

4.03.99 - Farmácia.

DESENVOLVIMENTO DE NANODISPERSÕES LARVICIDAS COM FRAÇÕES OBTIDAS DO ÓLEO DE SUCUPIRA (*Pterodon emarginatus* V.)

Ícaro R. Sarquis^{1*}, Jonatas L. Duarte^{1,2}, Rodrigo A.S. Cruz^{1,2}, Raimundo N.P. Souto³, Ricardo M.A. Ferreira³, Edemilson C. da Conceição⁴, José C.T. Carvalho², Anna E.M.F.M. Oliveira^{1,2}, Caio P. Fernandes¹

1. Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica - Faculdade de Farmácia – UNIFAP
icarosarquis@hotmail.com; jonatasdlobato@gmail.com; r.a.s.cruz@gmail.com;
caiofernandes@unifap.br /orientador; annaeliza.maciell@gmail.com
2. Laboratório de Pesquisa em Fármacos – Curso de Farmácia –UNIFAP; jctcarvalho@gmail.com
3. Laboratório de Artrópodes - Universidade Federal do Amapá - Curso de Ciências Biológicas –
rnpssouto@unifap.br; triato.ricardo@hotmail.com
4. Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Bioprodutos – Faculdade de Farmácia -
UFGO; edemilson_conceicao@ufg.com

Resumo:

A espécie *Pterodon emarginatus* pertence à família Fabaceae, é conhecida como Sucupira. De seus frutos é extraído o óleo/resina de Sucupira, este óleo é rico em produtos naturais da classe dos terpenóides, possuindo atividade larvicida reconhecida.

A baixa solubilidade em água dos terpenóides torna a sua viabilidade em formulações aquosas um desafio. Atualmente as nanodispersões demonstram-se promissoras por permitir a incorporação de terpenóides em meio aquoso.

Este trabalho teve o objetivo de obter nanodispersões larvicidas estáveis contendo frações obtidas do óleo de *Pterodon emarginatus*. Foram utilizados métodos cromatográficos para fracionamento do óleo de Sucupira e para obtenção e identificação de uma fração rica em diterpeno isolado..

A fase orgânica da nanodispersão foi composta de uma solução do diterpeno metil 6 α ,7 β -dihidroxivoucapan-17 β -oato em etanol absoluto, sendo adicionado certa quantidade de monoleato de polietileno glicol para compor a fase orgânica. Água previamente aquecida foi adicionada lentamente gota a gota sobre a fase orgânica, agitada em 400 rpm, durante 30 minutos, com posterior retirada do solvente sob pressão reduzida.

A caracterização da nanodispersão quanto a tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta foi realizada, demonstrando estabilidade do sistema. Com a nanoformulação preparada e caracterizada, foram realizados os ensaios biológicos com as larvas do mosquito *Aedes aegypti* onde foi estatisticamente significativa a capacidade do produto desenvolvido de provocar a morte das larvas em uma formulação aquosa.

Autorização legal: Departamento de Pesquisa da Universidade Federal do Amapá sob o nº 23125.003892/2013-12

Palavras-chave: Sucupira ; Nanotecnologia; *Aedes aegypti*.

Apoio financeiro: CNPQ

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UNIFAP.

Introdução:

Os produtos naturais se destacam como grandes fontes de novos recursos terapêuticos desde tempos imemoriais (D'Íppolito et al., 2005) e hoje sabe-se que isso se deve principalmente do metabolismo secundário vegetal, toxinas de animais e microrganismos. As substâncias naturais de maior interesse são comumente denominadas de metabólitos secundários. Eles representam verdadeiras interfaces químicas entre as espécies vegetais e o ambiente circundante (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Diversas propriedades tem sido atribuídas para essas substâncias, como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, anticolinesterásica (Fernandes et al., 2011; Fernandes et al., 2013; Albuquerque et al., 2012) entre outras. Além disso, substâncias de origem natural podem ser úteis no controle de pragas (Rattan, 2010), incluindo no combate a larvas de *Aedes aegypti*.

