



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANDRÉ LUIZ NASCIMENTO DE SOUSA

NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE *CALOTROPIS PROCERA*
CONTENDO ÁCIDO BETULÍNICO PARA APLICAÇÃO CONTRA CÂNCER DE
PRÓSTATA

FORTALEZA

2025

ANDRÉ LUIZ NASCIMENTO DE SOUSA

NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE *CALOTROPIS PROCERA* CONTENDO ÁCIDO
BETULÍNICO PARA APLICAÇÃO CONTRA CÂNCER DE PRÓSTATA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal do Ceará,
como requisito à obtenção do título de Doutor
em Química.

Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes
Silva Ricardo.

Coorientadora: Dra. Louhana Moreira Rebouças

FORTALEZA

2025

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

1. Ácido graxo. 2. Nanotecnologia. 3. Efeito Citotóxico. 4. Liberação Controlada de Fármaco. I. Título.
CDD 540

ANDRÉ LUIZ NASCIMENTO DE SOUSA

NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE *CALOTROPIS PROCERA* CONTENDO ÁCIDO
BETULÍNICO PARA APLICAÇÃO CONTRA CÂNCER DE PRÓSTATA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: 13/07/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Sandra de Aguiar Soares
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Antonia Flavia Justino Uchoa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Larissa Moraes Ribeiro da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais (*In memoriam*), à minha esposa
Wilsa, ao meu filho Rafael e à minha filha,
Nayara.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À minha esposa, Wilsa, por todo o apoio nos momentos mais difíceis que exigiram minha ausência para tratar da pesquisa.

A Prof.^a Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo e à Dra. Louhana Moreira Rebouças pela excelente orientação.

Aos meus colegas de turma do Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LABPIM), especialmente ao Marlon Lemos, pela relevante colaboração nesta pesquisa.

Aos professores da banca examinadora, Sandra, Nilce, Flávia e Larissa, pelas importantes recomendações.

RESUMO

Uma grande dificuldade do uso de drogas convencionais no tratamento de câncer está relacionada à sua hidrofobicidade em sistemas biológicos. Uma alternativa para contornar esse problema é o encapsulamento de fármacos por meio da nanotecnologia, a exemplo das nanoemulsões. Neste trabalho, foi desenvolvida uma formulação de nanoemulsão óleo em água à base de óleo das sementes de *Calotropis procera* contendo ácido betulínico (BA), para aplicação contra câncer de próstata. Foi realizada a caracterização físico-química do óleo de *C. procera*, por meio da determinação do seu índice de viscosidade, índice de iodo, índice de acidez e índice de saponificação. Também foi realizado estudo da estabilidade coloidal da nanoemulsão formulada, por meio da avaliação do tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão e quantificação do ativo, cujos resultados mostraram que a nanoemulsão produzida apresentou-se estável às temperaturas de 25 °C e a 45 °C durante 90 dias. Os componentes da nanoemulsão (óleo de *C. procera*, ácido betulínico e Pluronic F127) foram caracterizados por FTIR e RMN. A viabilidade celular de linhagens tumorais foi avaliada por meio do teste MTT. Testes de toxicidade *in vivo* foram realizados em um modelo de peixe-zebra. A cinética e mecanismos de liberação foram avaliados através de testes de liberação *in vitro*. A nanoemulsão mostrou alta capacidade de carregamento de BA (7500 µg/mL), estabilidade termodinâmica e alta eficiência de encapsulação (99,98 %). Os testes em peixe-zebra, revelaram que a nanoemulsão não alterou a atividade locomotora e não apresentou toxicidade aguda em 96 h de administração oral. No teste de liberação *in vitro* de 72 h, apresentou liberação controlada pelo modelo Higuchi, liberando 31,33 % (622,80 µg) de BA de forma controlada. A formulação NE-F2.2 apresentou atividade citotóxica para todas as linhagens de células tumorais, sendo mais expressiva a inibição para as células de PC3 (carcinoma de próstata humano) com IC₅₀ de 4,6 a 6,2 µg/mL e > 75 µg/mL para fibroblastos. Portanto, a formulação proposta mostrou-se estável diante dos testes de estabilidade, segurança biológica e liberação controlada de BA, mostrando-se promissora como medicamento antitumoral, especificamente câncer prostático.

Palavras-chave: Ácido graxo. nanotecnologia; efeito citotóxico; liberação controlada de fármaco.

ABSTRACT

A major difficulty in using conventional drugs in cancer treatment is related to their hydrophobicity in biological systems. An alternative to overcome this problem is the encapsulation of drugs through nanotechnology, such as nanoemulsions. In this work, an oil-in-water nanoemulsion formulation based on *Calotropis procera* seed oil containing betulinic acid (BA) was developed for use against prostate cancer. The physicochemical characterization of *C. procera* oil was performed by determining its viscosity index, iodine value, acidity value and saponification index. A study of the colloidal stability of the formulated nanoemulsion was also carried out by evaluating the particle size, zeta potential, polydispersity index and quantification of the active ingredient. The results showed that the produced nanoemulsion was stable at temperatures of 25 °C and 45 °C for 90 days. The components of the nanoemulsion (*C. procera* oil, betulinic acid and Pluronic F127) were characterized by FTIR and NMR. The cell viability of tumor cell lines was evaluated by the MTT test. In vivo toxicity tests were performed in a zebrafish model. The release kinetics and mechanisms were evaluated by in vitro release tests. The nanoemulsion showed high BA carrying capacity (7500 µg/mL), thermodynamic stability and high encapsulation efficiency (99.98%). Tests in zebrafish revealed that the nanoemulsion did not alter locomotor activity and did not present acute toxicity within 96 h of oral administration. In the 72-h in vitro release test, it presented controlled release by the Higuchi model, releasing 31.33% (622.80 µg) of BA in a controlled manner. The NE-F2.2 formulation showed cytotoxic activity for all tumor cell lines, with the most expressive inhibition for PC3 cells (human prostate carcinoma) with IC₅₀ of 4.6 to 6.2 µg/mL and > 75 µg/mL for fibroblasts. Therefore, the proposed formulation proved to be stable in the tests of stability, biological safety and controlled release of BA, showing promise as an antitumor drug, specifically prostate cancer.

