.; RHIM, J.-Y.; PARK, W.-B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 11, p. 1293–1301, 2005.
- MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y.; CHEN, M. &. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 561–573, 2006.
- ONG, E. S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 812, p. 23–33, 2004.
- PETRONILHO, F. et al. Hepatoprotective effects and HSV-1 activity of the hydroethanolic extract of *Cecropia glaziovii* (embauba-vermelha) against acyclovir-resistant strain. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 7, p. 911–918, 2012.
- ROSLER, K.-H.; GOODWIN, R. S. A general use of Amberlite XAD-2 resin for the purification of flavonoids from aqueous fractions. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 1, p. 188, 1984.
- SIGMA-ALDRICH. **Amberlite XAD polymeric resins**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com>>. Acesso em: 10fev. 2015.
- SILVA, I. T. DA. **Triagem anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade brasileira: Fracionamento biomonitorado de *Cecropia glaziovii* Sneth., Urticaceae (embaúba)**. 2009. 133p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.
- SILVA, I. T. et al. *In vitro* antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 143–148, 2010.
- SKEHAN, P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for anticancer-Drug screening. **Journal of the Cancer Institute**, p. 1107–1112, 1990.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A. et al. A comparative study of different amberlite XAD resins in flavonoid analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 3, n. 4, p. 178–181, 1992.
- TONGPOOTHORN, W. et al. Bioactive properties and chemical constituents of methanolic extract and its fractions from *Jatropha curcas* oil. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 437–444, 2012.
- VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

VOLPÉ, G.; MALLET, V. N. Recovery of fenitrothion from water using Amberlite resin XAD-7. **Journal of Chromatography**, v. 177, p. 385–389, 1979.

WAN, C. et al. Isolation and identification of phenolic compounds from *Gynura divaricata* leaves. **Pharmacognosy Magazine**, v. 7, n. 26, p. 101-108, 2011.

WANG, Y. et al. Flavone C -glycosides from the Leaves of *Lophatherum gracile* and Their *In Vitro* Antiviral Activity. **Planta Medica**, v. 78, n. 01, p. 46–51, 2012.

XIAO, W. et al. Isolation and Purification of Natural Products. In: *Natural Product Extraction: Principles and Applications*, p. 314-362.

ZUCOLOTTO, S. et al. Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 232-239, 2012.

## **Capítulo 2**

*Desenvolvimento e efeito do armazenamento na estabilidade  
das nanopartículas de PLGA contendo fração rica em  
flavonoides C-glicosídeos*

---



## INTRODUÇÃO

Os resultados deste trabalho estão escritos em forma de artigo e foram publicados na revista *Pharmaceutical Development and Technology* (Apêndice A). O artigo trata da obtenção de nanopartículas de PLGA contendo a fração enriquecida a partir de um estudo que avaliou a técnica de preparação e os tensoativos na fase aquosa interna e externa. Os sistemas foram caracterizados quanto ao tamanho médio, polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação e teor de fração.

O artigo conta também com resultados de um estudo de estabilidade em temperatura ambiente das formulações conduzido por um período de 60 dias. O objetivo principal deste estudo foi avaliar a capacidade de manutenção das principais características das formulações e, desta forma, inferir a contribuição do tipo de tensoativo presente na fase orgânica e da concentração do poloxamer 188 na fase aquosa interna sobre a estabilidade das mesmas. Durante este período, as formulações foram periodicamente caracterizadas por seus aspectos físicos e pela medida do tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, e da concentração de fração livre no sobrenadante.

## Development and effect of storage on the stability of Enriched Flavonoid Fraction of *Cecropia glaziovii*-loaded PLGA nanoparticles

Talitha Caldas dos Santos<sup>a,b,c</sup>, Mariana Alves Battisti<sup>a</sup>, Caroline Flach Ortmann<sup>b</sup>, Flávio Henrique Reginatto<sup>b</sup>, Cláudia Maria Oliveira Simões<sup>c</sup>, Angela Machado de Campos<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil.

<sup>b</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

<sup>c</sup>Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil.

\*Corresponding author at: Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil. Tel.: +55 48 3721 5067; fax: +55 48 3721 9350

E-mail address: angela.campos@ufsc.br

**Keywords:** PLGA nanoparticles. Enriched flavonoid fraction of *Cecropia glaziovii* Snethl. Stability study. Double emulsion.

### Abstract

Studies employing *Cecropia glaziovii* Snethl leaves have shown great potential in regard to their antiviral activity, mainly related to the phenolic compounds present in this species. The main goal of this work is to combine the therapeutic potential of this species with new technological strategies targeted at the development of an herbal nanoparticulate system for prepare a phytotherapeutic formulation. Poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles containing the enriched flavonoid fraction of *Cecropia glaziovii* Snethl were developed through a study for the choice of preparation technique, amount of drug and surfactants used. These nanostructured systems were characterized by particle size, polydispersity, zeta potential, encapsulation efficiency, and drug loading capacity. A stability study of the formulations was conducted at room temperature over a period of 60 days. The optimal formulation that best fit the characteristics of the encapsulated material was determined.



Sorbitan monooleate and the poloxamer 188 resulted in better colloidal stability, added to the organic and aqueous phases, respectively. These findings suggest that in the field of nanoparticles stability, it is important to evaluate the composition of the nanoparticulate system. This work highlights the importance of the optimization process, searching for a good formulation with suitable structural stabilization.

## 1. INTRODUCTION

In the field of drug delivery systems, nanoparticles of biodegradable polymers have been widely studied. Nanoparticles offer several advantages for improving the pharmacological and toxicological profile of therapeutic agents, and can provide site-specific and continuous therapeutic drug levels for extended periods of time (RESCIGNANO et al., 2013). Drug-delivery systems can be synthesized with controlled composition, shape, size and morphology (GOLDBERG; LANGER; JIA, 2007). Therefore, encapsulation is a useful technological tool in the pharmaceutical industry for the development of products with pharmaceutical potential (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2011; CHAN et al., 2010).

The use of herbal products in alternative medicine is becoming increasingly popular (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2011; ONWULATA, 2012). A delivery system can promote better chemical stability of the extract by isolating active compounds from a matrix. In folk medicine, the leaves of *Cecropia glaziovii* SnehI are used in the treatment of several diseases (MATOS; LORENZI, 2008; RAMOS ALMEIDA et al., 2006). Furthermore, pre-clinical assays were performed and antihypertensive, bronchodilator, antiulcer and anxiolytic-like activities were reported for this species (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011). *In vitro* antiviral studies conducted by Silva et al. (2010) compared the antiherpes effects of the crude aqueous extract obtained from *C. glaziovii* leaves and their related fractions. The results indicated that an enriched flavonoid fraction (EFF-Cg) of this plant can be regarded as a phytopharmaceutical candidate for the treatment of herpetic infections since it presented the most promising antiviral activity against *Herpes Simplex Virus* (HSV) types 1 and 2, when compared to the other tested samples. Concerning its chemical stability, previous studies evaluated the stability of the crude aqueous extract and the EFF-Cg. The stress conditions as temperature, UV light, acid, alkaline and neutral hydrolysis, oxidation during different times; and accelerated stability studies during six months, and also refrigerated conditions were used as study parameters. Quantitative analyses were

performed by HPLC/DAD and chlorogenic acid, isoorientin and isovitexin were chosen as major markers. The results demonstrated three degradation products for crude extract sample and only one for EFF-Cg during stress tests. It was observed that the C- glycosylflavonoids (isoorientin, isovitexin) showed higher stability on these stability studies compared to chlorogenic acid (ORTMANN, 2013). In view of this significant pharmacological activity, we decided to encapsulate this EFF-Cg into poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles as a drug delivery system. Among the synthetic polymers, PLGA is one of the most common materials used in the preparation of drug delivery systems, due to its safety in approved Food and Drug Administration applications in humans (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008).

The integrity of the nanoparticulate system after preparation is often not known, and even less is known concerning the long-term stability behavior of plant extracts when encapsulated into nanoparticles formulations. Nanoparticles present a drawback, which is their poor long-term stability in aqueous systems, including the tendency to form aggregates, which is often correlated with a loss of efficiency and applicability (REGAN; MULVIHILL, 2009; SOARES et al., 2013). The long-term storage stability of nanoparticles is an important parameter in the development of a formulation, where a major requirement is that the formulation can be reproducibly prepared and stored for an extended period of time while maintaining complete particle integrity and biological activity (DESAI, 2012).

The aims of this study were to develop PLGA nanoparticles containing EFF-Cg obtained from the extract of *Cecropia glaziovii* leaves, using double emulsion and nanoprecipitation methods, and to assess the influence of the surfactant type and different amounts of drug on particle characteristics. A stability study of these nanoparticles was also conducted, at room temperature, and the influence of storage conditions on the particle characteristics (particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, pH determination and supernatant quantification) was evaluated over a 60-day period.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Resomer PLGA 503H biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid) polymer (LA:GA 50:50, MW 24 000 – 38 000; inherent viscosity: 0.32 – 0.44 dL g<sup>-1</sup>; end group: free carboxylic acid) was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany) and stored -20°C prior to use. Freeze-dried EFF-Cg, standardized as 1 g of EFF-Cg corresponding to 143.9 ± 1.7 mg of isoorientin, was used as a water-

soluble drug. Soybean lecithin (75% hydrogenated) (Lipoid GMBH, Ludwigshafen, Germany) and sorbitan monooleate (SPAN 80, Merck, Darmstadt, Germany) were used as surfactants in the organic phase, and poloxamer 188 (Pluronic F68, BASF, St. Louis, EUA) and Poly (vinyl alcohol) (Mowiol 40 –88, MW ~ 205 000 g mol<sup>-1</sup>, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) were used in the aqueous phases. Chlorogenic acid, isoorientin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-6-glucoside, purity ≥ 98%) and isovitexin (4',5,7-tetrahydroxyflavone-6- glucoside, purity ≥ 98%) analytical standards were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Acetonitrile and acetic acid were purchased from VETEC (São Paulo, Brazil) and were of analytical grade. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q apparatus (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

#### *Plant material*

Dried leaves of *C. glaziovii* Snethl were obtained from the *Unidade de Conservação Ambiental Desterro* – UCAD, an environmental conservation area in Florianópolis, SC, Brazil. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Universidade Federal de Santa Catarina, under identification number FLOR 37143.

#### 2.1. EXTRACTION AND PREPARATION OF ENRICHED FLAVONOIDS FRACTION OF *Cecropia glaziovii* Snethl (EFF-Cg)

The extraction procedure was performed according to previously standardized conditions in order to maximize the extraction of the chemical markers; the flavonoids isoorientin and isovitexin. Briefly, the crude extract was prepared by turbo-extraction with an homogenizer using 5% (w/v) of ground plant material, 20% (v/v) water:ethanol solution as the extraction liquid, and extraction time of 5 minutes. The extract prepared under these conditions was concentrated under vacuum, freeze-dried without addition of adjuvants and used as the standardized dry extract (SDE) in this study. From SDE, an enriched flavonoid fraction (EFF-Cg) was prepared using the technique described by Costa et. al. (2011) with some modifications. Briefly, SDE was partitioned with *n*-butanol and concentrated under reduced pressure; the resultant dry residue was resuspended in distilled water and stirred with Amberlite XAD-16 ion exchange resin. Next, the resin was extracted by methanol to obtain the *C*-glycosylflavonoid-enriched fraction, dried under reduced pressure, and lyophilized. The EFF-Cg was used for further development of EFF-Cg-loaded nanoparticles.

## 2.2. HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYSIS

The content of the isoorientin in samples was determined by HPLC using chromatography conditions validated by Costa et al. (2011) (14). The chromatographic analysis was performed on a PerkinElmer chromatograph equipped with a Series 200 auto sampler, Series 200 binary pump, Series 200UV-Vis detector. The separation was performed in a PerkinElmer Brownlee Choice C<sub>18</sub> column (5  $\mu$ m, 150 mm $\times$ 4.6 mm), and the mobile phase consisted of a linear gradient between acetonitrile (A) and acetic acid 1.0% (B) as follows: 5–20% A (0–30 min) and isocratic 20% A (30–40 min) with a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. UV sample detection was performed at 340 nm.

## 2.3. DETERMINATION OF EFF-Cg SOLUBILITY

The solubility of EFF-Cg was determined by adding an excess amount of this fraction to water and dichloromethane, solvents used in the preparation of the nanoparticles. Suspensions were kept under magnetic stirring for 24 h at room temperature. After, the samples were filtered through a 0.45  $\mu$ m membrane, and an aliquot was diluted with methanol:water (1:1, v/v). EFF-Cg concentration was determined by HPLC and it was expressed as concentration of isoorientin present in the solution. The experiments were performed in triplicate.

## 2.4. DEVELOPMENT OF PLGA NANOPARTICLES

*Nanoparticles obtained by the double emulsion method (DE):* PLGA nanoparticles were prepared using a modified solvent emulsification-evaporation method based on a w/o/w double emulsion (EIDI et al., 2010). Briefly, EFF-Cg was dissolved in 1 mL of aqueous surfactant solution (poloxamer 188, 0.5%, w/v) (internal aqueous phase, w<sub>1</sub>) and added to 4 mL of dichloromethane containing the lipophilic surfactant sorbitan monooleate (0.5%, w/v) and 100 mg of PLGA (organic phase, o). This mixture was stirred for 2 min using a sonicator Sonic Dismembrator F60 (Fisher Scientific, France) to obtain the primary water-in-oil (w<sub>1</sub>/o) emulsion. This primary emulsion was then poured onto 40 mL of 0.5% (w/v) surfactant solution (external aqueous or dispersing phase, w<sub>2</sub>) and mixed using the same sonication conditions to obtain the double emulsion (w<sub>1</sub>/o/w<sub>2</sub>). The double emulsion was submitted to evaporation under reduced pressure at 40°C until 10 mL of nanoparticles suspension were obtained.

*Nanoparticles obtained by nanoprecipitation method (NP):* PLGA nanoparticles were prepared by nanoprecipitation method

adapted from Eidi et al. (2010) (15), EFF-Cg was dissolved in 1 mL of ultrapure water and added to the organic phase, 15 mL of acetone containing 300 mg of PLGA and sorbitan monooleate (0.5 %, w/v). This solution was poured under stirring magnetic in 40 mL of 0.5% (w/v) surfactant solution (dispersing phase), thereby leading to the formation of EFF-Cg-loaded nanoparticles. The organic solvent was evaporated under reduced pressure at 40°C and the final volume was adjusted to 10 mL.

*Influence of the surfactants in the external aqueous phase:* The effects of hydrophilic surfactants on the physical characteristics of nanoparticles were evaluated. Blank nanoparticles were formulated using poloxamer 188 (PLU) or poly (vinyl alcohol) (PVA) in the dispersing phase, and their particle size and polydispersity were compared.

## 2.5. NANOPARTICLES CHARACTERIZATION

### 2.5.1. Particles size, size distribution and zeta potential

Particle size and particle size distribution were determined by dynamic light scattering and zeta potential by laser-Doppler anemometry using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). The measurements were conducted in triplicate at 25°C after sample dilution in ultrapure water and placed in appropriate cells for each evaluation.

### 2.5.2. Encapsulation efficiency (EE) and drug loading capacity

Nanoparticles samples were placed in Ultracel-100 kDa filter devices (Amicon Ultra, Millipore, USA) and centrifuged at 6 200 rpm for 30 min at 25°C. Free EFF-Cg in terms of isoorientin was quantified by a previously validated HPLC method (COSTA et al., 2011). Samples were prepared in triplicate. The percentage encapsulation efficiency was calculated by the formula: (amount of EFF-Cg associated in nanoparticles/total EFF-Cg amount) x 100. The percentual drug loading for each formulation was expressed by the total amount of EFF-Cg (mg) in the nanoparticles for 100 mg of PLGA.

### 2.5.3. *In vitro* drug release

*In vitro* release profile was performed using phosphate buffer solution pH 7.4 (45 mL) and then 5 mL nanoparticles suspension (containing 689.7 µg total flavonoids) were suspended in glass bottles and incubated at 37°C under stirring at 70 rpm. Aliquots of 500 µL were withdrawn for analysis at specified time interval. The samples were then

filtered and the supernatants were analyzed by HPLC method as described above. The results obtained in triplicate were demonstrated as release of total flavonoids, the content of total flavonoids was expressed in terms of isoorientin equivalent. The release of free EFF-Cg was conducted under the same conditions as controls.

The drug release mechanism from the nanoparticles was analyzed by different mathematical models using DDSolver program. The drug release data were fitted with mathematical models.

## 2.6. PLGA NANOPARTICLES STABILITY AT ROOM TEMPERATURE

Six formulations were prepared with two different stabilizers of the organic phase (sorbitan monooleate and soybean lecithin) and two concentrations of poloxamer 188 in the internal aqueous phase (0.5 and 1%) (Table 6). For all formulations, the amounts of PLGA (100 mg) and EFF-Cg (10 mg) were kept constant.

**Table 6:** Formulations factors and parameter variations for stability study at room temperature.

Formulation	Organic phase			Internal aqueous phase	
	PLGA (mg)	Sorbitan Monooleate (%)	Lecithin (%)	Poloxamer 188 (%)	EFF-Cg (mg)
F1	100			1.0	10
F2	100			0.5	10
F3	100	4		0.5	10
F4	100		2.5	1.0	10
F5	100		2.5	0.5	10
F6	100	2		0.5	10

A 60-day study was performed to evaluate the stability of nanoparticles suspensions stored under static conditions at room temperature ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and protected from light. Immediately after preparation as well as after 5, 15, 30 and 60 days of storage, the samples were analyzed in triplicate for physical stability, particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, pH value, encapsulation efficiency and EFF-Cg loading. The physical stability during storage was monitored by visually examining changes in color and odor, occurrence of agglomerates, particle sedimentation and phase separation phenomena. For the qualitative evaluation, these parameters were rated using the following symbols: particle sediment (+ = traces, ++ = moderate and +++ = a lot), change in color (+ = yes, - = no), particle

agglomerates (+ = yes, - = no). At each of predetermined times, particle size, PDI and zeta potential were estimated as described above; particle size and size distribution were also determined by laser diffraction using a Mastersizer 2000 size analyzer (Malvern Instruments, UK); the pH values of the formulations were determined directly in the samples using a calibrated potentiometer (pHmetro Oakton WD-35613-00/EUA) at room temperature; and the amount of free isoorientin in the dispersing phase was estimated by HPLC, according to the methodology described above.

## 2.7. STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using SPSS software version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Differences between the test sites were tested for their statistical significance using the ANOVA test for paired data or Kruskal-Wallis test for not normally distributed non-paired data. The significance level was set at  $p \leq 0.05$ . All measured and calculated parameters are reported as arithmetic mean and standard deviation (mean  $\pm$  SD).

## 3. RESULTS

### 3.1. DETERMINATION OF EFF-Cg SOLUBILITY

Solubility of EFF-Cg in water and dichloromethane was evaluated in order to determine which medium that the fraction is more soluble. Results demonstrated that EFF-Cg was more soluble in water ( $1650 \pm 0.19 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) compared with dichloromethane ( $4.07 \pm 0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). On the basis of these results, it concludes that the EFF-Cg presents a hydrophilic profile.

### 3.2. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF PLGA NANOPARTICLES

In order to develop a polymeric nanoparticulate system capable of satisfactorily encapsulating EFF-Cg and, to obtain the highest encapsulation efficiency, nanoparticles were obtained with two different methods using well known polymer. Table 7 shows the physicochemical properties of the formulations prepared by DE and NP. To achieve the suitable amount of EFF-Cg for nanoparticles preparation, a range of  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  to  $40 \text{ mg mL}^{-1}$  concentrations of EFF-Cg (around of  $0.8$  to  $3.3 \text{ mg mL}^{-1}$  of isoorientin) in the internal aqueous phase was tested. The obtained results showed that the particle size values were not altered with increasing concentrations of EFF-Cg in the formulations ( $p = 0.08$ ). Likewise, the PDI values were not altered with the increase in EFF-Cg

concentration, indicating a high homogeneity in the particle distribution for all formulations, with values less than 0.2 (GAUMET et al., 2008). As shown in Table 7, the EE values gradually decreased as the concentration of EFF-Cg in the formulation increased, and in the case of the NP 30 mg mL<sup>-1</sup> and NP 40 mg mL<sup>-1</sup> formulations, a solid drug-free presence was observed immediately after preparation of the formulation. This might be due to a solubility problem of EFF-Cg or an incompatibility with any component of the formulation, resulting in precipitation of the fraction in small particles dispersed in the supernatant. These formulations were therefore excluded from the study since the nanoparticulate system was not able to encapsulate these quantities of the EFF-Cg. In the results for drug loading capacity of the formulations prepared by DE, the drug loading values increased with increasing amounts of EFF-Cg.

**Table 7:** Properties of nanoparticles prepared by double emulsion (DE) and nanoprecipitation (NP) techniques containing 10, 20, 30 or 40 mg of EFF-Cg (The results represent the mean  $\pm$  SD).

Formulation	Particle size (nm)	PDI	EFF-Cg encapsulation efficiency (%)	EFF-Cg loading (%)
DE 10 mg	172 $\pm$ 1	0.15 $\pm$ 0.02	68.04 $\pm$ 6.58	0.68 $\pm$ 0.07
DE 20 mg	186 $\pm$ 2	0.17 $\pm$ 0.03	55.63 $\pm$ 4.88	1.12 $\pm$ 0.10
DE 30 mg	185 $\pm$ 2	0.17 $\pm$ 0.01	47.56 $\pm$ 1.19	1.58 $\pm$ 0.04
DE 40 mg	185 $\pm$ 2	0.18 $\pm$ 0.02	41.65 $\pm$ 3.35	2.34 $\pm$ 0.11
NP 10 mg	144 $\pm$ 1	0.13 $\pm$ 0.01	55.08 $\pm$ 6.43	0.55 $\pm$ 0.06
NP 20 mg	159 $\pm$ 1	0.10 $\pm$ 0.03	51.78 $\pm$ 6.08	1.04 $\pm$ 0.12
NP 30 mg	NT	NT	NT	NT
NP 40 mg	NT	NT	NT	NT

NT: Not tested.

### 3.2.1. Influence of the surfactants in the external aqueous phase

The goal of this study was to assess the characteristics of blank PLGA nanoparticles using two non-ionic surfactants, poloxamer 188 (PLU) and poly (vinyl alcohol) (PVA), commonly used for the stabilization of PLGA nanoparticles. Other parameters were kept constant, e.g. the preparation technique (double emulsion), the internal

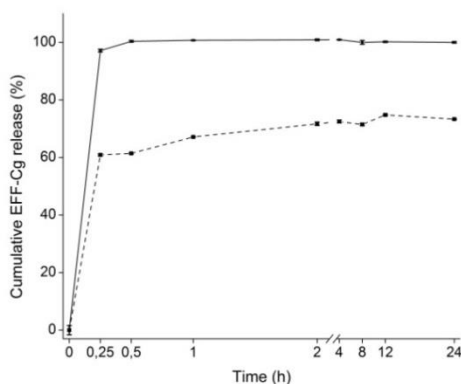


aqueous phase volume (1 mL), the amount of polymer (100 mg), the volume of organic phase (4 mL, dichloromethane), and the volume of the external aqueous phase (40 mL). The final volume of formulation was 10 mL and the surfactant concentration was 2% (w/v). The surfactant was chosen based on particle size and polydispersity index data. The results showed that all the formulations prepared under these conditions formed colloidal nanosystems; however, differences in particle characteristics were observed; smaller nanoparticles were observed using PLU in comparison with PVA,  $276 \pm 8$  and  $442 \pm 7$  nm, respectively and a PDI value of  $0.18 \pm 0.02$  was observed for both nanoparticulate systems.

### 3.2.2. *In vitro* drug release

In Fig. 17 the *in vitro* drug release from PLGA nanoparticles suspension were performed in PBS pH 7.4. The release of free EFFE-Cg was also investigated as control and showed constant concentration during the experiment. The release pattern of the nanoparticles showed an initial burst release of about 60% due to EFF-Cg free dispersed in the supernatant followed by a slowed release over a period of 24 h. The total cumulative release percentage of EFF-Cg represented as total flavonoids from PLGA nanoparticles was around 75% over these conditions, which exhibited a sustained release pattern.

**Figure 17:** Cumulative release of EFF-Cg from PLGA nanoparticles (dash line) and free EFF-Cg (solid line) in phosphate buffered saline pH 7.4 at 37°C during 24 h.



FONTE: Desenvolvido pelo autor.

### 3.3. STUDY OF PLGA NANOPARTICLES STABILITY AT ROOM TEMPERATURE

The formulations described in Table 6 were evaluated in relation to their visual appearance and the basic physicochemical characteristics of the nanoparticles. The features of visual appearance after 60 days of storage are summarized in Table 8. Within the set of samples obtained by double emulsion, the results showed no changes in odor and/or phase separation phenomena. Visually, the formulations showed changes in color after 5 days. In formulations F1, F2, F4 and F5, a change in color, from milky white to yellowish, was observed, and in the F3 and F6, there was a color change to pinkish. (see evidence in Apêndice B).

**Table 8:** Qualitative evaluation of PLGA nanoparticles after 60 days of storage at room temperature.

<b>Visual appearance</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>	<b>F6</b>
Change in color	+	+	+	+	+	+
Particle agglomerates	-	-	-	+	+	-
Particle sedimentation	+++	+++	+	++	++	+++

Change in color and particle agglomerates (+ = yes, - = no); particle sediment (+ = traces, ++ = moderate and +++ = a lot).

Particle sedimentation was observed during the study in all formulations, but with different magnitudes, depending on the type and amount of surfactant added to each formulation. Formulations F1 and F2, prepared without surfactant in the organic phase, presented particle sedimentation after 5 days of storage. Formulation F3 presented a lower sedimentation rate when compared to the other formulations at all evaluated times. Formulations F4 and F5, prepared with lecithin in the organic phase, showed less sediment compared to F1 and F2. Moreover, in formulations F4 and F5, the presence of particle aggregates was observed, adhered to the walls of the vial containing the sample. Formulation F6, which contained half of the concentration of sorbitan monooleate in the organic phase compared to F3, also showed a higher amount of sediment at the end of the 60-day experimental period (see evidence in Apêndice B).