Dentro do contexto de obtenção de produtos, a nanotecnologia pode ser definida como a ciência e engenharia envolvidos no design, síntese, caracterização e aplicação de

materiais e dispositivos cuja organização funcional se encontra na escala nanométrica (Silva, 2004). Apesar do grande potencial dos metabólitos especiais de plantas, algumas dessas substâncias possuem baixa solubilidade em água. Portanto, a nanotecnologia representa uma área em potencial para o desenvolvimento de produtos a base de produtos naturais, permitindo a otimização de suas atividades, visto que a redução do tamanho de partícula contribui para uma maior estabilidade em água, aumentar a reatividade, dentre outras qualidades (Sylvestre et al, 2011).

Os diterpenos são uma grande classe de terpenóides contendo 20 átomos de carbono (4 unidades de isopreno) (DEWICK, P.M. 2009). Eles podem ser acíclico, bicíclico, tricíclico, tetracíclico, macrocíclico ou variado e foram isolados a partir de várias fontes de (Hanson et al, 2003). O gênero *Pterodon* pertence à família Fabaceae e é nativa do Brasil (Flora do Brasil, 2016). espécies *Pterodon* são comumente conhecidos como sucupira e seus frutos têm uma oleoresina com uma vasta gama de actividades biológicas, incluindo a ação larvicida contra *Aedes aegypti*. Esta actividade foi parcialmente atribuída à diterpenos voucapânicos, que são considerados os principais compostos bioativos de *Pterodon* sp (Hansen et al, 2010; Hoscheid, 2015). As nanodispersões são promissoras para superar problemas, desde proteger uma substância frente a processos de degradação até o melhoramento da biodisponibilidade (BARRIOS, 2010; TAN & NAKAJIMA, 2004). Neste contexto, a nanodispersão seria a forma farmacêutica alternativa e eficiente para a incorporação de terpenóides isolados presentes no óleo de sucupira, já que o preparo de formulação na escala nano é interessante principalmente para substâncias com baixa solubilidade em água (IRACHE et al., 2011). Para melhorar os terpenóides quanto sua dispersão em água, sua biodisponibilidade, e maior estabilidade, a nanodispersão é a forma farmacêutica que representa uma excelente solução (RIBEIRO et al., 2008).

Aedes aegypti é o principal vetor da dengue, uma doença tropical que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Além disso, casos recentes de doenças incomuns transmitidas por este vector surgido, como zika e febre chikungunya (WHO, 2014; Brasil, 2016). Um dos principais problemas dos produtos larvicidas viáveis utilizando terpenóides contar com o facto de que eles

têm uma solubilidade limitada em água. Nesse contexto, a nanotecnologia emergiu como uma área promissora para o desenvolvimento de produtos bioativos viáveis para este fim, incluindo a utilização de compostos naturais tais como terpenóides (Oliveira et al, 2014). estudo recente realizado com oleoresina a partir de frutos de *P. emarginatus* que apresentaram diterpenos em sua composição apresentou uma nanoemulsão larvicida contra esta *Aedes aegypti* (Oliveira et al, 2016).

Sendo assim o presente trabalho teve como o objetivo o fracionamento do óleo de Sucupira, desenvolvimento de uma nanoformulação com o diterpeno isolado do óleo de sucupira, avaliar a estabilidade das nanodispersões obtidas, avaliar a atividade larvicida das nanodispersões obtidas.

Metodologia:

Uma fração de diterpenos anteriormente obtidos a partir de extrato de hexano de frutos de *P. Emarginatus* (Galceran et al, 2011) foi usado para procedimento de isolamento. 3,7 g da fracção diterpeno foi purificada através de cromatografia em coluna utilizando gel de sílica como fase estacionária. A eluição foi realizada com hexano (500 mL), hexano: CHCl₃ (1: 1; 500 mL). CHCl₃ (500 ml), CHCl₃: etanol (1: 1; 500 mL) e etanol (500 mL). Os cristais a partir da fracção etanol foram filtrados e lavados com acetona. A partir do filtrado de acetona, cristalização proporcionou 600 mg do diterpeno vouacapânico.