Keywords: fatty acid; nanotechnology; cytotoxic effect; controlled drug release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Levantamento bibliográfico dos trabalhos envolvendo <i>Calotropis procera</i>	22
Figura 2	– Estruturas moleculares de a) betulina (BE) b) ácido betulínico (BA)	23
Figura 3	– Tipos de emulsão classificadas por suas fases dispersas e contínuas (a) dispersão óleo em água (o/a) (b) dispersão água em óleo (a/o) (c) dispersão água em óleo em água (a/o/a) (d) dispersão óleo em água em óleo (o/a/o)	28
Figura 4	– Mecanismos de desestabilização de nanoemulsões	31
Figura 5	– Estrutura do Pluronic F127	34
Figura 6	– Janela terapêutica farmacológica	35
Figura 7	– Ilustração da planta <i>C. procera</i>	39
Figura 8	– Esquema de obtenção do óleo de <i>Calotropis procera</i>	44
Figura 9	– Esquema de preparo da nanoemulsão contendo o ácido betulínico	49
Figura 10	– Percentual de óleo extraído e índice de acidez versus tempo de extração ..	60
Figura 11	– Espectro de FTIR do óleo de <i>Calotropis procera</i>	62
Figura 12	– Espectro de FTIR do ácido betulínico	64
Figura 13	– Espectro de RMN ¹ H do ácido betulínico	65
Figura 14	– Espectro de RMN de ¹³ C do ácido betulínico	66
Figura 15	– Formulações versus tamanho de partícula	68
Figura 16	– Aparência das 9 nanoemulsões após o teste de estresse	69
Figura 17	– Formulações versus índice de polidispersão	70
Figura 18	– Formulações versus valores de potencial zeta para as formulações	71
Figura 19	– Curva de calibração para o ácido betulínico	74
Figura 20	– Curvas de FTIR do ácido betulínico (AB), do óleo de <i>Calotropis procera</i> (OCP), do branco da nanoemulsão F2.2 (BR F2.2) e da nanoemulsão F2.2 (NANO F2.2)	77
Figura 21	– Tamanho de partícula, PDI e valores de potencial zeta a 25 °C e 45 °C por 90 dias	79
Figura 22	– Gráfico do percentual cumulativo de liberação da droga em 72 h	80

Figura 23 – Avaliação do efeito de NE-F2.2 em zebrafish adulto no teste de campo aberto	83
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Mecanismos de desestabilização de nanoemulsões	31
Tabela 2	– Mecanismo de liberação de ativos seguindo o modelo de Korsmeyer-Peppas	38
Tabela 3	– Métodos de análise para determinação de propriedades físicas	46
Tabela 4	– Formulações para determinação da condição ideal de obtenção das emulsões do óleo de <i>Calotropis procera</i> com Pluronic F127	47
Tabela 5	– Composição das formulações projetadas para escolha da melhor combinação de óleo de <i>C. procera</i> e de Pluronic F127	47
Tabela 6	– Composição da nanoemulsão contendo o ativo e controle	50
Tabela 7	– Avaliação da variação dos rendimentos de extração e índices de acidez do óleo das sementes de <i>Calotropis procera</i> para diferentes tempos de extração e extração a frio com hexano	59
Tabela 8	– Composição percentual da massa dos ácidos graxos no óleo de <i>Calotropis procera</i> e comparação com dados da literatura	61
Tabela 9	– Propriedades físico-químicas do óleo de <i>Calotropis procera</i> e comparação com o óleo de outras espécies de plantas	63
Tabela 10	– Atribuições das principais bandas de transmitância no infravermelho para o ácido betulínico	65
Tabela 11	– Dados dos espectros de RMN ¹ H para o ácido betulínico	66
Tabela 12	– Dados dos espectros de RMN ¹³ C para o ácido betulínico	67
Tabela 13	– Resultados de LD e LQ a partir do coeficiente angular e do desvio do intercepto	75
Tabela 14	– Parâmetros cinéticos de liberação para o ácido betulínico em nanoemulsão	81
Tabela 15	– Resultado do IC ₅₀ em PC3 e L929 por meio do ensaio MTT	82
Tabela 16	– Resultado dos testes de toxicidade aguda das amostras NE-F2.2 e veículo, contra Peixe-zebra adulto	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Ácido betulínico
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
F2.2	Nanoemulsão com ácido betulínico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial de Saúde
O/A	Nanoemulsão de óleo em água
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
CGMS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
pH	Potencial hidrogeniônico
CE	Ceará
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético
PA	Para análise
BHL	Balanco hidrofílico lipofílico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CCD	Cromatografia de camada delgada
EI	Ionização por eletron
ATR	Refletância Total Atenuada
AOCS	American Oil Chemist's Society
ELD	Espalhamento de Luz Dinâmico
UV-VIS	Ultravioleta visível
MMQO	dos mínimos quadrados ordinários
ANOVA	Análise de variâncias
LQ	Limite de quantificação
LD	Limite de detecção
PDI	Índice de Polidispersão
PBS	Phosphate Buffered Saline

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	Câncer de próstata	18
3.2	Ácido Betulínico	22
3.3	Nanoemulsões	27
3.3.1	<i>Preparo de Nanoemulsões</i>	<i>28</i>
3.3.2	<i>Estabilidade das Nanoemulsões</i>	<i>29</i>
3.3.3	<i>Problemas de Estabilidade encontrados no desenvolvimento de nanoemulões</i>	<i>30</i>
3.4	Pluronic F127	33
3.5	Liberação controlada de fármacos e bioativos	34
3.5.1	<i>Modelo cinético de liberação de ordem zero</i>	<i>36</i>
3.5.2	<i>Modelo cinético de liberação de primeira ordem</i>	<i>37</i>
3.5.3	<i>Modelo de Higuchi</i>	<i>37</i>
3.5.4	<i>Modelo de Korsmeyer-Peppas</i>	<i>37</i>
3.6	Bioatividade de <i>C. procera</i>	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	Matérias-primas e reagentes	42
4.2	Linhagens celulares	42
4.3	Equipamentos	42
4.4	Extração e caracterização do óleo da <i>C. procera</i>	43
4.4.1	<i>Extração do óleo de <i>C. procera</i></i>	<i>43</i>
4.4.1	<i>Otimização da extração do óleo de <i>C. procera</i></i>	<i>44</i>
4.5	Perfil de ácidos graxos do óleo de <i>C. procera</i>	44
4.5.1	<i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	<i>44</i>
4.5.2	<i>Determinação da viscosidade dinâmica e densidade</i>	<i>45</i>