To obtain more information about the physical stability of these formulations, analysis of particle size, particle size distribution and zeta potential, pH determination and quantification of the isoorientin-free in the dispersing phase were performed immediately after preparation, and after 5, 15, 30 and 60 days of storage. As observed in Table 9, the particle size did not change during the stability study ( $p = 0.9574$ ), but particle sediment was observed in all formulations after the end of study. Thus, the particle size of these formulations was therefore evaluated for size and size distribution using another technique, laser diffraction, after the 60-day period. The measured sizes were larger, as reported in Table 10. This increase in the particle size, and consequently in size distribution, may be due to the aggregation process over the storage time (GUTERRES et al., 2010; CONTADO et al., 2013).

**Table 9:** Size, PDI and zeta potential values determined by dynamic light scattering and laser-Doppler anemometry, respectively, during the stability study under storage at room temperature (The results represent the mean  $\pm$  SD).

<b>Formulation</b>	<b>Time (days)</b>	<b>Size (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Zeta potential (mV)</b>
F1	1	201 $\pm$ 1	0.19 $\pm$ 0.01	-36.4 $\pm$ 0.21
	5	202 $\pm$ 3	0.18 $\pm$ 0.01	-38.3 $\pm$ 2.8
	15	204 $\pm$ 8	0.19 $\pm$ 0.02	-35.2 $\pm$ 2.6
	30	212 $\pm$ 2	0.19 $\pm$ 0.02	-36.2 $\pm$ 2.1
	60	212 $\pm$ 2	0.20 $\pm$ 0.01	-34.8 $\pm$ 0.6
F2	1	203 $\pm$ 3	0.20 $\pm$ 0.01	-39.8 $\pm$ 3.4
	5	201 $\pm$ 3	0.18 $\pm$ 3.31	-38.4 $\pm$ 2.4
	15	211 $\pm$ 2	0.19 $\pm$ 0.01	-37.0 $\pm$ 1.7
	30	214 $\pm$ 3	0.20 $\pm$ 0.02	-37.3 $\pm$ 2.1
	60	211 $\pm$ 3	0.20 $\pm$ 0.02	-35.9 $\pm$ 3.5
F3	1	206 $\pm$ 2	0.15 $\pm$ 0.01	-35.6 $\pm$ 2.0
	5	172 $\pm$ 4	0.15 $\pm$ 0.01	-37.8 $\pm$ 3.9
	15	173 $\pm$ 4	0.15 $\pm$ 0.01	-33.9 $\pm$ 0.6
	30	172 $\pm$ 4	0.14 $\pm$ 0.01	-34.6 $\pm$ 1.1
	60	171 $\pm$ 5	0.16 $\pm$ 5.12	-32.2 $\pm$ 1.3
F4	1	158 $\pm$ 3	0.19 $\pm$ 0.01	-46.9 $\pm$ 2.0
	5	158 $\pm$ 3	0.22 $\pm$ 0.01	-43.9 $\pm$ 1.1
	15	172 $\pm$ 3	0.24 $\pm$ 0.02	-42.2 $\pm$ 2.1
	30	175 $\pm$ 4	0.27 $\pm$ 0.04	-43.0 $\pm$ 4.4
	60	189 $\pm$ 19	0.36 $\pm$ 0.13	-38.1 $\pm$ 4.9
F5	1	159 $\pm$ 5	0.20 $\pm$ 0.01	-47.8 $\pm$ 1.8
	5	162 $\pm$ 5	0.22 $\pm$ 0.02	-45.7 $\pm$ 0.9
	15	170 $\pm$ 10	0.24 $\pm$ 0.04	-43.9 $\pm$ 1.9
	30	167 $\pm$ 7	0.23 $\pm$ 0.02	-44.3 $\pm$ 3.4
	60	188 $\pm$ 30	0.31 $\pm$ 0.14	-41.1 $\pm$ 4.8
F6	1	179 $\pm$ 3	0.18 $\pm$ 0.01	-38.2 $\pm$ 1.4
	5	181 $\pm$ 2	0.17 $\pm$ 0.02	-36.9 $\pm$ 1.5
	15	180 $\pm$ 2	0.18 $\pm$ 0.02	-38.3 $\pm$ 6.5
	30	181 $\pm$ 1	0.18 $\pm$ 0.01	-39.8 $\pm$ 2.1
	60	180 $\pm$ 2	0.19 $\pm$ 0.03	-39.1 $\pm$ 2.0

**Table 10:** Size and size distribution values evaluated by the laser diffraction technique after 60 days under storage at room temperature (The results represent the mean  $\pm$  SD).

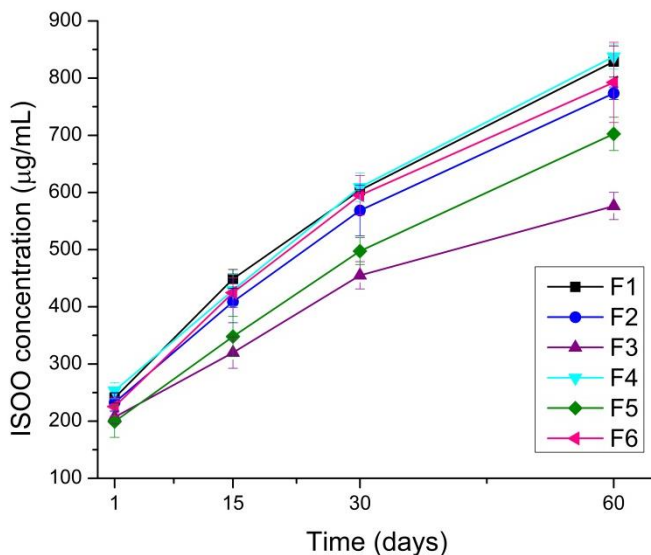
<b>Formulations</b>	<b>Size (first peak)</b>	<b>Size (second peak)</b>	<b>Size distribution (span)</b>
F1	479-550 nm	240-275 $\mu$ m	2.38 $\pm$ 0.83
F2	138-158 nm	>1000 $\mu$ m	6.85 $\pm$ 2.03
F3	275-316 nm	182-208 $\mu$ m	1.38 $\pm$ 0.35
F4	53-60 $\mu$ m	>1000 $\mu$ m	3.17 $\pm$ 0.23
F5	46-52 $\mu$ m	>1000 $\mu$ m	2.22 $\pm$ 0.06
F6	363-417 nm	>1000 $\mu$ m	2.51 $\pm$ 2.86

As reported in Table 9, when dynamic light scattering was used, all formulations presented a mean polydispersity index of about 0.2. The PDI values were evaluated based on the intensity distribution of particles, and provide information about the homogeneity of particle size distribution. This indicator clearly shows the variable size range of nanoparticles resulting from the formation of particle agglomerates in formulations F4 and F5 (see in Apêndice B, Fig. 2a). In the results presented by the laser diffraction technique (Table 10), the span (particle size distribution) values are established based on the relation of the values for the particle diameters, corresponding to 10%, 50% and 90% of the cumulative distribution for each sample (DOMINGUES et al., 2008). This parameter was affected by storage time in this study, in which a high span value indicates a wide size distribution (LEE et al., 2013).

Measurements of zeta potential revealed negatively charged particles, which may be attributed to the presence of EFF-Cg in the interfacial layer surrounding the nanoparticles, a composition that presented negative charge ( $-30.0 \pm 0.3$  mV). The zeta potential values of the formulations showed no significant changes, remaining greater than  $-30$  mV throughout the study. The pH of the formulations decreased during the stability study. As it was observed, the average pH values of the formulations ranged from 5.5 to 6.7 after preparation. At the end of the 60-day of storage, the final pH of the formulations F1, F2, F3, F4, F5 and F6 were  $3.6 \pm 0.24$ ,  $3.7 \pm 0.2$ ,  $3.6 \pm 0.4$ ,  $2.9 \pm 0.1$ ,  $3.0 \pm 0.1$  and  $3.9 \pm 0.6$ , respectively. An increase in isoorientin content (chemical

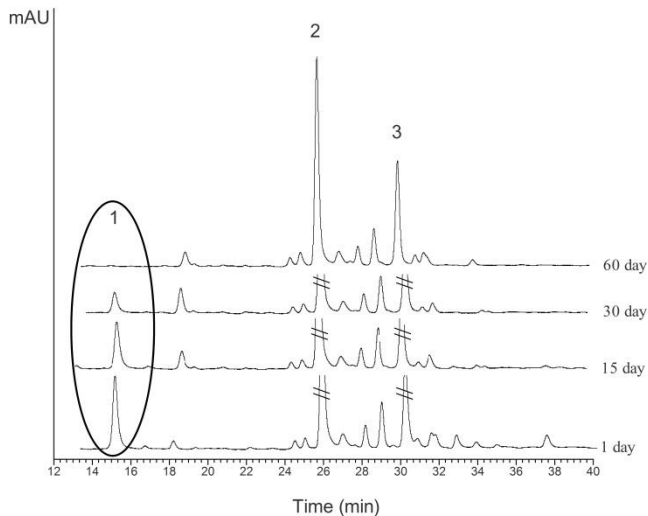
marker) was observed in the dispensing phase ( $p = 0.000$ ). Figure 18 indicates that formulation F3 showed less variation in isoorientin content on the supernatant after 60 days of storage when compared to the other formulations ( $p = 0.05$ ). According to the obtained results, isoorientin content was affected by the composition of formulation. Considering the qualitative chromatographic profile of EFF-Cg presented in the formulation supernatant (Figure 19), it was observed that the major flavonoids, isoorientin and isovitexin (retention time around of 26 and 31 min, respectively), remain unaffected during the 60-day of experiment. However, it was observed a decrease in the intensity of chlorogenic acid peak alongside with an intensity increase of another peak unidentified with retention time around of 15 min in all formulations. Since chlorogenic acid is an ester formed between quinic acid and cinnamate derivatives, the aqueous medium can be favorable to hydrolysis of ester linkages leading to the formation of its precursors such as caffeic acid.

**Figure 18:** Isoorientin content on the supernatant of the formulations after 60 days of storage at room temperature (The points represent the mean  $\pm$  SD).



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

**Figure 19:** HPLC chromatograms of EFF-Cg present in the formulation supernatant (F1 formulation) with detection at 340 nm. 1. chlorogenic acid; 2. isoorientin; 3. isovitexin. For chromatographic conditions, see the section Materials and Methods.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

## 4. DISCUSSION

### 4.1. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF PLGA NANOPARTICLES

The influence of relevant formulation parameters such as preparation technique, the amount of EFF-Cg added, and the surfactant for the external aqueous and organic phases on characteristics of nanoparticles, was evaluated. The characterization of the particles obtained included particle size, size distribution, zeta potential and encapsulation efficiency.

Two techniques of nanoparticles preparation, double emulsion (DE) and nanoprecipitation (NP), were compared to investigate whether the preparation method could affect EFF-Cg incorporation and particle properties, especially considering the complexity of the sample to be encapsulated. EFF-Cg is an enriched flavonoid fraction containing the C-glycosylflavonoids isoorientin and isovitexin, as the major compounds. This fraction was obtained from a crude extract of *C. glaziovii* leaves followed by a series of liquid and solid phase extractions, which led to the concentration of these compounds (COSTA

et al., 2011). The amount of EFF-Cg in the formulation was quantified using HPLC, and isoorientin was chosen as chemical marker.

The double emulsion technique followed by solvent evaporation is described as the most suitable technique for encapsulating hydrophilic substances (RAO; GECKELER, 2011). The double emulsion is a complex system consisting of droplets of internal aqueous phase dispersed in larger droplets of organic phase, which in turn, are dispersed in an external aqueous phase (WANG; GUO, 2008; REGAN; MULVIHILL, 2009; O'REGAN; MULVIHILL, 2010). The droplets of the aqueous internal phase dispersed in the polymer matrix can be regarded as a storage chamber for hydrophilic substances.

In the nanoprecipitation technique, the polymer dissolved in a solvent precipitates when a non-solvent is added in which the solvent is miscible in all proportions, generating nanoparticles. This technique is simple, easy to perform and reproduce, and does not require high speed or temperature. These characteristics make it interesting for complex matrices such as EFF-Cg, and result in particles of small sizes with narrow distribution system (FESSI et al., 1989; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010; RAO; GECKELER, 2011; LEPELTIER; BOURGAUX; COUVREUR, 2014). In general, nanoprecipitation is mainly focused on encapsulation compounds with lipophilic character, reaching close to 100% encapsulation efficiency. However, with some process modifications, it is possible to improve the versatility of the nanoprecipitation technique, and to achieve an acceptable encapsulation profile of hydrophilic substances (ARPICCO et al., 2015).

Taking into account the hydrophilic profile of EFF-Cg, a lower encapsulation efficiency and loading capacity in PLGA nanoparticles was expected using the nanoprecipitation technique, since this technique favors mainly the encapsulation of hydrophobic nature compounds due to the reduced or even zero drug leakage for the outer aqueous medium (FESSI et al., 1989; BILATI; ALLÉMAN; DOELKER, 2005). However, it was observed that when lower concentrations of EFF-Cg were used similar results of EE were obtained by both the double emulsion and nanoprecipitation methods.

Drug loading is very variable and dependent on the interactions between the drug, the polymer and the preparation process. Chu et. al. (2013) reported that nanoparticles prepared by nanoprecipitation may achieve up to 2% drug loading, while nanoparticles prepared by emulsion/solvent evaporation might present loadings of up to 14%. Drug loading is an important property that must be considered during the development of the nanoparticulate delivery system, as it is a parameter



that determines the efficiency of this system (JUDEFEIND; VILLIERS, 2009). Nanoparticles formulations with higher drug loading are advantageous in a delivery system, as higher drug loading is preferable because it is possible to determine the therapeutic dose using a lower number of particles (CHU et al., 2013). From a manufacturing viewpoint, achieving an adequate drug loading value is desired for a hydrophilic drug, as this can determine the applicability of this system. As it is known, the preparation of hydrophilic drug-loaded nanoparticles results in low drug loading because during preparation, the drug rapidly diffuses to the external aqueous phase (GOVENDER T, STOLNIK S, GARNETT MC, ILLUM L, 1999; KASHI et al., 2012). Considering these results, the loading capacity values were given as priorities based on their importance during the development of the nanoparticulate system. For this reason, the double emulsion technique was chosen to conduct the EFF-Cg delivery system study.

#### **4.1.1. Influence of the surfactants in the external aqueous phase**

In the development of nanostructured systems by the double-emulsion technique, the presence of surfactants is crucial to reduce the interfacial tension between the organic/aqueous phases, thus maintaining system stability and ensuring the formation of the particles. The nature and amount of surfactant used might, therefore, determine the size distribution, structure and stability of the resulting formulation, as well as other important characteristics such as drug release rate, biodistribution, mucoadhesion and cellular uptake (VANDERVOORT; LUDWIG, 2002; BALA; HARIHARAN; KUMAR, 2004). In the external aqueous phase, the type and concentration of surfactant are important, particularly in preventing droplets aggregation, thus maintaining a low polydispersity index. According to the obtained results, smallest particle sizes were obtained when PLU was used as surfactant. These results may be explained by the change in the viscosity of the emulsion formed during manufacture using different surfactants. The formulation prepared with PVA presented increased viscosity of the emulsion due to the high molecular weight (MW ~ 205 000 g mol<sup>-1</sup>) of this surfactant. Similarly, the high viscous resistance against shear stress during droplet formation resulted in particles with larger size. Apart from this, PVA normally remained largely on the nanoparticles surface, thereby also contributing to the increase in particle size (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). Although PVA surfactant is the most widely used surfactant in nanoparticles development, its safety is still a concern (DEMERLIS; SCHONEKER,

2003; WANG et al., 2009; MARTÍN BANDERAS et al., 2012). Some literature data suggest that using the poloxamer family may prevent unwanted interactions between the drug and PLGA, as well as neutralizing the acidity generated during PLGA degradation (SANTANDER-ORTEGA et al., 2006). Moreover, Kerleta, et. al. (2009) reported that when Caco-2 cells were incubated with fluorescent polystyrene nanoparticles in the presence of increasing amounts of poloxamer 188 cell viability remained unaffected at any concentration tested. These results corroborate the fact that poloxamers have a good safety profile, and are approved by the FDA for pharmaceutical and medical applications, including parenteral administration (GAD, 2008). Based on the data obtained for both nanoparticulate systems, PLU was chosen as the hydrophilic surfactant for the formulation.

#### **4.1.2. *In vitro* drug release**

The results of dissolution studies of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles presented a sustained release profile. The EFF-Cg that was adsorbed on the nanoparticles surface and entrapped near the surface might be the reason for increased release. Normally in polymeric nanospheres, the drug release occurs by diffusion and/or erosion of the matrix (SINGH; W., 2009). The drug release data by appropriate mathematical models that support the interpretation and comprehension of the mechanisms involved in the control of drug release process were applied to *in vitro* drug dissolution profiles and their respective coefficients were estimated. According to  $R^2_{\text{adjusted}}$  (0.9915) value it can be noted that the samples fitted better with the Weibull model. This model is applied for comparing the release profiles of matrix type drug delivery (DASH et al., 2010). The  $\beta$  value was between 0.078 ( $\beta < 1$ ), this means a fast release at the beginning and it is followed by slow drug release (AKSUNGUR et al., 2011).

## **4.2. STUDY OF PLGA NANOPARTICLES STABILITY AT ROOM TEMPERATURE**

The storage stability of nanoparticles is an important parameter in the development of delivery systems. It is well known that the larger surface area may result in particle aggregation after long periods of storage (RANJAN et al., 2012). Aggregation of particles (fusion) can be described as a mutual attraction between the particles by Van der Waals forces or chemical bonds (LI; KANER, 2006). This phenomenon often occurs in colloidal homogeneous suspensions after a long period of storage, since the large surface area of these systems favors

agglomeration (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006; ABDELWAHED et al., 2006; LI; KANER, 2006; CONTADO et al., 2013). As observed in Table 8, the presence of particle agglomerates may be related to the stabilizer used in the formulations since agglomeration occurs more intensely in formulations containing lecithin in the organic phase. Another fact that may contribute to the formation of agglomerates is the presence of EFF-Cg adsorption molecules on the surface of the nanoparticles, which may induce a possible displacement of the surfactant layer responsible for steric stabilization (ABDELWAHED et al., 2006).

Furthermore, the physical stability of formulations was evaluated through analysis of particle size, particle size distribution and zeta potential, pH determination and quantification of the isoorientin-free in the dispersing phase immediately after preparation, and after 5, 15, 30 and 60 days of storage. In the monitoring of changes in particle size by dynamic light scattering, the results demonstrated that particle size did not change during the stability study. In this case, the use of the dynamic light scattering technique to measure the movement of particle sediment in the formulations was not satisfactory. This technique requires a dilution of suspensions before the measurement, and reversible aggregation may not be detected (GUTERRES et al., 2010). For this, the formulations were evaluated by laser diffraction technique that indicated larger mean particle size.

Table 9 shows the zeta potential values of the formulations. As it clearly shows, all measurements of zeta potential revealed negatively charged particles. The zeta potential is related to the electrical charge on the surface of the nanoparticles (ZAMBAUX et al., 1998). The surface charge of the particles can indicate the binding type between the drug and a nanoparticles, which is an important parameter for determining the desorption rate of the drug in the nanoparticles and how the drug is distributed in the particle (HONARY et al., 2010; HONARY; ZAHIR, 2013). Once the zeta potential of the drug is known, it is possible to define whether the drug is on the particle surface. In a delivery system where the drug is fully encapsulated, or in nanoparticles without drug, the nanoparticles zeta potential will be close to the end group of polymer and residual surfactant, or even zero zeta potential (ZAMBAUX et al., 1998; HONARY; ZAHIR, 2013).

A comparison between the pH values shows that the pH of the formulations decreased during the stability study. The decrease of the pH values may be related to the higher contact of the particles with the aqueous phase, leading to hydrolysis of the polymer from of its ester

linkages (GUTERRES et al., 2010; MAKADIA; SIEGEL, 2011), particularly in the case of PLGA, which undergoes bulk degradation in alkaline or strongly acidic media (ZOLNIK; BURGESS, 2007; MAKADIA; SIEGEL, 2011; VINEETH et al., 2014). An acidic medium may promote a random scission along the polymeric chain, leading to the formation of mostly insoluble oligomers and low production of free carboxylic groups (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006).

In the end the study, it was observed an increase in the isoorientin content (chemical marker) on the dispensing phase. The increase in isoorientin content may be due to EFF-Cg desorption from the particle and diffusion to the external aqueous medium. This, in turn, is one of the major issues related to storage, and can result in a range of stability problems in aqueous solutions (BALA; HARIHARAN; KUMAR, 2004). Considering that the samples are aqueous suspensions, the decrease of the intensity of chlorogenic acid may be related to hydrolysis of this ester formed between quinic acid and cinnamate derivatives (NARITA; INOUE, 2013). Interestingly, C-glycosylflavonoids profile remain unaffected during all 60 days of the experiment, demonstrating the resistance of this compounds to hydrolysis, which can easily be attributed to the C-linkage of the glycosyl moiety to the anomeric carbon of flavonoid nucleus (TALHI; SILVA, 2012).

## 5. CONCLUSION

The results of the present work enable us to conclude that the appropriate choice of nanoencapsulation technique, combined with the use of suitable stabilizing agents, may result in good conditions for the encapsulation of a derived fraction of a plant extract, with favorable results in regard to particle size, PDI, zeta potential, encapsulation efficiency and drug release. This study is important, since preparation conditions are known to be critical steps that can directly influence the encapsulation of the active substance. This fact is even more relevant when we consider the complexity of the encapsulated drug. Considering the overall results of the stability study at room temperature presented here, it is clear that formulation F3 demonstrated a more stable profile after storage at room temperature over a 60-day period, when compared to the other formulations tested. However, in all formulations, changes were observed over time that may be considered aspects of instability. This study suggests that careful consideration of the stability profiles of nanoparticles is necessary when they are used as drug carriers. Further studies to ensure a greater stability of this nanoparticulate system may

enable longer storage times, allowing its application with more security and quality control.

## 6. REFERENCES

- ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688–1713, 2006.
- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 2, p. 87–94, 2006.
- AKSUNGUR, P. et al. Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: Cellular toxicity, uptake, and kinetic studies. **Journal of Controlled Release**, v. 151, n. 3, p. 286–294, 2011.
- ARPICCO, S. et al. Recent studies on the delivery of hydrophilic drugs in nanoparticulate systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 298–312, 2015.
- BALA, I.; HARIHARAN, S.; KUMAR, M. N. V. R. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 21, n. 5, p. 387–422, 2004.
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A. et al. Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 1094–1101, 2011.
- BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 67–75, 2005.
- CHAN, E. S. et al. Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with ca-alginate hydrogel beads. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 2-3, p. 195–201, 2010.
- CHU, K. S. et al. Nanoparticle drug loading as a design parameter to improve docetaxel pharmacokinetics and efficacy. **Biomaterials**, v. 34, n. 33, p. 8424–8429, 2013.
- CONTADO, C. et al. Influence of secondary preparative parameters and aging effects on PLGA particle size distribution: A sedimentation field flow fractionation investigation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 2-3, p. 703–711, 2013.

- COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1096–1102, 2011.
- COSTA, G. M.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. **Natural product communications**, v. 6, n. 6, p. 913–20, 2011.
- DASH, S. et al. Review: Kinetic Modeling on Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.
- DEMERLIS, C. C.; SCHONEKER, D. R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 319–326, 2003.
- DESAI, N. Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. **The AAPS journal**, v. 14, n. 2, p. 282–95, 2012.
- DOMINGUES, G. S. et al. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1966–1972, 2008.
- EIDI, H. et al. Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, n. 1-2, p. 156–165, 2010.
- FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.
- GAD, S. C. **Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Regulations and Quality**. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 2008. p. 857.
- GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1–9, 2008.
- GOLDBERG, M.; LANGER, R.; JIA, X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 18, n. 3, p. 241–68, 2007.
- GOVENDER T, STOLNIK S, GARNETT MC, ILLUM L, D. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Control Release**, v. 57, p. 171–185, 1999.
- GUTERRES, S. S. et al. Polymeric Nanocapsules for Drug Delivery: An overview. In: **Colloids in Drug Delivery**, Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010, p. 71–98.

- HONARY, S. et al. Doxorubicin-Loaded Albumin Nanoparticles: Formulation and Characterization. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 11, p. 7752–7757, 2010.
- HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265 – 273, 2013.
- JUDEFEIND, A.; VILLIERS, M. M. DE. Drug Loading into and *In Vitro* Release from Nanosized Drug Delivery Systems. In: **Nanotechnology in drug delivery**. New York: Springer New York, 2009, p. 129-162.
- KASHI, T. S. J. et al. Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 221–34, 2012.
- KERLETA. Pluronic® F-68 Enhances the Nanoparticle-Cell Interaction. **Scientia Pharmaceutica**, v. 77, n. 1, p. 179–179, 2009.
- LEE, D. et al. Comparisons of particle size measurement method for colloidal silica. **Journal of Ceramic Processing Research**, v. 14, n. 2, p. 274–278, 2013.
- LEPELTIER, E.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 71, p. 86–97, 2014.
- LI, D.; KANER, R. B. Shape and aggregation control of nanoparticles: Not shaken, not stirred. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 3, p. 968–975, 2006.
- LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 26–39, 2008.
- MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, v. 3, n. 4, p. 1377–1397, 2011.
- MARTÍN BANDERAS, L. et al. Cannabinoid Derivate Loaded PLGA Nanocarriers for Oral Administration: Formulation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5793–5806, 2012.
- MATOS, J. DE A.; LORENZI, H. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2º Ed. ed. São Paulo: Nova Odessa, 2008.
- MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 9–24, 2010.

- NARITA, Y.; INOUE, K. Degradation Kinetics of Chlorogenic Acid at Various pH Values and. **Journal of agricultural and food chemistry**, p. 966–972, 2013.
- O'REGAN, J.; MULVIHILL, D. M. Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 224–231, 2010.
- ONWULATA, C. I. Encapsulation of New Active Ingredients. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 183–202, 2012.
- ORTMANN, C. F. **Avaliação da estabilidade de extratos, fração e flavonoides C-glicosídeos presentes em *Cecropia glaziovii***. 2013. 122p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.
- QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113–1128, 1998.
- RAMOS ALMEIDA, R. et al. Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in Wistar rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 1-2, p. 109–113, 2006.
- RANJAN, A. P. et al. Scale up, optimization and stability analysis of Curcumin C3 complex-loaded nanoparticles for cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 38, 2012.
- RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.
- REGAN, J. O.; MULVIHILL, D. M. Water soluble inner aqueous phase markers as indicators of the encapsulation properties of water-in-oil-in-water emulsions stabilized with sodium caseinate. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2339–2345, 2009.
- RESCIGNANO, N. et al. Protein encapsulation in biodegradable polymeric nanoparticles: Morphology, fluorescence behaviour and stem cell uptake. **Macromolecular Bioscience**, v. 13, n. 9, p. 1204–1212, 2013.
- SANTANDER-ORTEGA, M. J. et al. Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 302, n. 2, p. 522–529, 2006.



