



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-IB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA

Luiza lanny de Lima

Desenvolvimento de uma nanoformulação autoemulsificante contendo o alcaloide epiisopiloturina para melhorar sua biodisponibilidade plasmática após administração via oral

Brasília – (DF)

2016

Luiza lanny de Lima

Desenvolvimento de uma nanoformulação autoemulsificante contendo o alcaloide episopiloturina para melhorar sua biodisponibilidade plasmática após administração via oral

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília (UnB), como requisito para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

**Brasília – (DF)
2016**

d de Lima, Luiza Ianny
Desenvolvimento de uma nanoformulação
autoemulsificante contendo o alcaloide
episopiloturina para melhorar sua
biodisponibilidade plasmática após administração via
oral / Luiza Ianny de Lima; orientador João Paulo
Figueiró Longo. -- Brasília, 2016.
61 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Nanociência e
Nanobiotecnologia) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. Nanotecnologia. 2. Sistema autoemulsificante.
3. Molécula Bioativa. I. Longo, João Paulo Figueiró ,
orient. II. Título.

Desenvolvimento de uma nanoformulação autoemulsificante contendo o alcaloide episopiloturina para melhorar sua biodisponibilidade plasmática após administração via oral.

Luiza lanny de Lima

Esta dissertação foi apresentada no dia 26 de fevereiro de 2016, ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em nanociência e Nanobiotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo
(Orientador)

Prof.^a Dra. Susana Suely Rodrigues Milhomem Paixão
(Membro externo)

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo
(Membro Interno)

Prof.^a Dra. Mônica Pereira Garcia
(Suplente)

“Uma mente aberta a uma nova
ideia, jamais voltará ao seu
tamanho original.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À Instituição Universidade de Brasília, pela oportunidade de realizar uma pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento ao Programa de Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia/nanotecnologia (INCT/Nanotecnologia), que deu todo apoio financeiro ao laboratório de nanotecnologia.

Aos professores do programa de PPG Nanociência e Nanobiotecnologia, pelos ensinamentos repassados e contribuição na minha superação profissional.

Ao professor Dr. João Paulo Longo, pela orientação, dedicação, confiança, amizade, exemplo profissional e contribuição científica ao longo da realização deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (Biotec), pelo envio das amostras para desenvolvimento desse projeto.

À técnica MSc. Karen Py-Daniel, pelo auxílio na metodologia analítica, pela grande experiência que adquiri durante desenvolvimento desta dissertação.

Aos profissionais e aos colegas do laboratório de Nanotecnologia, pela força, risadas, amizade, experiência e aprendizagem.

A Deus, nossa senhora de Fátima pela fé, saúde, força, inspiração e foco para correr atrás dos meus sonhos. Sou grata por tantas bênçãos e por ter sempre experiências maravilhosas em minha vida!

Aos meus pais, pelo apoio financeiro e pelo carinho incondicional. À Minha adorável mãe, pelo exemplo de vida, honestidade e por seus conselhos que sempre me ajudaram a ultrapassar os obstáculos que apareceram no meu caminho.

Agradeço à família Lima e Menezes, pelo apoio a cada etapa vivida durante o Mestrado.

Agradeço ao meu irmão Lemmon Lima e à minha cunhada Marinalva pelo apoio e carinho durante esta fase.

Agradeço aos meus “tios” de coração, Paulo e Consuelo, por acreditarem no meu sonho de realizar uma pós-graduação e pelo apoio na estadia em Brasília.

Em especial, ao meu amado amigo Eduardo Menezes, pelo apoio e carinho. Muito obrigada por cuidar de mim e por me ajudar a superar os obstáculos encontrados durante essa fase. Obrigada por estar presente nesta etapa de adaptação a uma realidade diferente. Com o seu apoio, tudo ficou mais fácil. Você é parte fundamental desta conquista!

RESUMO

LIMA, L. I. **Desenvolvimento de uma nanoformulação autoemulsificante contendo o alcaloide epiisopiloturina para melhorar sua biodisponibilidade plasmática após administração via oral.** Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Orientador: Prof. Dr. Joao Paulo Figueiró Longo. Brasília – DF: UnB, 2016.

Sistema autonanoemulsificante (do inglês, *Self-nanoemulsified drug delivery system* – *SNEDDS*) é um sistema nanotecnológico simples que possui aplicação para liberação e entrega de fármacos. Esse sistema utiliza via de administração oral para entrega de fármacos, tendo em sua composição uma fase lipídica que pode ser composta por óleos (vegetal e animal) e agentes emulsificantes. A formação de nanogotículas ocorre quando fase lipídica entra em contato com uma fase aquosa (exemplo fluidos gastrointestinais), formando dispersões lipídicas, que facilitam a absorção e o aumento da concentração do fármaco em níveis plasmáticos. O sistema autoemulsificante é foco da presente dissertação, sendo utilizado como carreador para a molécula epiisopiloturina (EPI), um alcaloide que tem característica hidrofóbica, extraída de uma planta nativa brasileira da espécie *Pilocarpus microphyllus*, esta molécula tem se destacado por ter efeito antiparasitário, demonstrado atividade biológica *in vitro* e *in vivo* contra o parasita *Schistosoma mansoni* causador da esquistossomose em humanos. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho consiste em incorporar o alcaloide EPI em uma formulação lipídica, sendo produzida pelo sistema autoemulsificante que promova o aumento da biodisponibilidade plasmática desta molécula. Como estratégia metodológica para produção da nanoformulação foi desenvolvida as seguintes etapas: a seleção dos componentes da fase oleosa da nanoformulação (óleo e agente emulsificante); produção das nanoformulações pelo sistema autoemulsificante; avaliação das características nanoscópicas da nanoformulação; incorporação de EPI na nanoformulação e o perfil de liberação *in vitro* de EPI associada na nanoformulação. A próxima etapa consiste na avaliação da biodisponibilidade de EPI em modelo experimental *in vivo*, usando camundongos Swiss. Como resultados, foi selecionado para fase lipídica óleo de copaíba como nanocarreador e o agente emulsificante o tensoativo cremophor EL. As melhores nanoformulações produzidas pelo sistema autoemulsificante foram as nanoformulação *SNEDDS* 1:1, 1:6 e 2.1 (razão óleo/surfactante), sendo estas de escolha para carrear a molécula EPI. No experimento de liberação de EPI *in vitro*, pelo método de dialise, foi demonstrado que o pH do meio dialisador interfere na liberação e que o pH ácido promove uma liberação mais rápida de EPI do nanocarreador. Além do mais, EPI incorporado em nanogotículas pequenas tem liberação mais rápida, comparando com nanoformulações de tamanho maiores. O teste de biodisponibilidade *in vivo* demonstrou que a molécula EPI carregada em lipídios promove uma maior concentração de EPI no plasma, comparado com a administração da molécula livre. As nanoformulações, contendo a epiisopiloturina, não demonstram toxicidade aos animais experimentais. Como conclusão, observou-se que a nanoformulação *SNEDDS* 2.1 contendo o alcaloide epiisopiloturina mostrou-se segura e eficaz para carrear e aumentar a disponibilidade plasmática do composto EPI pela via administração oral.

Palavras-chave: nanotecnologia, Jaborandi, *SNEDDS* e alcalóide imidazol.

ABSTRACT

LIMA, L.I. **Development of a self-emulsified nanoformulation containing epiisopiloturina alkaloid to improve its plasma bioavailability after oral administration.** Dissertation (Masters in Nanoscience and Nanotechnology) – Institute of Biology, University of Brasília. Advisor: Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo. Brasília – DF: UnB, 2016.

The emulsifying system also known as self-Nano emulsified drug delivery system-SNEDDS is a nanotechnology easy system to a application to deliver drugs. The system is administered orally is based on lipids (vegetable and animal oil) that are associated with an emulsifying agent. The formation of nano droplets occurs when the lipid phase is in contact with an aqueous phase (gastrointestinal fluid) forming lipid dispersions to facilitate the absorption and increasing the drug concentration in plasma levels. The emulsifying system it is the focus of this dissertation is used as a carrier the molecule epiisopiloturina (EPI) lipophilic compound, extracted from plant native to Brazil of plant species *Pilocarpus microphyllus*, highlights this is molecule antiparasitic effect biological activity *in vitro* and *in vivo* against the parasite *Schistosoma mansoni*, a causative agent of schistosomiasis in humans. Thus, the objective of this study is to incorporate alkaloid EPI produced the emulsifying system promotes increased plasma bioavailability of this molecule. To develop such a system three stages were followed; selection of the nanoformulation components (oil and surfactant); production of the nanoformulations; nanoformulation evaluation; incorporation of EPI in the nanoformulation and the *in vitro* release profile of EPI associated in the nanoformulation; after establishing the constituents elements of the nanoformulation an *in vivo* bioavailability test was conducted using Swiss mice. We found out that the optimum lipid phase for EPI was copaiba oil. The optimum surfactant for maintaining the emulsification was Cremophor EL. The most promising nanoformulations with EPI were SNEDDS 1:1 , 1:6 and 2.1 for the release of EPI through dialysis method. Furthermore, the pH of the solvent happened to interfere EPI release, where acidic pH favored a faster release of EPI. Moreover, the smaller droplets have quicker release in comparison to bigger droplets in the nanoformulations. The *in vivo* bioavailability test showed that the molecule EPI carried from lipids promotes greater concentration of EPI in plasma. The *in vivo* bioavailability test showed that the EPI molecule carried from lipid promotes a higher concentration of EPI in plasma compared to the administration of the free molecule. Nanoformulations EPI don't toxic to the experiment in animals. In conclusion, we showed that SNEDDS 2.1 containing the alkaloid epiisopiloturina proved to be safe and effective for carrying and increase the availability of the compound in the plasma through oral administration.

Keywords: nanotechnology, Jaborandi, SNEDDS and imidazole alkaloid.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura/Siglas	Significado
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DH	Diâmetro Hidrodinâmico
EHL	Equilíbrio hidrofílico lipofílico
EPI	Epiisopiloturina
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
INCT	Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia
IPD	Índice de polidispersão
MCTI	Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação
O/A	Formulação óleo/água
O:T	Razão óleo:tensoativo
PBS	Phosphate buffered saline
PZQ	Praziquantel
Seq	Solubilidade de equilíbrio
SNEDDS	Self-nanoemulsified drug delivery
TGI	Trato Gastrointestinal
UV	Ultravioleta

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. MOLÉCULAS BIOATIVAS	2
2.2. ALCALÓIDE	2
2.3. ALCALÓIDES DA ESPÉCIE <i>Pilocarpus microphyllus</i>	3
2.4. ESQUISTOSSOMOSE	4
2.5. NANOTECNOLOGIA	6
2.6. SISTEMA AUTOEMULSIONANTE PARA ENTREGA DE FÁRMACO	7
3. OBJETIVOS	9
3.1. Geral	9
3.2. Específicos	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	10
4.2. INSTRUMENTAÇÃO	12
4.2.1. Cromatógrafo	12
4.2.2. Analisador hematológico	12
4.2.3. Leitor Expectramax M2 – Molecular Davices	12
4.2.4. Zetasizer (NANO ZS, Malvern)	12
4.3. OBTENÇÃO DO ALCALÓIDE EPIISOPILOTURINA DO JABORANDI	13
4.4. COMPOSIÇÕES DAS NANOFORMULAÇÕES	13
4.4.1. Seleção da fase lipídica	13
4.4.2. Seleção da interface	14
4.4.3. Análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE	14
4.5. PRODUÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES USANDO SISTEMA AUTO-NANOEMULSIFICANTE	14
4.6. AVALIAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES	15
4.6.1. Diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanoformulações	15
4.6.2. Avaliação morfológica	16
4.7. INCORPORAÇÃO DA MOLÉCULA EPI NAS NANOFORMULAÇÕES PRODUZIDAS PELO SNEDDS	16
4.8. PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EPI INCORPORADA NAS NANOFORMULAÇÕES	16
4.9. EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VIVO</i>	17

4.9.1 Animais	17
4.9.2 Concentração plasmática de EPI após administração por via oral das nanoformulações	18
4.10 TESTE TOXICIDADE DA NANOFORMULAÇÃO	20
4.10.1 SINAIS CLÍNICOS	20
4.10.2 PATOLOGIA CLINICA.....	20
4.10.2.1 Hemograma	20
4.10.3 PESO CORPORAL	21
4.10.4 ALIMENTAÇÃO ANIMAL	21
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1 NANOFORMULAÇÕES	22
5.1.1 Seleção dos componentes da fase oleosa	22
5.2 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES	23
5.4 MORFOLOGIA DA NANOFORMULAÇÃO PELA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA	25
5.4 PERFIL DE LIBERAÇÃO DE EPI INCORPORADO NAS NANOFORMULAÇÕES	25
5.5 EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VIVO</i>	27
5.5.1 Concentração plasmática de EPI	27
5.6 TOXICIDADE <i>IN VIVO</i>	30
5.6.1 Características clínica do animal.....	30
5.6.2 Peso corporal.....	30
5.6.3 Alimentação	30
5.6.4 Análise de ensaios hematológicos	31
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	39
8. REFERÊNCIAS.....	40
9. ANEXO.....	49

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Pilocarpus microphyllus*, conhecida como Jaborandi, é uma planta medicinal que possui vários compostos químicos naturais, dos quais os alcaloides são majoritários nessa espécie. Esta classe de composto químico, desperta o interesse de indústrias farmacêuticas e farmoquímica, por se tratarem de fontes de princípios ativos. Em destaque na espécie *P. microphyllus*, os alcaloides pilocarpina (PILO) e epiisopiloturina (EPI) possuem ação biológica devido às suas propriedades físico-químicas. Estudos realizados com a molécula EPI, demonstrou atividade biológica no combate ao parasita causador da esquistossomose (Veras et al, 2012; Guimarães et al, 2015) em humanos, conferindo, também, seu efeito anti-inflamatório (SILVA et al, 2013). O grande desafio de trabalhar com a molécula EPI é sua insolubilidade em meio aquoso e a sua baixa absorção após a administração oral. Sendo que o presente trabalho focou-se em resolver essa questão da insolubilidade de EPI em sistemas biológicos.

A nanotecnologia apresenta ferramentas as quais podem ajudar a resolver essas questões farmacológicas. Atualmente, um sistema nanotecnológico que vem sendo utilizado para entrega de fármacos é o sistema autonanoemulsificante, termo oriundo do inglês *Self-nanoemulsified drug delivery systems (SNEDDS)*, sistema constituído por uma fase oleosa, que, por sua vez, é composto por uma mistura de óleo e surfactante, que, quando entra em contato com os fluídos aquosos do sistema gastrointestinal em movimento peristáltico, forma as dispersões lipídicas. Quando moléculas hidrofóbicas estão associadas a esses sistemas, esses compostos ficam dispersos nas nanogotículas oleosas formadas. A ideia é que essas nanogotículas dispersas facilitem a absorção gastrointestinal do conjunto, aumentando a biodisponibilidade plasmática dos compostos.