GCMS-QP2010 (Shimadzu) cromatógrafo de fase gasosa equipado com um espectrómetro de massa utilizando ionização por electrons foi utilizado, de acordo com estas condições experimentais: temperatura do injector, 270 ° C; temperatura do detector, 270 °C; gás de transporte, Hélio; taxa de fluxo 1 mL / min; injeção split com 1:40 razão de separação. A temperatura do forno foi programada de 180 ° C, com um aumento de 10 ° C / min até 270 ° C, terminando com uma isotérmica de 20 minutos a esta temperatura. Um microlitro da amostra, dissolvida em CHCl₃ (1: 100 mg / mL), foi injectado numa coluna RTX-5MS (d.i. = 0,25 mm, comprimento 30 m, espessura da película = 0,25 µm). espectrometria de massa (MS) as condições eram tensão de ionização, 70 eV e velocidade de varredura, uma varredura / s. gama de massa foi m / z 50-750). A identificação foi efectuada por comparação com os dados da literatura e fragmentação proposta.

O nanodispersão com o diterpeno foi

preparada por um método de deslocamento de solvente (Leong et al, 2011),, com algumas modificações. Da solução de 6 α metil, 7 β -dihydroxyvouacapan 17-oato β em etanol absoluto foi preparado a 40 mg / mL. Em seguida, 400 mg de mono-oleato de polietileno glicol 400 foram adicionados a 2 mL da solução de diterpeno e homogeneizados para gerar a fase orgânica. A água pré-aquecida a 80 ° C foi lentamente adicionada à fase orgânica e o sistema foi agitado a 400 rpm durante 30 minutos. A remoção do solvente orgânico foi realizada sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotativo. A adição posterior de água foi executado para restaurar a massa inicial e final de 40 g. A concentração final do diterpeno na nanodispersão foi de 2000 ng / mL. nanodispersão em branco foi preparado sob as mesmas condições, sem utilizar o diterpeno. Nanodispersões foram analisadas imediatamente após a preparação.

A caracterização física da nanodispersão foi realizada utilizando um Zetasizer Nano ZS. Nanodispersão foi diluída com água deionizada (01:25, v / v). As medições de tamanho de gotícula, o índice de polidispersidade e potencial zeta foram realizadas em triplicata. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

O ensaio biológico foi realizada utilizando 4 larvas de *Aedes aegypti*, obtido a partir do Laboratório Arthropoda (UNIFAP, Brasil). As experiências foram realizadas sob condições controladas como se segue: a temperatura da água foi de 25 ± 2 ° C; sala de umidade relativa foi de $75 \pm 5\%$ e 12 h escuro: foi usada ciclo de luz. Todas as experiências foram realizadas em triplicado com 10 larvas em cada repetição (n = 30). As taxas de mortalidade foram registados após cada ciclo (48 h). O grupo tratado foi realizada utilizando diterpeno nanodispersão a 200 ppm (expressos como 6 α metilo, 7 β -dihydroxyvouacapan 17-oato β conteúdo em meio aquoso). Efeito residual foi realizado de acordo com um protocolo publicado anteriormente (Kanis et al, 2012), com algumas modificações. Depois de cada ciclo, o meio aquoso foi filtrado e novas larvas (total de 10 por réplica) foram adicionados. O grupo controle foi constituído por água e de grupo em branco foi constituída por nanodispersão surfactante sem diterpeno.

Análise de variância (ANOVA de duas vias) seguido pelo teste de Tukey foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

A análise por cromatografia gasosa do produto obtido a partir de *P. emarginatus* oleorresina revelou a presença de um sinal com elevada abundância notável em 15,13 min, sugerindo que o isolamento do composto, dentre outros aspectos da análise no CG.