- SILVA, I. T. et al. *In vitro* antih herpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 143–148, 2010.
- SINGH, R.; W., L. J. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, n. 3, p. 215–223, 2009.
- SOARES, S. et al. Effect of freeze drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 2, p. 370–381, 2013.
- TALHI, O.; SILVA, A. M. S. Advances in C-glycosylflavonoid Research. **Current Organic Chemistry**, v. 16, p. 859–896, 2012.
- VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 238, p. 77–92, 2002.
- VINEETH, P. et al. Influence of organic solvents on nanoparticle formation and surfactants on release behaviour in-vitro using costunolide as model anticancer agent. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 638–645, 2014.
- WANG, S.; GUO, S. Disodium norcantharidate-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres. II. Modification of morphology and release behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1-2, p. 15–20, 2008.
- WANG, Y.-C. et al. Surfactant-free formulation of poly(lactic/glycolic) acid nanoparticles encapsulating functional polypeptide: a technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, p. 1263–1267, 2009.
- ZAMBAUX, M. F. et al. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly ( lactic acid ) nanoparticles prepared by a double emulsion method. **Journal of Controlled Release**, v. 50, p. 31–40, 1998.
- ZOLNIK, B. S.; BURGESS, D. J. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. **Journal of Controlled Release**, v. 122, n. 3, p. 338–344, 2007.



## **Capítulo 3**

*Preparação e caracterização de nanopartículas de PLGA contendo fração enriquecida em flavonoides de *Cecropia glaziovii* e avaliação in vitro do efeito antiherpes*

---



## INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta os resultados de um trabalho em colaboração realizado durante o doutorado sanduíche no *Instituto de Ciencias y Tecnología de Polímeros* orientado pela professora Dra. Carmen Mijangos Ugarte. Os resultados foram organizados em forma de artigo para submissão.

O objetivo do trabalho foi preparar nanopartículas de PLGA contendo a fração enriquecida nas mesmas condições padronizadas no estudo do capítulo 2. Neste caso também foi testado o tensoativo álcool polivinílico além do poloxamer 188, e estas formulações foram comparadas com um tipo de emulsão conhecido por *Pickering emulsion*, onde foi utilizada a celulose nanocristalina para estabilizar o sistema. A formulação preparada com poloxamer 188 apresentou melhores resultados e desta forma foi avaliada quanto ao perfil de liberação da fração e degradação do polímero. Além disso, o potencial citotóxico e efeito anti-herpético contra o vírus do herpes HSV-1 foi testado em células Vero no Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina.

## Preparation and characterization of a *C*-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* encapsulated in PLGA nanoparticles and *in vitro* antiherpes effects evaluation

Talitha Caldas dos Santos<sup>a,b,c,d</sup>; Nicoletta Rescignano<sup>a\*</sup>; Laurita Boff<sup>d</sup>; Flávio Henrique Reginatto<sup>c</sup>; Cláudia Maria Oliveira Simões<sup>c,d</sup>; Angela Machado de Campos<sup>b</sup>; Carmen Ugarte Mijangos<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Polymer Science and Technology, ICTP – CSIC, Madrid, 28006, Spain.

<sup>b</sup>Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Brazil.

<sup>c</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, Brazil.

<sup>d</sup>Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Brazil.

\*Corresponding author at: Institute of Polymer Science and Technology, ICTP – CSIC, Madrid, 28006, Spain. Tel: (+34) 915 622 900; Fax: (+34) 915 644 853. E-mail address: nicoresci@gmail.com

### Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effect of different surfactants (poloxamer 188 – PLU, polyvinyl alcohol – PVA and cellulose nanocrystal – CNC) on the preparation of a *C*-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* (EFF-Cg) - loaded PLGA nanoparticles (NPs) using solvent emulsification- evaporation method based on a w/o/w double emulsion technique. Nanoparticles were characterized in terms of size, polydispersity index, zeta potential, morphology, thermogravimetric analysis (TGA), loading capacity and percent yield. Since TGA analysis revealed thermo stability especially for NP-PLU, this formulation was selected for the evaluation of drug release profile, polymer degradation study, cytotoxicity and antiherpes activity. The drug delivery profile demonstrated a sustained release through the polymer structure and a significant reduction of the

polymer molecular weight at 21-day period. The cytotoxicity of these nanoparticles was determined on Vero cells by MTT assay for 48 h, and the selected formulation did not exhibit cytotoxicity even at the highest tested concentration (5 mg mL<sup>-1</sup>). Viral plaque number reduction assay demonstrated a potential antiherpetic effect of the EFF-Cg at 48 h of testing. In summary, EFF-Cg-loaded nanoparticles demonstrated a promising system for the effective drug delivery in the treatment of herpes infections.

## 1. INTRODUCTION

*Cecropia glaziovii* has several pharmacological properties described in the literature such as anxiolytic (ROCHA; LAPA; DE LIMA, 2002), hypotensive (LIMA-LANDMAN et al., 2007; NINAHUAMAN et al., 2007), antiasthmatic (DELARCINA et al., 2007), antidepressant (ROCHA et al., 2007), antacid/antiulcer (SOUCAR et al., 2008) and hypoglycemic effects (AREND et al., 2015). Beyond that, Silva et al. (2010) demonstrated the antiherpes effects of the crude aqueous extract obtained from *C. glaziovii* leaves and their fractions, *n*-butanol fraction and enriched flavonoid fraction (EFF-Cg). The results showed that the EFF-Cg presented the most promising antiviral activity against Herpes Simplex Virus (HSV) types 1 and 2, when compared to the other tested samples. The chemical major constituents of EFF-Cg include the *C*-glycosylflavonoids isoorientin and isovitexin (COSTA et al., 2011). These compounds may be the ones responsible for the pharmacological activities observed from this fraction (SILVA et al., 2010).

In general, extracts and fractions of the herbal medicinal products are complex mixtures of different phytochemicals, and it can generate instability during the period of use (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014). On the other hand, these compounds could present limitations associated to bioavailability, permeability, solubility, oxidation and hydrolysis reactions that could affect the delivery and absorption of the active compounds (AQIL et al., 2013; CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014). In order to overcome the possible problems and to better the biopharmaceutical profile of this fraction, a nanoparticulate system was developed using solvent emulsification-evaporation method based on a w/o/w double emulsion technique. Solubility tests of EFF-Cg in water and dichloromethane demonstrated that fraction presents a hydrophilic profile (SANTOS et al., 2016). The leakage to the external aqueous phase of the hydrophilic compounds

during the nanoparticles preparation is the higher challenge in the nanoparticulate system development (COHEN-SELA et al., 2009).

Considering these characteristics, the poly (lactide-co-glycolide acid) polymer (PLGA) was chosen to prepare nanoparticles, a biodegradable polymer approved by *Food and Drug Administration* (FDA). PLGA has been widely investigated for drug delivery applications due to a number of advantageous features. The most important that its degradation rate can be tailored to obtain controlled delivery of drugs (PANDITA, KUMAR and LATHER 2015). The stabilization of the particles was tuned by varying the surfactant type in the formulation. In general, a stabilizer is added to the formulation in order to stabilize the emulsion formed during particle preparation (VANDERVOORT and LUDWIG 2002). However, these surfactants can also influence the properties of the particles formed (VANDERVOORT and LUDWIG 2002; GRABOWSKI et al. 2013). Hence, the main aim of this study was to evaluate and compare the physicochemical characteristics and composition of the nanoparticles obtained with two different anionic surfactants (PLU and PVA) and a Pickering emulsion using cellulose nanocrystalline as surfactant.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. MATERIALS

Biodegradable polymer poly (lactic-co-glycolic acid) Resomer PLGA 503 H (LA:GA 50:50, Mw 24000 – 38 000; inherent viscosity: 0.32 – 0.44 dL g<sup>-1</sup>; end group: free carboxylic acid) was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany) and stored in a freezer prior to use. Freeze-dried enriched flavonoid fraction of *Cecropia glaziovii* Snethl (EFF-Cg) was used as a water-soluble drug. Sorbitan monooleate (SPAN 80, Merck, Darmstadt, Germany) was used as a surfactant in the organic phase and Poloxamer 188 (PLU) (BASF, São Paulo, Brazil) and Polyvinyl alcohol (PVA) (31 000– 50 000 g mol<sup>-1</sup>, 87–89% hydrolyzed) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) and cellulose nanocrystal (CNC) (sample synthesized and kindly provided by Dra. Elena Fortunati, University of Perugia, Italy) were used in the external aqueous phase. Isoorientin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-6-glucoside, ≥98.0%) was purchased from Sigma Aldrich and used as chemical marker for the quantification in HPLC. Other reagents acetonitrile and acetic acid were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA) and were of analytical grade. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q apparatus (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).



The cell line used was fibroblast of green monkey kidneys (VERO-ATCC:CCL81) (Department of Clinical Virology, Göteborg University, Sweden). Eagle's minimum essential medium (MEM), and penicillin G, streptomycin and amphotericin B were purchased from Cultilab (São Paulo, Brazil); fetal bovine serum (FBS) was obtained from Gibco (Grand Island, New York). Carboxymethylcellulose (CMC), naphthol blue-black, MTT and acyclovir were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Dimethylsulfoxide (DMSO) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). HSV-1 (KOS strain) was kindly provided by Faculty of Pharmacy, University of Rennes I, France. Virus stock was prepared, titrated and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

## 2.2. QUANTIFICATION OF THE EFF-Cg

The EFF-Cg was quantified in terms of content of chemical marker isoorientin using chromatography conditions validated by Costa et al. (2011). The chromatographic analysis was performed, for analysis of the EFF-Cg and nanoparticles on Waters Alliance 2690 Chromatograph Separations Module equipped with a multiple-UV-wavelength photo-diode array detector (Model 996, Waters) was used for liquid chromatography coupled to diode array detection (LC-DAD) analysis. PerkinElmer Brownlee Choice C18 column ( $5\mu\text{m}$ ,  $150\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$ ) was used. The gradient elution consisted of acetonitrile (A) acetic acid 1.0% (B) with a flow rate of  $1\text{ mL min}^{-1}$  and was programmed as follows: 5 – 20% A (0 – 30 min) and isocratic 20% A (30 – 37 min). Detection was at 340nm.

## 2.3. PREPARATION OF PLGA NANOPARTICLES

PLGA nanoparticles were prepared using a modified solvent emulsification-evaporation method based on a w/o/w double emulsion technique (RESCIGNANO et al., 2015). Briefly, 40 mg of EFF-Cg was dissolved in 2 mL of ultrapure water (internal aqueous phase,  $w_1$ ) and added to 4 mL of dichloromethane containing 100 mg of PLGA and 100 mg of sorbitan monooleate (organic phase, o). The water-in-oil ( $w_1/o$ ) emulsion was homogenized for 15 min, using a tip sonicator (Vibracell 75043, 750W, Bioblock Scientific). This primary emulsion was poured onto 40 mL of surfactant solution (5% (w/v) PLU or 2% (w/v) PVA or CNC) (external aqueous phase,  $w_2$ ) and mixed using the same sonication conditions to obtain the double emulsion ( $w_1/o/w_2$ ). For solvent extraction, the double emulsion was evaporated under reduced pressure at  $40^{\circ}\text{C}$ . The obtained particles were collected by centrifugation at 11000 rpm for 10 min and washed out two times with ultrapure water

and then lyophilized. The nanoparticles formulations were designated using abbreviations as NP-PLU (nanoparticle prepared with poloxamer 188), NP-PVA (nanoparticle prepared with poly (vinyl alcohol)), and NP-CNC (nanoparticle prepared with cellulose nanocrystal).

#### 2.4. DETERMINATION OF NANOPARTICLES SIZE, POLYDISPERSIVITY INDEX AND ZETA POTENTIAL

Particle size and polydispersity index were determined by dynamic light scattering and zeta potential by laser-Doppler anemometry using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern). The measurements were made at 25°C after sample dilution in ultrapure water and placed in appropriate cell for each evaluation. All measurements were performed in triplicate.

#### 2.5. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

The morphology of the nanoparticles was observed by scanning electron microscope (SEM, XL30 Philips). Each sample was dispersed with ultrapure water and a drop of the sample was deposited onto a cover glass. The dried sample was coated with an ultrathin coating of gold deposited on the sample by high-vacuum metallization.

#### 2.6. THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS

Thermogravimetric analyses (TGA) of the NP-PLU, NP-PVA and NP-CNC were performed using a quartz rod microbalance (Seiko Exstar 6300) in the following conditions: sample weight 6 mg, nitrogen flow (250 mL min<sup>-1</sup>), temperature range 25 - 600°C, heating rate 10°C min<sup>-1</sup>.

#### 2.7. ESTIMATION OF LOADING CAPACITY BY HPLC METHOD

Freeze-dried nanoparticles (20 mg) were dissolved in 4 mL of dichloromethane, after it was added 4 mL of water and the suspension was stirred overnight. The concentration of the EFF-Cg in the aqueous phase was quantified by HPLC. The percent drug loading capacity for each formulation was expressed as mg of EFF-Cg/100 mg nanoparticles.

#### 2.8. PERCENT YIELD OF THE NANOPARTICLES FORMULATION

Nanoparticles formulations were centrifuged at the end of preparation and the supernatant were removed. After, the nanoparticles were washed, and centrifuged twice to obtain a pellet. The pellets of nanoparticles formulations were lyophilized and weighed and the percent yield was calculated using the following equation:

Percent yield = (weight of the lyophilized nanoparticles/total weight of polymer) x 100.

## 2.9. *IN VITRO* DRUG RELEASE

*In vitro* release profile was observed using phosphate buffer solution (pH 7.2) and then incubated at 37°C at 70 rpm. At pre-determined time intervals, an aliquot of 1 mL was withdrawn for analysis. The medium was replaced with fresh dissolution medium at each interval. The samples were then filtered and analyzed by HPLC method as described above. The morphology of the nanoparticles was systematically analyzed by scanning electron microscopy. Furthermore, the pH value of the surrounding medium was measured using an Orion 420A pH Meter. The measurement was always done on a volume of solution equal to 10 mL. The results obtained in triplicate were expressed as a percentage of the drug release.

## 2.10. NANOPARTICLES DEGRADATION STUDY

To determine the degradation rates of the PLGA, NP-PLU was incubated under the same conditions as the *in vitro* release. At different time points, a small portion of the nanoparticles was removed, centrifuged to remove buffer solution and lyophilized. The lyophilized nanoparticles were dissolved in tetrahydrofuran (4 mg mL<sup>-1</sup>, w/v). The molecular weight of the samples was investigated by means of gel permeation chromatography (GPC) using a refractometer index detector Waters 2414. For the determination of their molecular weight, the samples were referenced to polystyrene standards between 4.000 and 400.000 g/mol. Before measurements, the samples were filtered using a PTFE filter. The molecular weight averages (MW) calculated is related to different physical properties and processing parameters of the polymer.

## 2.11. CYTOTOXICITY ASSAY

Cytotoxicity of free EFF-Cg, EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles and blank PLGA nanoparticles was evaluated by MTT assay (ISO 10993 2009). Vero cells (2.5 x 10<sup>4</sup> cells per well) were cultured in 96-well plates in MEM supplemented with 5% FBS and maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Before the cytotoxicity assay, EFF-Cg dissolved in MEM was filtered through a 0.22 µm sterile filter, and EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles and blank PLGA nanoparticles were sterilized under UV light for 30 min. Confluent cells were exposed to different concentrations of these samples for 48 h. Cells exposed to MEM or DMSO without samples were used as controls. After the

exposure period, MEM was replaced by MTT solution ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and plates were further incubated for 4h. Formazan crystals were dissolved by addition of DMSO and the optical densities were read at 540 nm (Spectra MD2, Molecular Devices). For the determination of  $CC_{50}$  values, nonlinear regression of concentration-response curves was used. The 50% cytotoxic concentration ( $CC_{50}$ ) was defined as the concentration that reduced cell viability by 50% when compared to untreated controls.

## 2.12. ANTIHERPES ACTIVITY

Antiherpes activity evaluation of free EFF-Cg, EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles and blank PLGA nanoparticles was performed by viral plaque number reduction assay (Silva et al. 2010). Firstly, Vero cell monolayers ( $2.5 \times 10^5$  cell per well) were infected with HSV-1 suspension (100 PFU/well) for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ , except in cell controls. The non-attached viral particles were removed and overlaid with MEM containing 1.5% CMC in the presence or absence of different non-cytotoxic concentrations of the samples, and incubated for 48 h. Cells were fixed and stained with naphthol blue-black, and viral plaques were counted by using a stereomicroscope (Olympus). The concentration of each sample that reduced viral replication by 50% ( $IC_{50}$ ), when compared to untreated controls, was estimated by nonlinear regression of concentration-response curves. Acyclovir was used as a positive control.

## 2.13. STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using SPSS software version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Differences between the test sites were tested for their statistical significance using the ANOVA test for paired data or Kruskal-Wallis test for not normally distributed non-paired data. The significance level was set at  $p \leq 0.05$ . All measured and calculated parameters are reported as arithmetic mean and standard deviation (mean  $\pm$  S.D.).

# 3. RESULTS AND DISCUSSION

## 3.1. PREPARATION OF PLGA NANOPARTICLES

The goal of this investigation is to encapsulate EFF-Cg in PLGA nanoparticles using double emulsion method. A study of nanoparticles formation was performed evaluating two non-ionic surfactants as poloxamer 188, and poly (vinyl alcohol) and nanocrystalline cellulose. In this case, nanocrystalline cellulose was used as solid nanoparticles

instead of surfactants for preparation of the double emulsion by Pickering emulsion (RESCIGNANO et al., 2015). Colloidal properties of the nanoparticles were evaluated as particles size, polydispersity index, zeta potential, loading capacity, yield formulation, morphology and thermal analysis. In second time, the release profile and degradation of polymer study of the chosen formulation had been performed. Moreover, cytotoxicity assay and antiherpes activity were used to evaluate this formulation.

### 3.2. CHARACTERIZATIONS OF THE NANOPARTICLES

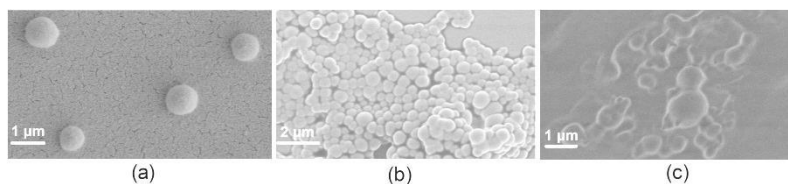
#### **3.2.1. Nanoparticles size, PDI, zeta potential, loading capacity and scanning electron microscopy**

PLGA nanoparticles formulations were successfully prepared by double emulsion technique using PLU, PVA and CNC as surfactants. For nanoparticles preparation, drug/polymer ratio, volumes of internal and external aqueous phase were kept constant. The results showed that the effective particles size for NP-PLU and NP-PVA was  $276 \pm 3$  and  $227 \pm 5$  nm, while it is  $330 \pm 1$  nm for particles prepared with CNC as surfactant. The particles obtained from PLU and PVA have an unimodal distribution with PDI of  $0.12 \pm 0.03$  and  $0.07 \pm 0.03$ , respectively. The presence of CNC led to the formation of a bimodal population distribution and a PDI of the  $0.41 \pm 0.02$ . Measurements of zeta potential confirmed the negative surface charge attributed to the presence of carboxyl end groups of the polymer,  $-15.6 \pm 0.3$ ,  $-0.2 \pm 0.0$  and  $-26.6 \pm 0.6$  mV for NP-PLU, NP-PVA and NP-CNC formulations, respectively (MURA et al., 2011; MANASPON; VIRAVAIDYA-PASUWAT; PIMPHA, 2012; JAIN et al., 2013). The yield of nanoparticles was represented by the percent weight of the lyophilized nanoparticles relative to the total weight of PLGA used for the preparation. The formulations presented different yield results, NP-PLU demonstrated a percent yield of the  $67 \pm 2\%$ , NP-PVA was  $26 \pm 1\%$  and NP-CNC was  $73 \pm 4\%$ . These results showed that in each washing steps there was a loss of surfactant and smaller nanoparticles that after centrifugation still remained suspended in the supernatant. NP-PLU and NP-PVA presented similar loading capacity around to 0.6 and 0.7%, NP-CNC demonstrated a lower loading capacity, 0.1%. In a technical point of view, it is difficult to load hydrophilic drugs into PLGA nanoparticles obtaining a high loading and encapsulation efficiency. During the preparation of the particles, the drug leaks from the internal aqueous phase into external aqueous phase (KASHI et al., 2012). Moreover, molecular weight, electrostatic repulsion forces also

may influence in low loading capacity values (CUN et al., 2011). Another limiting factor is that the herbal extracts contain a complex blend of phytochemicals, and different chemical interactions may occur, decreasing the loading capacity. On the other hand, there is another greatest disadvantage in this case, the nanoparticles washing step. The washing step allows withdrawal of the remaining drug in suspension and also adsorbed on the particles surface (BUDHIAN; SIEGEL; WINEY, 2005).

The SEM images for dried nanoparticles prepared using different surfactants are shown in Fig. 20. Nanoparticles formation was visually observed in SEM images, after preparation of the NPs, there was the total formation of particles in NP-PLU and NP-PVA formulations. These nanoparticles are spherical in shape, without aggregation for NP-PLU and with slight aggregation of the particles with PVA. The CNC presence in the external aqueous phase not allowed the full formation of the nanoparticles. For this formulation, the concentration of CNC may have been elevated, and thus, the cause of not particle formation. Literature reports that the solid particles used in preparation of the Pickering emulsion have a partly hydrophobic surface and can aggregate in presence of the water. Thus, an excess particle in the aqueous phase reduces the concentration of available particles to stabilize the emulsion (CHEVALIER; BOLZINGER, 2013).

**Figure 20:** SEM images of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles obtained with different surfactants: (a) NP-PLU, (b) NP-PVA and (c) NP-CNC.



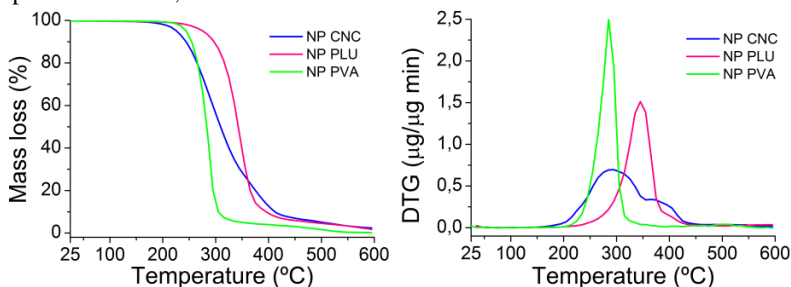
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

### 3.2.2. Thermal analysis

Thermal stability of the nanoparticles was determined by TGA analysis, TGA and DTG curves are plotted in Fig. 21. It was observed that the thermal degradation profile was influenced by the different emulsion stabilizer on the formulation. NP-CNC showed two regions of weight loss, 290 and 387°C, which were different from a single mass loss for the NP-PLU and NP-PVA at 345 and 285°C, respectively. A

higher thermal stability was observed in the NP-PLU compared with the other formulations.

**Figure 21:** Thermogravimetric profiles of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles prepared with PLU, PVA and CNC as surfactant.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

The results obtained from the physicochemical tests were considered to determine the formulation for the further studies. In general, NP-PLU demonstrated adequate particles size, narrow particles distribution and total formation of the particles. Also, TGA data shows that NP-PLU was more thermal stable compared with the NP-PVA and NP-CNC. Considering the profile of emulsion stabilizer, poloxamer 188 is approved by the FDA for pharmaceutical and medical applications and have a good safety profile administration (GAD, 2008; YAN et al., 2010).

### 3.2.3. *In vitro* drug release and nanoparticles degradation study

The cumulative percentage release profile of EFF-Cg in terms of isoorientin (chemical marker) from NP-PLU was evaluated at pH 7.2 PBS buffer during 21 days at 37°C (Fig. 22). EFF-Cg was continually released from nanoparticles for 21 days until the total content of drug was released from the particles. The modeling of dissolution data was determined using DDSolver program, a menu-driven add-in program for Microsoft Excel written in Visual Basic for Applications. A wide variety of mathematical models have been developed to fit the drug release data, most of which are presented as nonlinear equations (ZHANG et al., 2010). The most appropriate kinetic model was chosen according one with the highest adjusted coefficient of determination ( $R^2_{\text{adjusted}}$ ) and coefficient of determination ( $R^2$ ) provided by the program, 0.7561 and 0.7748, respectively.

In the initial release phase, a burst of 23% was considered in 30 min, a characteristic associated with hydrophilic drugs. Usually drug particles are encapsulated in form of small clusters on the surface or within the polymer matrix just below the surface of the particles, resulting in a high initial burst release (KASHI et al., 2012). Next, EFF-Cg release became slower due to association of drug diffusion and polymer erosion as mechanisms of drug release, as confirmed by the release exponent ( $n$ ) value of the Korsmeyer–Peppas equation. The  $n$  was equal to 0.15, according with this model if  $n \leq 0.43$ , drug release occurs by diffusion process through the polymer wall (Fickian diffusion) (SIEPMANN; SIEPMANN, 2012).

**Figure 22:** *In vitro* release of EFF-Cg from NP-PLU in PBS (pH 7.2) at 37°C. Data represented as mean  $\pm$  S.D., ( $n = 3$ ).