4.5.3	<i>Determinação dos índices de acidez, saponificação e iodo</i>	45
4.6	Caracterização do ácido betulínico	46
4.6.1	<i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para o BA</i>	46
4.6.2	<i>Ressonância Magnética Nuclear – RMN 1H e RMN 13C</i>	46
4.7	Desenvolvimento da formulação das nanoemulsões	46
4.7.1	<i>Estabelecimento dos parâmetros para preparação</i>	46
4.7.2	<i>Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta</i>	48
4.7.3	<i>Estresse mecânico</i>	48
4.8	Preparo e caracterização das nanoemulsões contendo ácido betulínico ...	48
4.8.1	<i>Método de obtenção da nanoemulsão com ativo</i>	49
4.8.2	<i>Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta</i>	50
4.8.3	<i>Quantificação do ativo</i>	50
4.8.4	<i>Preparo da amostra</i>	50
4.8.5	<i>Condições cromatográficas</i>	50
4.8.6	<i>Preparo dos padrões</i>	51
4.8.7	<i>Validação do método analítico</i>	51
4.8.7.1	<i>Linearidade</i>	51
4.8.7.2	<i>Limite de quantificação e limite de detecção</i>	51
4.8.7.3	<i>Seletividade</i>	52
4.8.7.4	<i>Recuperação</i>	52
4.8.7.5	<i>Repetibilidade</i>	53
4.9	Eficiência de encapsulação	53
4.10	Estudo de estabilidade coloidal	53
4.11	Caracterização das nanoemulsões por FTIR	54
4.12	Testes de segurança não clínica <i>in vivo</i> em peixe-zebra	54
4.12.1	<i>Animais</i>	54
4.12.2	<i>Teste de campo aberto</i>	55
4.12.3	<i>Toxicidade aguda</i>	55
4.13	Estudo cinético de liberação <i>in vitro</i>	57
4.14	Avaliação do potencial citotóxico <i>in vitro</i>	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Extração e caracterização do óleo de <i>C. procera</i>	59

5.1.1	<i>Perfil dos ácidos graxos do óleo de C. procera</i>	60
5.1.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	61
5.1.3	<i>Análise físico-química do óleo de C. procera</i>	62
5.2	Caracterização do ácido betulínico	64
5.2.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	64
5.2.2	<i>Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C</i>	65
5.3	Desenvolvimento da formulação das nanoemulsões	67
5.4	Caracterização da nanoemulsão NE-F2.2	72
5.4.1	<i>Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C</i>	72
5.4.2	<i>Potencial zeta</i>	73
5.4.3	<i>Quantificação do ativo</i>	73
5.4.4	<i>Validação do método de quantificação do ácido betulínico</i>	73
5.4.5	<i>Seletividade</i>	73
5.4.6	<i>Linearidade</i>	73
5.4.7	<i>Limite de quantificação e limite de detecção</i>	74
5.4.8	<i>Recuperação</i>	75
5.4.9	<i>Repetibilidade</i>	75
5.5	Aplicação do método validado na quantificação do ativo nas formulações	75
5.5.1	<i>Eficiência de encapsulação</i>	76
5.6	Caracterização da nanoemulsão por FTIR	76
5.7	Estabilidade coloidal	77
5.8	Estudo cinético de liberação <i>in vitro</i>	79
5.9	Avaliação do potencial citotóxico <i>in vitro</i>	81
5.10	Segurança não-clínica <i>in vivo</i>	83
6	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO	98
	APÊNDICE B – CARTA PATENTE CONCEDIDA	99

1 INTRODUÇÃO

Segundo o levantamento do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2023), ocorreram 19,3 milhões de novos casos de câncer no mundo em 2020 e esse número poderá chegar a 28,4 milhões em 2040, um aumento de 47%. A literatura aponta que 20% dos indivíduos terão câncer durante a vida, sendo que 60% de todos os casos são representados pelos dez principais tipos de câncer: câncer pele não melanoma, cânceres de mama, pulmão, colo e reto, próstata, estômago, cavidade oral, colo do útero, fígado e pâncreas (SUNG *et al.*, 2021; INCA, 2023). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2020) o câncer é uma das principais causas de morte nas américas, tendo causado 1,2 milhões de mortes em 2008, com previsão de aumento para 2,1 milhões em 2030.

Considerando todos esses impactos, têm-se intensificado os esforços da ciência para aperfeiçoar ou desenvolver produtos eficazes no combate à doença. Existem vários tratamentos para o câncer, sendo os principais a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia e a hormonioterapia (ONCOGUIA, 2023).

Dentre os métodos utilizados contra as neoplasias, destacamos a quimioterapia, método de tratamento em que o paciente é medicado, cuja administração pode ser feita via oral, injetável ou de forma tópica. Estes medicamentos destroem as células cancerígenas, entretanto, não apenas as células doentes são eliminadas, mas as saudáveis também. Isso acarreta vários efeitos adversos como queda de cabelo, vômitos, náuseas e queda da imunidade (ONCOFISIO, 2023).

Os efeitos indesejáveis provenientes do tratamento sistêmico do câncer com medicamentos têm sido objeto de estudo de pesquisadores na busca por produtos mais seletivos, que sejam direcionados a alvos específicos e de forma controlada. A doxorubicina, por exemplo, usada no tratamento de diversos carcinomas, como de mama, pulmão, bexiga, tireóide e ovário, exige prescrição e monitoramento por equipe médica e de enfermagem treinadas, pois seus efeitos colaterais incluem diminuição das células de defesa e de plaquetas, anemia e queda de cabelo; além disso, as doses desse medicamento são cumulativas e podem afetar o músculo cardíaco (SOARES e RUTKOWSKI, 2025). Outros agentes quimioterápicos conhecidos, como o 5- fluoruracil, a cisplastina, a vinblastina, a bleomicina e a ciclofosfamida, também apresentam efeitos colaterais associados à cardiotoxicidade (KARAKULAK *et al.*, 2016).