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma nanoformulação baseada na dispersão da molécula EPI em uma fase lipídica usando um sistema de autoemulsificação para aumentar a absorção da molécula pela via do trato gastrointestinal, melhorando sua biodisponibilidade plasmática. O desenvolvimento dessa plataforma de experimentação visa à aplicação futura das nanoformulações na otimização do tratamento da esquistossomose em modelos animais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. MOLÉCULAS BIOATIVAS

De modo geral o reino vegetal é responsável por uma grande parcela da variedade de substâncias químicas conhecida e registrada na literatura. A diversidade e a complexidade das micro e macromoléculas que constituem os metabólitos secundários de plantas são amplamente pesquisadas como fonte de molécula bioativa (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Moléculas bioativas são substâncias que têm ação farmacológica, são provenientes fontes naturais. O estudo fitoquímica dessas moléculas vem se desenvolvendo devido ao potencial farmacológico, representando, dessa maneira, uma alternativa as terapias convencionais (KANG et al., 2013).

Novos compostos farmacologicamente ativos provenientes de fontes naturais têm ajudado no desenvolvimento de novos medicamentos com finalidade para o tratamento clínico de diversas enfermidades (JUSTO et al., 2008). A indústria farmacêutica sempre atuou na prospecção de moléculas naturais com atividade farmacológica (AMBROZIN et al., 2006). Os produtos naturais podem ser vistos no mercado em forma de corantes, óleos essenciais, óleos comestíveis, moléculas isoladas (fármacos), extratos e entre outros.

O Brasil tem quase um terço da flora mundial, sendo pouco explorada acerca de novas moléculas com atividade farmacológica. Por isso, as indústrias e a comunidade científica possuem grande interesse em estudar e investigar novas moléculas providas de fontes naturais, com o intuito de descobrir novas potencialidades farmacológicas. O enorme número de compostos encontrados possibilita a triagem de novos fármacos com eficácia antibacteriana e antiparasitária, com base na diversidade molecular de algumas plantas e extratos (KAYSER, 2003).

2.2. ALCALÓIDE

A palavra alcalóide deriva do árabe *al-quali* (*álcali* = básico, com sufixo *-oide* = semelhante a), tem o caráter básico (LIMA, 2008), sendo encontrada principalmente em plantas. Esta classe de composto é amplamente utilizado na

indústria farmacêutica, por se tratar de uma fonte de princípio ativo, sendo considerado um dos grupos químicos de ocorrência vegetal mais importante do ponto de vista, farmacêutico, econômico e social (HENRIQUES *et al.*, 2000).

Nos últimos 150 anos, milhares de alcalóides imidazólico foram isolados (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006) e, por meio de técnicas analíticas, é possível avaliar possíveis atividades farmacológicas e toxicológicas dessas substâncias. Essa classe de compostos também corresponde aos principais agentes terapêuticos naturais com ação anestésica, neurodepressora, analgésica, psicoestimulante, entre outras atividades farmacológicas (HENRIQUES *et al.*, 2000; JUDD *et al.*, 2009). O principal mecanismo de ação da classe de alcalóides imidazólico é a inibição da síntese do ergosterol, que está relacionado com a integridade e a manutenção da função da membrana celular dos microrganismos (MIURA, 2009).

2.3. ALCALÓIDES DA ESPÉCIE *Pilocarpus microphyllus*

A espécie *P. microphyllus* (jaborandi) possui vários alcalóides, tais como: dictamina, epiisopilosina, epiisopiloturina, isopilocarpina, isopilocarpidina, isopilosina, pilocarpina, pilocarpidina, pilosina, plastidesmina, 13-nor-7(11)-dehidro-pilocarpina, N,N-dimetil-5-metoxi-triptamina, N,N-dimetiltriptamina, (1H)-4-metoxi-2-quinolona (SANTOS & MORENO, 2004).

Voightlander *et al.* (1978) foram os primeiros a descrever a existência do alcalóide imidazólico EPI, esse composto é hidrofóbico, possui peso molecular 286,33 g/mol, na sua estrutura química (Figura 1), contém um anel imidazólico ligado a um ciclopentano heterocíclico por meio de uma ligação C-C e um grupo hidrobenzílico (VERAS *et al.*, 2013).

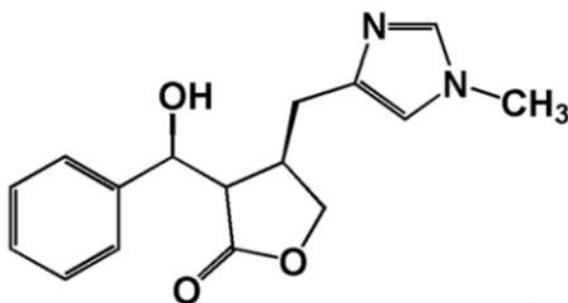


Figura 1. Estrutura química planar do alcalóide epiisopiloturina (VERAS *et al.*, 2012)

A atividade biológica *in vitro* da EPI foi descrita por Miura (2009), demonstrando efeito contra cepas de *Leishmania amazonenses*, na forma de amastigotas. Porém, outros estudos utilizando essa molécula contra outro tipo de parasita chamaram atenção, pesquisadores conseguiram avaliar, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, a ação dessa molécula contra o parasita causador da doença esquistossomose, o parasita *Schistosoma mansoni* (VERAS et al, 2013; GUIMARÃES et al 2015).

No experimento *in vitro* realizado por Veras et al., (2013), a atividade esquistossomicida foi confirmada para as concentrações de 150 e 200 µg/mL de EPI após 120 e 72 horas, respectivamente, causando redução da atividade motora e desintegração da membrana tegumentar (tubérculos), levando à morte do parasita. Além disso, as concentrações de EPI trabalhadas pelos referidos autores não apresentaram toxicidade para células de macrófagos peritoneais. Um outro teste *in vitro* usando a EPI carregada em estrutura de lipossomas foi realizado pelos pesquisadores Guimarães et al. (2014), o estudo revela que esse sistema nanotecnológico (EPI carregada em estrutura de lipossomas) ajudou na inibição do parasita *S. mansoni*.

Em um estudo mais recente, os mesmos pesquisadores realizaram testes *in vivo* para avaliação da ação da EPI e verificaram que a EPI livre apresentou efeito antiesquistossoma em modelo animal. Na dose 40 mg/kg, apresentou efeito para vermes jovens e adultos de *S. mansoni* quando administrados EPI na forma oral. A inibição do parasita foi de 50% e 70%, fase jovem e adulta, respectivamente (Guimarães et al., 2015). Nesse caso, acredita-se que uma parcela significativa da EPI não é corretamente absorvida pela via oral, reduzindo, portanto, o seu efeito terapêutico. Todos os testes realizados com epiisopiloturina (EPI) e verificação da atividade esquistossomicida foram reportados pela primeira vez.

2.4 ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose ou esquistossomíase é uma patologia que está na lista mundial de doenças negligenciadas, são todas aquelas patologias endêmicas que ocorrem em maior frequência em populações pobres. O parasita *Schistosoma mansoni* causador da infecção em humanos, também denominada de

esquistossomíase mansônica, é um dos principais problemas de saúde pública em mais de 70 países tropicais e subtropicais, especialmente na África, Ásia e América Latina (AMARAL et al, 2006).

No Brasil a esquistossomose está presente em 19 Unidades Federativas numa faixa que estende do Maranhão à Minas Gerais e, na Bahia e Minas Gerais, são os estados em que a ocorrência da doença é mais endêmica com distribuição de casos em quase todo território, porém focos isolados também já foram detectados nos estados do Pará, Goiás e na região Sul do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; AMARAL et al., 2006; KATZ E PEIXOTO, 2000).

A fase inicial dessa patologia pode ser assintomática, causando dermatite cercariana, a fase crônica inicia-se a partir dos seis meses após a infecção. A principal característica dessa enfermidade é a presença do ovo do parasita no fígado e na submucosa na luz intestinal, causando reação inflamatória e levando à formação de granulomas ao redor dos ovos do parasita (GRYSEELS et al., 2006; WYN et al., 2004; WILSON et al., 2007).

A transmissão dessa enfermidade ocorre por meio de caramujos do gênero *Biomphalaria*. No Brasil, a espécie *B. glabrata* é o principal vetor da doença (PARAENSE, 2001; MORGAN et al., 2001). O ciclo de vida do *S. mansoni* envolve uma fase de reprodução sexuada no hospedeiro definitivo, o homem e uma fase assexuada no hospedeiro intermediário, o caramujo. As cercarias penetram na pele humana intacta e transformam-se em esquistossômulos (formas jovens), que residem na pele por até 72 horas antes de entrarem em um vaso sanguíneo. Dentro do sistema vascular, migram para o seu sítio de maturação final o sistema porta hepático, em que amadurecem transformando-se em parasitas adultos (masculino e feminino). Os vermes adultos acasalam e migram para o território da veia mesentérica inferior, depositando seus ovos na parede intestinal e expelindo-os nas fezes (CAFFREY et al., 2007; GRYSEELS et al., 2006; MORAES, 2011; REY, 2010).

Para combater essa infecção parasitária, atualmente é utilizado o fármaco praziquantel (PZQ). Esse anti-helmíntico atua na inibição da bomba Na^+/K^+ dos esquistossomos, aumentando a permeabilidade da membrana do parasita (GREENBERG, 2005). O fármaco PZQ é administrado em dose única por via oral 40 mg/kg (dose em função do peso do paciente). Esse fármaco tem efeito, apenas, na forma adulta do *S. mansoni*. Esse tratamento apresenta falhas devido à baixa

ineficácia no estágio jovem do parasita e inibição dos ovos, como também baixa absorção do fármaco em meio aquoso. Além disso, há dados que comprovam a resistência do parasita a esse medicamento (ALONSO et al., 2006).

Com base nesses dados, são necessárias as investigações de novos fármacos ou formas de tratamento alternativas que sejam eficazes para o tratamento dessa doença parasitária. Uma dessas alternativas pode ser a utilização da *Pilocarpus microphyllus*, uma vez que já são descritos na literatura trabalhos utilizando princípios ativos oriundos dessa espécie com ação para esta doença.

2.5. NANOTECNOLOGIA

O marco inicial da nanotecnologia está relacionado com o pesquisador Richard Feynman, que ganhou o prêmio Nobel de física em 1975, ele explorou pesquisas voltadas à escala molecular, atômica e subatômica e sugeriu que um dia seria possível manipular a matéria átomo por átomo na escala nanométrica (AMORIM, 2007).

A nanotecnologia é um conjunto de técnicas usadas na manipulação da matéria na escala nanométrica. Atualmente, a nanotecnologia tornou-se um dos mais promissores campos da pesquisa por não possuir uma tecnologia específica e sim interdisciplinar. A nanotecnologia tem grande aplicação na medicina, nos campos de diagnóstico, terapêutico e entrega de drogas em órgãos específicos (FIGUEIREDO, 2011).

Em países industrializados, a área nanotecnológica é um dos principais focos das atividades de pesquisa, desenvolvimento e a inovação (ZANETTI-RAMOS & CRECZYNSKI-PASA, 2008). Entre esses países, destacam-se; Europa, EUA (Estados Unidos da América) e Japão. Esses países são os que mais investem no setor nanotecnológico. No Brasil foi criado Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em especial os INCT's na área de Nanotecnologia. Além disso, desde 2000 o Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) considera a nanotecnologia como uma área prioritária de desenvolvimento (SILVA et al., 2003).

Com o avanço da nanotecnologia nas áreas biomédicas, é possível realizar pesquisas na área terapêutica, diminuição de toxicidade de fármacos, aumento na concentração plasmática de moléculas de interesse, liberação controlada e/ou

direcionada em sistemas biológicos e direcionamento a alvos específicos. A partir da nanotecnologia, as indústrias farmacêuticas podem aprimorar formas farmacêuticas e com isso gerar novos produtos (CARLUCCI & BREGNI, 2009; PIMENTEL, et al, 2007).

Os sistemas de carreamento de fármacos são todos os sistemas responsáveis por contornar as características físico-químicas limitantes dos fármacos, melhorando dessa forma a farmacocinética destes em diferentes níveis, desde a absorção, biodisponibilidade plasmática e direcionamento destes à tecidos específicos, (ALLEN JR.; POPOVICH; ANSEL, 2007). Recentemente, tem sido dada atenção aos tipos de nanocarreadores para encapsulação de ativos, como exemplo, as formulações à base de lipídios, nanocápsulas, nano e microemulsões, lipossomas, dentrímeros e formulações usando sistema autoemulsificação (GURSOY & BENITA, 2004).

2.6. SISTEMA AUTOEMULSIONANTE PARA ENTREGA DE FÁRMACO

O *Self nanoemulsifying drug delivery systems* – *SNEDDS* é um sistema composto por lipídeos, tensoativos ou, ainda, pela presença de cotensoativo e o fármaco de interesse. Esse sistema é formado por uma fase lipídica (óleo e agente emulsificante) que em ambientes aquosos (como trato gastrointestinal) emulsificar formando nanogotículas (MICHAELSEN et al, 2016). O *SNEDDS* é, frequentemente, utilizado para administrar moléculas lipofílicas por via oral, com o intuito de aumentar a biodisponibilidade do composto no plasma, a biodistribuição e proteção do fármaco contra degradação ao entrarem em contato com sistemas biológicos (HUMBERSTONE & CHARMAN, 1997).

A biodisponibilidade de uma substância está relacionada com a percentagem da molécula livre disponível no plasma. Segundo Levy (1963), a biodisponibilidade é a razão entre a quantidade de droga administrada e a concentração disponível no sangue, utilizando uma dosagem conhecida. Após administração de um fármaco por via oral sua absorção pode ser de várias formas, transporte passivo, vesicular, e mediado por carreadores (GRASSI et al, 2006).

Pensando em desempenhar um papel importante para absorção do fármaco, a *SNEDDS* está relacionada com a solubilização do fármaco nas estruturas coloidais

e formação de dispersões lipídicas que ajudam na absorção da molécula (MICHAELSEN et al, 2016). A digestão desse conteúdo lipídico é um processo dinâmico e os estudos demonstraram que várias fases coloidais são formadas durante a digestão, dependendo da natureza molecular dos componentes da fase oleosa (MICHAELSEN et al., 2016).