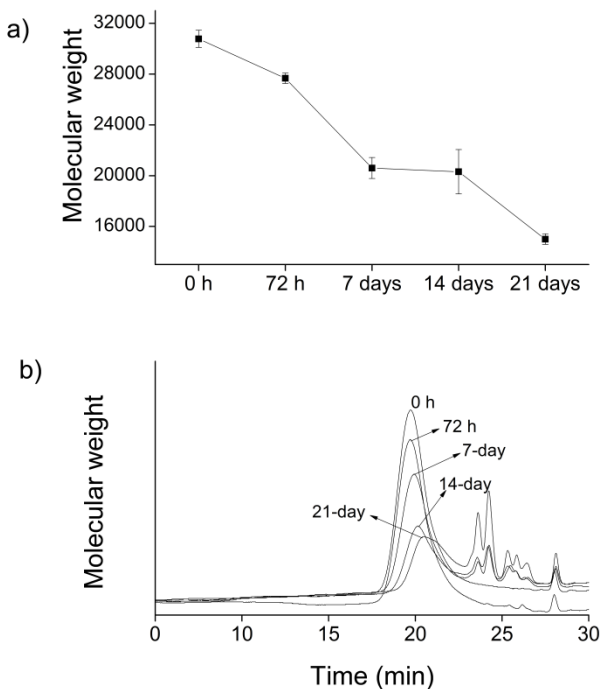


Fonte: Desenvolvido pelo autor.

The nanoparticles degradation profile was evaluated according molecular weight (MW) values of the nanoparticles during release test. The MW at all time of EFF-Cg-loaded nanoparticles decreased throughout the experiment, as shown in Fig. 23. Within an incubation period of 21 days, a significant MW reduction of the nanoparticles occurred compared with the original MW (51%,  $p = 0.000$ ). The rate of MW reduction may depend of the different factors including for example, physicochemical parameters (pH, temperature, and ionic strength of the environment), and polymer composition as presence of the ester groups closer to the surface that may be more susceptible to degradation (DINARVAND et al., 2011; TERRY et al., 2014).



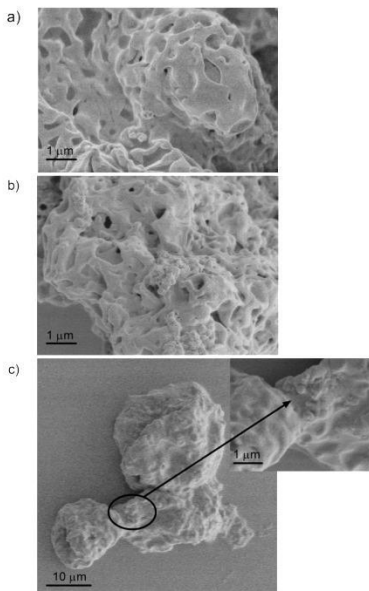
**Figure 23:** Effect of change in molecular weight (MW) of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles (Mean  $\pm$  S.D.;  $n = 3$ ) (a), and gel permeation chromatography elution profiles of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles (b). The nanoparticles were incubated at 37°C for 21-day period in pH 7.2 PBS buffer.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

SEM micrographs also revealed the morphology of nanoparticles in the latter stages of the degradation test (7, 14 and 21-day). Images showed that there was a total agglomeration of the nanoparticles and a loss of initial round shape (Fig. 24). After 21-day period, it was observed a variation of the medium pH of 7.2 to 6.8. This may occur due to the accumulation of the degradation products as carboxylic acid end groups and acids oligomers that induce a decrease in pH values (PARK, 1995; ZOLNIK; BURGESS, 2007).

**Figure 24:** SEM images of EFF-Cg-loaded-nanoparticles morphology change during degradation in PBS at 37°C. (a) 7-day, (b) 14-day and (c) 21-day period.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

### 3.2.4. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity of free EFF-Cg, EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles and blank PLGA nanoparticles prepared with poloxamer 188, on Vero cells was assessed using MTT assay for 48 h. Samples exhibited low cytotoxic effects at all concentrations tested, which is indicative of safety. EFF-Cg at the highest concentration tested reduced viable cells number by approximately 35% and showed  $CC_{50}$  value  $> 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

EFF-Cg-loaded-PLGA nanoparticles and blank PLGA nanoparticles were evaluated at the concentration range from  $78 \mu\text{g mL}^{-1}$  to  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ . They inhibited cell viability, respectively, by 28% and 22%. These results indicated that PLGA nanoparticles are appropriate as a carrier for EFF-Cg showing a  $CC_{50}$  value  $> 5 \text{ mg mL}^{-1}$ . In general, nanoparticles cytotoxicity is based on their characteristics, such as shape, size, surface chemistry/charge, chemical composition, surface activity and solubility (KONG et al. 2011). Usually, PLGA nanoparticles did not present cytotoxicity in different cell lines confirming that this polymer is biocompatible. Nkabinde et al. (2014)

treated Caco-2 cells (colorectal epithelial cells) with PLGA nanoparticles using a maximum concentration of  $5.8 \text{ mg mL}^{-1}$ , which was not cytotoxic. However, the toxic effects of nanoparticles are dependent on the cell type due to cell features such as physiology, proliferation state, and membrane and phagocyte characteristics (DÍAZ et al. 2008). Mura et al. (2011) showed that Calu-3 cells (human bronchial adenocarcinoma) after exposure to PLGA nanoparticles prepared with PLU, PVA and chitosan induced low toxicity, independently of their chemical composition and surface properties. On the contrary, Grabowski et al. (2013) showed that the type of surfactant is crucial for the cytotoxic effects. They assessed the cytotoxicity of PLGA nanoparticles prepared with PVA, PLU and chitosan in A549 cells (human lung carcinoma) at a concentration range from 0.01 to  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ . The results demonstrated that low concentrations of nanoparticles prepared with PVA induce mild reduction of cell viability, whereas the impact of nanoparticles prepared with PLU and chitosan is more pronounced. Thus, it is important to choose the appropriate cell type and the suitable surfactant that could measure and cause cytotoxicity considering the introduction route and the target organ of the nanoparticles (KONG et al. 2011).

### 3.2.5. Antiherpes activity

Antiviral activity of free EFF-Cg ( $5$  to  $80 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ), EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles and blank PLGA nanoparticles ( $312.5$  to  $5000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was evaluated by viral plaque number reduction assay (SILVA et al. 2010) after 48 h of incubation. The obtained results showed that free EFF-Cg inhibited HSV-1 replication by 100% at  $80 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , and its viral inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) was  $8.24 \pm 0.89 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . In the same manner, EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles inhibited viral replication by 81% and its  $\text{IC}_{50}$  value was  $1.85 \pm 0.05 \text{ mg mL}^{-1}$ , indicating that these samples seem to be active against HSV-1 replication. Blank PLGA nanoparticles presented no activity against HSV-1 replication.

The results showed that none nanoparticles tested concentrations inhibited viral infection completely when compared to free EFF-Cg. Correlating these results with those from the *in vitro* release assay, when 43% of the EFF-Cg was released from PLGA nanoparticles (around  $52.7 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  of EFF-Cg), we can state that nanoparticles formulation presented antiherpes effects. Considering that EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles presented a prolonged release (21 days), the antiviral assay performed for 48 h did not allowed EFF-Cg total release but probably

the effective antiviral drug concentration will be reached during more prolonged period of time. In summary, the obtained results indicated that these nanoparticles seem to be an interesting delivery system for EFF-Cg and they could be administered by different routes according to the type of different formulations such as gels, films or creams.

#### 4. CONCLUSION

EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles were prepared and characterized to determine whether the surfactant type altered their physicochemical characteristics. The use of anionic surfactants (PLU and PVA) created NPs with similar characteristics as size, PDI and loading capacity. Since TGA analysis revealed thermo stability especially for NP-PLU, this formulation was selected for the evaluation of drug release profile, polymer degradation study, cytotoxicity and antiherpes activity. The drug delivery profile demonstrated a sustained release through the polymer structure and a significant reduction of the polymer molecular weight at 21-day period. The cytotoxicity of these nanoparticles was determined on Vero cells by MTT assay for 48 h, and the selected formulation did not exhibit cytotoxicity even at the highest tested concentration ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Viral plaque number reduction assay confirmed the antiherpes effects of free EFF-Cg and a potential activity for the EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles, and indicated this system seems to be promising for the effective drug delivery in the treatment of herpes infections.

#### 5. REFERENCES

- AQIL, F. et al. Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. **Cancer Letters**, v. 334, n. 1, p. 133–141, 2013.
- AREND, D. P. et al. *In vivo* potential hypoglycemic and *in vitro* vasorelaxant effects of *Cecropia glaziovii* standardized extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 5, p. 473–484, 2015.
- BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Production of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles for extended controlled drug release of haloperidol. **Journal of microencapsulation**, v. 22, n. 7, p. 773–785, 2005.
- CHEVALIER, Y.; BOLZINGER, M.-A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 439, p. 23–34, 2013.

- COHEN-SELA, E. et al. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 133, n. 2, p. 90–95, 2009.
- CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Assessment of stability of a spray dried extract from the medicinal plant *Bidens pilosa* L. **Journal of King Saud University - Engineering Sciences**, n. 28, p. 141–146, 2014.
- COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1096–1102, 2011.
- CUN, D. et al. High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: Quality by design optimization and characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 1, p. 26–35, 2011.
- DELARCINA, S. et al. Inhibition of histamine-induced bronchospasm in guinea pigs treated with *Cecropia glaziovii* Sneth and correlation with the *in vitro* activity in tracheal muscles. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 328–332, 2007.
- DÍAZ, B. et al. Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. **Small**, v. 4, n. 11, p. 2025–2034, 2008.
- DINARVAND, R. et al. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 877–895, 2011.
- EIDI, H. et al. Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, n. 1-2, p. 156–165, 2010.
- GAD, S. C. **Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Regulations and Quality**. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 2008. p. 857.
- GRABOWSKI, N. et al. Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 2, p. 686–694, 2013.
- ISO 10993-5:2009 (E). Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. **International Organization for Standardization**, 2009.
- JAIN, D. et al. Studies on stabilization mechanism and stealth effect of poloxamer 188 onto PLGA nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 109, p. 59–67, 2013.

- KASHI, T. S. J. et al. Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 221–34, 2012.
- KONG, B. et al. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 929–941, 2011.
- LIMA-LANDMAN, M. T. R. et al. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An *in vivo* approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 314–320, 2007.
- MANASPON, C.; VIRAVAIIDYA-PASUWAT, K.; PIMPFA, N. Preparation of Folate-Conjugated Pluronic F127/Chitosan Core-Shell Nanoparticles Encapsulating Doxorubicin for Breast Cancer Treatment. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1–11, 2012.
- MURA, S. et al. Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2591, 2011.
- NINAHUAMAN, M. F. M. L. et al. ACE activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth: A comparative study to captopril effects in rats. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 321–327, 2007.
- NKABINDE, L. A. et al. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: Uptake by epithelial cells and cytotoxicity. **Express Polymer Letters**, v. 8, n. 3, p. 197–206, 2014.
- PANDITA, D., KUMAR, S., LATHER, V. Hybrid poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: design and delivery prospectives. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 95 - 104, 2015.
- PARK, T. G. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. **Biomaterials**, v. 16, n. 15, p. 1123–1130, 1995.
- RESCIGNANO, N. et al. Use of alginate, chitosan and cellulose nanocrystals as emulsion stabilizers in the synthesis of biodegradable polymeric nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 445, p. 31–39, 2015.
- ROCHA, F. F. et al. Antidepressant-like effect of *Cecropia glazioui* Sneth and its constituents - *In vivo* and *in vitro* characterization of the underlying mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, n. 6, p. 396–402, 2007.
- ROCHA, F. F.; LAPA, A. J.; DE LIMA, T. C. M. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glazioui* Sneth in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 1-2, p. 183–190, 2002.

- SANTOS, T. C. dos, BATTIST, M. A., ORTMANN, C. F., REGINATTO, F. H., SIMÕES, C. M. O., de CAMPOS, A. M. Development and effect of storage on the stability of Enriched Flavonoid Fraction of *Cecropia glaziovii*-loaded PLGA nanoparticles. *Pharmaceutical Development and Technology*, DOI: 10.1080/10837450.2016.1245742.
- SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Swelling Controlled Drug Delivery Systems. In: SIEPMANN, J.; SIEGEL, R. A.; RATHBONE, M. J. **Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery**. Boston: Springer US, 2012. p. 153–170.
- SILVA, I. T. et al. *In vitro* antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 143–148, 2010.
- SOUCCAR, C. et al. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. **Phytomedicine**, v. 15, n. 6-7, p. 462–469, 2008.
- TERRY, A. B. et al. PLGA Nanoparticles for the Sustained Release of Rifampicin. **Journal of Nanogenomics and Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2014.
- VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 238, p. 77–92, 2002.
- YAN, F. et al. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 170–178, 2010.
- ZHANG, Y. et al. DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. **The AAPS journal**, v. 12, n. 3, p. 263–271, 2010.
- ZOLNIK, B. S.; BURGESS, D. J. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. **Journal of Controlled Release**, v. 122, n. 3, p. 338–344, 2007.





## **Capítulo 4**

*Filmes nanocompósitos de quitosana contendo nanopartículas de PLGA carregadas com fração rica em flavonoides C-glicosídeos: Preparação, caracterização e efeito citotóxico*

---



## INTRODUÇÃO

Os filmes são uma das alternativas na tecnologia farmacêutica como dispositivos de liberação controlada de substâncias ativas. Para viabilizar sua aplicação, testes de caracterização são de suma importância para conhecimento de suas propriedades (WANG et al., 2005).

Este trabalho teve por objetivo a obtenção e a caracterização de uma estrutura polimérica híbrida, à base de quitosana e nanopartículas de PLGA contendo fração rica em flavonoides como um sistema de liberação para o tratamento do herpes labial. Os experimentos baseados na caracterização das propriedades químicas, morfológicas e mecânicas foram realizados no *Instituto de Ciencias y Tecnología de Polímeros* em Madri em colaboração com a professora Dra. Carmen Mijangos Ugarte. A avaliação da citotoxicidade em células Vero destes materiais foi realizada no Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina.

## **Chitosan/PLGA nanoparticles nanocomposite film: preparation, characterization and cytotoxicity assays.**

Talitha Caldas dos Santos<sup>a,b,c,d</sup>; Nicoletta Rescignano<sup>a\*</sup>; Laurita Boff<sup>d</sup>; Flávio Henrique Reginatto<sup>c</sup>; Cláudia Maria Oliveira Simões<sup>c,d</sup>; Angela Machado de Campos<sup>b</sup>; Carmen Ugarte Mijangos<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Polymer Science and Technology, ICTP – CSIC, Madrid, 28006, Spain.

<sup>b</sup>Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Brazil.

<sup>c</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, Brazil.

<sup>d</sup>Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Brazil.

\*Corresponding author at: Institute of Polymer Science and Technology, ICTP – CSIC, Madrid, 28006, Spain. Tel: (+34) 915 622 900; Fax: (+34) 915 644 853. E-mail address: nicoresci@gmail.com

**Keywords:** Nanocomposites; *Cecropia glaziovii* Snethl; Chitosan; Thin films; PLGA nanoparticles

### **Abstract**

In this study the preparation and characterization of nanocomposites films based on chitosan/PLGA nanoparticles (NPs) were prepared by a simple solvent evaporation technique. The chitosan films were prepared with three different concentration of NPs (1, 3, 5 and 10%, w/w) and were characterized in term of morphology, chemical (FTIR, TGA), mechanical properties and water absorption test. Furthermore a cytotoxicity assay was analyzed to evaluate the biocompatibility of systems. The results obtained from these analyses revealed that nanocomposite films present transparent appearance in all composition and SEM images show a continuous and compact section structure. Compared to the control film, mechanical responses of nanocomposites presented lower tensile strength values and no significant effect on the elongation at break. DMA tests indicated that increasing of NPs concentration caused decreased stiffness and an increased of glass

transition values. Direct cytotoxicity test shows that nanoparticles and chitosan films not induce cytotoxic effect.

## 1. INTRODUCTION

Biopolymers including chitosan have frequently been used as materials for the design of drug delivery formulations owing to their excellent properties, such as non-toxicity, biocompatibility, biodegradability (MUZZARELLI; MUZZARELLI; WANG et al., 2007; WU et al., 2007). These properties combined with some of the polymeric properties of chitosan have made this polysaccharide as a promising candidate for tissue engineering (DI MARTINO SITTINGER; RISBUD, 2005; CROISIER; JÉRÔME, 2013) and drug delivery applications (BERNKOP-SCHNÜRCH; DÜNNHAUPT, 2012). Linear structure of the chitosan results in tough, flexible and transparent films (VIEIRA et al., 2011). There are several reports about the drug release behavior from the chitosan nanocomposites in the biomedical field with different applications and the vastly different functional requirements for each of these applications (VENKATESAN et al., 2011).

Nanocomposites are functional materials composed of nanoparticles dispersed inside the polymeric matrix (MARIE AROCKIANATHAN et al., 2012). These materials form an interdisciplinary area that brings together biology, materials science, and nanotechnology (HULE; POCHAN, 2007). Many nanocomposites are found proper to be used as drug delivery carriers because they frequently, exhibit remarkably improved properties compared with the pure polymer. The introduction of nanoparticles can reduce the burst drug release effect, increase the stability of drug and provide a slower and more continuous release mode of drugs (SATARKAR; HILT, 2008).

A preliminary studies conducted by Silva et. al. (2010) evaluated the antiherpes effects of the enriched flavonoid fraction obtained from *Cecropia glaziovii* Snethl crude extract. The results indicates that the fraction can be regarded as a phytopharmaceutical candidate for the treatment of herpetic infections once that presented the more promising antiviral activity against HSV types 1 and 2 compared the other samples. Based on these results, PLGA nanoparticles were developed by the double emulsion solvent evaporation method. Particle size, size distribution, zeta potential, encapsulation efficiency and *in vitro* drug release were evaluated as previously described (SANTOS et al., 2016).

The aim of this work is development nanocomposites chitosan films containing PLGA NPs loaded with enriched flavonoid fraction of *C. glaziovii* (EFF-Cg) and the characterization of morphological, chemical, thermal and mechanical properties, in order to evaluate the advantage of nanocomposites in the final application. Furthermore the nanocomposites chitosan films were analyzed in terms of cytotoxic effect.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. MATERIALS

Biodegradable polymer poly (lactic-co-glycolic) Resomer PLGA 503H (LA:GA 50:50, Mw 24000-38000; inherent viscosity: 0.32 – 0.44 dL g<sup>-1</sup>; end group: free carboxylic acid) was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany) and stored in a freezer prior to use. Freeze-dried enriched flavonoid fraction of *Cecropia glaziovii* Sneath (EFF-Cg) was used as a water-soluble drug. Poloxamer 188 (Kolliphor P188, BASF, Ludwigshafen, Germany) and sorbitan monooleate (SPAN 80, MERCK, Darmstadt, Germany) were used as surfactant in the aqueous and organic phase, respectively. Chitosan was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA) with low molecular weight (approximately 50 000–190 000 Da) and degree of deacetylation of 83%. Acetic acid was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and dichloromethane was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA) and were of analytical grade. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q apparatus (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The cell line used was fibroblast of green monkey kidneys (VERO- ATCC:CCL81) (Department of Clinical Virology, Göteborg University, Sweden). Eagle's minimum essential medium (MEM), and penicillin G, streptomycin and amphotericin B were purchased from Cultilab (Campinas, Brazil); fetal bovine serum (FBS) was obtained from Gibco (Carlsbad, USA). MTT was obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA) and dimethylsulfoxide (DMSO) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2. PLGA NANOPARTICLES PREPARATION

PLGA nanoparticles were prepared using a modified solvent emulsification-evaporation method based on a w/o/w double emulsion technique (RESCIGNANO et al., 2015). Briefly, 40 mg of EFF-Cg was dissolved in 2 mL of ultrapure water (internal aqueous phase, w<sub>i</sub>) and added to 4 mL of dichloromethane containing 100 mg of PLGA and 100 mg of sorbitan monooleate (organic phase, o). The water-in-oil (w<sub>1</sub>/o)

emulsion was obtained after 15 min, using a tip sonicator (VIBRA CELL Sonics mod. VC 750, USA). This primary emulsion was mixed with 40 mL of 5% (w/v) poloxamer 188 solution (external aqueous phase,  $w_2$ ) using the same sonication conditions describe above to obtain the double emulsion ( $w_1/o/w_2$ ). For solvent extraction, the double emulsion was evaporated under reduced pressure at 35°C. The obtained particles were collected by centrifugation at 11000 rpm for 10 min and washed out two times with ultrapure water and then lyophilized. The resulting nanoparticles were characterized in term of size, polydispersity index, zeta potential and morphology.

### 2.3. CHITOSAN NANOCOMPOSITE PREPARATION

Chitosan film was prepared by the solvent evaporation/casting technique. Chitosan was dissolved in acetic acid aqueous solution 0.1M (v/v) in order to obtain 2% (w/v) chitosan solution, under stirring until total homogenization of the mixture. The chitosan films were obtained by drying 20 mL solutions into Petri dishes (9 cm diameter) and dried at 37°C for 48 h.

Nanocomposites films were obtained by adding nanoparticles during the preparation of the chitosan solution in following concentrations: 1, 3, 5 and 10% of nanoparticles with respect to the weight of chitosan (w/w). The formulations were designated using abbreviations as Ch-pure (pure chitosan film), Ch-1% NP (nanocomposite with 1% nanoparticles), Ch-3% NP (nanocomposite with 3% nanoparticles), Ch-5% NP (nanocomposite with 5% nanoparticles), and Ch-10% NP (nanocomposite with 10% nanoparticles).

### 2.4. FILM CHARACTERIZATION

#### 2.4.1. Fourier transform infrared

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of the nanoparticles and the nanocomposites films were carried out with a Perkin Elmer Spectrum One FTIR spectrometer (Shelton, USA) equipped with an ATR accessory. Spectra were performed in the range from 4000 to 500  $\text{cm}^{-1}$  with a 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution and an accumulation of 16 scans.

#### 2.4.2. Thermogravimetric analysis

The thermogravimetric analysis was performed with a TA-TGA Q500 analyzer (New Castle, USA). The experiments was carried out using 10 mg of sample starting from the room temperature and heating

up to 600°C at 10°C min<sup>-1</sup> under nitrogen atmosphere with nitrogen flow of 60 mL min<sup>-1</sup>. The temperature of the peaks characterizing the derivative curve of the weight loss is defined as the degradation temperatures of the studied samples.

#### **2.4.3. Scanning electron microscopy**

The morphology of nanocomposites microstructure was observed by scanning electron microscope (SEM, XL30 Philips, Billerica, USA). Cryofracture of each sample was mounted on the specimen holders. The dried samples were coated with an ultrathin coating of gold deposited on the sample by high-vacuum metallization.

#### **2.4.4. Film thickness**

Films thickness was measured using a digital micrometer (Mahr Millitast 1085/ Göttingen, Germany). Five thickness measurements were taken on different parts of the films, as center, corners and border.

#### **2.4.5. pH determination**

The pH values of the films were determined directly in the samples before drying using a calibrated potentiometer (pHmetro Metrohm 8015 titter/ Herisau, Switzerland), at room temperature (n= 3).

#### **2.4.6. Water absorption test**

Water absorption capacity of the samples was measured by gravimetry. Ch-pure and nanocomposites films (2 x 2 cm) were weighed and immersed in vial glass containing 5 mL of sodium phosphate buffer (pH = 7.2) at 37°C. After different time intervals (0.5, 3 and 24 h) the films were removed from the solution and the excess of buffer on the surface was absorbed using filter paper and swollen films were reweighed (*n* = 3). The swelling index (%) in the samples was calculated according to equation (COSTA et al., 2014):

$$\text{Swelling index (\%)} = (W_s - W_d)/W_d \times 100$$

Where  $W_s$  is the weight of the swollen film and  $W_d$  is the weight of the initially dry film.

#### **2.4.7. Mechanical properties**

The strength and elongation of the films were evaluated by using a universal test device (Instron 3366 Series, Grove City, USA). A rectangular sample with the dimensions of 3 x 6 mm was submitted to



testing ( $n = 5$ ). The tests were conducted using a 50 N load cell, a speed of  $2 \text{ mm min}^{-1}$ , and a temperature of  $25^\circ\text{C}$ .

#### **2.4.8. Dynamic mechanical thermal analysis**

The storage modulus and  $\tan \delta$  of the Ch-pure and nanocomposites films were determined by dynamic mechanical analyzer (Mettler Toledo, DMA/SDTA 861e, Greifensee, Switzerland) according to the suggested method of Thakhiew et al. (2010) with some modifications. Samples with the dimensions of  $3 \times 6 \text{ mm}$  were used in a tension mode at frequency, force amplitude and displacement amplitude of 1 Hz, 0.15 N and  $4 \mu\text{m}$ , respectively. The tests were conducted using a temperature range of 25 to  $180^\circ\text{C}$  at a heating rate of  $2^\circ\text{C min}^{-1}$ .

#### **2.4.9. Cytotoxicity assay**

The evaluation of cytotoxicity was in accordance with the ISO 10993 (2009) standard. Vero cell line was used in this study in order to evaluate the cytotoxicity of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles, Ch-pure and Ch-10% NP films. Briefly, the cells were maintained in MEM supplemented with 5% (v/v) fetal bovine serum and cultured at  $37^\circ\text{C}$  in humidified 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere for 24 h. Before the assay, nanoparticles and all films were sterilized under UV light for 30 min. In order to evaluate the cytotoxicity of the NP, cells were seeded in 96-well plates and after 24h the medium was aspirated out and they were treated with different concentrations ( $0.078$  to  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles. To evaluate the cytotoxicity of the films, cells were seeded in 24-well plates, and after discarding the medium, film pieces ( $0.3 \text{ mm}^2$ ) were placed carefully on the top of cell layers using  $100 \mu\text{L}$  of medium. MEM and DMSO were used as negative and positive controls, respectively. After 48 h, MTT solution ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) was added to each well, followed by additional 4 h incubation. After carefully discarding the volume of each well, DMSO was added, and the plates were shaken for 10 min to solubilize formazan crystals. The absorbances were measured at 570 nm in a microplate spectrophotometer (Spectra Max M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). The results were expressed as the reduction of cell viability (%) calculated in relation to the negative controls.