Portanto, drogas mais seletivas, como o ácido betulínico, têm despertado a atenção de pesquisadores como alternativas aos fármacos tradicionais usados nas terapias anticâncer (PISHA *et al.*, 1995).

O ácido betulínico é um triterpeno pentacíclico de fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$, encontrado principalmente na casca de eucalipto (*Betula alba* L.), bastante promissor como agente anticâncer. Esta substância foi inicialmente testada com sucesso em células cancerígenas de melanoma com indução de apoptose e posteriormente teve sua ação confirmada contra câncer em linhas celulares de mama, cólon, pulmão, pâncreas, ovário, neuroblastoma e osteosarcoma (ZHANG; HU; CHEN, 2016; KUMAR *et al.*, 2018).

Além da ação confirmada contra câncer em diversos tipos de células, o ácido betulínico mostrou-se seletivo à células doentes, induzindo a morte de neuroblastomas e meduloblastomas enquanto as células sadias de neurônios de murinos se apresentaram indiferentes à sua presença, o que sugere a seletividade desse ativo (FULDA, 2008).

Entretanto, este composto apresenta certas limitações no que tange à sua baixa solubilidade em meio aquoso ($0,02 \mu\text{g/mL}$), restringindo sua aplicação em sistemas biológicos.

No entanto, o uso de nanotecnologia para o tratamento do câncer com drogas de alta eficiência tem sido amplamente estudado (G. Sousa & Rocha, 2020) e sistemas nanométricos como as nanoemulsões têm sido apresentadas como solução à problemática relacionada a fármacos hidrofóbicos (JÄGER *et al.*, 2007; DEHELEAN *et al.*, 2011).

Nanoemulsões são dispersões coloidais com tamanho de partícula entre 10 e 1.000 nm que apresentam instabilidade termodinâmica. Sua formação se dá pela união de dois líquidos imiscíveis, onde o líquido disperso encontra-se na forma de pequenas gotículas, sendo o uso de tensoativos o meio usado para sua estabilização (JAISWAL *et al.*, 2015).

A fase em maior quantidade representa a fase contínua e a de menor quantidade a fase dispersa. Denomina-se nanoemulsão de óleo em água (O/A) aquela em que a fase contínua é a água e a dispersa é o óleo, cuja emulsificação é favorecida quando o tensoativo principal utilizado é hidrofílico.

Com o intuito de estabilizar as nanoemulsões, os copolímeros vêm sendo utilizados como tensoativos por apresentarem segurança na preparação de fármacos e cosméticos. Destaca-se nesse grupo de compostos químicos os Plurônicos, aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) por não serem tóxicos. Eles são constituídos por um bloco central lipofílico de poli (óxido de propileno) (Pm) e por extremidades hidrofílicas formadas por blocos de poli (óxido de etileno) (En) (GIOFFREDI *et al.*, 2016). Um exemplo importante desses compostos é o Pluronic F127, um copolímero tribloco de fórmula molecular $E_{98}P_{67}E_{98}$, que além de não tóxico, seu tamanho o impede de ser controlado por macrófagos, o que aumenta seu tempo de permanência no sangue (LIN *et al.*, 2018).

Dentre os sistemas nanométricos usados, as nanoemulsões de óleo em água (O/A) são importantes mecanismos de entrega de ativos hidrofóbicos com potencial uso no tratamento antineoplásico. O nanocarreamento favorece a absorção, cinética de liberação e aumento do tempo de ação do fármaco melhorando sua estabilidade e efeito clínico (Aghapour *et al.*, 2018). Outras vantagens dos nanosistemas para carreamento de fármacos são os baixos efeitos colaterais, longa capacidade de liberação, ampliação da permeabilidade e direcionamento do fármaco melhorando sua eficácia (QIU *et al.*, 2022). Nesta perspectiva, o encapsulamento do AB em nanoemulsões por promover liberação controlada pode aumentar a seletividade antitumoral do AB.

Para o preparo de nanoemulsões a fim de carrear ativos hidrofóbico faz-se necessário a solubilização prévia do fármaco na fase oleosa, seguida de sua dispersão na fase aquosa. É comum o uso de óleos com ou sem atividade biológica para compor a fase oleosa de nanoemulsões.

C. procera, é uma planta exótica, de extensa distribuição geográfica no mundo, notadamente em regiões semiáridas como o Nordeste do Brasil, possuindo diferentes nomes populares, dentre eles, bombardeira, flor de seda, flor de sodoma (Melo *et al.*, 2001). É uma planta bem comum em áreas degradadas, que se adapta com facilidade em variadas condições ambientais, sendo resistente a solos com poucos nutrientes e a períodos longos de estiagem (Fabricante *et al.*, 2013). As sementes do fruto dessa espécie vegetal apresentam um teor de óleo de 22% (SULAIBI *et al.*, 2020), podendo chegar a 25,6%, dependendo de quão alta for a média mensal de temperaturas da região de cultivo (BARBOSA *et al.*, 2014).

O óleo das sementes de *C. procera* tem ação farmacológica comprovada, com atividade antimicrobiana e antibacteriana (WADHWANI *et al.*, 2021). O óleo fixo da semente apresenta também potentes atividades anti-inflamatórias e imunomoduladoras *in vivo* através da modulação de citocinas inflamatórias (METTWALLY *et al.*, 2022).