Preparação nanodispersão com o metil 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oato foi realizada pelo método de deslocamento de solvente. A distribuição de tamanho de partícula de nanodispersão à base de diterpeno e nanodispersão em branco (sem diterpeno) foram avaliadas.

Nanodispersões vazias apresentaram tamanho médio de gotículas inferior ($186,8 \pm 4,62$ nm), quando comparado com nanodispersões com diterpeno ($445,3 \pm 6,07$ nm). No entanto, a nanodispersão contendo o diterpeno apresenta mais estreito índice de polidispersão. Valores de 0,500 para PDI estão associados à distribuição relativamente ampla (Cheong et al, 2008). Potencial Zeta de ambos as nanodispersões foram negativos, sendo o valor observado para o diterpeno nanodispersão superior (no módulo). Fisicamente nanodispersões aquosas estáveis estão associados ao potencial zeta mais baixo do que -30 mV (Kelman et al, 2007).

A atividade larvicida residual após o tratamento com nanodispersão aquosa preparada com metil 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oato (200 ppm expressos como diterpeno conteúdo em meio aquoso) isolado a partir da oleorresina de *P. Emarginatus* obtida dos frutos. Após o primeiro ciclo, foi observado um nível mais elevado de mortalidade para o grupo tratado ($40,0 \pm 8,2\%$), seguido pelo grupo do branco ($20,0 \pm 14,1\%$), enquanto quase nenhuma mortalidade foi observada no grupo de controle ($3,33 \pm 4,7\%$). Em seguida, foi observado aumento do nível de mortalidade para o grupo tratado, atingindo um máximo após o segundo ciclo ($56,67 \pm 17,0\%$). Esse resultado apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos em branco e controle ($p < 0,0001$), que apresentou quase nenhuma mortalidade. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de mortalidade de grupos em branco ($P > 0,05$) do segundo ciclo de controle e ao final do experimento ($p > 0,05$). Depois terceiro ciclo, foi observada uma ligeira diminuição do nível de mortalidade para o grupo tratado, que atingiu $53,3 \pm 4,7\%$ ($p < 0,0001$). Em seguida, foi observada maior diminuição, atingindo $26,67 \pm 24,9\%$ depois do quarto ciclo ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística significativa no nível de mortalidade de grupo tratado após o quinto ciclo ($23,33 \pm 12,5\%$), quando comparados ao grupo controle

Resultados e Discussão:

e em branco ($p > 0,05$).

Conclusões:

Estudos detalhados de fragmentação dos diterpenos têm sido negligenciados na maioria das pesquisas anteriores do gênero *Pterodon*. O presente estudo realizou uma investigação crítica sobre a fragmentação, provando ser uma ferramenta valiosa para a correta identificação e, além disso, o fragmento chave devido a um mecanismo de retro Diels-Alder atribuído. Esta reação é considerada muito importante para a análise terpenóides e pode ser útil para estudos posteriores com diterpenos vouacapânicos. Também apresentamos um método de baixo custo e ecoamigável usando um "solvente-verde" para gerar nanodispersões viáveis com um diterpeno de *P. emarginatus*. Observou-se o tamanho médio de gotículas satisfatório, índice de polidispersibilidade e potencial zeta, o que sugere que o método foi capaz de gerar de forma satisfatória a nanodispersão. Considerando que apresentou atividade residual, de libertação controlada do presente composto natural larvicida pode ser envolvido e, portanto, pode ser útil para os programas de controle contra o *Aedes aegypti*, o vetor principal de doenças tropicais.

Referências bibliográficas

BARRIOS, J. G. **Desenvolvimento e caracterização de suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno com diferentes núcleos oleosos**. 2010. 104f. Dissertação, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria –RS. 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. Secretária de vigilância em saúde, v. 47, n. 8. 2016.