### **2.5. STATISTICAL ANALYSIS**

Statistical analysis was performed using SPSS software version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Differences between the test sites were tested for their statistical significance using the ANOVA test for paired

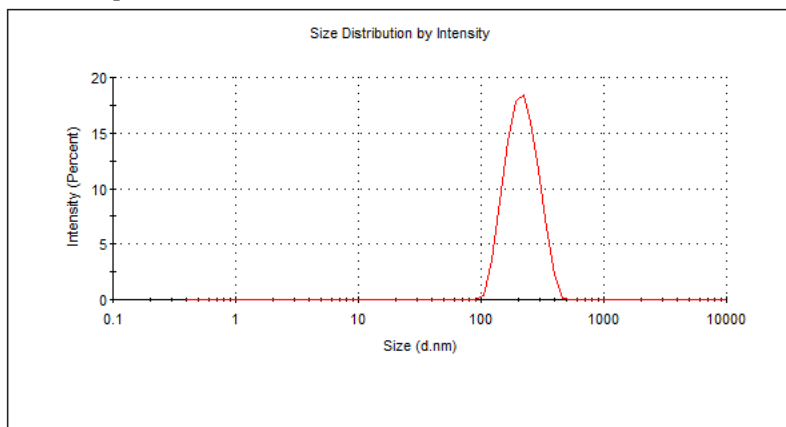
data or Kruskal-Wallis test for not normally distributed non-paired data. The significance level was set at  $p \leq 0.05$ . All measured and calculated parameters are reported as arithmetic mean and standard deviation (mean  $\pm$  SD).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. PLGA NANOPARTICLES PREPARATION AND CHARACTERIZATION

The EFF-Cg-loaded nanoparticles had particle size of  $226 \pm 3$  nm, polydispersity index of  $0.13 \pm 0.02$  and the surface charge was  $-15.6 \pm 0.2$  mV. The size distribution by intensity was demonstrated in the Fig. 25. Scanning electron microscopy showed spherical and uniform nanoparticles, without aggregation.

**Figure 25:** Histogram representing the size distribution of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

#### 3.2. NANOCOMPOSITE CHARACTERIZATION

Ch-pure exhibits homogeneous and transparent visual appearance. The addition of nanoparticles resulted in a slight reduction of the gloss of the nanocomposites films (Fig. 26). The film surfaces are characterized by a gloss due to the drying step. Normally, the smoother surface corresponds to higher gloss (VARGAS et al., 2009; BONILLA et al., 2012). In this case, it is possible that the nanocomposites are less glossy than Ch-pure due to the presence of nanoparticles in the film matrix. The value of average thickness of the nanocomposites was 51.5

$\pm 0.0$   $\mu\text{m}$ . The pH of all formulations was around 4.4, the presence and concentration of nanoparticles did not affect the pH values in the formulations. It demonstrated that both Ch-pure and nanocomposites films are physiologically adequate for topical use (BLAAK, 2011).

**Figure 26:** Ch-pure (left) and Ch-10% NP nanocomposite (right).

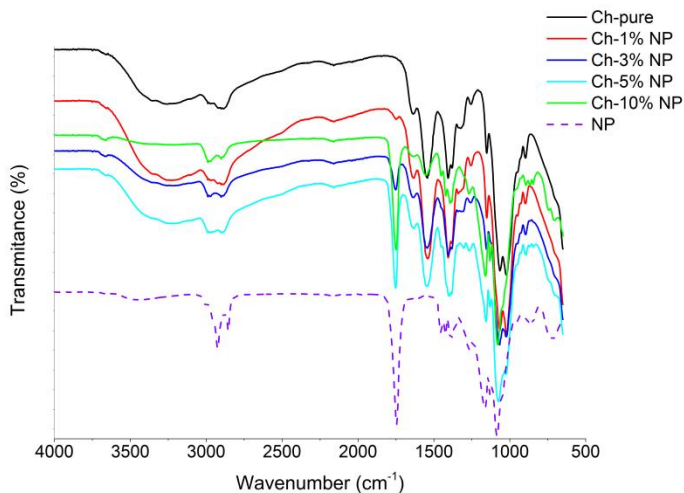


Fonte: Desenvolvido pelo autor.

### 3.2.1. Fourier transform infrared

FTIR spectroscopy was used to investigate the chemical structure of Ch-pure film and nanocomposites in different proportions of PLGA nanoparticles. FT-IR spectra of chitosan pure film, chitosan nanocomposites (Fig. 27) show a broad band between 3500 and 3000  $\text{cm}^{-1}$ , attributed to stretching of OH bonds in the molecule and N-H bonds in amino group. The peaks at 2900  $\text{cm}^{-1}$  ascribe to amino group and  $\text{CH}_2$  asymmetric stretching, other characteristic absorption bands appeared at 1636  $\text{cm}^{-1}$  and 1538  $\text{cm}^{-1}$  ascribes to the amide I ( $>\text{C}=\text{O}$ ) and N-H bending vibration (amine II), at 1402  $\text{cm}^{-1}$  was due to C-H bending vibration and at 1022, 1064, 1144 are due to C-O stretching and -OH deformation vibrations (RUBILAR et al., 2013; HROMIŠ et al., 2015; LECETA et al., 2015; PRADHAN; DASH; SWAIN, 2015; YOUSSEF et al., 2015). These results agree with those reported in the literature as characteristics bands of chitosan. In nanocomposite spectra appear a peak around 1750  $\text{cm}^{-1}$ , this peak is due to the presence of PLGA nanoparticles.

**Figure 27:** FTIR spectra of Ch-pure, Ch-1% NP, Ch-3% NP, Ch-5% NP, Ch-10% NP nanocomposites and EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

### 3.2.2. Thermogravimetric analysis

The thermal stability of pure chitosan film, nanocomposites films and PLGA NPs was evaluated by thermal gravimetric analysis curves versus temperature as shown in Table 11.

**Table 11:** Thermal gravimetric analysis properties of the pure chitosan film, nanocomposites films and PLGA nanoparticles.

Samples	$T_{max}$ (°C)		
	Event 1 (150-210)	Event 2 (230-390)	Event 3 (235-440)
Ch-pure	188.22	280.21	---
Ch-1% NP	191.06	280.21	---
Ch-3% NP	189.08	280.21	---
Ch-5% NP	188.22	279.22	---
Ch-10% NP	186.38	280.21	---
NP	---	---	345.29

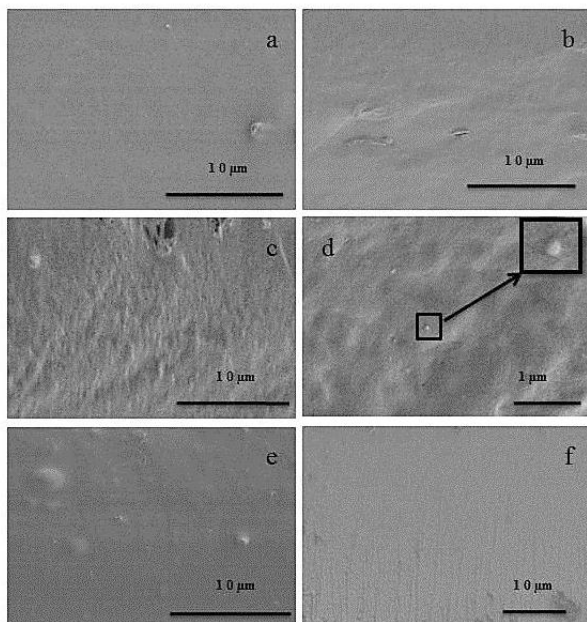
The weight loss stages for the chitosan films can be divided in two events. The small weight loss at the first event (about 10%) is probably due to the loss of adsorbed and bound water and the residual

acetic acid. The second weight loss step (50 – 55%) at 230 – 390°C is attributed to the thermal degradation of CH, as previously reported by several authors (CHEN et al., 2008; LEWANDOWSKA, 2009; TRIPATHI; MEHROTRA; DUTTA, 2009). These results suggest that the different concentrations of nanoparticles in the chitosan films do not affect the thermal stability of chitosan polymer.

### **3.2.3. Scanning Electron Microscopy (SEM)**

The morphology of pure and nanocomposites films was investigated in order to study the dispersion of NPs in chitosan matrix structure. Fig. 28 shows the fractured surface of Ch-pure, and chitosan nanocomposites with all concentrations (1, 3, 5, 10% NPs) nanocomposites just after cold-fracture. On the fractured surface of the Ch-5% NP film (Fig. 28c and d) it is possible to observe the presence of PLGA nanoparticles that are homogenously dispersed in the continuous matrix at the nanoscale level, moreover in the inset fig. 28d a nanospheres is clearly reported. The presence of the surfactant on the PLGA nanoparticle surface supports the interaction of biopolymeric nanosystem with the matrix (PERETZ et al., 2013). All films present a continuous and compact structure an increase in the surface roughness respect to the pure film was detected for this system due to the presence of nanofillers (RESCIGNANO et al., 2014). As can be seen, with the NPs content increasing, the morphology is quite different from Ch-pure film.

**Figure 28:** The panel presents the SEM image of criofracture of samples: (a) Ch -1% NP; (b) Ch-3% NP; (c and d) Ch-5% NP and inset shows a PLGA nanoparticle immerse in the chitosan matrix, (e) Ch-10% NP and (f) Ch-pure film.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

### 3.2.4. Water absorption test

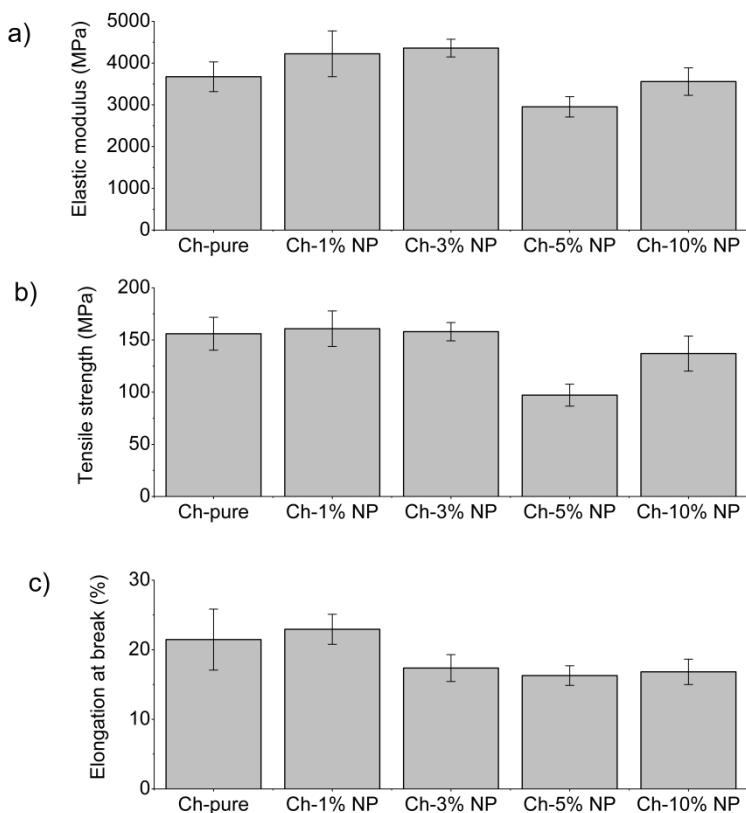
The aim of this test is the comparison of hydration capacity between Ch-pure and nanocomposites films when keep in contact with PBS pH 7.4. From literature it is known that chitosan is a bioadhesive polymer (LEHR et al., 1992) and the water absorption capacity is an important parameter to verify that presence of hydrophobic PLGA nanoparticles doesn't influence nanocomposite film bioadhesive behavior (SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005). The swelling was examined by measurement of weight, and all samples presented a similar condition in the water absorption. A maximum uptake capacity was installed in 30 min with swelling index around 583%. When chitosan is immerged in aqueous medium, occurs a relaxation of the polymer chains resulting in the exposure of all hydrophilic groups (i.e. hydroxyl groups and amine groups) present in the structure, causing swelling of chitosan membranes (WAN et al.,

2003). In this case, the swelling properties of the polymer is favorable to bioadhesion and consequently, allowing control of drug release and increased surface area for the interpenetrating polymer/epithelium (SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005). The swelling index was not significantly influenced by hydrophobicity of the PLGA nanoparticles ( $p = 0.167$ ).

### **3.2.5. Mechanical properties: Tensile testing and dynamic mechanical thermal analysis**

The strength and elasticity of film can be evaluated through mechanical tests results (PEH; WONG, 1999). The effect of incorporating PLGA NPs in different proportions on mechanical properties of chitosan films is presented in Fig. 29. The study focused on the measuring of elastic modulus (Young's modulus), tensile strength, and elongation at break. The mechanical behavior of the samples show that the nanoparticles concentration presented no significant effect on the elastic modulus ( $p = 0.170$ ), tensile strength ( $p = 0.119$ ) and elongation at break ( $p = 0.227$ ) in nanocomposites films compared with Ch-pure films. These results suggest that the addition of hydrophobic nanoparticles in determined concentrations produced a film structure with stiffness, flexibility and resistance to fracture similar to Ch-pure.

**Figure 29:** Mechanical properties of Ch-pure, Ch-1% NP, Ch-3% NP, Ch-5% NP, Ch-10% NP nanocomposites; (a) Elastic modulus, (b) Tensile strength, (c) Elongation at break.



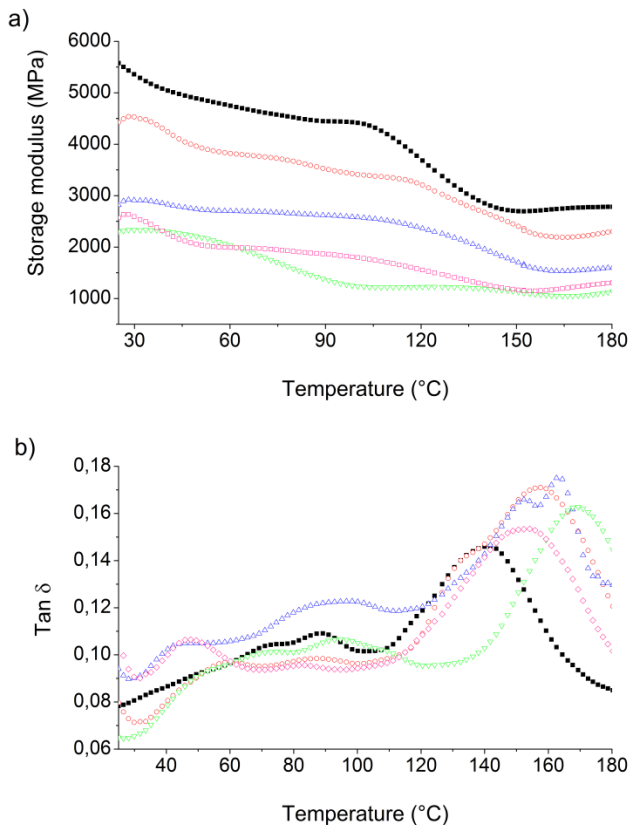
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

The effect of PLGA nanoparticles on the mechanical properties of chitosan film can be studied by the dynamic mechanical properties (DMA). In the nanocomposite development, the thermomechanical behavior of polymers is altered by the addition of trace amounts of nanoparticles (BANSAL et al., 2005). The structural change on the mechanical properties of the nanocomposites films compared with Ch-pure can be illustrated through the DMA data in Fig. 30. The storage modulus and  $\tan \delta$  of the samples were display as a function of the temperature, in the range of 25 to 180°C. Ch-pure film presented a higher storage modulus than the nanocomposites, the modulus decreased



with crescent concentration of the nanoparticles. Thus, these results showed that increasing the NPs concentration turns films less stiffness. The glass transition temperature ( $T_g$ ) of samples can be provided from the  $\tan \delta$  curves (Fig. 30b).  $\tan \delta$  curves showed two peaks, the first of them is due to the  $\beta$  relaxation (around 85 - 100°C) and the other one the relaxation (around 140 - 170°C) is designed as the  $T_g$  of amorphous phase (ZIMOCH-KORZYCKA et al., 2015). The  $T_g$  values for Ch-pure and nanocomposites films present an increment from 140°C to almost 170°C related to PLGA NPs concentration (QUIJADA-GARRIDO et al., 2007). This effect on the composite properties could be considered an interaction between the matrix and the particles (PAUL; ROBESON, 2008). In literature examples where the  $T_g$  was changed, it was observed alterations using low levels of nanoparticles incorporation (BANSAL et al., 2005; HUSKIĆ; ŽIGON, 2007; MENG; HETZER; DE KEE, 2011). It was observed that the  $T_g$  of the nanocomposites shift to higher temperatures and the storage modulus of the nanocomposites are decreased with loadings of nanoparticles.

**Figure 30:** Storage modulus and  $\tan \delta$  of ( $\square$ ) Ch-pure film, ( $\bullet$ ) Ch-1% NP, ( $\blacktriangle$ ) Ch-3% NP, ( $\blacktriangledown$ ) Ch-5% NP and ( $\blacksquare$ ) Ch-10% NP films.



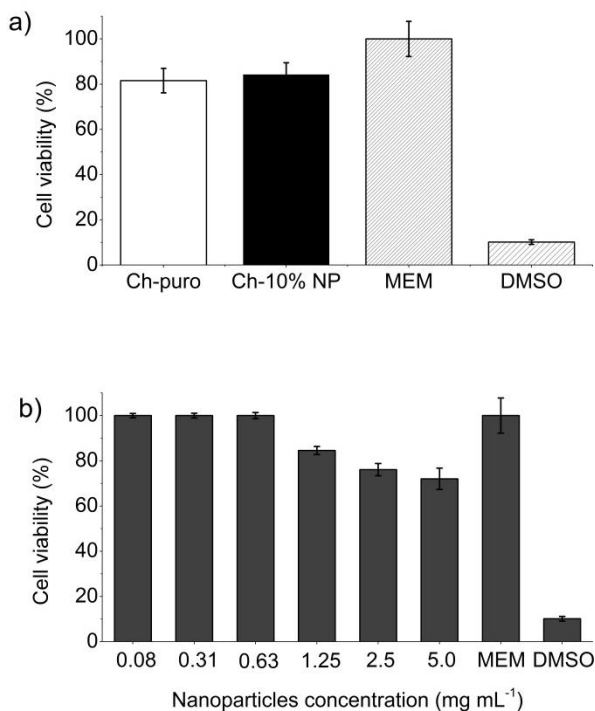
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

### 3.2.6. Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of EFF-Cg-loaded PLGA NPs and chitosan nanocomposite films containing NPs was also evaluated. To assess the possible cytotoxic effects of Ch-pure and Ch-10% NP, they were tested by direct contact to cells. According to the obtained results, it was observed that the Ch-pure and Ch-10% NP films exhibited the same cell viability reduction around 20% (Fig. 31a). These results indicate that Ch-10% NP film did not present relevant cell toxicity even at the highest tested nanoparticles concentration. Similar results were obtained with EFF-Cg-loaded PLGA NPs (Fig. 31b). In this case, different

concentrations of NPs were tested ( $0.078$  to  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) to confirm the absence of cytotoxicity of the component used in the nanocomposites films. Cell viability decreased to 72% at the highest concentration tested indicating that all concentrations assayed did not have important effects on cell viability after 48 h of incubation.

**Figure 31:** Cytotoxicity MTT assay performed with: Ch-pure and Ch-10% NP films (a) and EFF-Cg-loaded PLGA NPs (b), after 48 h incubation. Positive control: DMSO and negative control: culture medium.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

#### 4. CONCLUSION

The aim of the present study was to formulate and characterize chitosan nanocomposites films formulations containing PLGA nanoparticles. The effect of NPs in modifying the physicochemical and mechanical properties of chitosan film was evaluated. As results, successful chitosan nanocomposites films were produced using solvent evaporation/casting technique. PLGA nanoparticles into chitosan films

showed adequate properties in relation to chemical, thermal and mechanical properties. The obtained results indicated that these systems showed no cytotoxicity at the conditions tested and primarily may be considered appropriate for nanocomposite delivery purposes.

## 5. REFERENCES

- BANSAL, A. et al. Quantitative equivalence between polymer nanocomposites and thin polymer films. **Nature materials**, v. 4, n. 9, p. 693–698, 2005.
- BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; DÜNNHAUPT, S. Chitosan-based drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 463–469, 2012.
- BLAAK, J. Treatment of Aged Skin with a pH 4 Skin Care Product Normalizes Increased Skin Surface pH and Improves Barrier Function: Results of a Pilot Study. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 01, p. 50–58, 2011.
- BONILLA, J. et al. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 9–16, 2012.
- CHEN, Z. et al. Intermolecular interactions in electrospun collagen–chitosan complex nanofibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 3, p. 410–418, 2008.
- COSTA, I. DOS S. M. et al. Chitosan-based mucoadhesive films containing 5-aminolevulinic acid for buccal cancer's treatment. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 140, p. 266–275, 2014.
- CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780–792, 2013.
- DÌ MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M. V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 30, p. 5983–5990, 2005.
- HROMIŠ, N. M. et al. Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax. **Journal of Food Engineering**, v. 158, p. 86–93, 2015.
- HULE, R. A.; PCHAN, D. J. Polymer Nanocomposites for Biomedical. **Mrs Bulletin**, v. 32, p. 354–358, 2007.
- HUSKIĆ, M.; ŽIGON, M. PMMA/MMT nanocomposites prepared by one-step in situ intercalative solution polymerization. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 12, p. 4891–4897, 2007.

ISO 10993-5:2009 (E). Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. **International Organization for Standardization**, 2009.

LECETA, I. et al. Ageing of chitosan films: Effect of storage time on structure and optical, barrier and mechanical properties. **European Polymer Journal**, v. 66, p. 170–179, 2015.

LEHR, C. M. et al. *In vitro* evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 78, n. 1-3, p. 43–48, 1992.

LEWANDOWSKA, K. Miscibility and thermal stability of poly(vinyl alcohol)/chitosan mixtures. **Thermochimica Acta**, v. 493, n. 1-2, p. 42–48, 2009.

MARIE AROCKIANATHAN, P. et al. Preparation, characterization and evaluation of biocomposite films containing chitosan and sago starch impregnated with silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 4, p. 939–946, 2012.

MENG, Q. K.; HETZER, M.; DE KEE, D. PLA/clay/wood nanocomposites: nanoclay effects on mechanical and thermal properties. **Journal of Composite Materials**, v. 45, p. 1145–1158, 2011.

MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C. Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. In: **Polysaccharides I**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. p. 151–209.

PAUL, D. R.; ROBESON, L. M. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. **Polymer**, v. 49, n. 15, p. 3187–3204, 2008.

PEH, K. K.; WONG, C. F. Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences**, v. 2, n. 2, p. 53–61, 1999.

PERETZ, S. et al. Chitosan microparticulate systems prepared by polymer-surfactant interaction. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 58, n. 2-3, p. 275–281, 2013.

PRADHAN, G. C.; DASH, S.; SWAIN, S. K. Barrier properties of nano silicon carbide designed chitosan nanocomposites. **Carbohydrate polymers**, v. 134, p. 60–5, 2015.

QUIJADA-GARRIDO, I. et al. The role played by the interactions of small molecules with chitosan and their transition temperatures. Glass-forming liquids: 1,2,3-Propantriol (glycerol). **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 1, p. 173–186, 2007.

RESCIGNANO, N. et al. PVA bio-nanocomposites: A new take-off using cellulose nanocrystals and PLGA nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 47–58, 2014.

- RESCIGNANO, N. et al. Use of alginate, chitosan and cellulose nanocrystals as emulsion stabilizers in the synthesis of biodegradable polymeric nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 445, p. 31–39, 2015.
- RUBILAR, J. F. et al. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 466–474, 2013.
- SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1666–1691, 2005.
- SANTOS, T. et al. Development and effect of storage on the stability of Enriched Flavonoid Fraction of *Cecropia glaziovii*-loaded PLGA nanoparticles. **Pharmaceutical Development and Technology**, DOI: 10.1080/10837450.2016.1245742.
- SATARKAR, N.; HILT, J. Magnetic hydrogel nanocomposites for remote controlled pulsatile drug release. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 3, p. 246–251, 2008.
- SILVA, I. T. et al. *In vitro* antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 143–148, 2010.
- THAKHIEW, W.; DEVAHASTIN, S.; SOPONRONNARIT, S. Effects of drying methods and plasticizer concentration on some physical and mechanical properties of edible chitosan films. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 2, p. 216–224, 2010.
- TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan–PVA film for food packaging applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 4, p. 372–376, 2009.
- VARGAS, M. et al. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 536–547, 2009.
- VENKATESAN, P. et al. The potential of celecoxib-loaded hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the treatment of colon cancer. **Biomaterials**, v. 32, n. 15, p. 3794–3806, 2011.
- VIEIRA, M. G. A. et al. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 3, p. 254–263, 2011.
- WAN, Y. et al. Ionic conductivity of chitosan membrane. **Polymer**, v. 44, p. 1057–1085, 2003.
- WANG, Q., DU, Y., FAN, L. Properties of Chitosan/Poly(vinyl alcohol) Films for Drug-Controlled Release. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 96, p. 808–813, 2005.

WANG, X. et al. Chitosan/organic rectorite nanocomposite films: Structure, characteristic and drug delivery behaviour. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 41–49, 2007.

WU, J. et al. A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. **Biomaterials**, v. 28, n. 13, p. 2220–2232, 2007.

YOUSSEF, A. M. et al. International Journal of Biological Macromolecules Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan / nanocomposite films. v. 76, p. 25–32, 2015.

ZIMOCH-KORZYCKA, A. et al. Chitosan and Cystatin/Lysozyme Preparation as Protective Edible Films Components. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, p. 1-10, 2015.





## **Capítulo 5**

*Hidrogéis nanocompósitos termossensíveis de quitosana: uma alternativa para sistema de liberação de substâncias ativas*

---



## INTRODUÇÃO

Os hidrogéis são estruturas tridimensionais de polímeros hidrofílicos, capazes de absorver grandes quantidades de água e manterem-se insolúveis devido ao entrecruzamento químico ou físico. O teor elevado de água é importante na hidratação e elasticidade da pele proporcionando uma melhor sensação quando aplicada sobre a mesma, tornando-os uma boa alternativa para os sistemas de liberação de substâncias ativas (SILVA et al., 2008).

Hidrogéis termossensíveis de quitosana foram preparados e caracterizados quanto suas propriedades químicas, reológicas, morfológicas e citotóxicas. Nanocompósitos foram preparados com diferentes concentrações de nanopartículas de PLGA e comparados ao hidrogel puro.