As potentes atividades biológicas do óleo da semente para o tratamento de inflamações e/ou doenças inflamatórias associadas (como infecções parasitárias), além de sua atividade imunomoduladora o tornam um candidato promissor para a formulação de nanoemulsões com ácido betulínico e Pluronic F127 para aplicação em terapias antineoplásicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Encapsular o ácido betulínico em nanoemulsões, contendo o óleo de *C. procera* como fase oleosa e o Pluronic F127 como proposta de formulação antitumoral.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Extrair o óleo da semente de *C. procera* e caracterizá-lo;
- ✓ Caracterizar o ácido betulínico;
- ✓ Realizar um estudo de desenvolvimento de formulação de nanoemulsão;
- ✓ Preparar nanoemulsões contendo óleo de semente de *C. procera* e ácido betulínico;
- ✓ Caracterizar a nanoemulsão;
- ✓ Validar um método para a quantificação do ácido betulínico na formulação;
- ✓ Determinar a Eficiência de Encapsulação da nanoemulsão;
- ✓ Realizar um estudo de estabilidade coloidal;
- ✓ Realizar estudo de citotoxicidade *in vivo* em peixe-zebra;
- ✓ Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* contra a linhagem celular não tumoral L-929 (fibroblastos de murino) e contra as linhagens celulares tumorais HCT-116 (carcinoma colorretal), SNB-19 (glioblastoma) e PC-3 (carcinoma de próstata).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer de próstata

O câncer de próstata (CaP) é a segunda principal causa de mortes relacionada a câncer no mundo todo, depois do câncer de pele (ZHOU; SONG; GIUBELLINO, 2019), sendo a malignidade mais comum diagnosticada em homens nos países desenvolvidos (G. HUANG *et al.*, 2022) e responsável por 29% dos diagnósticos de câncer registrados. Esse tipo de câncer está em crescimento, com a maioria dos novos casos e mortes, em países de renda baixa e média, os quais registraram 650.195 novos casos e 237.032 mortes, em 2020. Um prognóstico apontado por (KITSON-MILLS *et al.*, 2025) mostra que o número de diagnósticos em homens dobrará de 2020 a 2040, passando de 1.4 para 2.9 milhões.

Segundo (KAVUMA *et al.*, 2023) as maiores dificuldades no controle da doença incluem a falta de conscientização, programas direcionados a rastreamento, baixo acesso a serviços de patologia e má acompanhamento de dados. Essa realidade requer iniciativas que possibilitem a melhoria da qualidade de vida dos pacientes, como a detecção precoce, diagnósticos mais precisos, oportunidades de tratamento e acompanhamento ideal.

Segundo (KITSON-MILLS *et al.*, 2025), dentre as opções disponíveis em países de renda baixa e média para tratamento de câncer de próstata citam-se a terapia hormonal, a radioterapia por feixe externo, a braquiterapia e a prostatectomia retro púbica radical.

A resposta ao tratamento e o estágio da doença definem o tipo de câncer. A terapia hormonal é um dos tratamentos mais comuns, que tem como objetivo a redução dos hormônios masculinos no corpo. Andrógenos agem estimulando o crescimento das células tumorais e, a redução desses hormônios no corpo pode levar à redução do tamanho dos tumores ou induzi-los a um crescimento mais lento. Entretanto, a hormonioterapia não cura o câncer de próstata e, quando resistente a esse tratamento, é chamado de câncer de próstata resistente à castração (CRCP).

A hormonioterapia pode ser indicada em situações em que, o tumor está em fase de metástase, não sendo possível operar a glândula nem fazer radioterapia, quando o paciente já passou por cirurgia ou mesmo radioterapia e ainda assim o câncer entrou em recidiva, em conjunto com radioterapia, nos casos em que o paciente tem alto risco de recidiva após esse tratamento, ou ainda, antes da radioterapia, para tentar reduzir o tamanho do tumor e aumentar a eficácia do tratamento.

Um sinal de que um paciente possui um tumor resistente à castração é quando o exame de Antígeno Prostático Específico (PSA) apresenta níveis progressivamente elevados e baixos níveis de testosterona, devendo haver mudança na estratégia de tratamento.

Conforme as características clínicas de cada paciente, existem algumas alternativas de tratamento. Em 2020 foi aprovado no Brasil, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) o uso da darolutamida (Nubeqa®), um bloqueador androgênico que é usado no tratamento de câncer resistente à castração não metastático. Outros antiandrogênicos como a apalutamida e enzalutamida são usados, entretanto, esses medicamentos apresentam graves efeitos colaterais.

Segundo (J. Wang *et al.*, 2025) a maioria dos cânceres de próstata se desenvolvem lentamente, são indolores e curáveis, apesar disso, o CRCP é a causa primária e terminal da mortalidade do paciente. A maioria desse tipo de câncer inicia como adenocarcinoma, o mais comum dos CaP (90%), e alguns evoluem, após longos períodos de hormonioterapia, para o câncer de próstata neuroendócrino (NEPC), um tipo raro de câncer de próstata (1% dos casos diagnosticados) e agressivo, sem tratamento eficaz até o momento. O NEPC mostra-se resistente à terapia hormonal na maioria das vezes, sendo a quimioterapia à base de platina, o tratamento padrão adotado, mas com péssimo prognóstico. Huang e colaboradores (2022) alertam que, desde o diagnóstico até a morte, o tempo de vida dos pacientes com NEPC é de apenas, 7 meses.

Uma das formas mais econômicas de tratamento do câncer é a radioterapia. Entretanto, algumas questões acabam dificultando a condução dessa terapia em muitos países. Para (KAVUMA *et al.*, 2023), a radioterapia, continua sendo um impedimento, como consequência de número reduzido de funcionários, equipamentos e infraestrutura treinados, embora haja uma alta demanda. Segundo dados do Diretório de Centros de Radioterapia da Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), o número de unidades de radioterapia de feixe externo por milhão de habitantes é de aproximadamente 0,1 para Uganda, 0,4 para Guatemala e 1,5 para Mongólia, em comparação com os Estados Unidos com 11,6. Os números para pacientes em tratamento também se mostram muito baixos. A porcentagem de pessoas com câncer tratados na Uganda é de apenas 7,5% e 13,0% para Mongólia. Além da baixa disponibilidade do tratamento, os ricos relacionados à radioterapia também são fatores limitantes. Apesar da melhora na sobrevivência de pacientes com câncer de próstata submetidos a radioterapia, há um persistente debate sobre a radiação da próstata com cânceres secundários.

O caso mais comum encontrado é o câncer de bexiga (LIAUW *et al.*, 2006). Um estudo desenvolvido por Shirodkar *et al.* (2009) investigou a saúde de 44 pacientes há uma

média de 5,5 anos após serem tratados de câncer de próstata com radioterapia. Desse total, 60% apresentou tumor no músculo da bexiga.