O sistema autoemulsificante, empregado no presente trabalho, é um sistema que foi planejado para melhorar a biodisponibilidade do EPI após administração via oral, bem como para proteger o composto EPI contra degradação no sistema gastrointestinal (AUNGST, 1993). As nanoformulações *SNEDDS* que foram produzidas neste trabalho são de fácil preparo e são, também, facilmente dispersas no trato gastrointestinal (TGI). A formação do *SNEDDS* dentro do sistema gastrointestinal está relacionada com a atividade motora gástrica. A atividade motora gástrica ocorre pelo funcionamento coordenado de dois compartimentos fisiológicos distintos: proximal e distal. O movimento peristáltico desses dois compartimentos ajuda na digestão alimentar (acomodação, trituração, mistura e absorção) (AMÉRICO et al, 2010). Além disso, a motilidade digestiva do estômago fornece energia necessária para auxiliar no processo de emulsificação da fase lipídica do sistema.

A inovação principal deste trabalho consiste em melhorar a biodisponibilidade plasmática (aumentar níveis plasmáticos), bem como a atividade farmacológica por via administração oral da epiisopiloturina (alcaloide imidazólico), isolado da planta jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), por meio do desenvolvimento de uma nanoformulação *SNEDDS* com vista para aplicação contra o parasita da espécie *S. mansoni*.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo principal é desenvolver uma nanoformulação autoemulsificante contendo o alcalóide epiisopiloturina para melhorar a sua biodisponibilidade plasmática após administração via oral da nanoformulação.

3.2 Específicos

- desenvolver os parâmetros e componentes da nanoformulação lipídica autoemulsificante associada ao alcalóide epiisopiloturina;
- caracterizar os aspectos nanoscópicos das nanoformulações contendo EPI;
- caracterizar os aspectos de liberação *in vitro* de EPI incorporado nas nanoformulações desenvolvidas;
- determinar a concentração plasmática de EPI após a administração oral das diferentes nanoformulações desenvolvidas em camundongos Swiss;
- avaliar a toxicidade *in vivo* das nanoformulações desenvolvidas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Esta dissertação apresenta as etapas metodológicas ilustradas no delineamento experimental (Figura 2). Em resumo foram desenvolvidas cinco etapas: **i)** seleção da fase lipídica e da interface; **ii)** desenvolvimento e caracterização da nanoformulação; **iii)** perfil de liberação de epiisopiloturina pelo método de diálise; **iv)** concentração plasmática da EPI e **v)** teste de toxicidade da nanoformulação.

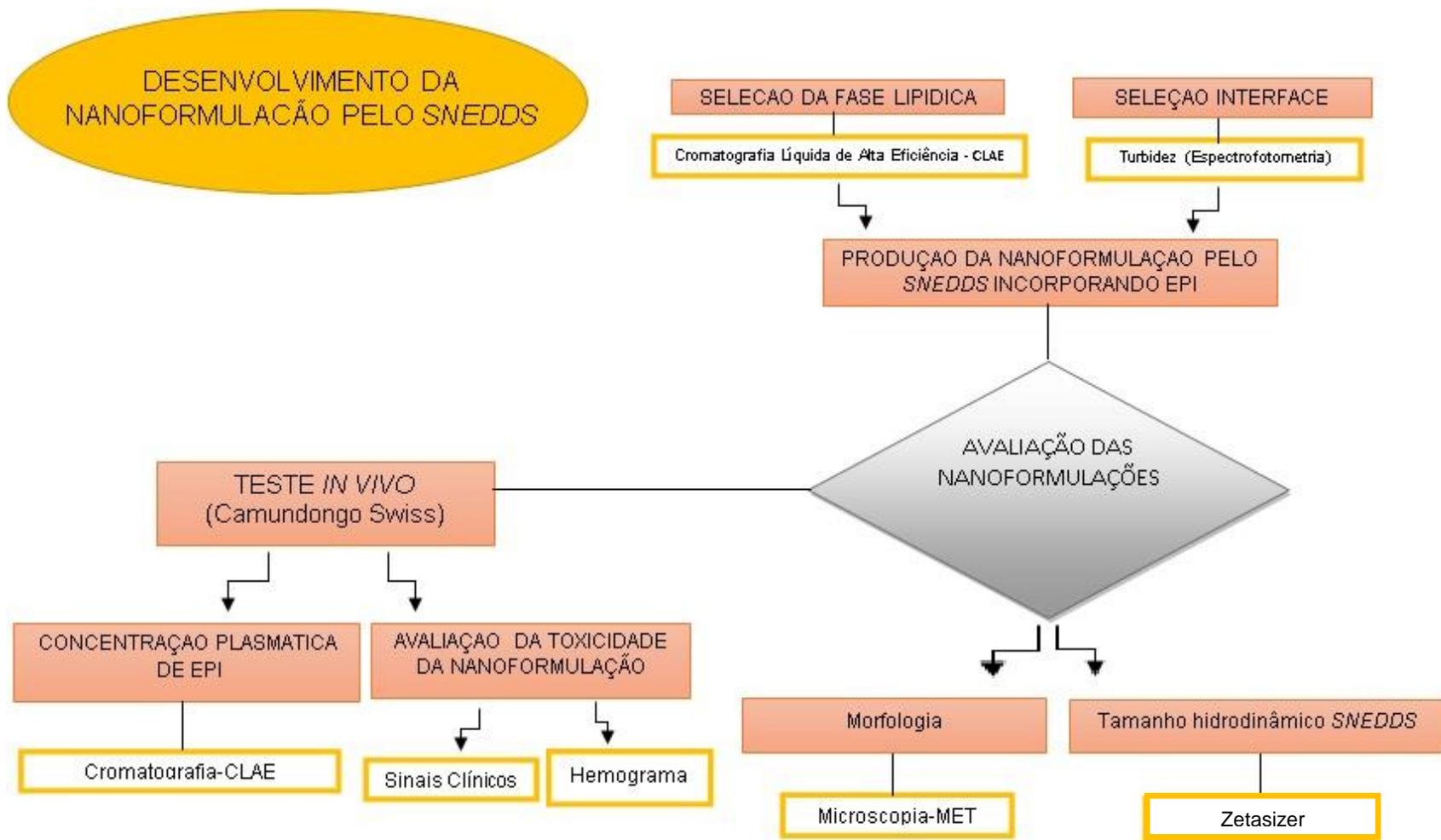


Figura 2. Fluxograma do delineamento experimental do projeto

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

4.2.1 Cromatógrafo

Foi utilizado o equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE, cromatográfico UFLC proeminência, marca shimadzu-Prominence, composto por um degaseificador linha (Modelo DGU 20A5) consistido de uma bomba (Modelo LC-20AT) com amostrador automático (SÉRIES SIL-20AHT), que comporta 105 amostras. O detector usado foi um UV-vis (SPD-A Proeminence), o comprimento de onda foi fixado em 216 nm e sistema controlador CBM-20A. A coluna utilizada foi de fase reversa C-18 (250 x 4,6 mm, 5 um) Vydac, acoplada a um forno com a temperatura de 30°C. O software utilizado foi LCsolution.

4.2.2 Analisador hematológico

Utilizou-se o equipamento hematológico veterinário Sysmex pochH-100iV™ para uma análise precisa de eritrócitos, plaquetas, leucócitos totais e diferencial leucocitária de 3 partes. Esse equipamento avalia, também, sangue de quatro espécies de animais — cão, gato, equino e bovino e possibilita, também, a configuração de outras 13 espécies.

4.2.3 Leitor Expectramax M2 – Molecular Davices

Esse equipamento foi utilizado para a leitura das massas moleculares, o qual apresenta como princípio de funcionamento a absorção de luz e densidade óptica (UV-Vis), isso permite, ainda, avaliações e medições de intensidade de fluorescência.

4.2.4 Zetasizer (NANO ZS, Malvern)

Esse equipamento foi utilizado para medir o diâmetro hidrodinâmico das partículas. O princípio de funcionamento do Zetasizer consiste no espalhamento dinâmico luz sobre a amostra, com isso é calcular o diâmetro e/ou raio hidrodinâmico

na faixa de nanômetro até 1 micro. O equipamento permite, ainda, o cálculo do Potencial Zeta por meio da mobilidade eletroforética das partículas, espalhamento de luz eletroforética e a massa molecular por espalhamento de luz estática.

4.3 OBTENÇÃO DO ALCALÓIDE EPIISOPILOTURINA DO JABORANDI

O alcalóide de interesse da pesquisa, epiisopiloturina (EPI) é um subproduto gerado a partir da extração da pilocarpina. A pilocarpina primeiramente foi extraída das folhas do jaborandi da espécie *Pilocarpus microphyllus* de origem nativa e cultivadas pela empresa farmoquímica Anidro do Brasil Extrações S.A., que dispõe de toda infraestrutura para produção da pilocarpina isolada. A partir da biomassa residual da extração da pilocarpina, os subprodutos gerados foram levados e purificados pelo Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia-Biotec da Universidade Federal do Piauí (UFPI), *Campus* Parnaíba, para obtenção da epiisopiloturina (EPI), a qual foi cedida para a pesquisa.

A EPI foi extraída por meio de um processo químico baseado na acidificação e filtração, seguido de alcalinização. O processo de extração, purificação e isolamento do alcalóide epiisopiloturina originou numa patente que foi depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI com o número de registro (PI0904110-9 A2).

4.4 COMPOSIÇÕES DAS NANOFORMULAÇÕES

4.4.1 Seleção da fase lipídica

A escolha do óleo foi realizada com base na capacidade do lipídio em solubilizar maior quantidade de EPI. Para tal, foram selecionados os óleos (açai, andiroba, amêndoa, canola, oliva, girassol, mineral, copaíba, pequi, mamona, triacilglicerol cáprico/caprílico (TCC) e babaçu). A concentração da molécula EPI foi de 10 mg/mL, foram adicionados 1g de óleo em um tubo de eppendorf e submetidos sob agitação em um agitador de tubos (shaker) velocidade de 2,0124 g, por 72 h, a 25 °C. Após agitação, a mistura foi centrifugada (Hettich- Mikro 220R) sob temperatura ambiente

a 8944 g e coletados 150 µL do sobrenadante, os quais foram armazenados em eppendorf para quantificação de EPI pelo método de cromatografia líquida (CLAE).

4.4.2 Seleção da interface

O teste baseia-se na capacidade de um agente tensoativo em reduzir a tensão superficial e/ou aumento da repulsão entre as gotículas de óleo. Foram selecionados diferentes agentes tensoativos (Tween 20, cremophor EL, Span 80 e Tween 80). Em um béquer, foi solubilizada a amostra EPI numa solução contendo individualmente cada tensoativo, conforme descritos acima, na concentração de 150 mg/mL e mantidas sob agitação constante. Em seguida, quantidades crescentes do óleo-de-copaíba foram adicionadas a solução para a verificação dispersão do óleo na solução.

Para a avaliação da capacidade emulsificante, retiraram-se 300 µL (3 x 100 µL) para a avaliação da turbidez da solução. Para tal, foi empregada a técnica de espectrofotometria em placa de poliestireno transparente de 96 poços (triplicata).

4.4.3 Análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

Para a análise via CLAE, foi utilizada a fase móvel tampão de fosfato de potássio 367,59 mM (KH₂PO₄), ajustada para pH 2,5. A análise foi feita com o fluxo de 1 mL/min, método isocrático e tempo de corrida 25 min. A detecção UV foi ajustada no comprimento de onda 216 nm e forno 50°C. As amostras foram diluídas com 1,5 mL da fase móvel fosfato de potássio 5%, em seguida filtradas em um filtro 22 µm (millipore-Millex) e colocado em vials para análise, conforme método analítico para quantificação EPI, disponível por em Miura, (2009) com adaptações.

4.5 PRODUÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES USANDO SISTEMA AUTONANOEMULSIFICANTE

Após o estabelecimento e seleção da fase oleosa e interface, foi realizada a produção das nanoformulações, conforme método disponível em GUPTA et al em 2014, com modificações. Foram utilizadas diferentes proporções dos componentes

da mistura, razão óleo e tensoativo (O:T) para um volume final de 1g. Foram pesadas em um bécker o óleo e o tensoativo, conforme proporções disponíveis na Tabela 1 sob agitação branda (0,3507 G). Para a formação da nanoformulação, a própria energia de agitação da água é capaz para de emulsificar a mistura. Esse conjunto foi mantido sob agitação por cinco minutos.

As proporções e razões (O:T) podem ser conferidas na Tabela 1. A avaliação da formação das nanoformulações ocorreu por meio do método nanoscópico (tamanho hidrodinâmico e índice de polidispersão).

Tabela 1. Proporções das nanoformulações. Razão entre massa (mg) de óleo copaíba e cremophor EL

NANOFORMULAÇÃO (copaíba: cremophor EL)	COPAÍBA (mg)	CREMOPHOR EL (mg)	O:T
<i>SNEDDS</i> 1:6	142,8	857,1	0,17
<i>SNEDDS</i> 1:4	200	800	0,25
<i>SNEDDS</i> 1:2	333,3	666,7	0,5
<i>SNEDDS</i> 1:1,5	400	600	0,67
<i>SNEDDS</i> 1:1	500	500	1
<i>SNEDDS</i> 1,5:1	600	400	1,5
<i>SNEDDS</i> 2:1	666,7	333,3	2
<i>SNEDDS</i> 4:1	800	200	4
<i>SNEDDS</i> 6:1	857,1	142,8	6

Razão O:T: proporção de óleo /tensoativo

4.6 AVALIAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES

4.6.1 Diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanoformulações

O teste foi realizado para avaliar e para verificar a homogeneidade das nanoformulações. As nanoformulações produzidas pelo sistema *SNEDDS* não contêm fase aquosa, por isso as nanoformulações foram dispersas em meio aquosa para serem analisadas pelo método espalhamento dinâmico da luz – EDL, utilizando equipamento Zetasizer com ângulo de 90 graus em cubetas de poliestireno.

Foram diluídas as nanoformulações em 20 vezes de modo a obter a concentração das nanoformulações de 0,5 mg/mL. Os dados obtidos representam a

média de três leituras de cada amostra, frequência da dispersão por intensidade de luz espalhada.

4.6.2 Avaliação morfológica

A análise morfológica das gotículas da nanoformulação foi por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET. A amostra para o MET foi preparada na concentração de 0,5 mg/mL em água. A amostra foi colocada em tela de cobre de 300 mesh, fixada e contrastada com vapor de ósmio. Após 24 horas de secagem da amostra, o material foi analisado em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Jeol® 1011C Japão).