CHEONG, J. N.; TAN, C. P.; MAN, Y. B. C.; MISRAN, M. α -tocopherol nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **Journal of Food Engineering**, 2008, 89, 204-209.

D'IPPOLITO, JAC; ROCHA, LM; DA SILVA, RF; **Fitoterapia Magistral – Um guia prático para a manipulação de fitoterápicos**, 194p. 2005.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products – A biosynthetic approach**, 3 ed; John Wiley e Sons, Chichester, 2009.

GALCERAN, C. B.; SERTIE, J. A. A.; LIMA, C. S.; CARVALHO, J. C. T. Anti-inflammatory and analgesic effects of $6\alpha,7\beta$ -dihydroxy-vouacapan-17 β -oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits. **Inflammopharmacol**, 2011, 19, 139-143

GOBBO-NETO, LNP. **Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários**. Química Nova. 30: 374-381. 2007.

FERNANDES, CP; CORRÊA; AL; CRUZ, RAS; **Anticholinesterasic activity of Manilkara subsericeae (Mart.) Dubard triterpenes**. Latin American Journal of Pharmacy 30: 1631 – 1634. 2011.

FERNANDES, CP et al; **Triterpene esters and biological activities from edible fruits of Manilkara subsericea (Mart.) Dubard, Sapotaceae**. Biomed Res Int. 2013

FERNANDES, CP et al; **Development of an insecticidal nanoemulsion with Manilkara subsericeae (Sapotaceae) extract**. Journal of Nanobiotechnology, 12:22. 2014

Pterodon in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB29840>. Accessed on: 10 Jul. 2016.

HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of 'sucupira' (*Pterodon* spp.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2010, 46, 607-616.

HANSON, J. R. **Diterpenoids**. *Nat Prod Rep*, 2003, 20, 70-78.

HOSCHIED, J.; CARDOSO, M. L. C. Sucupira as a potential plant for arthritis treatment and other diseases **Arthritis**, 2015, Article ID 379459, 12 pages.

Kelmann, R. G.; Kuminek, G.; Teixeira, H. F.; Koester, L. S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, 342, 231-239. 2007.

Leong, W. F.; Lai, O. M.; Long, K.; Man, Y. B. C.; Misran, M.; Tan, C. P. Preparation and characterization of water-soluble phytosterol nanodispersions. **Food Chemistry**, 2011, 77-83.

IRACHE, J. M.; et al. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Veterinary Parasitology**. v. 180. p. 47-71. 2011.

RATTAN, RS; **Mechanism of action of insecticidal secundar metabolites of plant origin**. **Crop Protection**. 29: 913-920. 2010.

RIBEIRO, H. S.; et al. Preparation of nanodispersions containing b-carotene by solvent displacement method. **Food Hydrocolloids**. v. 22. p. 12-17. 2008.

SILVA, GA; **Introduction to nanotechnology and its applications to medicine**. **Surgical Neurology**. 61: 2016-220. 2004.

SYLVESTRE, JP; **Nanonization of megestrol acetate by laser fragmentation in aqueous milieu**. *Journal of Controlled Release* 149: 273-280. 2011.

TAN, C.P; NAKAJIMA, M. β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**. v. 92, p. 661-671. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2. **A global brief on vector-borne diseases**. Geneva, Switzerland. 2014.

Oliveira, J. L.; Campos, E. V. R.; Bakshi, M.; Abhilash, P. C.; Fraceto, L. F. **Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises**. **Biotechnology Advances**, 2014, 32, 1550-1561.

Oliveira, A. E. M. F. M.; Duarte, J. L.; Amado, J. R. R.; Cruz, R. A. S.; Rocha, C. F.; Souto, R. N. P.; Ferreira, R. M. A.; Santos, K.; Conceição, E. C.; Oliveira, L. A. R.; Kelecom, A.; Fernandes, C. P.; Carvalho, J. C. T. **Development of a larvicidal nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel oil**. *Plos One*, 2016.