Um estudo populacional apresentado Ho *et al.* (2020) comparou os efeitos da radiação da próstata e da prostatectomia total em relação à ocorrência de câncer colorretal secundário. O estudo concluiu que há risco positivo de câncer de colo retal secundário para os pacientes submetidos à prostatectomia total, em comparação com os tratados com radioterapia. Além disso, os pacientes tratados com radioterapia apresentam uma porcentagem superior de doenças autoimunes (22.34% vs 18.75%, $p < 0.0001$), além de doença de Crohn, osteoartrite e distúrbios diversos. O estudo populacional encerra, defendendo a continuidade do debate sobre a existência ou não da relação entre a radioterapia e a ocorrência de câncer colorretal e recomenda vigilância médica contínua.

Se a radioterapia convencional tem disponibilidade precária para a população em geral, técnicas avançadas, que poupam o tecido saudável próximo à exposição da radiação, muito usadas em tumores localizados em áreas complexas, como próstata, cabeça, pescoço, mama, e pulmões são ainda mais restritas. Apesar disso, não asseguram a proteção contra o surgimento de cânceres secundários, conforme concluiu o estudo de Xiang, Chang e Pollom (2020), que avaliou 450.373 pacientes pediátricos e adultos, que receberam acompanhamento mediano de 5,1 anos após tratamento com radioterapia utilizando as técnicas de radioterapia conformacional tridimensional (3DCRT), radioterapia de intensidade modulada (IMRT) e radioterapia por feixe de prótons (PBRT).

Apesar dos avanços tecnológicos e dos modernos protocolos de tratamento visando a precisão e à redução das consequências aos tecidos normais, a própria natureza da radioterapia torna inevitável, por menor que seja o grau de exposição, consequências e potenciais impactos sobre os tecidos saudáveis no entorno da área tratada. Os efeitos colaterais podem variar em intensidade e continuidade, que vão de reações agudas (inflamação e desconforto localizado), a complicações crônicas e exemplo como perda de função orgânica e fibrose. Esses impactos são um desafio adicional a ser administrado durante e após o término do tratamento radioterápico (ARAÚJO *et al.*, 2024).

A quimioterapia é um tratamento com medicamentos para destruir o câncer, não sendo usado pela maioria dos homens em estágios iniciais de câncer de próstata, mas sim, em casos de câncer de próstata metastáticos, em que não há resposta a outros tratamentos. Dentre os quimioterápicos mais utilizados no tratamento do CaP estão o docetaxel, cabazitaxel, mitoxantrona, estramustina e carboplatina. O início do tratamento se dá em sua maioria pela administração do do taxano docetaxel, (primeira linha), associado à prednisona ou

dexametasona (Shore *et al.*, 2017). O cabazitaxel, outro taxano, é administrado na sequência, caso não haja resposta à medicação inicial. Ele é absorvido mais rápido, possui melhor retenção intracelular, além de ter apresentado atividade contra linhagem de células de câncer de próstata resistente ao docetaxel, sendo administrado a uma dosagem de 25 mg/m² nesses casos de resistência ao quimioterápico de primeira linha.

Apesar da sobrevida e melhora da qualidade vida do paciente, é pouco provável a cura do câncer de próstata por quimioterapia. Quimioterápicos agem matando células do corpo que dividem rapidamente. Sendo assim, a depender do tipo e da dose do medicamento, a quimioterapia pode acarretar queda de cabelo, inflamação na boca, náuseas, vômitos, diarreia e infecções, devido a seus efeitos deletérios sobre células dessas regiões do corpo.

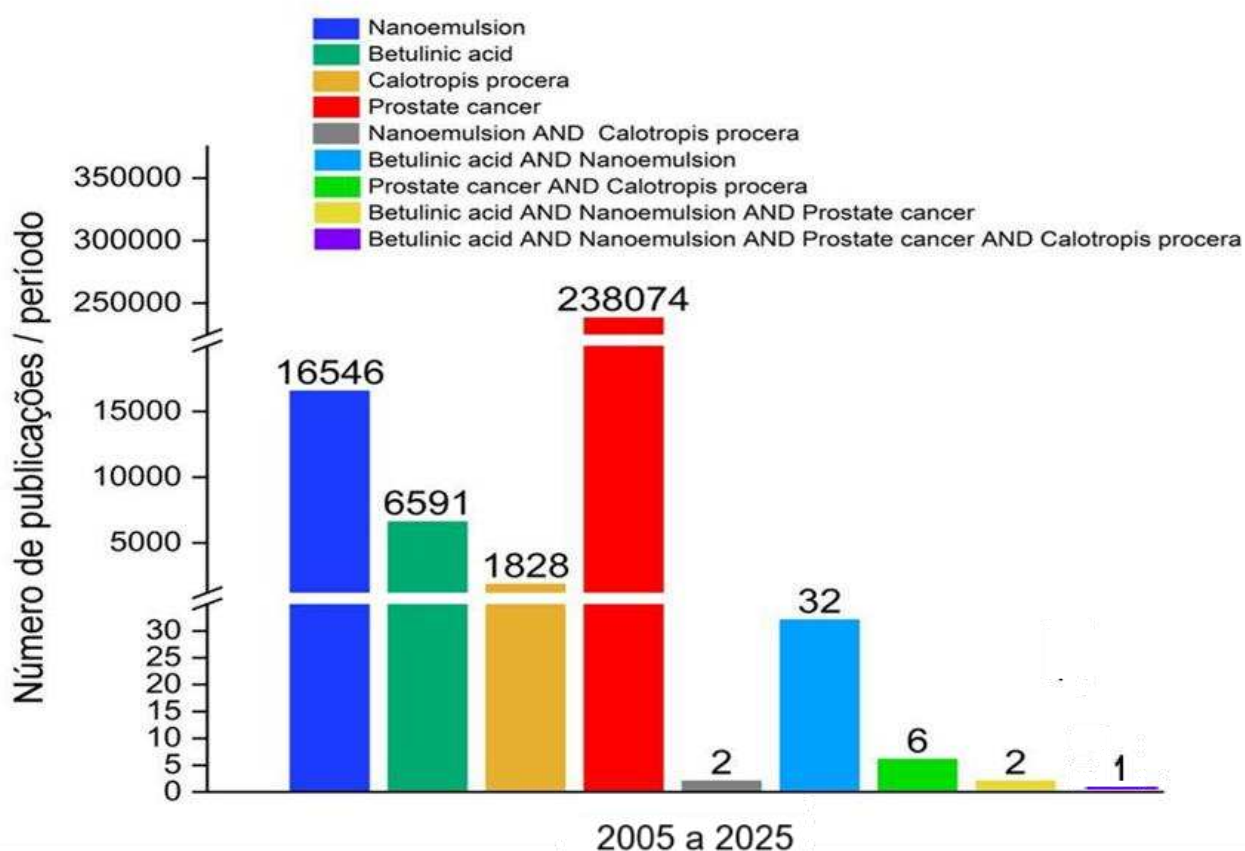
Apesar de a quimioterapia com docetaxel ter se tornado o padrão de tratamento de primeira linha para o câncer de próstata refratário à castração, as respostas do PSA quase sempre são inferiores a 50% e a sobrevivência média é menor que 20 meses (Petrioli *et al.*, 2008). Isso sugere que o uso da quimioterapia nesta doença continua sendo um assunto ativo de investigação clínica.