4.7 INCORPORAÇÃO DA MOLÉCULA EPI NAS NANOFORMULAÇÕES PRODUZIDAS PELO *SNEDDS*

Para incorporação de EPI no *SNEDDS*, foi utilizado a metodologia descrita por Gupta et al. (2014), com adaptações feitas no laboratório. O experimento foi dividido nas seguintes etapas:

- etapa 1: Foram pesados 1g das diferentes nanoformulações contendo óleo de copaíba e tensoativo cremophor EL em um béquer;
- etapa 2: Foi acrescentado 10 mg de EPI em cada formulação;
- etapa 3: A formulação foi colocada sob agitação branda por 10 minutos.

Para verificar a melhor incorporação de EPI nas nanoformulações, foi realizado o teste do perfil de liberação de EPI livre pelo método de diálise.

4.8 PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE EPI INCORPORADA NAS NANOFORMULAÇÕES

Para entender o processo de liberação do fármaco incorporado ao nanocarreador, experimentos *in vitro* de liberação da molécula EPI foi conduzido após a otimização do método de preparo das nanoformulações. O esquema do sistema pode ser visto na Figura 3, em que foram utilizados membrana CE 50 K Dalton (polímero celulose regenerativa), sobe constante agitação da solução dialisador (solução tampão PBS em diferentes pHs).

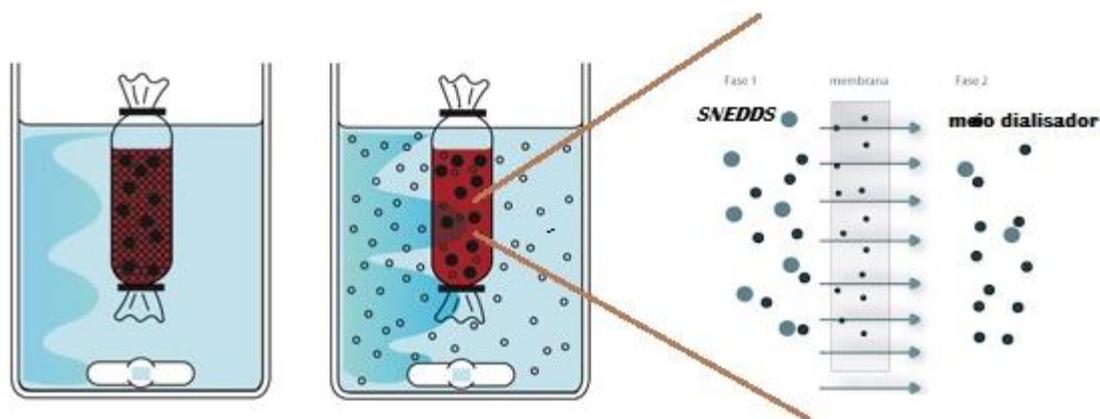


Figura 3. Sistema de liberação *in vitro* empregado para verificar o perfil de epiisopiloturina em nanoformulações

As amostras individuais foram inseridas no saco de diálise, vedadas e transferidas para recipiente de vidro (béquer de 300 mL) com meio dialisador contendo 250 mL de solução tampão fosfato em meio ácido (pH 3,5) e meio neutro (pH 7,5), a uma velocidade de agitação de 0,2436 G e temperatura ambiente (25°C).

As amostras foram coletadas 1 mL nos intervalos de tempo (5,10,15, 30, 60, 120, 180, 360, 720 e 1440 minutos). Para cada volume retirado, foi repostado com mesmo meio dialisador e a evaporação foi controlada antes de cada coleta, corrigindo-se o volume evaporado com mesma solução dialisador. Após esse período coleta, as amostras foram armazenadas no freezer -80°C para futura análise por cromatografia.

4.9 EXPERIMENTAÇÃO *IN VIVO*

4.9.1 Animais

O protocolo de experimentação animal foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) UnBDOC 143288/2015 (Anexo 1). O modelo animal trabalhado foi camundongos SWISS fêmeas, 21 animais, dos quais nove (9) foram para quantificação plasmática, (3) para validação do método analítico por CLAE e nove (9) para teste de toxicidade das nanoformulações. No experimento inicial, os animais apresentaram peso médio 35-45 gramas e idades entre 4-6 semanas.

Animais foram comprados pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), mantidos em quarentena no biotério do departamento de Genética e Morfologia (Instituto de Ciências Biológicas) da UnB. Foram alojados em gaiolas colocadas em prateleiras ventiladas diretamente com sistema de filtração de ar individual. Os camundongos foram mantidos à temperatura controlada (23 °C) com ciclo circadiano automatizado e com fornecimento de água filtrada e ração comercial à vontade.

4.9.2 Concentração plasmática de EPI após administração por via oral das nanoformulações

O protocolo experimental consiste em manter os animais em jejum por 3 horas antes do experimento. O método de escolha para administração oral ocorreu por meio de gavagem, usando cânula de ferro (Figura 4). Foram avaliados os seguintes grupos experimentais:

- grupo A (EPI livre): Solução de EPI (tampão fosfato (PBS) e 10% tensoativo Tween 80), formulação descrita por Guimarães et al, 2015;
- grupo B (SNEDDS 1:6): nanoformulação (copaíba 42,8 mg: cremophor EL 857,1 mg);
- grupo C (SNEDDS 2:1): nanoformulação (copaíba 666,7 mg: cremophor 333,3 mg).



Figura 4. Método de gavagem em camundongos. Cânula de ferro acoplada em seringa. (<https://www.famema.br/ensino/pos-lato>)

Todos os grupos experimentais obtiveram concentração da molécula EPI 40 mg/kg. Após 3 horas da administração, os camundongos foram eutanasiados mediante overdose de anestésicos, via intraperitoneal 200 μ L (ketamina e Xilazina), após óbito dos animais, o sangue foi coletado (por pulsão cardíaca), aproximadamente \sim 400 μ L e transferido para tubo minicollect® CE, sem anticoagulante.

As amostras de sangue dos animais foram processadas para extração do analito EPI, adicionando-se 900 μ L da solução extratora fosfato de potássio pH 2,5 (KH_2PO_4), em seguida foi agitado por 2 minutos no mine-vortex e centrifugadas por 2436 g durante 5 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo e realizado uma segunda extração. Após as duas extrações, as amostras foram filtradas (0,22 μ M) e quantificadas pelo método de cromatografia-CLAE.

Para especificidade e seletividade do método analítico para detecção de EPI no sangue, acrescentaram-se 20 μ L padrão EPI (10 μ g/mL) nas amostras de sangue e logo em seguida agitou-se por 2 minutos (vortex), empregando o mesmo procedimento de extração descrito acima. Foi utilizado o método analítico descrito por CLAE previamente referido por Miura, (2009), com adaptações.

4.10 TESTE TOXICIDADE DA NANOFORMULAÇÃO

Os parâmetros a serem avaliados quanto ao teste de toxicidade foram: sinais clínicos (comportamentais), patologia clínica (hematologia), variações no peso corporal e no consumo de ração. O modelo experimental do teste de toxicidade pode ser visto na Figura 5, todos os animais receberam administração por via oral e foram observados diariamente no período de 07 dias. A concentração da molécula EPI foi de 40 mg/kg.

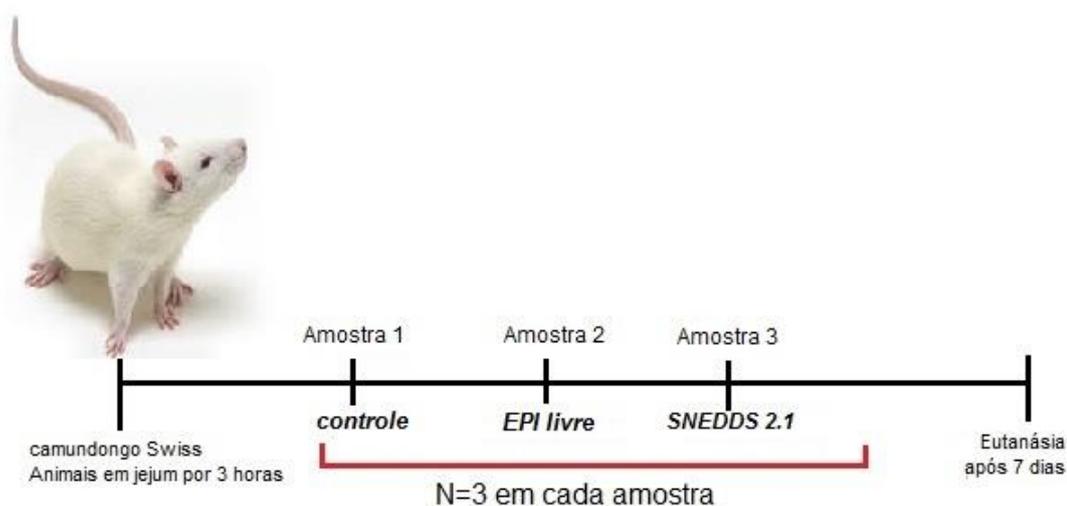


Figura 5. Modelo experimental do teste toxicidade *in vivo*. Administração por via oral. Legenda: Amostra 1: animais sem administração; Amostra 2: EPI livre e Amostra 3: SNEDDS 2.1 (copaíba e cremophor EL). Todos os grupos experimentais tiveram concentração de EPI 1mg/mL

4.10.1 SINAIS CLÍNICOS

Os animais foram avaliados diariamente durante 07 dias, observando o aspecto dos pelos, presença de reflexos e movimentação.

4.10.2 PATOLOGIA CLINICA

4.10.2.1 Hemograma

A análise sanguínea dos animais foi realizada no hematímetro (Sysmex) e a coleta da amostra sanguínea por pulsão cardíaca. Para o procedimento de coleta de sangue, os animais foram mantidos sob anestesia profunda após a administração intraperitoneal 200 µL (70% Ketamina e 30% Xylazina). Aproximadamente, 400 µL de sangue total foram transferidos para um tubo com anticoagulante EDTA (Minicollect®), para análise.

Todos os tubos foram colocados em uma caixa de isopor contendo gelo e levados para análise no hematímetro. Foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem de células brancas, contagem de células vermelhas, hemoglobina (proteína) e hematócrito (porcentagem de células vermelhas no sangue) e plaquetas. Os resultados foram expressos em média aritmética \pm erro padrão.

4.10.3 PESO CORPORAL

Dentre os dados obtidos para avaliar o estado de saúde geral dos animais, o peso destes foram monitorados e registrados antes e após administração via oral. O tempo experimental teve duração 07 dias. A medição foi realizada em balança semianalítica e o peso foi comparado entre os grupos experimentais.

4.10.4 ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Foram avaliadas a quantidade de alimentos consumidos pelos animais após administração via oral das nanoformulações. Diariamente, no período de 07 dias experimentais, foi pesado a ração.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados utilizando-se a análise de variância e o teste Tuckey por meio do programa de estatística Graphpad Prism versão 6.0 (GraphPad software, EUA), com nível de significância considerado $p \leq 0,05$ aceitos como estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 NANOFORMULAÇÕES

5.1.1 Seleção dos componentes da fase oleosa

Para determinação do componente oleoso, avaliamos a solubilidade do composto EPI em diferentes amostras de óleo. Na Figura 6, são apresentados os resultados da capacidade do óleo de solubilizar a molécula EPI.

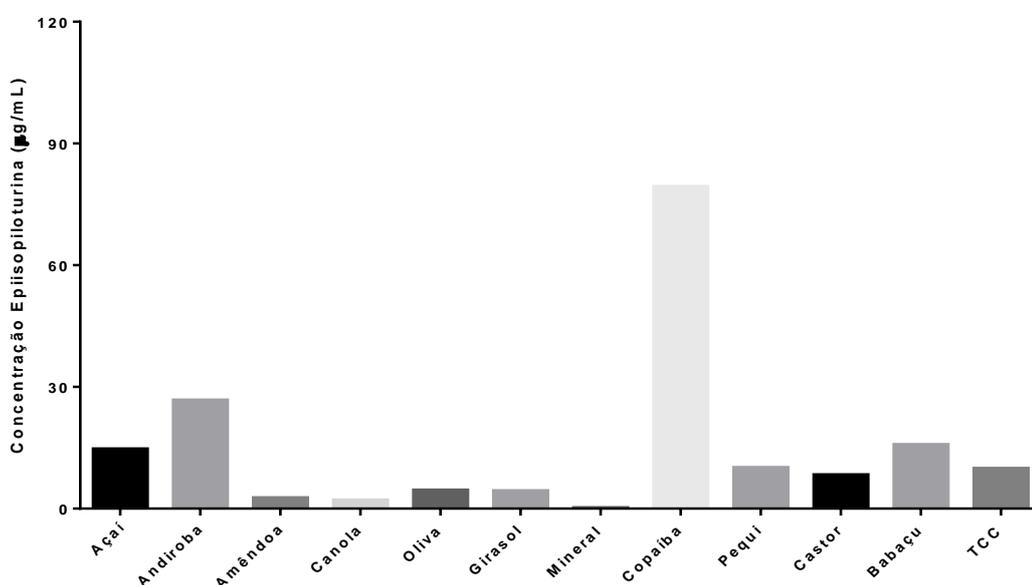


Figura 6. Solubilidade do alcaloide epiisopiloturina em diferentes amostras de lipídeos. No eixo y, concentração EPI encontradas em diferentes óleos. Em cada óleo a concentração inicial foi de 10 mg/mL

Entre as amostras de óleos avaliadas, o que apresentou a maior capacidade de solubilização foi o óleo de copaíba. Cerca de 90 µg/mL de EPI manteve-se dispersa no óleo, maior média obtida comparada com os outros óleos utilizados no teste. A partir desses resultados, selecionamos o óleo de copaíba para o desenvolvimento das nanoformulações.

Na composição das nanoformulações, o agente tensoativo é o componente essencial na dispersão da fase lipídica na fase aquosa, assim, formando

nanogotículas. Foram testados três tipos de tensoativos: Cremophor EL, Tween 20 e Tween 80. A Figura 7 mostra o perfil de emulsificação dos diferentes tensoativos em óleo de copaíba.