Este trabalho foi orientado pela professora Dra. Carmen Mijangos Ugarte no *Instituto de Ciencias y Tecnología de Polímeros* em Madri. A avaliação da citotoxicidade em células Vero destes materiais foi realizada no Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina. Os resultados foram dispostos em forma de artigo para posterior submissão.

## Chitosan nanocomposite hydrogel based on PLGA nanoparticles: a tool for drug delivery system

Talitha Caldas dos Santos<sup>a,b,c,d</sup>; Nicoletta Rescignano<sup>a</sup>; Rebeca Hernández<sup>a\*</sup>; Laurita Boff<sup>d</sup>; Flávio Henrique Reginatto<sup>c</sup>; Cláudia Maria Oliveira Simões<sup>c,d</sup>; Angela Machado de Campos<sup>b</sup>; Carmen Ugarte Mijangos<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Polymer Science and Technology, ICTP – CSIC, Madrid, 28006, Spain.

<sup>b</sup>Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Brazil.

<sup>c</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, Brazil.

<sup>d</sup>Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Brazil.

\*Corresponding author at: Institute of Polymer Science and Technology, ICTP – CSIC, Madrid, 28006, Spain. Tel: (+34) 915 622 900; Fax: (+34) 915 644 853. E-mail address: rhernandez@ictp.csic.es

Keywords: Nanocomposites; *Cecropia glaziovii* Snethl; Chitosan; PLGA nanoparticles; Thermosensitive hydrogel; Physical hydrogel.

### Abstract

Chitosan is a natural polymer that exhibit thermosensitive properties by transforming from a liquid-like behavior to gel-like behavior in determined conditions. The aim of the present study was to develop chitosan nanocomposite hydrogels as *in situ* gelling formulation for drug delivery system. The PLGA nanoparticles containing enriched flavonoid fraction of *Cecropia glaziovii* Snethl were used in the nanocomposite preparation. First, chitosan hydrogel was prepared with different NaHCO<sub>3</sub> concentrations to optimize the optimal condition to obtain homogeneous thermosensitive hydrogel. Then, different nanoparticles concentrations were added in chitosan solution for hydrogel obtainment. The formulations were characterized for thermogravimetric, FT-IR, scanning electron microscopy analysis, pH determination, rheological, and cytotoxic properties. The results showed that all hydrogels exhibited

thermosensitive property, changing from liquid-like behavior at 25°C to gel-like behavior at 37°C. FT-IR spectra confirm the nanoparticles presence in the chitosan matrix through the absorption peak at  $\sim 1750 \text{ cm}^{-1}$ . Thermal analysis demonstrated that nanoparticles presence affected the thermal stability of chitosan compared with pure chitosan hydrogel. The nanocomposite hydrogels presented homogeneous appearance in all composition and loss transparency, SEM images show porous structures and nanoparticles appear to be dispersed in the polymeric matrix. Rheological responses of nanocomposites showed to form strong hydrogels with different mechanical stiffness, compared to pure hydrogel. Cytotoxicity tests showed that after 48h pure hydrogel and Ch-10% NP demonstrated toxicity only in the higher concentration. This fact might be related to sodium bicarbonate presence due to a rise in pH of the surrounding environment of the cells.

## 1. INTRODUCTION

Chitosan is a linear, semi-crystalline polysaccharide and can be easily derived from the partial deacetylation of the chitin (DORNISH; KAPLAN; SKAUGRUD, 2001). In the chitosan structure, the presence of amino groups gives to this polymer many properties such as, antibacterial (BENHABILES et al., 2012), antifungal activity (ING et al., 2012), mucoadhesive (SOGIAS; WILLIAMS; KHUTORYANSKIY, 2008), analgesic (OKAMOTO et al., 2002) and haemostatic properties (LIU et al., 2014). It is biodegraded into non-toxic residues (BAGHERI-KHOULENJANI; TAGHIZADEH; MIRZADEH, 2009), biologic compatible polymer and it was approved by the FDA for use in wound dressings (WEDMORE et al., 2006). All these features make chitosan a notable candidate for biomedical applications including drug delivery (CROISIER; JÉRÔME 2013). Moreover, due to its positive charges, chitosan can also interact with the negative part of cells membrane, which can lead to reorganization and an opening of the tight junction proteins, explaining the permeation enhancing property of this polysaccharide (SCHIPPER et al., 1997).

Hydrogels are an extremely important class of materials with numerous applications in biology and pharmaceutical sciences (SAHINER et al., 2006). The solid phase ensures the consistency of the gel, and it able to absorb large quantities of water or biological fluids while remaining insoluble in the liquid phase (LIN; METTERS, 2006; MAITRA; SHUKLA, 2014). Hydrogels are interesting biomaterials because their high water content makes them compatible with a majority of living tissues. The mechanical properties of hydrogels tend to mimic

those of the soft body tissues, which allow the hydrogels insure the functional and morphological characteristics of the tissue to be treated (CROISIER; JÉRÔME, 2013). The preparation of chitosan physical hydrogels can be achieved using a neutralization process without any use of organic solvent or crosslinker. The mechanism of gelation is attributed to the formation of physical inter-chains junctions. When chitosan is dissolved in acetic acid aqueous solution occurs the stoichiometric protonation of the  $-NH_2$  sites. Then, the mixing the chitosan solution to a base, for example,  $NaHCO_3$ , occurs a reaction between  $HCO_3^-$  and  $H^+$  producing carbon dioxide ( $CO_2$ ) and an increase of pH value. The gel matrix formation is a result of the proton transfer from the amine moieties of chitosan to the base (LIU et al. 2011; ASSAAD, MAIRE, AND LEROUGE 2015).

The enriched flavonoid fraction obtained from *Cecropia glaziovii* Snethl crude extract (EFF-Cg) was evaluated in a preliminary study as antiherpes effects against HSV types 1 and 2. The results indicates that the fraction can be regarded as a phytopharmaceutical candidate for the treatment of herpetic infections once that presented the more promising antiviral activity compared the other samples tested (SILVA et al., 2010). Based on these properties of EFF-Cg, it was investigated the encapsulation in PLGA nanoparticles for improve drug delivery. A stability study of these nanoparticles suspension was performed in room temperature and demonstrated colloidal stability, without significant change, for 60 days (SANTOS et al., 2016).

The aim of this work was to determine the  $NaHCO_3$  concentration more adequate to form a transparent and homogeneous thermosensitive chitosan hydrogel. In a second moment, the objective was to prepare nanocomposite associating chitosan solution with EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles as a potential drug delivery system. The characteristics of the nanocomposite hydrogels were compared with those of pure chitosan hydrogels. The impact of nanoparticles presence was evaluated on the thermal properties, morphological, rheological behavior, and cytotoxic effect of materials.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. MATERIALS

Biodegradable polymer poly (lactic-co-glycolic) Resomer PLGA 503 H (LA:GA 50:50, MW 24000 – 38 000; inherent viscosity: 0.32 – 0.44 dL  $g^{-1}$ ; end group: free carboxylic acid) was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany) and stored in a freezer prior to use. Freeze-dried enriched flavonoid fraction of

*Cecropia glaziovii* Snethl (EFF-Cg) was used as a water-soluble drug. Sorbitan monooleate (SPAN 80, MERCK, Darmstadt, Germany) was used as a surfactant in the organic phase and Poloxamer 188 (Kolliphor P188, BASF, Ludwigshafen, Germany) was used in the internal and external aqueous phases. Chitosan was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, EUA), with low molecular weight and degree of deacetylation of 83%. Sodium hydrogen carbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) from Sigma Aldrich (St. Louis, EUA) was used for the sol-gel transition at a temperature close to  $37^\circ\text{C}$ . Other reagents acetonitrile and acetic acid were purchased from VETEC (São Paulo, Brazil) and were of analytical grade. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q apparatus (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The cell line used was fibroblast of green monkey kidneys (VERO- ATCC:CCL81) (Department of Clinical Virology, Göteborg University, Sweden). Eagle's minimum essential medium (MEM), and penicillin G, streptomycin and amphotericin B were purchased from Cultilab (Campinas, Brazil); fetal bovine serum (FBS) was obtained from Gibco (Carlsbad, USA). MTT was obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA) and dimethylsulfoxide (DMSO) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

## 2.2. PREPARATION OF PLGA NANOPARTICLES

PLGA nanoparticles were prepared using a modified solvent emulsification-evaporation method based on a w/o/w double emulsion technique (RESCIGNANO et al., 2015). Briefly, 40 mg of EFF-Cg was dissolved in 2 mL of ultrapure water (internal aqueous phase,  $w_1$ ) and added to 4 mL of dichloromethane containing 100 mg of PLGA and 100 mg of sorbitan monooleate (organic phase, o). The water-in-oil ( $w_1/o$ ) emulsion was homogenized for 15 min, using a tip sonicator (VIBRA CELL Sonics mod. VC 750, Newtown, USA). This primary emulsion was poured onto 40 mL of 5% (w/v) poloxamer 188 solution (external aqueous phase,  $w_2$ ) and mixed using the same sonication conditions to obtain the double emulsion ( $w_1/o/w_2$ ). For solvent extraction, the double emulsion was evaporated under reduced pressure at  $40^\circ\text{C}$ . The obtained particles were collected by centrifugation at 11 000 rpm for 10 min and washed out two times with ultrapure water and then lyophilized.

## 2.3. PREPARATION OF CHITOSAN HYDROGEL

Chitosan solution (2%, w/v) was obtained by dissolving chitosan in 0.1 M acetic acid aqueous solution, with overnight magnetic stirring until form a homogeneous and transparent solution. Five milliliters this solution were chilled in an ice bath, then  $\text{NaHCO}_3$  powder (10 to 60%,

w/w, based on chitosan weight) was added to the chitosan solution under magnetic stirring to get homogeneous mixture. The resulting sample was maintained at 37°C for sol-to-gel transition (LIU et al., 2011). The sol-to-gel transition was monitored by visually examining changes in appearance of the hydrogel (transparency or opacity), gelation occurrence and gelation time using the test tube inverted method.

#### 2.4. PREPARATION OF NANOCOMPOSITES HYDROGELS

The freeze-dried EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles were incorporated into hydrogels during the preparation of the stock solutions by magnetic stirring until complete homogenization of the particles. The nanocomposites hydrogels were prepared to obtain the following concentrations of nanoparticles in the hydrogel composition: 1%, 3%, 5% and 10% with respect to the weight of chitosan polymer (w/w). Pure chitosan hydrogel was denominated as Ch-pure and the nanocomposite hydrogels were designated using abbreviations as Ch-1% NP (nanocomposite with 1% nanoparticles), Ch-3% NP (nanocomposite with 3% nanoparticles), Ch-5% NP (nanocomposite with 5% nanoparticles), and Ch-10% NP (nanocomposite with 10% nanoparticles).

#### 2.5. CHARACTERIZATION OF THE NANOCOMPOSITES HYDROGELS

##### 2.5.1. Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric analyses (TGA) of the EFF-Cg free, EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles and the nanocomposites hydrogels were performed using a TA-TGA Q500 analyzer (New Castle, USA) in the following conditions: sample weight 6 mg, nitrogen flow (250 mL min<sup>-1</sup>), temperature range 25 – 600°C, heating rate 10°C min<sup>-1</sup>.

##### 2.5.2. Fourier transform infrared

Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of the chitosan powder, NaHCO<sub>3</sub> powder, EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles and the nanocomposite hydrogels were carried out with a Perkin Elmer Spectrum One FTIR spectrometer (Shelton, USA) equipped with an ATR accessory. Spectra were performed in the range from 4000 to 500 cm<sup>-1</sup> with a 4 cm<sup>-1</sup> resolution and an accumulation of 16 scans.

##### 2.5.3. Scanning electron microscopy

The morphology of nanocomposites microstructure was observed by scanning electron microscopy (SEM, XL30 Philips, Billerica, USA).



Samples were prepared in teflon molds and lyophilized and after each sample was mounted on the specimen holders. The dried samples were coated with an ultrathin coating of gold deposited on the sample by high-vacuum metallization.

#### **2.5.4. pH determination**

The pH values of the chitosan solutions and nanocomposites hydrogels were determined directly in the samples before and after gelation using a calibrated potentiometer (pHmetro Metrohm 8015 titter/ Herisau, Switzerland), at room temperature.

#### **2.5.5. Rheology**

Rheological characterization of the chitosan pure and nanocomposites hydrogels was performed in a TA Instruments AR-G2 Rheometer (New Castle, USA) using a steel plate cross hatched geometry (20 mm diameter). The viscoelastic properties of the formulations were performed at 37°C. A strain sweep test was done to confirm the linear viscoelastic range. Frequency sweep analysis was performed over the frequency range of 0.01 – 100 Hz following application of constant strain of 1% which is within the linear viscoelastic region. Temperature ramp step was evaluated in the temperature range of 37 to 85°C, using a ramp rate of 5°C min<sup>-1</sup> and constant strain and frequency of 1% and 1 Hz, respectively. The elastic modulus (G'), viscosity modulus (G'') and the loss tangent (tan δ) were calculated using the Rheology Advantage Data Analysis software. The resulting sample (0.6 mL) was poured in teflon molds (20 mm diameter) and maintained overnight at 37°C for sol-to-gel transition. The experiment was performed in triplicates for each formulation.

#### **2.5.6. Cytotoxicity assay**

To evaluate the cytotoxicity of Ch-pure and Ch-10% NP hydrogels, Vero cell line was used. They were maintained in MEM supplemented with 5% fetal bovine serum and the suspension was cultured at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere by 24 h. Before the cytotoxicity assay, nanoparticles and all dried hydrogels were sterilized under UV light for 30 min. Cells were seeded in 96-well plate for treatment with EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles, and after 24 h, the medium was aspirated out, and each well was treated with different concentration (0.078 to 5 mg mL<sup>-1</sup>) of the NP.

The hydrogels were dissolved in DMSO separately and the volume was completed with MEM medium to obtain a stock solution of

1 mg mL<sup>-1</sup> concentration. To evaluate the cytotoxicity of the hydrogels, the cells were seeded in 24-well plates. After discarding the original culture medium, each well was treated with different concentration (50 to 800 µg mL<sup>-1</sup>) of hydrogels. MEM medium and DMSO were used as negative and positive controls, respectively. After 48 h, MTT solution was added to each well, followed by additional 4 h incubation. After carefully discarding the solutions in each well, DMSO was added, and the cell culture plate was shaken for 10 min to dissolve Formazan crystals. The absorbance was measured at a wavelength of 570 nm with a microplate spectrophotometer (Spectra Max M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). The evaluation of cytotoxicity was in accordance with the ISO 10993 (2009) standard.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1. PLGA NANOPARTICLES PREPARATION AND CHARACTERIZATION**

In previous studies, we develop and characterized PLGA nanoparticles containing EFF-Cg using poloxamer 188 as surfactant agent. Particle size, polydispersity index and surface charge of these nanoparticles were measured using dynamic light scattering, the results were around  $226 \pm 3$  nm,  $0.13 \pm 0.02$  and  $-15.6 \pm 0.2$  mV, respectively. The drug release followed Korsmeyer–Peppas kinetics, a Fickian transport mechanism and a significant reduction of molecular weight of the polymer at 21-day period. The toxicity of these nanoparticles was determined by the MTT test and at 48 h the nanoparticles not exhibit cytotoxicity over Vero cells.

#### **3.2. PREPARATION OF CHITOSAN PURE AND NANOCOMPOSITE HYDROGELS**

The formation of the chitosan thermosensitive hydrogel using NaHCO<sub>3</sub> was found simple and rapid. The mixing between chitosan/NaHCO<sub>3</sub> is based on the physical hydrogel formation that arises of transient junctions from physical interactions such as ionic interactions and hydrogen bonds. In consequence, amine fractions of chitosan (CS-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) are translated to amino fractions (CS-NH<sub>2</sub><sup>+</sup>) and eventually leads to the polymer precipitation in above pH 6 (TANG et al., 2007; LIU et al., 2011). Initially, preliminary studies were carried out in order to identify the concentration of NaHCO<sub>3</sub> suitable to form homogeneous hydrogels. Four concentrations of NaHCO<sub>3</sub> (10, 40, 50 and 60%, w/w) were examined in the transparent and homogeneous hydrogel formation. In order to select an adequate hydrogel, the samples

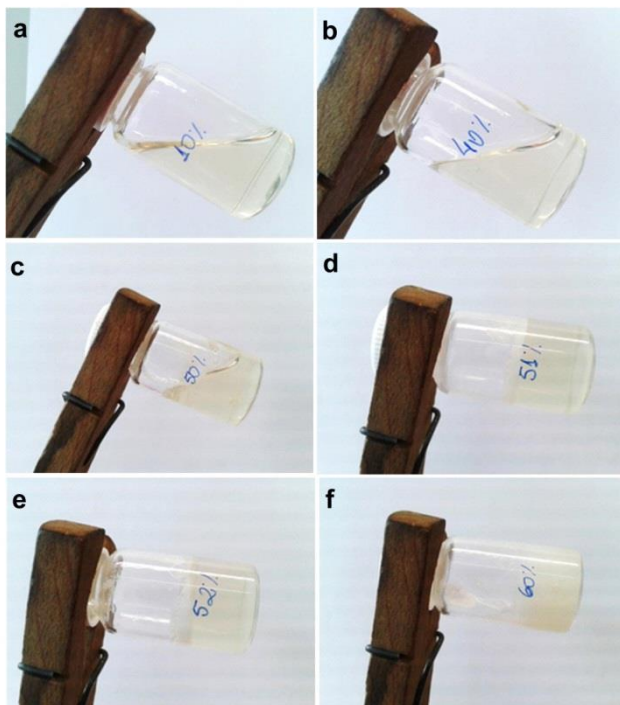
were evaluated about the visual appearance, gelation and gelation time. Table 12 shows that using until 50% of  $\text{NaHCO}_3$  no gelation was observed, the chitosan solution keeping transparent and a liquid-like behavior at  $37^\circ\text{C}$  (Fig. 32 a, b, c).

**Table 12:** Factors and parameter of the formulations for chitosan hydrogel formation.

<b>Chitosan:<math>\text{NaHCO}_3</math> (%, w:w)</b>	<b>Sol-to-gel transition</b>	<b>Sol-to-gel transition time</b>	<b>Visual appearance</b>
10	No	---	Transparent
40	No	---	Transparent
50	No	---	Transparent
51	Yes	30 min	Transparent
52	Yes	30 min	Transparent/precipitate
60	Yes	30 min	opaque

Results showed that using 60% of  $\text{NaHCO}_3$  there was the formation of a white precipitate in the chitosan solution (Fig. 32f). This is due to excess of sodium bicarbonate in the solution. When introduced in proper amounts to the solution, sodium bicarbonate neutralizes it and causes a polymer precipitation resulting in the gelation phase. But a  $\text{NaHCO}_3$  excess allows a higher precipitation resulting in white particles disperses in the chitosan solution. The same condition was observed in others works in literature (TANG et al., 2007; LIU et al., 2011). Therefore,  $\text{NaHCO}_3$  concentrations between 50 and 60% were evaluated and this study demonstrated that the ideal concentration for hydrogel formation is in a narrow range. The more adequate  $\text{NaHCO}_3$  concentration was 51% (Fig. 32d), the hydrogel was transparent without white precipitation presence in a gelation time of 30 minutes when left in an oven at  $37^\circ\text{C}$ . Also it was observed that a concentration of 52% gelling in 30 minutes (Fig. 32e), but the mixture represented as a heterogeneous dispersion with little polymer aggregates. Sol-gel transition was observed by the inclination of the tube (Fig. 32).

**Figure 32:** Visual aspect of the chitosan solution/ $\text{NaHCO}_3$  mixture after gelation time in oven at  $37^\circ\text{C}$ .



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

The Ch-pure hydrogel exhibits homogeneous and transparent visual appearance. The addition of EFF-Cg-loaded nanoparticles resulted in a loss transparency. However, the nanocomposites hydrogels maintained a homogeneous dispersion in the chitosan solution. The pH values were investigated before and after gelation for all formulations, the solutions contained nanoparticles in different concentrations (1, 3, 5 and 10% NP) no altered the pH values maintaining around 4.4 before gelation. After addition of  $\text{NaHCO}_3$  the presence and concentration of nanoparticles presented 6.7 for Ch-pure and 6.6, 7.4, 6.7 and 6.8 for nanocomposites in crescent concentration of the nanoparticles. Chenite and contributors (2006) described that the neutralization of acidic chitosan solutions to a pH above the  $\text{pK}_a$  of chitosan at about 6.3 – 6.4 results in interactions and water-chitosan hydrogen bonds, which induce a hydrated three-dimensional network. Considering this information,

even reaching a final pH greater than 6.4, the solutions containing nanoparticles no presented gelation (without white precipitation). Thus, different concentrations of  $\text{NaHCO}_3$  were evaluated and the nanocomposites gelation occurred using 65% of sodium bicarbonate. The gelation process was influenced by the nanoparticles incorporation in the chitosan solution.

The process of formation of chitosan hydrogels depends of a balance between hydrophilic and hydrophobic interactions which are responsible for the formation of the physical junctions. The nanoparticles presence might interfere in the sol-gel transition due to possible interaction with these ions in the solution or interactions of the  $\text{NaHCO}_3$  with the nanoparticles surface decreasing the effectiveness of the physical interactions and consequent hydrogel formation (MONTEBAULT et al., 2005; PAUL; ROBESON, 2008).

This thermosensitive behavior is very interesting for hydrogels once that it allows easy administration at room temperature (liquid state), and an *in situ* gelation at body temperature preventing the migration outside the targeted site. An *in situ* gelling system could improve the residence time and the bioavailability of the EFF-Cg in oral and vaginal mucosa for the treatment of herpes infection, for example, according reported in the literature (CHAUDHARY; VERMA, 2014; TUĞCU-DEMİRÖZ; ACARTÜRK; ÖZKUL, 2015).

### 3.3. THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS

The TGA thermograms of the Ch-pure hydrogel and nanocomposite hydrogels were analyzed and table 13 shows the decomposition range of these samples. The hydrogels showed three weight loss steps because of water evaporation and hydrogel degradation. The samples present moderately lost weight from 43°C to 180°C because of water loss and a main weight loss from 180°C to 310°C. These characteristics are attributed to chitosan, the TGA data of chitosan power shows that chitosan have two events, the first one because moisture vaporization and residues of acetic acid and the second attributed to the degradation of the saccharide structure of chitosan molecule, including the dehydration of saccharide rings and the polymerization and decomposition of the acetylated and deacetylated units of chitin (ZU et al. 2012; RESCIGNANO et al. 2015). Another weight loss event was observed in the hydrogels, a slight event occurs from 310°C to 520°C, which is similar to those of the Ch-pure and nanocomposite hydrogels. The TGA data represented in table 13 show that Ch-pure hydrogel was more thermally stable compared with

nanocomposite hydrogels because the hydrogel degradation occurs in higher temperature.

**Table 13:** Thermal gravimetric analysis properties of the chitosan powder, pure chitosan hydrogel and nanocomposite hydrogels.

Samples	$T_{\max}$ (°C)		
	Event 1 (43-180)	Event 2 (180-310)	Event 3 (310-520)
Ch-pure	107	278	475
Ch-1%NP	76	274	447
Ch-3%NP	72	252	429
Ch-5%NP	170	261	326
Ch-10%NP	137	243	319

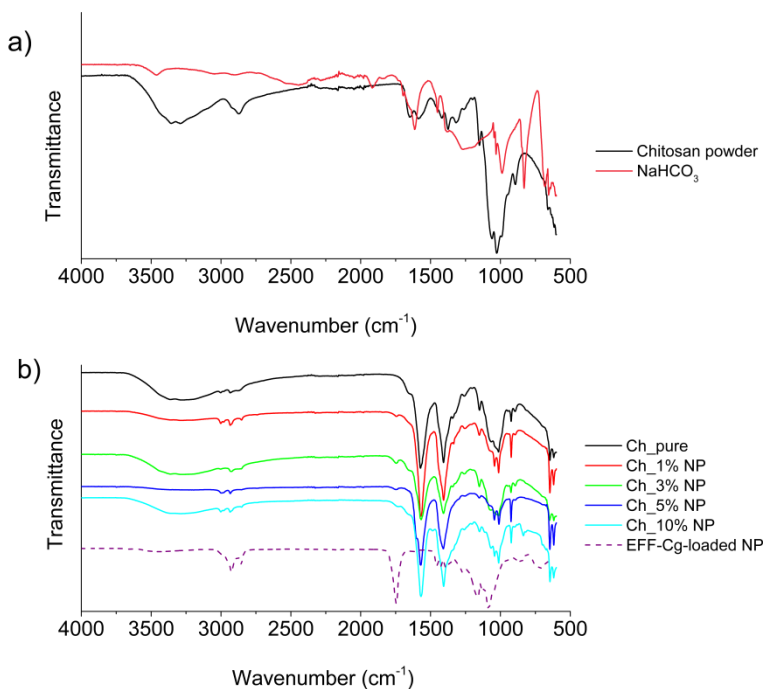
### 3.4. FOURIER TRANSFORM INFRARED

Infrared spectroscopy was carried out to confirm the chemical structure of the Ch-pure hydrogel and nanocomposite hydrogels. The FT-IR spectra of dried chitosan powder,  $\text{NaHCO}_3$  powder, and freeze-dried EFF-Cg-loaded nanoparticles, Ch-pure hydrogel and nanocomposite hydrogels are presented in Fig. 33. For chitosan powder, absorption peaks are observed in the range of  $\sim 3287\text{--}3355\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the oscillation of O–H, at  $\sim 2873\text{ cm}^{-1}$  that is a stretching vibration in aliphatic groups ( $-\text{CH}_2$  and  $-\text{CH}_3$ ). The spectrum of chitosan shows a band at  $\sim 1649\text{ cm}^{-1}$  assigned to the C=O stretch of the amine bond, and at  $\sim 1585\text{ cm}^{-1}$  assigned to the amino group ( $\text{NH}_2$ ) of chitosan. In the wave number range of  $1200\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ , the chitosan molecule showed four peaks at the bands at 1420, 1375, 1315 and  $1260\text{ cm}^{-1}$ . The band at  $\sim 1420\text{ cm}^{-1}$  is associated with oscillations characteristic of C–H bending of  $\text{CH}_2$  groups,  $\sim 1375\text{ cm}^{-1}$  represents the C–O stretching of the primary alcoholic group  $-\text{CH}_2\text{--OH}$ , and at  $\sim 1315\text{ cm}^{-1}$  is OH deformation of  $\text{CH--OH}$ . The wide band at  $650\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ , the FTIR spectrum of chitosan powder showed bands at 1063, 1026, 991, 943, 895 and  $660\text{ cm}^{-1}$ . The range of  $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$  is assigned to the saccharide structure and at  $660\text{ cm}^{-1}$  is connected with vibration of O=C–N groups (MODRZEJEWSKA et al., 2014). For  $\text{NaHCO}_3$  powder, absorption peaks are distributed in a wide band. The peaks which coincide with chitosan powder are around  $\sim 1375$  and  $991\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 30 a). The band at  $\sim 1384\text{ cm}^{-1}$  represents stretching of the

carbonate asymmetric of the sodium bicarbonate (DUTCHER; FAN; LEONARD, 2011).