Todos os estudos apresentados até esse ponto, mostram a existência de lacunas que comprometem a eficácia dos tratamentos disponíveis e afetam de alguma maneira a saúde do paciente em tratamento com câncer de próstata. Isso aponta para uma necessária e urgente busca por estratégias de diagnósticos e mais opções de tratamento.

Neste contexto, observa-se uma necessidade de desenvolvimento de medicamentos contendo ativos menos citotóxicos, que causem menos efeitos adversos, para a terapia de câncer de próstata.

No intuito de aprofundar a busca por trabalhos com novas formulações objetivando o tratamento do câncer de próstata, foi realizada pesquisa nos motores de busca do *Web of Science*, *Scopus* e *Scifinder*, na qual não foram encontrados dados de estudos que associem o AB em nanoemulsões à base de óleo da *C. procera*, conforme dados da Figura 1.

Figura 1 - Levantamento bibliográfico dos trabalhos envolvendo *C. procera*



Feitas essas considerações, a presente pesquisa trata do desenvolvimento de nanoemulsões contendo ácido betulínico utilizando como núcleo oleoso o óleo das sementes de *C. procera* e como tensoativo o Pluronic F127.

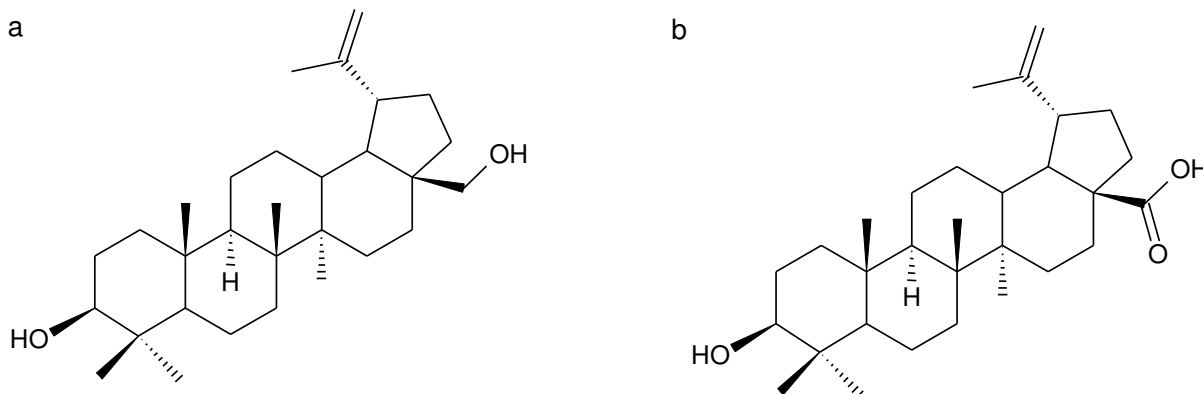
3.2 Ácido Betulínico

O ácido betulínico (AB) (ácido 3- β -hidróxi-lup-20(29)-en-28-óico) é um triterpenoide naturalmente pentacíclico (Figura 2B) amplamente encontrado no reino vegetal, estando especialmente presente na casca de bétula (*Betula* sp.). Ele também tem sido isolado de outros gêneros como o *Ziziphus* (*Rhamnaceae*), *Syzygium* (*Myrtaceae*), *Diospyros* (*Ebenaceae*) e *Paeonia* (*Paeoniaceae*). Na planta ele se apresenta como uma aglicona livre ou derivados glicosados, isolados com diversos solventes, sendo o diclorometano o mais comum. (RASTOGI *et al.*, 2015; RÍOS & MÁÑEZ, 2018).

Apesar de isolado principalmente da casca de bétula, a quantidade disponível é insuficiente para um possível uso comercial, tendo sido proposta sua síntese química a partir da

betulina (BE) (Figura 2A), um composto de MM=442.72 g/mol, como uma forma de ampliar a disponibilidade deste agente químico (JÄGER *et al.*, 2009; LOU *et al.*, 2021).

Figura 1 – Estruturas moleculares de a) betulina (BE) b) ácido betulínico (BA)



Fonte: Elaborado pelo autor

Existe uma vasta literatura citando o BA como um ativo químico com várias propriedades biológicas, como efeitos antivirais, anticâncer, anti-inflamatórios, antissépticos, antimicrobianos, antimaláricos, antileishmania e anti-helmínticas (GHAFARI MOGHADDAM *et al.*, 2012; MOLDOVEANU & Scott, 2016; EGBUBINE *et al.*, 2020; GARCÊS DE COUTO *et al.*, 2020).

Zhang, Hu e Chen (2016) destacam que, inicialmente, os estudos dos efeitos antitumorais do BA mostraram sua eficácia em melanoma maligno (Pisha *et al.*, 1995), mas estudos subsequentes comprovaram sua ampla atuação contra tumores de diversas partes do corpo humano. Explicam ainda, que o BA tem a capacidade de induzir apoptose em células cancerígenas, sem toxicidade para células normais *in vivo* e *in vitro*.

Park e colaboradores (2021), relataram a atividade do BA contra leucemia humana, comprovando um efeito citotóxico significativo nas células U937, por meio da parada do ciclo celular na fase G2/M (fase em que a célula se prepara para a divisão celular), além de induzir a apoptose dessas células.