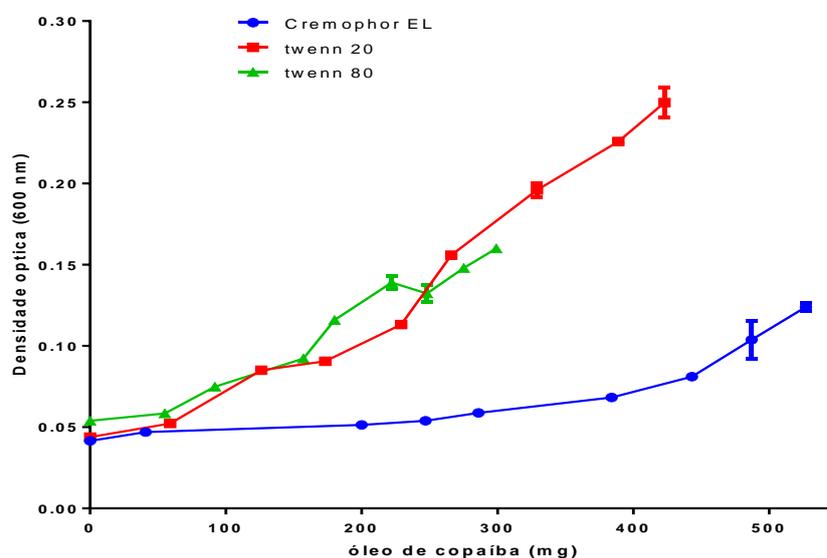


Figura 7. Turbidez da solução contendo óleo copaíba e fase aquosa. Na solução inicial, composta por 15 mg/mL de tensoativos, foram adicionadas quantidades crescentes, representadas no eixo X, de óleo de copaíba. Eixo y representa a turbidez (Densidade óptica em 600 nm) das soluções em diferentes condições

5.2 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES

Diferentes nanoformulações foram preparadas pelo método de autoemulsificação e foram avaliadas quanto ao seu tamanho hidrodinâmico e índice de polidispersão (IPD). Considerando-se que a quantidade de óleo e tensoativo alteram as características das nanogotículas, principalmente o tamanho e índice de polidispersão-IPD, estes foram dois parâmetros considerados para a avaliação dessa etapa.

As diferentes proporções das nanoformulações foram analisadas pelo teste de Dispersão Dinâmica da Luz – DLS, que fornecem dados sobre tamanho hidrodinâmico e homogeneidade das nanogotículas lipídicas. O sistema de autoemulsificação não contém uma fase aquosa, então, fase lipídica foi dispersas em meio aquoso (água) para formação das nanogotículas.

Na Figura 8, estão os resultados do tamanho hidrodinâmico e IPD das nanoformulações. Pode-se notar, de modo geral, que nanoformulações com razão O:T>1 apresentam tamanho hidrodinâmico e IPD maiores. Já para as proporções razão O:T<1, o tamanho hidrodinâmico das nanoformulações apresentou dados menores. O IPD de todas as nanoformulações não ultrapassou 0,5 o que indica que as formulações apresentam certa homogeneidade de tamanho. O diâmetro é influenciado pela composição e pelo método de preparo. A redução da proporção de tensoativos na composição da fase oleosa eleva o diâmetro hidrodinâmico significativamente.

As nanoformulações que mostraram diâmetro hidrodinâmico e IPD mais adequados foram *SNEDDS* 1.6 com 244 nm e PDI de 0,3 e *SNEDDS* 2.1, com 278 nm e PDI 0,4. Essas nanoformulações mostraram baixa polidispersão, sendo de escolha para teste *in vivo*.

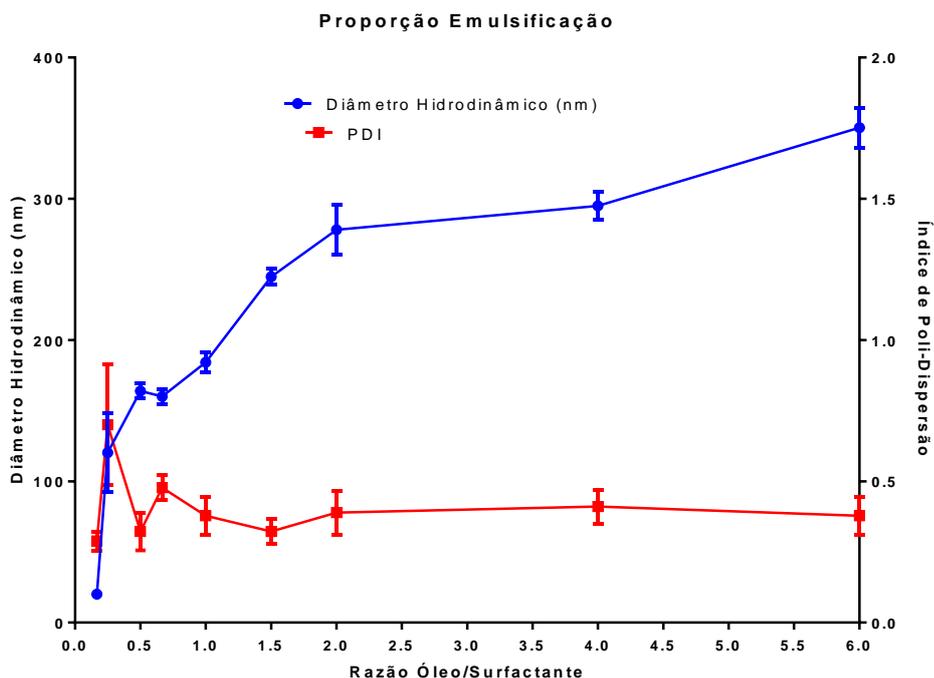


Figura 8. Tamanho hidrodinâmico das nanoformulações em diferentes proporções O:T. No eixo y (esquerda) está relacionado com raio hidrodinâmico (nm) e eixo y (direita) representa índice de polidispersão – PDI

5.4 MORFOLOGIA DA NANOFORMULAÇÃO PELA TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Para verificar a morfologia das nanoformulações, foi utilizada a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão-MET. A imagem obtida pode ser vista na Figura 9, que fornece dados em relação à morfologia e dispersão das nanogotículas lipídicas na fase aquosa. Na Figura 9, observa-se um mix de tamanho das nanogotículas lipídicas, revelando tamanho médio de 200 nm. O dado da morfologia pelo MET corrobora os dados obtidos pelo método de espalhamento dinâmico da luz (Figura 8).

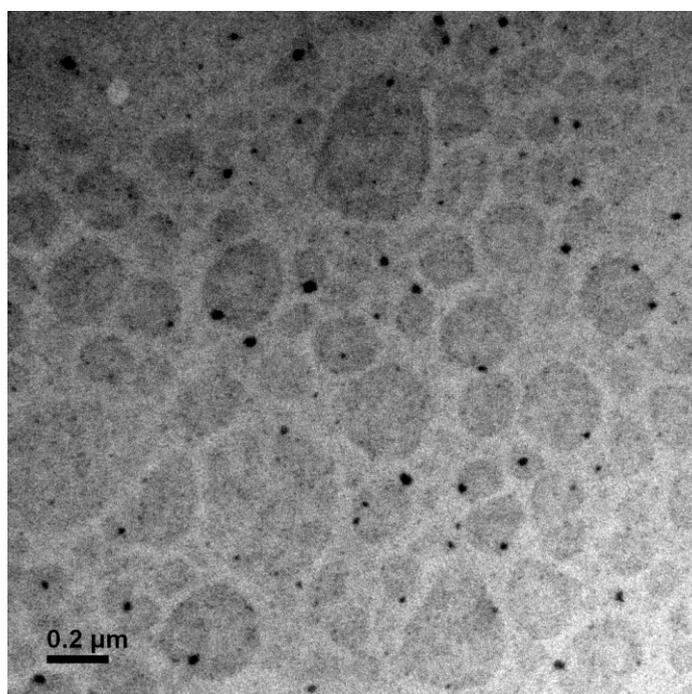


Figura 9. Eletromicrografia de transmissão das nanogotículas lipídicas de copaíba (cinza claro). Barras de escala: 200 nm

5.4 PERFIL DE LIBERAÇÃO DE EPI INCORPORADO NAS NANOFORMULAÇÕES

O teste de diálise baseia-se na difusão passiva da molécula livre conforme o gradiente de concentração, além de verificar a influência da nanoformulação nessa liberação. Na Figura 9, estão representados os dados do perfil de liberação de EPI, quantificada em meio dialisador por unidade de tempo.

Observa-se que, na amostra que contém apenas o óleo de copaíba com molécula EPI, a dissolução do composto tem o mesmo perfil de liberação nos dois tipos de pHs (Figura 10A), havendo uma retenção da molécula dentro da membrana. Na nanoformulação *SNEDDS* 1:1, em pH ácido, libera mais rapidamente o composto e pH neutro retém (Figura 10 B). Já as nanoformulações *SNEDDS* 1:6 e 2:1 (Figura, 10 C e D) apresentam perfil de liberação semelhante. A EPI é liberada controladamente em função do tempo, originando uma curva de crescimento da concentração EPI. Essas formulações *SNEDDS* 1:6 e 2:1 com proporções diferentes, razão O:T, ajudam na cinética de liberação da EPI, promovendo uma liberação controlada.

De modo geral, observa-se que, em pH 7,5, quanto menor o diâmetro das gotículas das nanoformulações mais rápida é a liberação. A amostra contendo apenas o óleo de copaíba reteve o fármaco por mais tempo.

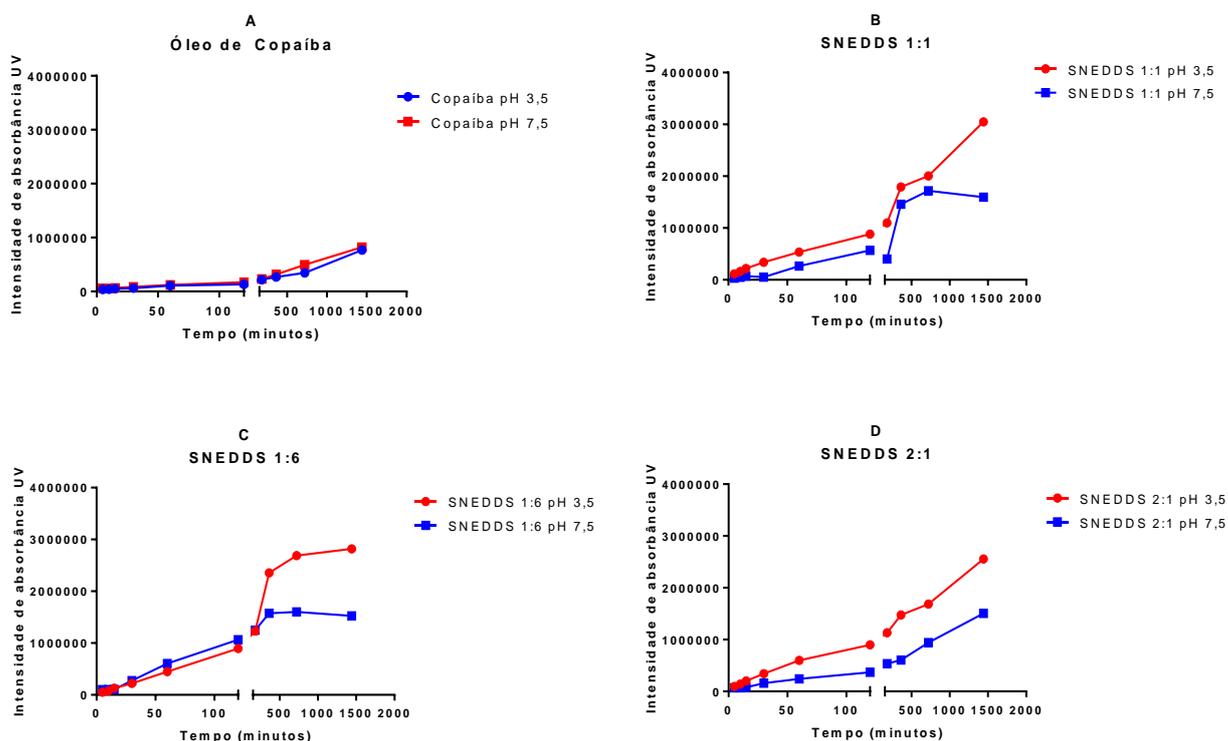


Figura 10. Perfil liberação *in vitro* de epiisopiloturina incorporada a nanoformulações em função do tempo. Meio extrator solução tampão PBS em pH 3,5 e 7,5 (37°C, 0,246 G, n=3). Gráfico A: óleo de copaíba associado com epiisopiloturina em pH 3,5 e 7,5; Gráfico B: *SNEDDS* 1:1 associada com epiisopiloturina em pH 3,5 e 7,5; Gráfico C: *SNEDDS* 1:6 com epiisopiloturina em pH 3,5 e 7,5; Gráfico D: *SNEDDS* 2:1 com epiisopiloturina em pH 3,5 e 7,5

Esse modelo de cinética de liberação proposto é determinado pela liberação da molécula carregada pelo sistema lipídico, por meio do compartimento membranoso fechado que monitora a concentração liberada da molécula livre dependendo do seu meio externo dialisador. A liberação da EPI a partir das nanoformulações *SNEDDS* 2:1 e 1:6 é mais lenta, sendo sua passagem para o meio extrator mais prolongado. Essa liberação lenta evita picos de concentração plasmática que ocorrem quando o fármaco é injetado na forma de solução, evitando, assim, muitos efeitos adversos.

5.5 EXPERIMENTAÇÃO *IN VIVO*

5.5.1 Concentração plasmática de EPI

Primeiramente, para a quantificação do composto EPI no sangue de camundongo, foram determinados três parâmetros analíticos: especificidade, seletividade e linearidade. A linearidade do método foi avaliada usando alíquotas de solução do analito epiisopiloturina na faixa de concentrações de 0,25 a 10 µg/mL, detector UV em 216 nm ($r^2 = 0,9998$) cujos resultados estão contidos na Figura 11.

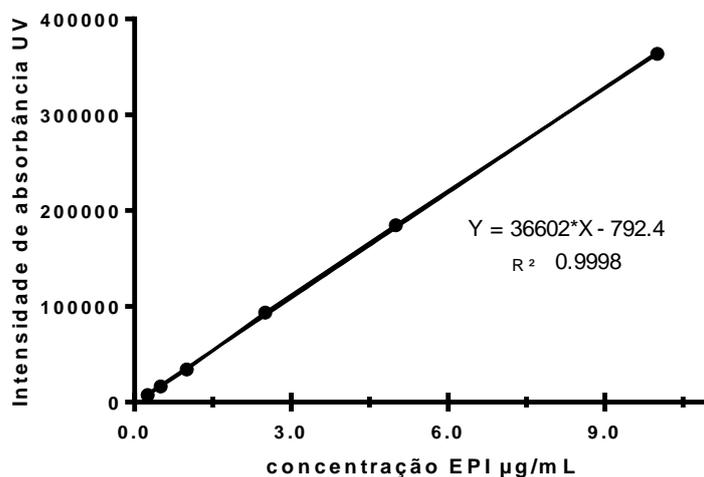


Figura 11. Curva de calibração de diferentes concentrações do analito epiisopiloturina. No eixo y e absorvância (UV), detector no comprimento de onda 216 nm

A especificidade e seletividade esta relacionando com a capacidade do método analítico em distinguir a presença do analito (EPI) de outros componentes tais como; impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz biológica. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 12, representado por cromatogramas da matriz biológica branca (sangue) e outra amostra matriz biológica dopada com concentração conhecida da EPI para demonstrar a recuperação da molécula dessa matriz. O método demonstrou ser específico para o analítico epiisopiloturina, visto que não tem interferência em relação aos componentes do sangue, tampouco pelos reagentes utilizados durante o processamento das amostras.