The Ch-pure hydrogel and nanocomposite hydrogels showed similar absorption bands in the entire spectrum. In addition, no new absorption peak in the spectrum of the hydrogel in comparison to the spectrum of the chitosan powder. This information suggests that there is no direct chemical interaction between chitosan and sodium bicarbonate as an introduction of additional chemical functionality to account for gelation. Therefore, direct evidence that the gelation process is a result of physical interaction phenomena between chains of the components. The EFF-Cg-loaded nanoparticles presence in the nanocomposite hydrogels was confirmed by a new absorption peak appeared at  $\sim 1750$   $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 33b).

**Figure 33:** FT-IR spectra of chitosan powder and  $\text{NaHCO}_3$  (a), and freeze-dried Ch-pure hydrogel, nanocomposite hydrogels and EFF-Cg-loaded nanoparticles (b).

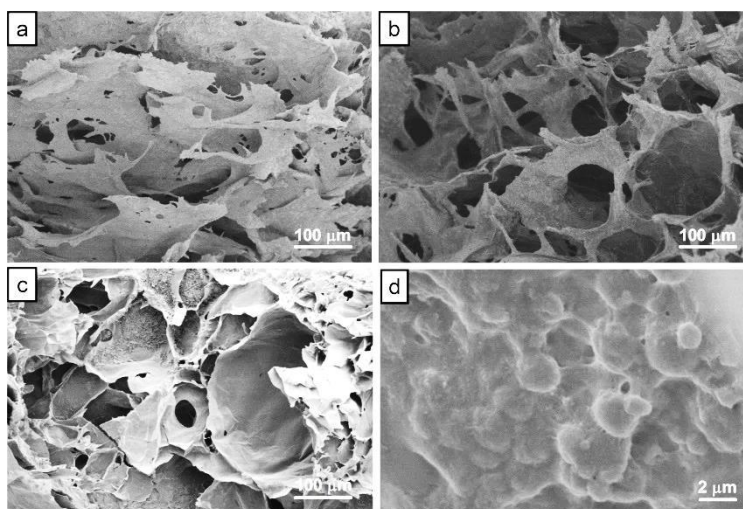


Fonte: Desenvolvido pelo autor.

### 3.5. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

The hydrogels structures were visually observed by scanning electron micrographs as shown in Fig. 34. The formed hydrogels are porous in all structure. The pores formation is favored by  $\text{NaHCO}_3$  presence. Sodium bicarbonate has a decomposition accompanied by carbon dioxide release, the emitted  $\text{CO}_2$  can additionally increase porosity (ZARZYCKI et al., 2008).

**Figure 34:** SEM images of the freeze-dried samples: Ch-pure (a); Ch-1% NP (b); the Ch-3% NP (c) and PLGA NP immersed in the chitosan matrix hydrogel in Ch-10% NP (d).



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

In order to determine the dispersion of PLGA NPs within the chitosan matrix, a SEM image at a higher magnification is shown in figure 34d. As can be observed, nanoparticles appear to be dispersed in the polymeric matrix, and with a relatively uniform distribution. It is possible to observe spherical particles in the entire matrix, the morphology of the Ch-10% NP showed irregular shapes in wall of the pores often with particles agglomeration. The incorporation of these nanoparticles in the chitosan solution and the gelation step using  $\text{NaHCO}_3$  no damage the nanoparticles structure. Large pores were observed in nanocomposite hydrogels, this was expected because the gelation of the nanocomposites only occurred with an increased amount of  $\text{NaHCO}_3$ , compared to Ch-pure hydrogel.

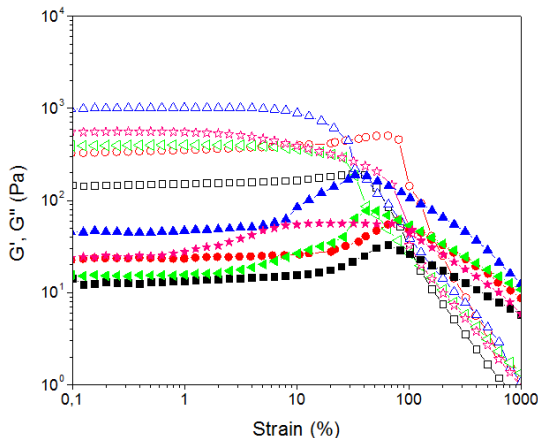


### 3.6. RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION

Preparation of chitosan hydrogel has been described in other studies showing how the amount of  $\text{NaHCO}_3$  was able to affect the adequate hydrogel formation (HUANG et al., 2011; LIU et al., 2011; ASSAAD; MAIRE; LEROUGE, 2015). For this reason, a chitosan solution (2%, w/v) and a sodium bicarbonate concentration of 51% (w/w) were chosen in this work as the optimal condition to obtain homogeneous thermosensitive Ch-pure hydrogel at  $37^\circ\text{C}$ . In the nanocomposite hydrogels preparation a higher concentration the  $\text{NaHCO}_3$  was used in the hydrogel formation as discussed above.

A strain sweep test was first done to determine the linear viscoelastic region, where elastic modulus ( $G'$ ) and viscous modulus ( $G''$ ) are parallel and independent of the strain amplitude (CHOI et al., 2015). In order to maintain the experiments within the linear viscoelastic region, in all further measurements the deformation was set at 1% for all samples. In results of the strain sweep test was possible to identify the yield stress, which is the minimum stress that must be applied to a sample in order to induce flow. Thus, the yield stress was estimated as the point where the slope of the stress-strain curve changed dramatically and  $G'$  and  $G''$  rapidly decrease with increasing amplitude of strain, causing the non-linearity (DONG et al., 2013). Nanocomposite hydrogels demonstrated an increase in the elastic modulus compared to Ch-pure hydrogel. The  $G'$  improved in the presence of nanoparticles, mainly in Ch-3% NP formulation and then decreased in the formulations prepared with 5% and 10% of NP. These results confirm that even a small addition of nanoparticles has the potential to drastically transform the structure-properties of the polymeric matrix. The changes in the structure might be related to the extensive surface area of the nanoparticles and consequent alteration the mobility of polymer chains near their interfaces (HAMMING et al., 2009). In order to get a further insight on the effect of the addition of PLGA nanoparticles on the elastic modulus of the resulting nanocomposite hydrogels,  $G'$  was measured at a frequency and deformation of 1 Hz and 1%, respectively as a function of the nanoparticles concentration in figure 35.

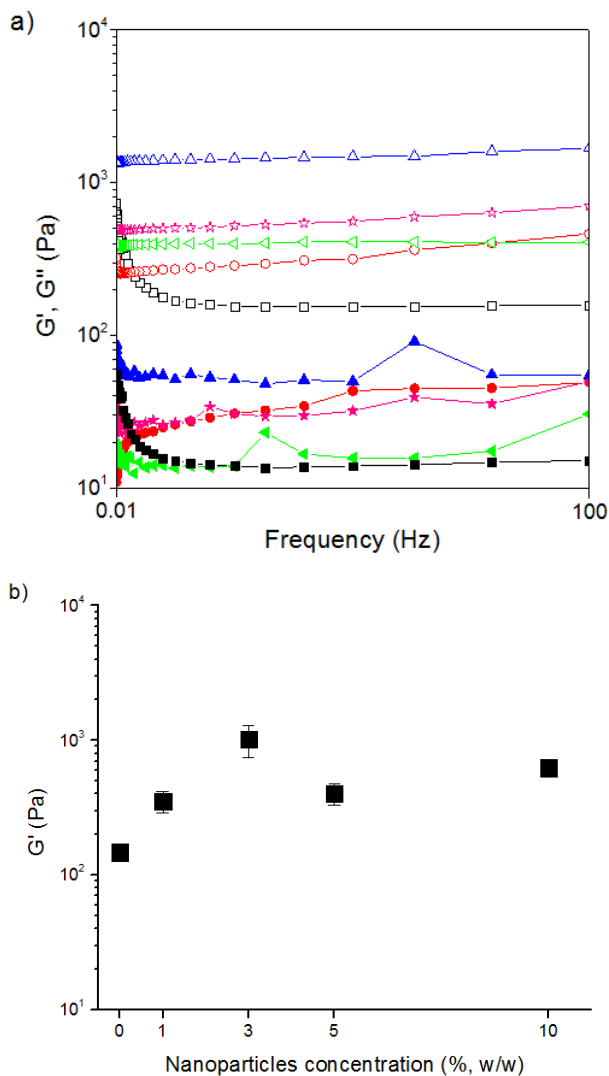
**Figure 35:** Elastic modulus ( $G'$  – hollow symbol) and viscous modulus ( $G''$  – solid symbol) as a function of strain for Ch-pure hydrogel (black line), Ch-1% NP (red line), Ch-3% NP (blue line), Ch-5% NP (green line) and Ch-10% NP (pink line) nanocomposite hydrogels.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

The mechanical spectrum of the different samples was investigated by the variation of the corresponding  $G'$  and  $G''$  values over frequency dependence. Fig. 36 shows that as required for hydrogels, the values of the elastic modulus exceeded viscous modulus ( $G' > G''$ ) (IKEDA; NISHINARI, 2001; HERNÁNDEZ et al., 2009; BALOGLU et al., 2011). Thus, the hydrogels presented behave gel-like and the course of the curve was nearly parallel to the x-axis at all frequency range evaluated for the samples. This behavior indicates the stable structure of the hydrogels that it was not broken down by the mechanical shear force at 37°C (ISLAM; RIAZ; YASIN, 2013). In addition, it was observed that the combination of these two different types of materials generated a change in the elastic modulus of the nanocomposites compared to Ch-pure hydrogel. The formulation Ch-3% NP nanocomposite hydrogel showed higher  $G'$  values compared to other formulations. The fact of nanoparticles presence to reduce the elasticity in formulations containing 5% and 10% NP may be due to the interlinking space generated between the groups in the chitosan hydrogel when nanoparticles was added (NAIR et al., 2015).

**Figure 36:** Elastic modulus ( $G'$  – hollow symbol) and viscous modulus ( $G''$  – solid symbol) as a function of frequency for Ch-pure hydrogel (black line), Ch-1% NP (red line), Ch-3% NP (blue line), Ch-5% NP (green line) and Ch-10% NP (pink line) nanocomposite hydrogels; and elastic modulus as a function of nanoparticles concentration (b).



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

The viscoelastic nature of the samples also was described using the loss tangent ( $\tan \delta$ ) which is considered useful parameter summarizing the rheological properties of semisolids.  $\tan \delta < 1$  indicates a solid gel-like response, whereas  $\tan \delta > 1$  reflects a liquid-like response. Thus, as  $\tan \delta$  becomes smaller the elasticity of the material increases, while the viscous behavior is reduced (MADSEN; EBERTH; SMART, 1998). In Table 14 the loss tangent,  $\tan \delta = G''/G'$ , calculated for each sample at frequency range of 0.01 to 100 Hz, has been reported as a function of the concentration of NP used in the nanocomposite preparation. The quantity  $\tan \delta$  represents the ratio of dissipated energy/stored energy during every deformation step (IKEDA; NISHINARI, 2001). The results shown that Ch-pure hydrogel and nanocomposite hydrogels presented loss tangent less than 1, indicating the prevalence of the elastic component ( $G'$ ) at all tested frequencies.

**Table 14:** Loss tangent ( $\tan \delta$ ) of formulations at different frequencies at 37°C. The values represents the mean  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ).

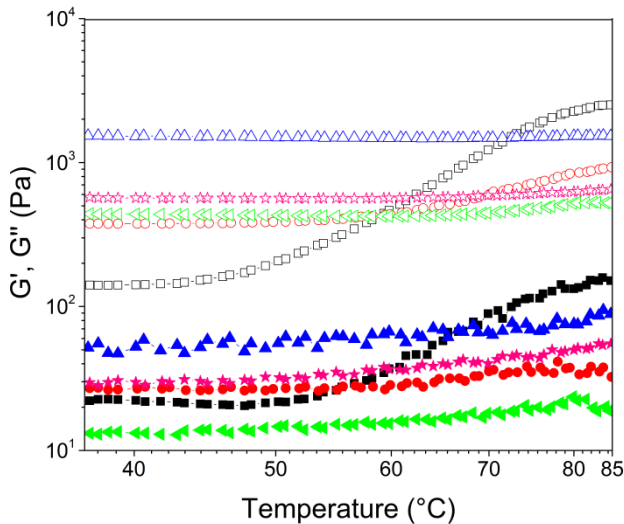
Sample	Loss tangent at oscillatory frequencies (Hz)				
	0.01	0.1	1	10	100
Ch-pure	0.11 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02	0.82 $\pm$ 2.00	0.03 $\pm$ 0.14
Ch-1% NP	0.03 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.19
Ch-3% NP	0.06 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.13
Ch-5% NP	0.05 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.11
Ch-10% NP	0.09 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.07	0.05 $\pm$ 0.03

In particular, from the mechanical spectra, it is possible to describe that these samples might be considered strong hydrogels. The typical strong gel spectrum consists of an almost horizontal straight line. The  $G'$  and  $G''$  curves are almost frequency independent and parallel to each other. Furthermore, the loss tangent is lower than 0.1 and the  $G'$  values are basically 1 to 2 orders of magnitude greater than  $G''$  values. Differently, in the weak gel the profile of elastic and viscous modulus can show slight frequency dependence and the  $\tan \delta$  is higher than 0.1 (BORZACCHIELLO; AMBROSIO, 2009).

Temperature sweep was used to observe the thermal behavior of Ch-pure hydrogel and nanocomposite hydrogels. The experiments were performed at a constant frequency and deformation of 1 Hz and 1%, respectively. Results of the effect of temperature on the viscoelastic properties of Ch-pure and nanocomposite hydrogels show that all of them displayed a gel character ( $G' > G''$ ) (Fig. 37). As shown, the elastic and viscous modulus for nanocomposite hydrogels remained approximately the same over the entire temperature range of 37°C to 85°C, suggesting that the viscoelastic properties of samples were not susceptible to temperature.

As can be observed, the Ch-pure continued the sol-to-gel transition due to the increased the mechanical properties of the hydrogel,  $G'$  increased as the temperature increased. Literature data suggest that an increase in temperature causes the deprotonation of the ammonium group of chitosan and weakening of the polymer-water hydrogen bonds and strengthening of polymer-polymer hydrophobic interactions (dipole, hydrogen, van der Waals and other interactions). Thus, hydrophobic association of chitosan under the condition of ionic strength led to the formation of the hydrogel network (MOON et al. 2012; MODRZEJEWSKA et al. 2014). The nanoparticles presence in the nanocomposites might have decreased the hydrogen bonding interactions interfering in the increase of the  $G'$  values in the nanocomposite hydrogels.

**Figure 37:** Elastic modulus ( $G'$  – hollow symbol) and viscous modulus ( $G''$  – solid symbol) as a function of temperature Ch-pure hydrogel (black line), Ch-1% NP (red line), Ch-3% NP (blue line), Ch-5% NP (green line) and Ch-10% NP (pink line) nanocomposite hydrogels.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

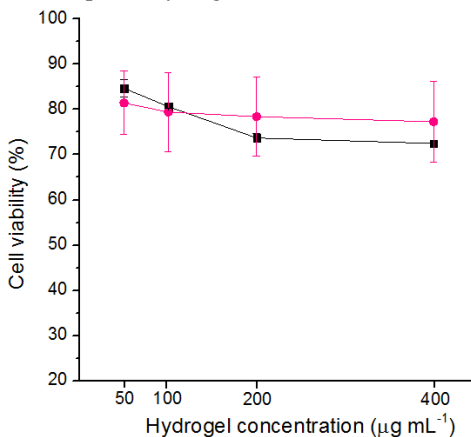
### 3.7. CYTOTOXICITY

Chitosan is biodegraded *in vivo* by several proteases, and its biodegradation leads to the formation of non-toxic oligosaccharides of variable length. These oligosaccharides can be incorporated in metabolic pathways or be further excreted (CROISIER; JÉRÔME, 2013; AHMADI et al., 2015). Despite the fact that chitosan has been widely used as a drug delivery system and has been extensively studied for topical and mucosal drug delivery (SZYMAŃSKA et al., 2015), its safety profile may depend of the cross-linking type used for hydrogel formation.

The MTT assay, a quantitative and rapid colorimetric method, was chosen to preliminarily screen the cytotoxicity range of Ch-pure hydrogel and Ch-10% NP nanocomposite hydrogel in Vero cells. The MTT test is based on the cleavage of a yellow tetrazolium salt (MTT) to insoluble purple formazan crystals in the presence of the mitochondrial dehydrogenases of viable cells (SCUDIERO et al., 1988). Results showed concentration-dependent cytotoxicity at the range of 50 to 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  after 48 h. Cell viability decreased in the presence of the

highest tested concentration; however, the viability was higher than 70% at all tested concentrations and cytotoxicity of both hydrogels was not compromised (Fig. 38).

**Figure 38:** Cytotoxicity evaluation of Ch-pure hydrogel (●) and Ch-10% NP nanocomposite hydrogel (■) on Vero cell line using MTT method.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

#### 4. CONCLUSION

In this study, the benefits of the combination of two different materials, nanoparticles and hydrogels lead to materials with unique properties absent in the individual components. Different  $\text{NaHCO}_3$  concentrations 10 to 60% (w/w, based on chitosan weight) were evaluated to produce a homogeneous and transparent hydrogel. The concentrations between 51% (w/w) sodium bicarbonate showed liquid-like behavior at room temperature ( $25^\circ\text{C}$ ) and gel-like behavior at physiological temperature ( $37^\circ\text{C}$ ). Different concentrations of EFF-Cg-loaded PLGA nanoparticles are dispersed in chitosan solution for nanocomposite chitosan hydrogels preparation. All nanocomposite exhibited gel-like behavior at  $37^\circ\text{C}$ , but a higher concentration the  $\text{NaHCO}_3$  was added to appropriate hydrogel formation.

Nanocomposite hydrogels formed stronger and more elastic gels with subsequent higher values in elastic modulus compared to the Ch-pure hydrogel. These properties are advantageous to prolong residence time and reduce leakage of the dosage form, when applied on mucosal layers. Moreover, formulations containing 5% and 10% of nanoparticles rendered gels with lower modulus compared to Ch-3% NP formulation.

No differences were observed between the Ch-pure and Ch-10% NP formulations in relation to their cytotoxicity. Based on these results, only the higher concentration tested presented cytotoxic effects on Vero cells, when compared to the other tested concentrations. A rise in the pH of cell culture medium due to the sodium bicarbonate presence could be a reason for these results. In summary, the combination of PLGA nanoparticles with chitosan did not influence negatively for the hydrogel formation. Thus, Ch-10% NP could be considered a promising thermosensitive system for delivery of EFF-Cg in order to improve properties for innovative applications.

## 5. REFERENCES

- AHMADI, F. et al. Chitosan based hydrogels: Characteristics and pharmaceutical applications. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2015.
- ASSAAD, E.; MAIRE, M.; LEROUGE, S. Injectable thermosensitive chitosan hydrogels with controlled gelation kinetics and enhanced mechanical resistance. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 87–96, 2015.
- BAGHERI-KHOULENJANI, S.; TAGHIZADEH, S. M.; MIRZADEH, H. An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 773–778, 2009.
- BALOGLU, E. et al. Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 16, n. 6, p. 627–636, 2011.
- BENHABILES, M. S. et al. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 1, p. 48–56, 2012.
- BORZACCHIELLO, A.; AMBROSIO, L. Structure-Property Relationships in Hydrogels. In: BARBUCCI, R. **Hydrogels: Biological Properties and Applications**. Milan: Springer Milan, 2009. p. 9–20.
- CHAUDHARY, B.; VERMA, S. Preparation and Evaluation of Novel In Situ Gels Containing Acyclovir for the Treatment of Oral Herpes Simplex Virus Infections. **The Scientific World Journal**, p. 1–7, 2014.
- CHENITE, A. et al. Monolithic gelation of chitosan solutions via enzymatic hydrolysis of urea. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 3, p. 419–424, 2006.
- CHOI, B. et al. Introduction to In Situ Forming Hydrogels for Biomedical Applications. In: LOH, X. J. **In-Situ Gelling Polymers**. Singapore: Springer Singapore, 2015. p. 5–35.



- CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780–792, 2013.
- DONG, W. et al. Superior mechanical properties of double-network hydrogels reinforced by carbon nanotubes without organic modification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 22380–22394, 2013.
- DORNISH, M.; KAPLAN, D.; SKAUGRUD, O. Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products: ASTM alginate and chitosan standard guides. American Society for Testing and Materials. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 944, n. 388, p. 388–397, 2001.
- DUTCHER, B.; FAN, M.; LEONARD, B. Use of multifunctional nanoporous TiO(OH)<sub>2</sub> for catalytic NaHCO<sub>3</sub> decomposition-eventually for Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> based CO<sub>2</sub> separation technology. **Separation and Purification Technology**, v. 80, n. 2, p. 364–374, 2011.
- HAMMING, L. M. et al. Effects of dispersion and interfacial modification on the macroscale properties of TiO<sub>2</sub> polymer-matrix nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 69, n. 11-12, p. 1880–1886, 2009.
- HERNÁNDEZ, R. et al. Influence of iron oxide nanoparticles on the rheological properties of hybrid chitosan ferrogels. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 339, n. 1, p. 53–59, 2009.
- HUANG, Z. et al. Modification of an injectable chitosan scaffold by blending with NaHCO<sub>3</sub> to improve cytocompatibility. **Polymers and Polymer Composites**, v. 19, n. 9, p. 781–787, 2011.
- IKEDA, S.; NISHINARI, K. “ Weak Gel ” -Type Rheological Properties of Aqueous Dispersions of Nonaggregated K -Carrageenan Helices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4436–4441, 2001.
- ING, L. Y. et al. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, p. 1-9, 2012.
- ISLAM, A.; RIAZ, M.; YASIN, T. Structural and viscoelastic properties of chitosan-based hydrogel and its drug delivery application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 119–124, 2013.
- ISO 10993-5:2009 (E). Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. **International Organization for Standardization**, 2009.

- LIN, C. C.; METTERS, A. T. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 12-13, p. 1379–1408, 2006.
- LIU, L. et al. Smart gelation of chitosan solution in the presence of NaHCO<sub>3</sub> for injectable drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n. 1-2, p. 6–15, 2011.
- LIU, M. et al. The improvement of hemostatic and wound healing property of chitosan by halloysite nanotubes. **Rsc Advances**, v. 4, p. 23540–23553, 2014.
- MADSEN, F.; EBERTH, K.; SMART, J. D. A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: The effect of mucoadhesive type and concentration. **Journal of Controlled Release**, v. 50, n. 1-3, p. 167–178, 1998.
- MAITRA, J.; SHUKLA, V. K. Cross-linking in Hydrogels - A Review. **American Journal of Polymer Science**, v. 4, n. 2, p. 25–31, 2014.
- MODRZEJEWSKA, Z. et al. Mechanism of formation of thermosensitive chitosan chloride gels. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives**, v. 19, p. 125–134, 2014.
- MONTEBAULT, A. et al. Rheometric Study of the Gelation of Chitosan in Aqueous Solution without Cross-Linking Agent. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 653–662, 2005.
- MOON, H. J. et al. Temperature-responsive compounds as in situ gelling biomedical materials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 14, p. 4860-4883, 2012.
- NAIR, M. B. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Composite hydrogel of chitosan – poly ( hydroxybutyrate- co -valerate) with chondroitin sulfate nanoparticles for nucleus pulposus tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 84–92, 2015.
- OKAMOTO, Y. et al. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 249–252, 2002.
- PAUL, D. R.; ROBESON, L. M. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. **Polymer**, v. 49, n. 15, p. 3187–3204, 2008.
- RESCIGNANO, N. et al. Use of alginate, chitosan and cellulose nanocrystals as emulsion stabilizers in the synthesis of biodegradable polymeric nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 445, p. 31–39, 2015.
- SAHINER, N. et al. Microgel, nanogel and hydrogel-hydrogel semi-IPN composites for biomedical applications: Synthesis and characterization. **Colloid and Polymer Science**, v. 284, n. 10, p. 1121–1129, 2006.

- SANTOS, T. et al. Development and effect of storage on the stability of Enriched Flavonoid Fraction of *Cecropia glaziovii*-loaded PLGA nanoparticles. **Pharmaceutical Development and Technology**, DOI: 10.1080/10837450.2016.1245742.
- SCHIPPER, N. G. et al. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. **Pharmaceutical research**, v. 14, n. 7, p. 923–9, 1997.
- SCUDIERO, D. A et al. Evaluation of a Soluble Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. **Cancer research**, v. 48, p. 4827–4833, 1988.
- SILVA, I. T. et al. *In vitro* antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 143–148, 2010.
- SOGIAS, I. A.; WILLIAMS, A. C.; KHUTORYANSKIY, V. V. Why is chitosan mucoadhesive? **Biomacromolecules**, v. 9, n. 7, p. 1837–1842, 2008.
- SZYMAŃSKA, E. et al. The effect of  $\beta$ -glycerophosphate crosslinking on chitosan cytotoxicity and properties of hydrogels for vaginal application. **Polymers**, v. 7, n. 11, p. 2223–2244, 2015.
- TANG, Y. F. et al. Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) blend hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 4, p. 491–499, 2007.
- TUĞCU-DEMİRÖZ, F.; ACARTÜRK, F.; ÖZKUL, A. Preparation and characterization of bioadhesive controlled-release gels of cidofovir for vaginal delivery. **Journal of Biomaterials Science**, v. 26, n. 17, p. 1237-1255, 2015.
- WEDMORE, I. et al. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. **The Journal of trauma**, v. 60, n. 3, p. 655–658, 2006.
- ZARZYCKI, R. et al. New Chitosan Structures in the Form of the Thermosensitive Gels. **Progress on chemistry and applications of chitin**, v. XIII, p. 35–42, 2008.
- ZU, Y. et al. Preparation and characterization of chitosan-polyvinyl alcohol blend hydrogels for the controlled release of nano-insulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 82–87, 2012.