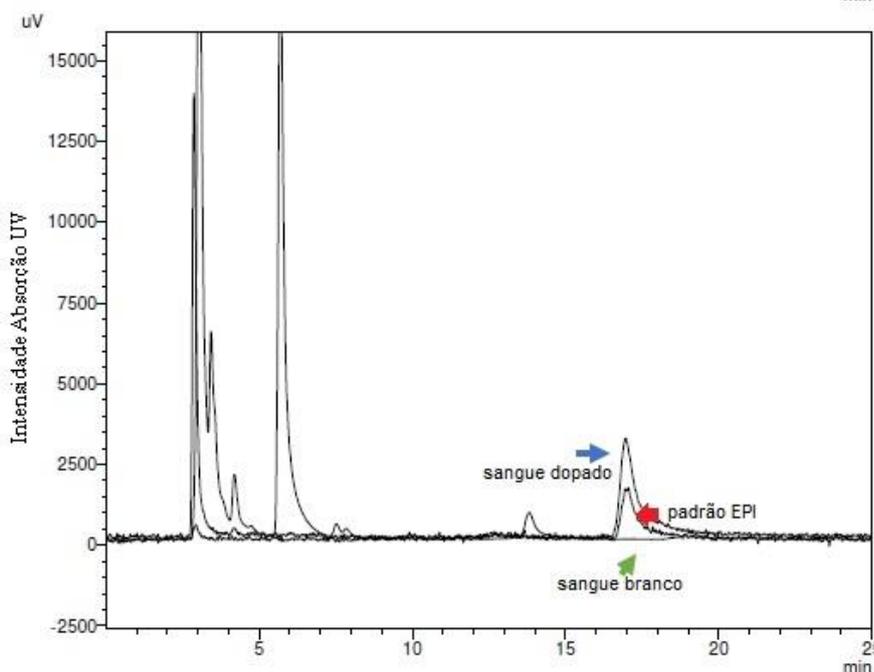


Figura 12. Cromatograma amostras da matriz biológica sangue (branco e dopado) e padrão epiisopiloturina. No eixo y intensidade de absorção (UV) do analito EPI e eixo x tempo de retenção epiisopiloturina 17,5 minutos. Na seta azul (sangue dopado com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EPI), na seta vermelha (padrão de EPI 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e seta verde (matriz biológica branco). As setas estão marcando no tempo de do analito EPI

Os resultados descritos das concentrações plasmáticas foram obtidos após administração das amostras pela via oral. Encontram-se na Tabela 2 e Figura 13 as variáveis da concentração plasmática da EPI. O grupo (A), para os animais que foram administrados com a molécula EPI livre, apresentou concentração média de

100 µg da EPI por sangue total, comparado com os grupos experimentais aplicados com (B) *SNEDDS 1.6* e (C) *SNEDDS 2.1*. A concentração plasmática foi de 236 µg e 315 µg, respectivamente, por sangue total em camundongos.

Tabela 2. Concentrações plasmáticas médias de EPI (40mg/kg). Intensidade relativa da absorbância (nm) e porcentagem da biodisponibilidade de EPI após três horas administração

<i>Parâmetros</i>	EPI [®]	EPI <i>SNEDDS1.6</i>	EPI <i>SNEDDS2.1</i>
C_{max} µg/sangue total	119,31	235,97	315,29
AUC (intensidade relativa)	183037	347808	481942
Biodisponibilidade (%)	10,6%	23,4%	31,5%

A correlação entre os dados baseia-se pelo fato de a molécula ser mais absorvida e carregada pelo SNEDDS. A porcentagem da concentração plasmática da EPI variou de ~10% até 32%. O sistema autoemulsificante aumentou a biodisponibilidade da molécula.

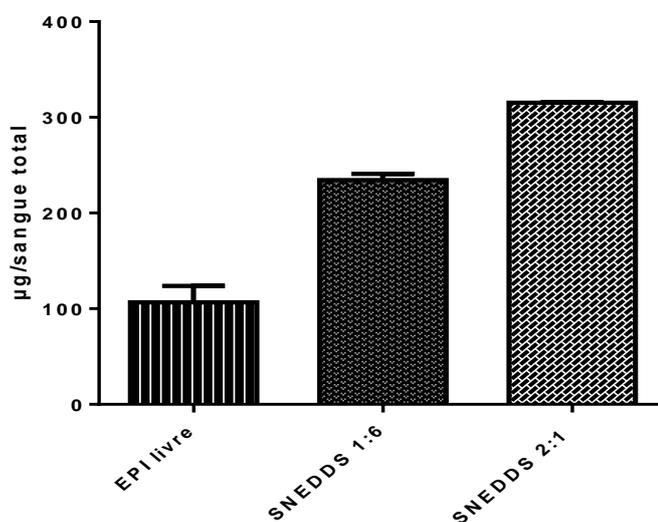


Figura 13. Perfis médio (média ± desvio-padrão) das concentrações sanguíneas de epiisopiloturina, em ambos os grupos de nanoformulações. No eixo y, mostra a concentração EPI µg pelo sangue total encontrado

5.6 TOXICIDADE *IN VIVO*

5.6.1 Características clínica do animal

Os animais, ao longo do experimento, não demonstraram mudança no seu comportamento, reflexos e aspecto da pelagem, todos dados indicativos de ausência de toxicidade significativa das formulações.

5.6.2 Peso corporal

Dos parâmetros considerados para a análise clínica dos animais, o peso corpóreo foi observado diariamente durante 07 dias experimentais. Na Figura 14, pode-se observar que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação ao peso corporal.

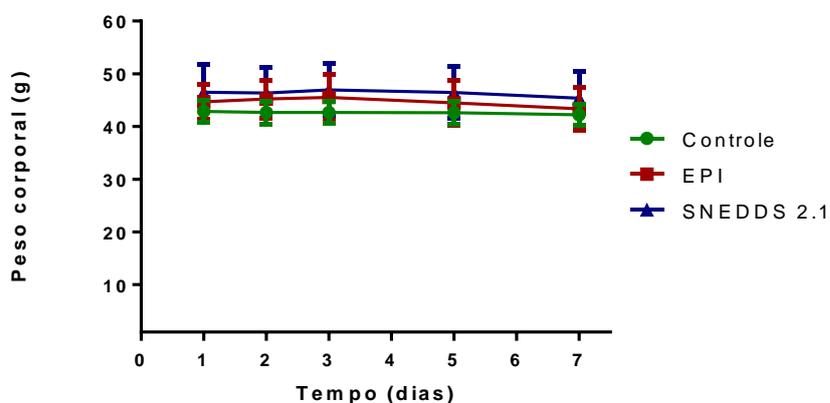


Figura 14. Peso corporal de camundongos Swiss em função do tempo experimental Controle sem administração da nanoformulação (Controle negativo), solução EPI (amostra tampão fosfato salina (PBS) com 10000µg/mL EPI) e nanoformulação *SNEDDS* 2:1. Valores apresentados pelas médias e desvio padrão. ($p > 0,05$; ANOVA)

5.6.3 Alimentação

Foi monitorado o consumo de ração durante todo o período experimental. Durante 07 dias (diariamente), foi pesada a ração fornecida para os animais de cada grupo. Os dados podem ser vistos na Figura 15.

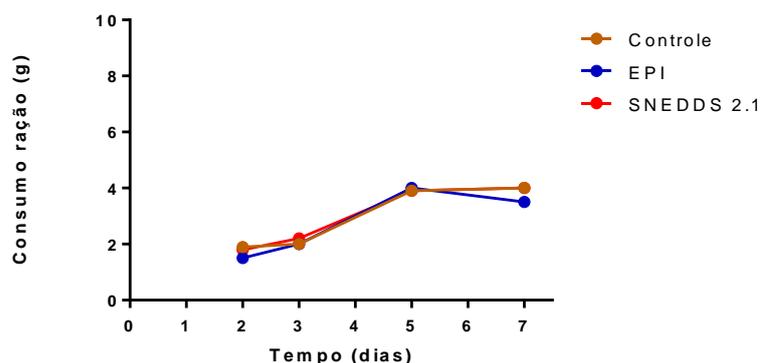


Figura 15. Consumo de alimento por dias após administração das nanoformulações via oral

A massa de ração consumida pelos animais tratados com as amostras de EPI livre e em formulação, comparados com os animais do grupo controle, não apresentou diferença significativa. Os animais que consumiram ração após tratamento com EPI livre e *SNEDDS 2:1* tiveram o mesmo perfil de consumo alimento.

5.6.4 Análise de ensaios hematológicos

Na Tabela 3, constam os resultados obtidos no teste hematológico, seguindo seguintes parâmetros: leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$), hemácias ($10^6/\mu\text{L}$), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%) e plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$) presente no sangue.

Tabela 3. Parâmetros hematológicos em camundongos Swiss, após administração do composto epiisopiloturina incorporado em sistema autoemulsificante (*SNEDDS 2.1*)

GRUPOS	Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)
Controle	$5,2 \pm 1,5$	$10,1 \pm 0,2$	$15,2 \pm 0,3$	38 ± 1	$677,7 \pm 128,8$
EPI	$5,1 \pm 1,1$	$9 \pm 1,7$	$14,7 \pm 1$	$35,7 \pm 3,1$	$676 \pm 218,3$
SNEDDS 2.1	$4,9 \pm 1,7$	$10,33 \pm 0,2$	$15 \pm 0,3$	$38,9 \pm 1$	$1156,7 \pm 232,5$

Legenda: dados da média \pm desvio padrão. Cada grupo experimental $n=3$. Hemoglobina: Proteína presentes nos glóbulos vermelhos. / Hematócrito: porcentagem das hemácias no volume total de sangue

Em modo geral, os resultados mostraram pequenas variações individuais, quando avaliados cada parâmetro isoladamente, comparando entre as 03 amostras

experimentais. A amostra 2, solução contendo a molécula epiisopiloturina livre, não teve alterações significativas nos valores de células do sangue, comparadas com o hemograma da amostra 1 (controle). Pode-se dizer que a aplicação dessa molécula livre não causa efeitos nos valores de contagem de células sanguíneas no sangue periférico dos animais.

Porém, comparando-se o efeito da molécula livre com sistema carreador com EPI, foi observado um aumento das plaquetas. As plaquetas são as frações celulares responsáveis pela coordenação da formação de coágulos sanguíneos. Essas alterações celulares podem estar relacionadas a algum tipo de alteração dessa natureza, necessitando de mais investigações acerca deste resultado.

6. DISCUSSÃO

As nanoformulações autonanoemulsificantes (*SENDDS*, do inglês *Self-nanoemulsified drug delivery systems*) têm sido utilizadas com o intuito de aumentar a absorção de fármacos hidrofóbicos pela via de administração oral. Conceitualmente, essas nanoformulações são dispersões de óleo em água estabilizadas com tensoativos de superfície. A diferença desse tipo de nanoformulação em relação as demais nanoemulsões é que o componente aquoso é o fluido gastrointestinal que entra em contato com a fase lipídica somente no momento da administração, promovendo uma estabilidade da molécula no sistema. Além do mais, a produção dessa nanoformulação ocorre pela auxílio da movimentação peristáltica gastrointestinal que oferece energia suficiente para emulsificar o sistema e não necessita de energia externa como equipamentos (turrax e sonificador).

Nesse sentido, por se tratar de um sistema simples as etapas de desenvolvimento das nanoformulação envolvem o estudo apenas dos componentes da fase lipídica, sendo o carreador lipídico e/ou tensoativos utilizados e as proporções desses elementos para atingir os objetivos finais relacionados ao aumento da absorção oral da molécula de interesse (FRONZA, CAMPOS, TEXEIRA, 2004). A seleção da fase lipídica deve levar em consideração a capacidade do óleo de dispersar o fármaco de interesse, o grau de esterificação, além de aspectos de fusão e algumas características físico-química dos óleos (BO TANG et al.,2008).

Os lipídios (neste caso os óleos vegetais) podem apresentar, na sua composição, ácidos graxos de cadeia pequena, média ou longa, saturados ou parcialmente insaturados (GUPTA et al,2014), essas cadeias de carbono dos ácidos graxos que solubilizam a molécula de interesse. O óleo de copaíba, selecionado no presente estudo para a composição da fase lipídica, teve a maior capacidade de dissolver molécula EPI sendo que esse tipo de óleo possui triglicerídeos que conseguem este efeito, sendo necessário realização de uma investigação futura a cerca desse dado. Na triagem para escolha do melhor excipiente lipídico, os óleos comestíveis (açai, amêndoa, canola, oliva, girassol, pequi e babaçu), que seriam os mais indicados para administração por via oral, não foram capazes de solubilizar acentuadas concentrações de EPI. Esse efeito pode ser explicado pelo fato esses

óleos não apresentarem um tipo de cadeias carbônicas adequando para solubilizar grandes quantidades de drogas lipofílicas (CHRISTENSEN et al., 2004; HAUSS, 2007).

Após a seleção do componente oleoso do sistema, passamos à seleção do tensoativo a ser utilizado, sendo que, evidência para a emulsificação é a turbidez da solução, ou seja, quanto mais translúcida a solução, mais emulsificado está o sistema. Em contrapartida, quanto mais turvo o sistema, menos emulsificado, ou menor a capacidade emulsificante do tensoativo. A escolha é fundamental para os sistemas autoemulsificante, levando sempre, em consideração seu nível de Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico (EHL). O EHL é calculado pela razão entre a massa da porção hidrofílica (M_h) e a massa molecular do tensoativo (M), multiplicado por um fator 20 (KOMMURU et al., 2001), e está relacionado com a extensão das porções anfifílicas dos tensoativos de modo que a formação de emulsões óleo em água (O/A) depende desse valor. Em geral valores de EHL maiores que 12 são adequados para a produção de emulsões óleo em água. Em contrapartida valores de EHL menores que 6 são adequados para a formação de emulsões água em óleo (POUTON, 2008).

Em relação às condições experimentais avaliadas, o tensoativo cremophor EL foi o que demonstrou melhor capacidade de emulsificar o óleo de copaíba. Nas demais etapas do projeto, esse tensoativo foi utilizado para a produção das nanoformulações. O agente emulsificante cremophor EL (EHL 14), sendo capaz de forma nanoformulação óleo em água o/a. As nanoformulações produzidas nesse estudo tiveram variação da concentração do agente tensoativo entre 30 e 60% da proporção em massa da fase oleosa. No processo de desenvolvimento das nanoformulações, a razão O:T (óleo:tensoativo) teve influência no tamanho hidrodinâmico. Quanto maior a proporção do tensoativo, menor o valor do diâmetro hidrodinâmico das nanogotículas. Segundo Fryd & Mason (2012), concentrações altas de tensoativo na fase dispersa reduzem a tensão superficial e aumentam a estabilidade das gotículas, proporcionando também uma homogeneidade das nanogotículas. Além disso, resultados semelhantes também foram observados por estudos prévios do grupo, o que corrobora os dados da literatura, o aumento da proporção de tensoativos consegue reduzir o tamanho das nanogotículas dispersas (MUEHLMANN et al, 2015).

Após a determinação das proporções dos componentes da fase lipídica, o passo seguinte foi verificar o perfil de liberação *in vitro* da EPI em duas diferentes condições de pH. A informação obtida com base nesse teste foi possível observar que a liberação da molécula EPI foi mais acelerada nas formulações com nanogotículas de menor tamanho. Apesar de haver essa tendência ($r^2=0,9641$, não apresentada na dissertação) de correlação entre a velocidade de liberação e o tamanho das gotículas, embora não foi estatisticamente significativa. Um fato que justificaria essa tendência é o aumento da razão da área de superfície quando se reduz o tamanho das nanogotículas dispersas. Esse fato propiciaria um contato significativamente menor entre a superfície das nanoemulsões e o meio externo aquoso, o que poderia aumentar o fluxo do composto no sentido nanogotículas e meio externo. O perfil de EPI liberado permite um controle qualitativo em condições semelhantes às encontradas no sistema gastrointestinal, fornecendo informações para a realização de etapas posteriores para estudo *in vivo* em animais. Essa etapa é muito importante e reduz o número de amostras necessárias para os testes *in vivo* (GORDON et al., 1995).

Para administração de medicamentos, a via mais utilizada é a via oral, tendo vantagem do ponto de vista fisiológico, além de ser a mais aceita pelos pacientes (ZHANG,2008). O sistema gastrointestinal possui quatro camadas distintas mucosa (epitélio, lâmina própria e muscular da mucosa), submucosa (tecido conjuntivos), muscular externa (musculo liso) e serosa (epitélio simples de movimento). Esse conjunto de barreiras forma um sistema extremamente complexo que é usado para digestão e regulação alimentos, como também, proteção de agentes externos ao sistema biológico (BRODY,1999). Existe também o muco de revestimento (extensamente na superfície camada da mucosa), composto por mucina, células, enzimas, eletrólitos e água. O muco exibe várias ações, tais como manter a lubrificação da superfície da mucosa, ajudando a digestão e proteger o epitélio superficial de irritação, formando uma grossa camada de gel de muco (Peppas, Sallin, 1996; Edwards, 1997). Esse muco reduz a absorção de moléculas hidrofóbicas no sistema gastrointestinal é a extensão do muco aquoso, com baixa permeabilidade às formas hidrofóbicas, que ficam adsorvidas sobre a mucosa de revestimento. Por esse motivo que usando fármaco associado a carreadores como o *SNEDDS* tem por objetivo ultrapassar essa barreira que pode chegar a 100-200 μm

de espessura (CHRISTOPHER et al, 2007). Além disso, após ultrapassar a barreira de muco, este carreador (*SNEDDS*) tem grande chance de se fundir com as membranas celulares da mucosa gastrointestinal e especula-se que sejam transportados para o sistema linfático associado e assim alcançar a vascularização sanguínea (DWIVEDI et al, 2014).

Porém, esta via é comprometida por causa de sua alta lipofilicidade quando é usada para absorção de fármacos (GURSOY & BENITA, 2004). Uma estratégia tem sido utilizar formulações farmacêuticas e matérias nanoestruturadas para carrear esses compostos, melhorando, assim, sua biodisponibilidade oral. A utilização de *SNEDDS* nessa pesquisa foi planejada com o intuito de proteger a molécula epiisopiloturina contra degradação no fluído gastrointestinal e, principalmente, aumentar sua absorção por essa via de administração oral. A emulsificação ocorre rapidamente no conteúdo aquoso do estômago, permitindo que a EPI fique dispersa na fase lipídica após a formação das nanogotículas. Essas pequenas nanogotículas de óleos são amplamente distribuídas pelo trato gastrointestinal e são rapidamente difundidas pelo muco presente em todo o trato gastrointestinal, permitindo, dessa forma, a difusão da nanoformulação na barreira do sistema gastrointestinal (GURSOY & BENITA, 2004; GRASSI et al, 2006).

Kohli et al. (2010) mostram que algumas variedades de fármacos hidrofóbicos tiveram sua biodisponibilidade melhorada usando o sistema *SNEDDS*, como exemplo: a celecoxib (SUBRAMANIAN et al., 2004), itraconazol (WOO et al., 2008), pranlukast (BAEK et al., 2013), entre outros. Além disso, estão disponíveis no mercado nanoformulações feitas pelo sistema *SNEDDS*, disponível em cápsulas gelatinosas, exemplos incluem; Agenerase (amprenavir, GlaxoSmithkline), Gengraf (ciclosporina A, Abbott) e Accutane (isotretinoína, Roche).

Os resultados do experimento *in vivo* tiveram como objetivo apresentar uma prova de conceito que suporte o uso das *SNEDDS* para aumentar a concentração plasmática de epiisopiloturina. Todos os tratamentos aplicados tiveram efeitos diferentes na absorção da epiisopiloturina. A nanoformulação *SNEDDS* 2.1 teve aumento na absorção EPI em 3 vezes quando comparada à aplicação do composto EPI livre. Com isso, os resultados obtidos no presente estudo comprovam que o sistema *SNEDDS* pode ser aplicado para melhorar a eficiência de absorção desse composto. É importante salientar que esse fármaco já foi testado, em sua forma

livre, para o tratamento de modelos experimentais para esquistossomose em camundongos (GUIMARÃES et al., 2015). Como o resultado principal desta dissertação foi o incremento da absorção oral desta molécula, pressupomos que o tratamento da esquistossomose também pode ser viável com a utilização dessa formulação autonanoemulsificante.

O ensaio de avaliação da toxicidade *in vivo*, após administração do alcalóide epiisopiloturina e na forma de nanoformulação, por via oral, é de extrema importância para consolidação da utilização do sistema *SNEDDS* para absorção da molécula EPI. Os dados obtidos do consumo de alimento, peso corporal e hemograma, mostram que os animais não apresentaram alterações fisiológicas após administração das nanoformulações. Agentes como os tensoativo e fármacos são candidatos para causar irritação no GI, porém isso não foi observado (SWENSON et al, 1994). Sobre a citotoxicidade do alcalóide epiisopiloturina, segundo Veras (2014), os testes realizados com células VERO (células rim de macaco) e células peritoneais de macrófagos de camundongos, na concentração entre 300 a 500 µg/mL, não apresentaram toxicidade para essas células, mesmo em dose máxima testada. Podendo indicar a segurança de se trabalhar com o composto epiisopiloturina. Dessa forma, o mesmo pode ser aplicado para novos testes *in vivo* sob novas formulações e vias de administração. Jain & Yalkowsky (2007) demonstraram que a dose letal – DL50 oral em ratos foi de 500 µg/kg de peso, usando sistema *SNEDDS* para carrear o composto 2-pirrolidona. Em comparação com a nanoformulação *SNEDDS 2.1* produzida, mostra que o volume aplicado em cada dose é inferior ao citado acima. Ademais, todos os volumes de tensoativos e óleos utilizados no presente trabalho estão abaixo dos limites de toxicidade descritos na literatura (KISS et al., 2011).

O teste hematológico é considerado como um dos melhores métodos para monitorar possíveis alterações que possam interferir em variáveis experimentais (PEREIRA et al, 2003). Os resultados dos parâmetros do hemograma mostram que o animal, após experimentação com a molécula EPI e a nanoformulação, não apresentaram alterações significativas relacionados aos fatores fisiológicos. Porém, um parâmetro chamou atenção, o nível de plaquetas. No grupo de animais tratados com *SNEDDS 2.1*, o dado obtido de contagem de plaquetas mostrou um aumento dessas no sangue, aumento chamado de trombocitemia, sendo preciso uma

investigação acerca desse resultado. Plaquetas ou trombócitos são responsáveis pela homeostase sanguínea, formando trombos que impedem os sangramentos (HARVEY, 2001), consideradas a primeira linha de defesa quando os vasos sanguíneos são danificados (FELDMAN et.al., 2000).

Com os dados obtidos nessa pesquisa, pode-se considerar que as formulações produzidas por *SNEDDS* podem ser usadas com êxito. Para facilitar a aplicação das nanoformulações, uma estratégia é a associação com cápsulas gelatinosas que facilitariam a administração das formulações. Os próximos passos para o desenvolvimento do projeto estão relacionados à avaliação dessa nanoformulação em modelos experimentais para esquistossomose. A ideia central é tentar aumentar a efetividade do tratamento pelo aumento da absorção oral do princípio ativo que já demonstrou ser eficaz em estudos realizados em modelos animais (GUIMARÃES et al 2015).

7. CONCLUSÃO

Os componentes selecionados para produção do sistema *SNEDDS* mostraram-se adequados para solubilização da molécula epiisopiloturina. A produção da nanoformulação usando sistema autoemulsificante se mostrou um bom carreador do composto epiisopiloturina, sendo capaz de aumentar sua absorção no sistema gastrointestinal, como também sua concentração na circulação sistêmica. Porém, esse sistema não forma formulações estáveis, precisando de mais estudos empregando uma metodologia mais adequada.

Esse sistema mostra-se como uma alternativa para veiculação do fármaco EPI em sistemas aquosos, uma vez que o mesmo é insolúvel em água. Dessa forma, por meio desse sistema, é melhorada significadamente a biodisponibilidade da EPI quando administrada por via oral. Por fim, é importante ressaltar que a molécula epiisopiloturina carreada por esse sistema tem um grande potencial biotecnológico contra a esquistossomose.

8. REFERÊNCIAS

ADNAN A.M., MOHAMMAD R., FARHAN J., AHMAD Z.I., ROOP K., KHAR M., AQIL A.N.D SUSHAMA TALEGAONKAR. Nanoemulsion Components Screening and Selection: a Technical Note. PharmSciTech, Vol. 10, No. 1, March, 2009.

AGRAWAL A.G., KUMAR A., GIDE P.S. Toxicity Study of a Self-nanoemulsifying Drug Delivery System Containing N-methyl pyrrolidone. Drug Res (Stuttg); 65(08): p.446-448, 2015.

ALLEN J.R.L., POPOVICH N.G., ANSEL H.C.A. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8.ed. São Paulo: Premier, 2007.

ALMEIDA M.A.O., AYRES, M.C.C., SPINOSA H.S., GÓRNIARK S.L., BERNARDI M.M. Considerações gerais sobre os helmintos. Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.519-550, 2006.

ALONSO D., MUÑOZ J., GASCON J., VALLS M.E., CORACHAN M. Failure of standard treatment with praziquantel in two returned travelers with *Schistosoma haematobium* infection. Am J Trop Med Hyg., v. 74, p. 342–344, 2006.

AMARAL R., TAUIL P.L., LIMA D.D., ENGELS D. An analysis of the impact of the schistosomiasis control programme in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 101, p. 79-85, 2006.

AMBROZIN A.R.P., LEITE A.C., BUENO F.C., VIEIRA P.C., FERNANDES J.A., BACCI JR.M.B. Limonoids from Andiroba oil and Cedrela fissilis and their insecticidal activity. Journal of the Brazilian Chemical society, São Paulo Vol. 17, No. 3, p 542-547, 2006.

AMERICO ET AL. Effects os meal size and proximal-distal segmentation on gastric activity. Word J.Gastroenterol.,v. 16, p 5861-5868, 2010.

AMORIM TADE-ANE. Quão seguro é seguro o suficiente Controvérsias científicas e a construção da idéia da segurança dos nanomedicamentos. UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

ANTON N., VANDAMME T.F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. Pharm Res. May;28(5):978-85. doi: 10.1007/s11095-010-0309-1, 2011.

ANVISA. Agencia de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/medicamentos>. Acesso em: 18/02/2016.

AUNGST B.J. Novel formulation strategies for improving oral bioavailability of drugs with poor membrane permeation or pre-systemic metabolism. J. Pharma. Sci 82: 979-986,1993.

BARBOSA-FILHO J.M., PIUVEZAM M.R., MOURA M.D., SILVA M.S., LIMA K.V.B. Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. *Rev Bras Farmacogn* 16: 109–139. doi: 10.1145/355769.355773, 2006.

BARNABÉ E.C. Extração de pilocarpina e epiisopiloturina de jaborandi utilizando processos envolvendo solventes supercríticos. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2008.

BO TANG, GANG CHENG, JIAN-CHUN GU AND CAI-HONG XU. Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. v.13, n.13/14, july, 2008.

CAFFREY C.R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v. 11, p. 433–439, 2007.

CARLUCCI A.M., BREGNI C. Productos Nanotecnológicos de Aplicación en Farmacoterapia. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 03, p.470-477, 2009.

CIOLI D., PICA-MATTOCCIA L., BASSO A. Schistosomiasis control: raziquantel forever? *Mol. Biochem. Parasitol.*195(1), 23–29, 2014.

COSTA A.F. *Farmacognosia*. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2 v. cap. 4, p. 370-722. 1994.

CONSTANTINIDES P.P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm Res*12:1561–72, 1995.
COSTA A.F. *Farmacognosia*. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2 v. cap. 4, p. 370-722, 1994.

LOVELYN C., ATTAMA A. Estado Atual das nanoemulsões em Drug Delivery. *Journal of Biomaterials e Nanobiotecnologia* , Vol. 2 No. 5A, pp. 626-639, 2011.

CHRISTENSEN JØ, SCHULTZ K., MOLLGAARD B., KRISTENSEN H.G., MULLERTZ A. Solubilisation of poorly water-soluble drugs during in vitro lipolysis of medium- and long-chain triacylglycerols. *Eur J Pharm Sci*23(3):287–96, 2004.

DWIVEDI P., *et al.* Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of arteether: pharmacokinetics, toxicity and antimalarial activity in mice. *RSC Advances*, 2014.