## **Discussão geral**

---



## DISCUSSÃO GERAL

A importância histórica do uso de plantas em saúde no Brasil se destaca especialmente na área farmacêutica. O que pode ser justificado pela origem da indústria farmacêutica ser voltada inicialmente ao emprego de diversos insumos vegetais. Esta realidade se mantém com grande parte da indústria nacional utilizando plantas como insumo básico, uma vez que se trata de um país com grande biodiversidade e apresenta condições climáticas, edáficas e potencial hídrico suficiente para adaptação de inúmeras espécies vegetais (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

O gênero *Cecropia* é amplamente utilizado na medicina popular para tratamento de bronquite, asma, hipertensão arterial e como ansiolítico (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011). Estudos relacionados com *C. glaziovii* demonstraram que extratos e frações desta planta estão relacionados, além de outras atividades, à ação antiviral contra os vírus do herpes (HSV-1 e HSV-2) (SILVA et al., 2010). Estes autores avaliaram o efeito anti-herpético do extrato bruto preparado por infusão e suas respectivas frações (fração butanólica e fração rica em flavonoides C-glicosídeos). Os resultados foram promissores, uma vez que a fração rica em flavonoides foi a mais eficiente contra os vírus do tipo 1 e 2. Além disso, foi observado que o mecanismo de ação da fração parece estar relacionado com a redução da infecciosidade viral para HSV-2; inibição da adsorção e penetração dos vírus nas células; inibição da propagação viral intercelular; e redução dos níveis da proteína ICP27 e das proteínas do envelope gD e gE do HSV-1. Em outro estudo, um extrato hidroetanólico das folhas de *C. glaziovii* preparado por refluxo utilizando etanol 40° GL demonstrou atividade anti-herpética relevante contra uma cepa do vírus HSV-1 resistente ao aciclovir. Os dados indicam que esta atividade está relacionada aos seus compostos fenólicos presentes em maior concentração no extrato (PETRONILHO et al., 2012).

Considerando que as infecções causadas pelos vírus herpéticos são endêmicas, e representam uma das mais prevalentes no mundo, as infecções causadas por esses vírus assumem grande relevância no contexto da saúde pública (BRADY; BERNSTEIN, 2004). Em consonância com os resultados apresentados na literatura, o objetivo deste trabalho foi aliar a esta planta uma ferramenta tecnológica, desenvolvendo um sistema nanoparticulado contendo a fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos. Estes sistemas apresentam potencial para melhorar a eficácia e biodisponibilidade da fração, bem

como reduzir os efeitos na instabilidade dos componentes ativos que eventualmente podem ocorrer (AULTON, 2005).

Sendo assim, este trabalho foi dividido em etapas, envolvendo inicialmente a otimização da obtenção da fração rica em flavonoides C-glicosídeos de *C. glaziovii* (FEF-Cg) e na sequência o desenvolvimento e a caracterização físico-química de nanopartículas de PLGA contendo a fração, bem como um estudo de estabilidade dos sistemas desenvolvidos. Além disso, a incorporação das nanopartículas em duas formas farmacêuticas distintas e sua caracterização, como descrito a seguir.

A partir de um extrato aquoso as condições de obtenção da FEF-Cg foram estabelecidas pela eficiência de extração dos flavonoides C-glicosídeos utilizando Amberlite® XAD-2 e XAD-16. Os resultados mostraram que a resina XAD-16 foi menos eficiente na extração dos marcadores, porém apresentou maior rendimento em massa da fração, sendo a resina escolhida para a preparação da fração. Por outro lado, a fim de avaliar a etapa de partição na técnica de obtenção da FEF-Cg foram testadas três condições diferentes partindo de um extrato aquoso e um extrato hidroetanólico (20%, v/v). A influência destas variáveis foi avaliada a partir dos resultados de análise estatística dos valores de teor dos marcadores químicos, ISOO e ISOV. Os resultados obtidos demonstraram que os extratos preparados com água não apresentaram diferença estatística nos teores dos marcadores comparados aos extratos preparados com etanol 20%. Neste caso, o líquido extrator de preparação do extrato bruto não influenciou na obtenção da FEF-Cg.

A ausência de partição, partição com acetato de etila seguida de partição com *n*-butanol e partição com *n*-butanol apresentaram diferença significativa na extração do marcador ISOO. O maior teor deste marcador foi encontrado utilizando partição, principalmente com *n*-butanol. Além disso, os teores de ISOV só apresentaram diferença estatística na partição com *n*-butanol. Desta forma, para otimizar a obtenção da FEF-Cg considerou-se que a melhor condição de preparo é partição do extrato bruto hidroetanólico com *n*-butanol seguida de tratamento com resina XAD-16. Após a otimização da fração, a citotoxicidade e efeito anti-herpético contra o vírus HSV-1 foram confirmados para o extrato bruto e a FEF-Cg. As amostras não demonstraram citotoxicidade para as células Vero nas concentrações testadas, alcançando um valor de  $CC_{50} > 2 \text{ mg mL}^{-1}$ . No ensaio de redução do número de placas, para avaliar atividade antiviral a FEF-Cg apresentou maior inibição na replicação do vírus comparada aos valores de  $CI_{50}$  do extrato bruto.



Para a preparação das nanopartículas de PLGA, maiores valores de eficiência de encapsulação e teor de fração foram obtidos pela técnica de dupla emulsão seguida pela evaporação do solvente, quando comparados aos obtidos pela técnica de nanoprecipitação. Estes parâmetros foram considerados como fatores determinantes para a escolha da técnica de dupla emulsão para preparação do sistema nanoparticulado. Um segundo estudo de formulação mostrou que o tensoativo poloxamer 188 na fase aquosa externa durante a preparação do sistema nanoparticulado induziu a obtenção de nanopartículas monodispersas de menor tamanho ( $276 \pm 8$  nm e índice de polidispersão de  $0,18 \pm 0,02$ ). Com a técnica de dupla emulsão, o teor de ISOO aumentou proporcionalmente à quantidade de FEF-Cg adicionada à formulação, portanto a quantidade de fração incorporada ao sistema foi de 40 mg.

Um estudo de estabilidade foi conduzido, no qual foram avaliadas possíveis alterações em características como aparência (alteração de cor, formação de agregados e sedimentação), tamanho de partículas e polidispersão, carga superficial, pH e quantidade de ISOO livre em função do tempo de estocagem em temperatura ambiente. A formulação que apresentou melhores resultados frente aos fatores avaliados foi a F3, que continha monooleato de sorbitano como tensoativo na fase orgânica e poloxamer 188 0,5% (m/v) na fase aquosa interna e externa. O perfil de liberação da formulação F3 apresentou um comportamento de liberação controlada da fração a partir da matriz polimérica. Dados da cinética de liberação sugerem um mecanismo pelo modelo de Weibull caracterizado por uma liberação inicial elevada seguida de uma liberação controlada (DASH et al., 2010).

Com base na formulação F3, três novas formulações foram preparadas utilizando poloxamer 188 (PLU), álcool polivinílico (PVA), de menor massa molar, como tensoativos da fase aquosa externa e celulose nanocristalina (CNC) para preparação de nanopartículas por *Pickering emulsion*. Após a formação das nanopartículas, o sobrenadante, juntamente com a fração não encapsulada foram retirados e as nanopartículas foram lavadas com água. O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar as características físico-químicas destas formulações após as alterações descritas e a secagem por liofilização.

As nanopartículas preparadas com PLU e PVA apresentaram tamanhos de partículas inferiores a 300 nm e uma distribuição do tamanho de partículas unimodal, diferente das características apresentadas pelas preparadas por CNC. Além disso, imagens de microscopia eletrônica mostraram total formação das partículas somente

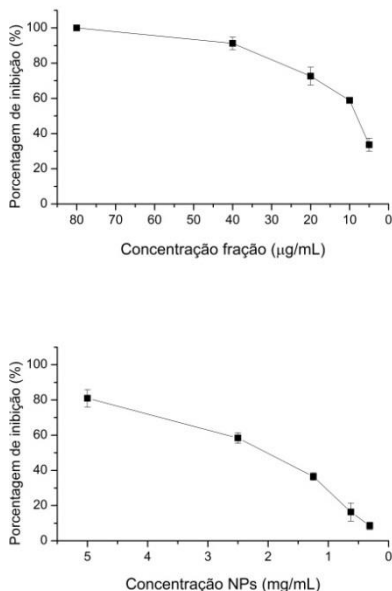
usando os tensoativos PLU e PVA (Ver figura 18 no capítulo 3, página 18).

Dados de TGA demonstraram maior estabilidade térmica das nanopartículas preparadas com PLU comparando com as outras formulações. Considerando estes resultados e a aprovação do PLU pela FDA para uso em produtos farmacêuticos e médicos, a formulação preparada com PLU foi escolhida para seguir com os experimentos de liberação e degradação das nanopartículas.

O perfil de liberação da FEF-Cg a partir das nanopartículas lavadas e liofilizadas foi conduzido por 21 dias em tampão 7,2 a 37°C. Nos 30 minutos iniciais, 23% do marcador ISOO foi liberado, seguido de uma liberação mais lenta por difusão a partir da erosão da matriz polimérica. A degradação das nanopartículas foi avaliada pelos valores de massa molar do polímero PLGA 503H em tempos determinados durante o estudo de liberação. Ao final dos 21 dias, a massa molar do polímero reduziu 51% comparado ao valor inicial.

Ensaio de citotoxicidade da FEF-Cg livre, nanopartículas contendo FEF-Cg e nanopartículas brancas foram avaliados em células Vero pelo ensaio colorimétrico *in vitro* de MTT. Em geral, as amostras não apresentaram citotoxicidade às células nas concentrações testadas. A FEF-Cg livre inibiu 35% da viabilidade celular enquanto que as nanopartículas contendo FEF-Cg e nanopartículas brancas inibiram 28% e 22%, respectivamente. O efeito anti-herpético destas amostras foi avaliado pelo ensaio de redução do número de placas em células Vero por 48 h. Após 1 h de incubação dos vírus, as células foram tratadas com diferentes concentrações das amostras dispersas em meio. Para efeito de comparação foram testadas concentrações semelhantes de fração nas amostras FEF-Cg livre e das nanopartículas contendo FEF-Cg. Estas amostras exibiram uma resposta concentração-dependente na redução do número de placas, a figura abaixo mostra a influência destas amostras na replicação do vírus. A concentração efetiva para inibir 50% dos vírus ( $CI_{50}$ ) foi de  $8,24 \pm 0,89 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $1,85 \pm 0,05 \text{mg mL}^{-1}$  para a fração livre e NPs, respectivamente.

**Figura:** Efeito na replicação do vírus HSV-1 em células Vero da FEF-Cg livre e NPs contendo FEF-Cg durante 48h de tratamento.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Filmes de quitosana (filmes brancos) e nanocompósitos, que são filmes de quitosana contendo diferentes concentrações de nanopartículas, foram preparados e suas propriedades físico-químicas foram comparadas. Os filmes foram obtidos pela técnica de evaporação do solvente, conhecida também por *casting* e apresentaram espessuras em torno de 51 µm e uma aparência transparente e homogênea, independente da concentração de nanopartículas adicionadas (0, 1, 3, 5 e 10%, m/m em relação ao peso da quitosana). Dados de infravermelho demonstraram a presença das nanopartículas nos filmes e resultados de TGA sugerem que a presença e concentração das mesmas não alterou a estabilidade térmica dos filmes de quitosana.

A resistência e elasticidade do filme branco e dos filmes nanocompósitos foi comparada segundo suas propriedades mecânicas pelo ensaio de tração. Os resultados mostraram que a incorporação de nanopartículas em diferentes proporções não influenciou significativamente as propriedades mecânicas do filme de quitosana. Ao

final, todos os nanocompósitos apresentaram rigidez, flexibilidade e resistência à fratura semelhante ao filme branco.

Os filmes também foram comparados de acordo com resultados das análises dinâmico-mecânico com variação da temperatura na faixa de 25 à 180°C. Neste caso, o módulo elástico diminuiu com o aumento da concentração de nanopartículas, deixando os filmes menos rígidos. A temperatura de transição vítrea dos filmes nanocompósitos aumentou com o aumento da concentração de nanopartículas, sugerindo uma interação entre a matriz de quitosana e as nanopartículas.

A citotoxicidade do filme branco e do filme contendo maior concentração de nanopartículas (10%, m/m) foi avaliada em células Vero pelo ensaio MTT. As células foram cultivadas em placas de 24 cavidades e após 24 h pequenas peças dos filmes (cobrindo aproximadamente um décimo da monocamada celular, de acordo com as recomendações da ISO 10993-5 (2009)) foram colocadas na superfície das células e mantidas em estufa por 48 h. O filme branco e o filme contendo 10% de nanopartículas reduziram em 20% a viabilidade celular, indicando que não houve efeito citotóxico nas condições testadas e que a presença de nanopartículas no filme de quitosana não influenciou na toxicidade do material.

Na sequência dos estudos visando desenvolver uma formulação de uso tópico contendo as nanopartículas e como uma alternativa aos filmes nanocompósitos, hidrogéis termossensíveis foram desenvolvidos a partir da mistura de solução de quitosana com bicarbonato de sódio (LIU et al., 2011). Um estudo de formulação demonstrou que a combinação de uma solução de quitosana a 2% e 51% de bicarbonato de sódio (m/m), referente à massa de quitosana, formou um hidrogel termossensível transparente e homogêneo a 37°C. Foi observado que a faixa de variação de concentração de  $\text{NaHCO}_3$  adequada para gelificar é muito estreita, sendo que uma pequena alteração nesta quantidade pode resultar no aparecimento de precipitados brancos no gel (TANG et al., 2007). Em seguida, hidrogéis nanocompósitos contendo 1, 3, 5 e 10% (m/m) de nanopartículas foram preparados e suas propriedades físico-químicas foram comparadas. Devido à presença de nanopartículas na solução de quitosana, uma maior concentração de  $\text{NaHCO}_3$  foi necessária para promover a gelificação do hidrogel. A presença de nanopartículas pode ter gerado interações tanto com a solução de quitosana quanto com o bicarbonato de sódio devido sua carga negativa e consequentemente reduzido a eficiência de gelificação na mesma concentração de  $\text{NaHCO}_3$  utilizada para os hidrogéis brancos (PAUL; ROBESON, 2008).

Os nanocompósitos apresentaram uma redução da transparência em função do aumento da concentração de nanopartículas adicionadas. Resultados de TGA mostraram que o hidrogel branco apresentou maior estabilidade térmica comparada aos nanocompósitos. Dados do infravermelho confirmaram que a formação do hidrogel se dá por interações físicas pelo não surgimento de bandas adicionais, e as bandas apresentadas pelo hidrogel branco e nanocompósitos foram semelhantes às da quitosana em pó. Além disso, a presença das nanopartículas nos nanocompósitos foi confirmada pelo surgimento de uma banda em torno de  $1750\text{ cm}^{-1}$  que demonstrou maior intensidade com aumento da concentração das partículas.

Através das imagens por microscopia eletrônica de varredura pode-se observar que os hidrogéis são estruturas altamente porosas e esta porosidade parece ser favorecida pela concentração do  $\text{NaHCO}_3$  (ver figura 31 no capítulo 5, página 171). Os nanocompósitos apresentaram maior porosidade comparados ao hidrogel branco, possivelmente por conter maior concentração de bicarbonato. A presença das nanopartículas foi confirmada pelas imagens, que revelam uma distribuição relativamente uniforme das mesmas nas paredes dos poros.

Os ensaios reológicos para determinação das propriedades mecânicas dos hidrogéis foram realizados por aplicação de uma deformação oscilatória. Durante a determinação da região viscoelástica linear, foi identificada a tensão de escoamento (*yield stress*), ponto onde o módulo elástico diminui drasticamente indicando fluidez da amostra (DONG et al., 2013). Os resultados indicam que a tensão de escoamento é maior nos nanocompósitos comparado ao hidrogel branco, e que o maior valor foi do nanocompósito contendo 3% de nanopartículas. Isto significa que as concentrações de 5% e 10% de nanopartículas reduziram esse valor possivelmente pela presença de nanopartículas alterarem a mobilidade das cadeias da quitosana (HAMMING et al., 2009).

Continuando os estudos das características reológicas dos hidrogéis, uma varredura de frequência demonstrou que os valores de módulo elástico ( $G'$ ) foram maiores que o módulo viscoso ( $G''$ ) confirmando a presença de um material tipo gel. O módulo elástico dos nanocompósitos foi maior que o módulo do hidrogel branco, e o módulo do nanocompósito contendo 3% de nanopartículas foi o mais elevado. Dados na literatura sugerem que concentrações elevadas de nanopartículas presentes na estrutura do hidrogel, como nas formulações contendo 5% e 10%, podem reduzir sua elasticidade por gerar espaços

no entrecruzamento que ocorre durante a gelificação (NAIR et al., 2015).

Uma varredura de temperatura na faixa de 37 a 85°C demonstrou que todas as amostras apresentaram um comportamento tipo gel durante o experimento. Desta forma, pode-se concluir que os hidrogéis mantiveram sua estrutura estável mesmo na presença de temperaturas mais elevadas. Um ensaio de MTT foi utilizado para avaliar o possível efeito citotóxico do hidrogel branco e nanocompósito contendo 10% de nanopartículas na faixa de concentração de 50 a 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A viabilidade celular para o hidrogel branco e o hidrogel nanocompósito contendo 10% de NPs foi de 72% e 77%, respectivamente. Os resultados demonstraram que estes materiais não apresentaram citotoxicidade às células Vero, uma vez que a viabilidade celular foi superior a 70% em todas as concentrações testadas.

## REFERENCIAS

- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Porto Alegre: Artimed; 2005. p. 678.
- BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v. 61, p. 73–81, 2004.
- COSTA, G. M.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. **Natural product communications**, v. 6, n. 6, p. 913–20, 2011.
- DASH, S. et al. Review: Kinetic Modeling on Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.
- DONG, W. et al. Superior mechanical properties of double-network hydrogels reinforced by carbon nanotubes without organic modification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 22380–22394, 2013.
- HAMMING, L. M. et al. Effects of dispersion and interfacial modification on the macroscale properties of TiO<sub>2</sub> polymer-matrix nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 69, n. 11-12, p. 1880–1886, 2009.
- ISO 10993-5:2009 (E). Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. **International Organization for Standardization**, 2009.
- LIU, L. et al. Smart gelation of chitosan solution in the presence of NaHCO<sub>3</sub> for injectable drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n. 1-2, p. 6–15, 2011.

NAIR, M. B. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Composite hydrogel of chitosan – poly ( hydroxybutyrate- co -valerate ) with chondroitin sulfate nanoparticles for nucleus pulposus tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 84–92, 2015.

PAUL, D. R.; ROBESON, L. M. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. **Polymer**, v. 49, n. 15, p. 3187–3204, 2008.

PETRONILHO, F. et al. Hepatoprotective effects and HSV-1 activity of the hydroethanolic extract of *Cecropia glaziovii* (embauba-vermelha) against acyclovir-resistant strain. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 7, p. 911–918, 2012.

SILVA, I. T. et al. *In vitro* antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 143–148, 2010.

TANG, Y. F. et al. Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) blend hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 4, p. 491–499, 2007.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1421–1428, 2010.





**Conclusões gerais**

---



## CONCLUSÕES GERAIS

- ♣ A obtenção da fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos de *C. glaziovii* foi padronizada. O maior teor dos marcadores foi alcançado nas condições de partição do extrato bruto etanólico, preparado por turboextração, com *n*-butanol e em seguida o resíduo foi tratado com resina de troca iônica Amberlite® XAD-16. Na etapa subsequente a resina foi tratada com metanol, o resíduo resultante foi denominada de FEF-Cg utilizada neste estudo.
- ♣ O extrato bruto e o FEF-Cg apresentaram concentrações citotóxica (CC<sub>50</sub>) acima de 2 mg mL<sup>-1</sup> e a concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) foi de 48,41 ± 8,43 µg mL<sup>-1</sup> e 8,24 ± 0,89 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes valores corroboram com dados já publicados para esta espécie.
- ♣ A partir da fração padronizada, nanopartículas de PLGA foram desenvolvidas e caracterizadas. Um estudo de estabilidade das suspensões de nanopartículas em temperatura ambiente durante 60 dias demonstrou que a formulação preparada com monooleato de sorbitano na fase orgânica e poloxamer 188 na fase aquosa interna apresentou características de maior estabilidade nas condições testadas.
- ♣ Nanopartículas foram preparadas nas mesmas condições estabelecidas no estudo de estabilidade utilizando poloxamer 188, álcool polivinílico como tensoativos da fase aquosa externa e celulose nanocristalina para preparação de NPs por *Pickering emulsion*. O sobrenadante foi removido por centrifugação e as nanopartículas lavadas com água e em seguida liofilizadas. Estas NPs foram comparadas quanto às suas características físico-químicas, e foi observado que as NPs preparadas com poloxamer 188 apresentaram total formação das partículas, polidispersão unimodal e uma média de tamanho em torno de 276 nm. Além disso, estas NPs mostraram melhor estabilidade térmica nos resultados de TGA. Face aos resultados, as NPs preparadas com poloxamer 188, lavadas e liofilizadas foram selecionadas para dar prosseguimento ao estudo.
- ♣ A partir daí um estudo de liberação e de degradação do polímero avaliou que o mecanismo de liberação deste sistema foi por difusão a partir da matriz polimérica. Ainda, os estudos mostraram que ao final de 21 dias nas mesmas condições do estudo de liberação o polímero PLGA reduziu 51% da massa molar, colaborando com a liberação da FEF-Cg. Resultados do ensaio de redução do número de placas mostraram que as nanopartículas são um sistema de liberação controlada viável para inibir a replicação do vírus HSV-1.

- ♣ As nanopartículas foram incorporadas em matrizes de quitosana como filme e hidrogel termossensível. Estas formas farmacêuticas foram caracterizadas de acordo com suas características físico-químicas e apresentaram perfil promissor como alternativas de tratamento do herpes para as infecções manifestadas na região oral.

**Perspectivas**

---



## PERSPECTIVAS

As formulações propostas neste trabalho de doutorado foram desenvolvidas e caracterizadas com técnicas básicas e necessárias para um estudo inicial. Maiores informações devem ser averiguadas para dar continuidade ao estudo e viabilizar a aplicação destas formas farmacêuticas. Desta forma, tendo em vista os resultados apresentados, para a complementação do trabalho sugere-se:

- Avaliar as propriedades mecânicas dos filmes com adição de agentes plastificantes;
- Realizar ensaios de mucoadesão, permeação e liberação a partir da forma farmacêutica para os filmes e hidrogéis;
- Avaliar a estabilidade destas formas farmacêuticas;
- Determinar a dose terapêutica para atividade *in vivo*;
- Avaliar a atividade anti-herpética dos filmes e hidrogéis frente aos vírus do herpes em ensaios *in vivo*.





## **Apêndice**

---



## APÊNDICE A – Artigo publicado na revista *Pharmaceutical Development and Technology*.



Pharmaceutical Development and Technology

ISSN: 1083-7450 (Print) 1097-9867 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/iphd20>

### Development and effect of storage on the stability of Enriched Flavonoid Fraction of Cecropia glaziovii-loaded PLGA nanoparticles

Talitha Caldas dos Santos, Mariana Alves Battisti, Caroline Flach Ortmann, Flávio Henrique Reginatto, Cláudia Maria Oliveira Simões & Angela Machado de Campos

To cite this article: Talitha Caldas dos Santos, Mariana Alves Battisti, Caroline Flach Ortmann, Flávio Henrique Reginatto, Cláudia Maria Oliveira Simões & Angela Machado de Campos (2016): Development and effect of storage on the stability of Enriched Flavonoid Fraction of Cecropia glaziovii-loaded PLGA nanoparticles, *Pharmaceutical Development and Technology*, DOI: [10.1080/10837450.2016.1245742](https://doi.org/10.1080/10837450.2016.1245742)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10837450.2016.1245742>



Accepted author version posted online: 06 Oct 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



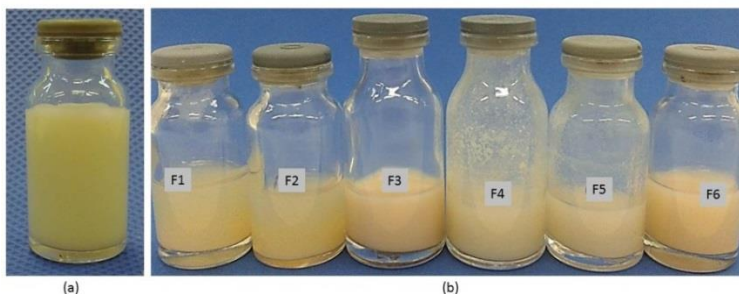
View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iphd20>

## APÊNDICE B – Informações suplementares do Capítulo 2 com fotos das formulações submetidas ao estudo de estabilidade em temperatura ambiente durante 60 dias.

Photographs of vials containing EFF-Cg-loaded nanoparticles immediately after preparation (Figure 1a) and after 60 days of storage at room temperature (Figure 1b). Initially, all formulations presented a milky appearance, and then changes in the color were observed. Formulations F1, F2, F4 and F5 showed loss of milky appearance while F3 and F6 had a color change to pinkish.

**Figure 1:** Images of nanoparticles after preparation (a) and 60 days after storage (b) at room temperature. Preparation conditions may be found in the section “Study of PLGA nanoparticles stability at room temperature”.



The Figure 2 shows the particle agglomerates (2 a) adhered to the vial walls from F4 and F5. Sedimentation phenomenon (2 b) was observed for all formulations during the stability study.

**Figure 2:** A visual analysis example of particle agglomerate (a) and sedimentation (b) for PLGA-based nanoparticles after 60 days of storage at room temperature.