FIGUEIREDO J. Nanomedicina: ficção ou realidade? Universidade do Algarve. CNA – Centro para automação em nanobiotecnologia. 04 de dezembro de 2009. Disponível em: http://www.observatoriodoalgarve.com/cna/opinioes_ver.asp?opinioao=683> Acesso em: 25 de novembro de 2015.

FELDMAN B.F., ZINKL J.G., JAIN N.C. *Schalm's veterinary hematology* (5th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 2000.

FRONZA T., CAMPOS A., TEIXEIRA H. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. Acta Farm. Bonaerense 23 (4): 558-66, 2004.

GUIMARÃES, M.A., CAMPELO Y.D.M., VÉRAS L.M.C., COLHONE M.C., LIMA D.F., CIANCAGLINI P., KUCKELHAUS S.S., LIMA F.C.A., DE MORAES J., LEITE J.R.S.A. Nanopharmaceutical Approach of Epiisopiloturine Alkaloid Carried in Liposome System: Preparation and In Vitro Schistosomicidal Activity. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Volume 14, Number 6, pp. 4519-4528(10). June, 2014.

GUIMARÃES M.A., DE OLIVEIRA R.N., VÉRAS L.M.C., LIMA D.F., CAMPELO Y.D.M., CAMPOS S.A. Anthelmintic Activity *in vivo* of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. PLoS Negl TropDis, 2015.

GERSHANIK T., BENITA S. Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. Eur J Pharm Biopharm, 50:179–88, 2000.

GHANEM, HUSSEIN & MOHAMED. Possíveis aplicações dos nanorobôs na medicina sexual: um artigo de revisão. Volume 03 - Número 1 - Setembro / Outubro – 2006. Disponível em: <http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=45119&id_seccion=2859&id_ejemplar=4569&id_revista=98>.

GREENBERG R.M. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? Int. J. Parasitol., v. 35, p. 1-9, 2005.

GROVES M.J., MUSTAFA RMA, CARLESS, JE. Phase studies of mixed phosphate surfactants, nhexane and water. J. Pharm. Pharmacol v. 26: p. 616-623, 1974.

GRYSEELS B., POLMAN K., CLERINX J., KESTENS L. Human schistosomiasis. Lancet, v.368, p. 1106–1118, 2006.

GRUPO ETC. Nanotecnologia: os riscos da tecnologia do futuro: saiba sobre produtos e invisíveis que já estão no nosso dia-a-dia e o seu impacto na alimentação e na agricultura. Porto Alégre: L&PM, 2005.

GUPTA ET AL. Self nano emulsifying drug delivery system: a strategy to improve oral bioavailability. Review Article world journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. Vol 3, Issue 5, 2014.

GURSOY R.N., BENITA S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. Biomedicine & Pharmacotherapy. v.58, 173–182, 2004.

GRASSI G. LAPASIN R. GRASSI M. COLOMBO I. Understanding drug release and absorption mechanisms. Boca Raton: CRC Press, 2006.

HAUSS D.J. Oral lipid-based formulations. Adv. Drug. Deliv. Rev. 59, 667-676, 2007.

HAUSS ET AL. Lipid-based delivery systems for improving the bioavailability and lymphatic transport of a poorly water-soluble LTB₄ inhibitor. J.Pharm. Sci.v.87, p. 164–169, 1998.

HARVEY ET AL. Atlas of Veterinary Hematology Blood and Bone Marrow of Domestic Animals. Florida: Saunders, 2001.

KATZ N., CHAVES A., PELLEGRINO J. A simple device for quantitative stool thicksmeat technique in schistosomiasis mansoni. Rev. Inst. Med. Trop., v. 14, p. 397–400, 1972.

KANG ET AL. Bioactive molecules: current trends in discovery, synthesis, delivery and testing. Review Article IeJSME. 7 (Suppl 1): S32-46, 2013.

KOHLI ET AL. Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. Drug discovery today, v.15, n. 21, p. 958-965, 2010.

HENRIQUES A.T., KERBER V.A., MORENO P.R.H., SIMÕES C.M.O. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Florianópolis: UFSC. p. 641-656, 2000.

HOCKLEY D.J., MCLAREN D.J. *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. Int. J. Parasitol., v.3, p. 13-25, 1973.

HOLM R., PORTER C.J.H., MÜLLERTZ A., KRISTENSEN H.G., CHARMAN W.N. Structured triglyceride vehicles for oral delivery of halofantrine: examination of intestinal lymphatic transport and bioavailability in conscious rats. Pharm Res 19:13. p. 54–61, 2002.

HUMBERSTONE A.J., CHARMAN W.N. Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs. Adv Drug Deliv Rev. 25 (1):103–28, 1997.

ISMAIL M., METWALLY A., FARGHALY., ET AL. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. Am. J. Trop. Med. Hyg.55(2), 214–218, 1996.

JAIN P., YALKOWSKY S.H. Solubilization of poorly soluble compounds using 2-pyrrolidone. Journal International of Pharmaceutics, v. 342, p.1-5, 2007.

JUDD W.S., ET AL. Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

JUSTO O.R., ET AL. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. Química Nova, v.31, n.7, p.1699-705, 2008.

KATZ N., PEIXOTO S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.33, p. 303-308, 2000.

KIMURA M., SHIZUKI M., MIYOSHI K., SAKAI T., HIDAKA H., TAKAMURA H., MATOBA T. Relationship between the molecular structures and emulsification properties of edible oils. Biosci Biotech Biochem;58:1258–61, 1994.

KISS L., ET AL. Kinetic Analysis of the Toxicity of Pharmaceutical Excipients Cremophor EL and RH40 on endothelial and Epithelial Cells. journal of pharmaceutical sciences, vol. 102, no. 4, april 2001.

Kommuru T.R.B., Gurley M.A., Khan I.K. Reddy. Selfemulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. Int J Pharm. 212:233–246, 2001.

KAYSER O., KIDERLEN A.F., CROFT S.L. Natural products as antiparasitic drugs. Parasitol. Res., v. 90, p. S55-S62, 2003.

LEITE J.R.S.A., ET AL. Processo de obtenção de epiisopiloturina e sua aplicação no combate à infecções parasitárias. INPI. UFPI. Brasil. PI0904110-9, 2009.

LEVY G. Prescription Pharmacy. Sprowls J.B.(Ed.), Lippincott Co., Philadelphia. pp.31-94. 1963

LIMA D.F. Alcalóides de interesse industrial: aspectos químicos e biológicos. 2008. 56 f. Monografia (Especialização em Plantas Mediciniais) – Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

LIMA S.F., VIEIRA L.Q., HARDER A., KUSEL J.R. Altered behaviour of carbohydratebound molecules and lipids in areas of the tegument of adult Schistosoma mansoni worms damaged by praziquantel. Parasitology. v. 109, p. 469–477, 1994.

LIN MEI, ZHIPING ZHANG, LINGYUN ZHAO, LAIQIANG HUANG, XIANG-LIANG YANG, JINTIAN TANG, SI-SHEN FENG. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. Advanced Drug Delivery Reviews v.65; p. 880–890, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica/7 ed. P. 816. Brasília, 2009.

MIURA L.M.C.V. Isolamento do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa do jaborandi (*pilocarpus microphyllus*) e avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antiviral, antiesquistosoma e sialogoga. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

MICHAELSEN ET AL. The Effect of Digestion and Drug Load on Halofantrine Absorption from Self-nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS). The AAPS Journal, Vol. 18, No. 1, January 2016.

MORAES J., SILVA M.P., OHLWEILER F.P.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. v. 51, p. 77-82, 2009.

MORAES, J., NASCIMENTO C., LOPES P.O., NAKANO E., YAMAGUCHI L.F., KATO M.J., KAWANO T. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. Exp. Parasitol., v. 127, p. 357-364, 2011.

MORAES J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. Tropical Medicine Book. Rijeka: InTech, 2012.

MORAES ET AL. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. Parasitology Research (1987. Internet) *JCR*, v. 112, p. 603-610, 2013.

MORAES J. Natural products with antischistosomal activity. Review Special Focus Issue: Schistosomiasis. Future Medicinal Chemistry, Vol. 7, No. 6, Pages 801- 20, 2015.

MONTANARI C.A., BOLZANI V.S. *Quim. Nova* 24,p. 105, 2001.

MORGAN J.A.T., DEJONG R.J., SNYDER S.D., MKOJI G.M., LOKER E.S. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. Parasitology, v. 123, p. S221-S228, 2001.

MUEHLMANN L.A., RODRIGUES M.C., LONGO J.P.F., GARCIA M.P., PY-DANIEL K.N.R., VELOSO A.B.S., NARCISO P.E., DA SILVA S.W., AZEVEDO R.B. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. Journal of Nanobiotechnology *JCR*, v. 13, p. 36, 2015.

NEWMAN D.J., CRAGG G.M., SNADER K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J. Nat. Prod., v.66, p. 1022-1037, 2003.

PARAENSE W.L. The schistosome vectores in Americas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 96, p. 7-16, 2001.

PEREIRA ET AL. Hematological and histopathological evaluation of BALB/c and C57BL/6 mice exposed to *Cytoplasmic Repetitive Antigen* and *Flagellar Repetitive*

Antigen recombinant antigens of Trypanosoma cruzi. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 36(6):739-742, nov-dez, 2003.

PIMENTEL ET AL. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, v.43, n.4, 2007.

PIRES L.B. A nanotecnologia na busca do tratamento de doenças através da nanomedicina- Tratamentos eficazes de saúde para as próximas décadas. Universidade Federal da Bahia– Salvador/BA, 2008.

REISS H. Entropy-induced dispersion of bulk liquids. J Colloids Interface. p. 61–70, 1975.

POUTON C.W. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. European Journal of Pharmaceutical Sciences. v.11: S93-S98, 2000.

POUTON C.W., PORTER C.J.H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 60, n. 6, p. 625-637, 2008.

PORTER C.J.H., TREVASKIS N.L., CHARMAN W.N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. Nature reviews | drug discovery volume 6. March, 2007.

REY L. Bases da parasitologia médica. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. P. 424, 2010.

ROCHA J.A. Caracterização molecular e avaliação antibacteriana e antischistosomados alcaloides pilosina, epiisopilosina, isopilosina e macaubina de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew.). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Coordenadoria do Pós-graduação, Universidade Federal do Piauí. Parnaíba 2013.

SANTOS A.P., MORENO P.R.H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 40, p. 115-137, 2004.

SILVA V.G., SILVA R.O., DAMASCENO S.R.B., CARVALHO N.S., PRUDENCIO R.S., ARAGAO K.S., GUIMARÃES M.A., CAMPOS S.A., VERAS L.M.C., GODEJOHANN M., LEITE J.R.S.A., BARBOSA A.L.R., MEDEIROS J.V.R. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. Journal of Natural Products. 76, p. 1071-1077, 2013.

SHAH N.H., CARVAJAL M.T., PATEL C.I., INFELD M.H., MALICK A.W. Selfemulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs. Int J Pharm;106: p. 15–23, 1994.

SIMÕES ET AL. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4 ed. Porto Alegre: Ed. Universitária. p. 651-716, 2002.

NAZZAL ET AL. Preparation and in vitro characterization of a eutectic based semisolid self-nanoemulsified drug delivery system (SNEDDS) of ubiquinone: mechanism and progress of emulsion formation, Int. J. Pharm. v.235 p. 247–265, 2002.

STRICKLEY R.G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. Pharmaceutical research [0724-8741].vol:21 iss:2 p. 201 -230, 2004.

SWENSON E.S., MILISEN W.B., CURATOLO W. Intestinal permeability enhancement: efficacy, acute local toxicity and reversibility. Pharm Res 11:1. p. 32–42, 1994.

SINGH K.K., VINGKAR S.K. Formulation antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine, Int. J. Pharm. 347 ; p. 136–143, 2008.

SOLIMAN ET AL. Novel non-ionic surfactant proniosomes for transdermal delivery of lacidipine: optimization using 23 factorial design and in vivo evaluation in rabbits. Drug delivery. p.1-15, 2016.

TASSIANA F., ANGELA C., HELDER T. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. Acta farmacêutica bonaerense. nº4; vol. 23, 2004.

VERAS L.M., GUIMARÃES M.A., CAMPELO Y.D., VIEIRA M.M., NASCIMENTO C., LIMA D.F., VASCONCELOS L., NAKANO E., KUCKELHAUS S., BATISTA M.C., LEITE J.R., MORAES J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. Curr. Med. Chem. 19:2051-2058, 2012.

VERAS L.M.C., CUNHA V.R.R., GUIMARÃES M.A., VIEIRA M.M., CAMPELO Y.D.M., SAKAIM V.Y., LIMA D.F., CARVALHO JUNIOR P.S., ELLENA J.A., SILVA P.R.P., VASCONCELOS L.C., GODEJOHANN M., PETRILLI H.M., CONSTANTINO V.R.L., MASCARENHAS Y.P., LEITE J.R.S.A. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. *Plos One*. 8: e66702, 2013.

VOIGTLANDER H-W., BALSAM G., ENGELHARDT M., POHL L. Epiisopiloturin, ein neues *Pilocarpus*-Alkaloid. Arch Pharm (Weinheim) 311: 927–935, 1978.

WAKERLY M.G., POUTON C.W, MEAKIN B.J., MORTON F.S. Selfemulsification of vegetable oil-non-ionic surfactant mixtures. ACS Symp Series; p.311:242–55, 1986.

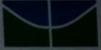
WILSON M.S., MENTINK-KANE M.M., PESCE J.T., RAMALINGAM T.R., THOMPSON R., Wynn T.A. Immunopathology of schistosomiasis. Immunol. Cell Biol., v. 85, p. 148-154, 2007.

WYNN T.A., THOMPSON R.W., CHEEVER A.W., MENTINK-KANE., M.M. Immunopathogenesis of schistosomiasis. Immunol. Rev., v. 201, p.156–167, 2004.

ZANETTI-RAMOS B.G., CRECZYNSKI-PASA T.B. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. Revista Brasileira de Farmácia, v. 89, p.95-101, 2008.

9. ANEXO

Declaração Comitê de Ética



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

Brasília, 2 de dezembro de 2015.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **“DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADOS CONTENDO ALCALOIDES DA CADEIA PRODUTIVA DO JABORANDI (PILOCARPUS MICROPHYLLUS) PARA O TRATAMENTO DE SCHISTOSOMOSE EM MODELOS EXPERIMENTAIS IN VIVO.”**, UnBDoC n.º 143288/2015, sob responsabilidade do Professor João Paulo Figueiró Longo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus*: 80. A presente aprovação é válida pelo período de 01/2016 a 03/2016.



Paula

Profa. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA

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