Outra equipe de pesquisadores desenvolveu um estudo para determinar a ação do ácido betulínico contra células de câncer de bexiga. O estudo mostrou que o tratamento com a administração de 25 μ M de BA dificultou o crescimento das linhagens celulares de câncer de bexiga 253JB-V e KU7, sendo o primeiro estudo a indicar que o BA inibe a disseminação de células de câncer de bexiga pela indução de apoptose, necrose e parada do ciclo celular, além de uma redução na migração e invasão de células (KIM *et al.*, 2021). Além disso, observou-se redução da expressão de proteínas de especificidade (Sp) e do fator de crescimento epidérmico

(EGF), sugerindo que a ação anticâncer do BA em cânceres de bexiga e de próstata se dá pela supressão da expressão dessas proteínas (CHADALAPAKA *et al.*, 2010).

Vários processos celulares, como sobrevivência celular, angiogênese e proliferação, são regulados por um fator de transcrição conhecido como transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3). Um estudo examinou e constatou o efeito inibitório do BA na ativação mediada por hipóxia do STAT3 em células de câncer de próstata humano (PC3), independentes de andrógeno, sugerindo a atividade angiogênica do BA (SHIN *et al.*, 2011).

Segundo Jiang e colaboradores (2021), a atividade tumoral do BA para diversos tipos de câncer se dá por mecanismos que envolvem, principalmente, a indução do estresse oxidativo mitocondrial, mas também pela regulação de fatores de transcrição de proteínas de especificidade e pela inibição do transdutor de sinal e ativador das vias de sinalização da transcrição 3 e do fator nuclear- κ B. Para os autores, o BA ainda tem a capacidade de ampliar a sensibilidade das células cancerígenas a outros medicamentos usados em quimioterapia.

Uma estratégia anticâncer adotada é aumentar a degradação de oncoproteínas, que têm sua quantidade exacerbada em cânceres. Reiner *et al.* (2013) observaram que, o BA aumenta a apoptose, especificamente no câncer, mas não em células normais. Os resultados do estudo sugeriram que o ácido betulínico inibiu diversas deubiquinases, resultando no aumento de proteínas poli-ubiquinadas. Observou-se ainda, a diminuição de oncoproteínas e elevação da morte celular apoptótica, eliminando células supérfluas e defeituosas. Por outro lado, o estudo mostrou que em fibroblastos normais, o ácido betulínico não inibiu a atividade de deubiquinases, resultando em um número normal de proteínas poli-ubiquinadas, o que sugere a ausência de efeito na morte de células saudáveis. Ao tratar camundongos transgênicos para o adenocarcinoma de próstata (TRAMP) utilizando BA (10 mg/Kg), houve aumento do apoptose e inibição de tumores primários, além da redução da angiogênese e do receptor de andrógeno. Destaca-se neste estudo que os tecidos normais de camundongos não sofreram degradação em função do tratamento com BA. Esse estudo conclui que o BA se apresenta como um agente eficaz, não tóxico e clinicamente seletivo para quimioterapia.

Evidências emergentes também expressam os efeitos anticâncer combinados do BA com outros compostos naturais com bioatividade ou medicamentos aprovados (Banerjee *et al.*, 2024). Um estudo recente, associou BA, nanocompósito de Zn:MnO₂ (NCs) e casca polimérica de ácido gálico (GA)-ácido polilático (PLA)-alginato, tendo apresentado resultados promissores na terapia do câncer de próstata, com valor de IC₅₀ de 7,351 μ /mL (TAN; DANĐŞMAN-KALĐNDEMIRTAŞ; KARAKUŞ, 2023). Além de estudos de terapia pré-clínica combinando o ácido betulínico com outros fármacos em quimioterapia, pesquisadores

começaram a lançar luz sobre investigações que buscam descobrir os impactos anticâncer específicos de nanoformulações baseadas em BA.

O ácido betulínico (BA), comprovadamente apresenta propriedades biológicas de amplo espectro, com aplicações na medicina. Apesar de sua ação farmacológica, há relatos de algumas desvantagens do BA, como sua baixa solubilidade aquosa ($0,02 \mu\text{g/mL}$ a 25°C) e curta meia-vida *in vivo*, que dificulta sua aplicação terapêutica. Nesse sentido, muitos trabalhos ao longo dos anos foram desenvolvidos com o intuito de contornar essas dificuldades, procurando melhorar a solubilidade aquosa, meia-vida e eficácia do BA, através de sistemas de administração de fármacos nano-estruturados, incluindo nanopartículas magnéticas, lipossomas, conjugados poliméricos, complexos de ciclodextrina e nanotubos de carbono, nanopartículas poliméricas e nanoemulsões (Saneja *et al.*, 2017, 2018), que têm a capacidade de acumulação fácil e seletiva nos tecidos tumorais, em função da falta de um sistema linfático bem definido, quando comparado ao fármaco nativo pelos fenômenos de efeito de permeação e retenção aprimoradas.

Um polímero de quitosana (CS) foi usado para o revestimento de nanopartículas magnéticas (MNPs) formando nanopartículas CS–MNP. Foi então agregado BA a essa composição para formar um nanocompósito BA–CS–MNP. O Estudo mostrou que o BA na formulação não apresentou toxicidade contra células de fibroblastos normais (3T3) de camundongo. Entretanto, tanto livre, quanto encapsulado, apresentou efeitos inibitórios em células de câncer de mama (MCF-7), com IC_{50} de 2 e $3,6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Hussein-Al-Ali *et al.*, 2014), com efeitos dose-dependentes.

Um triterpenediol pentacíclico (TPD) de *Boswellia serrata* apresentou um bom potencial anticâncer, no entanto, sua ação biológica mostrou-se limitada devido à sua baixa solubilidade aquosa e alta lipofilicidade. Foram então preparadas nanopartículas de PLGA carregadas com TPD por uma técnica de nanoemulsão-difusão-evaporação. Um teste de citotoxicidade em células cancerígenas MCF-7 e OVCAR-5 *in vitro* mostrou que o TPD encapsulado teve sua bioatividade aumentada em comparação com sua forma livre. Em testes *in vivo* no modelo de tumor de ascite de Ehrlich (EAT), o potencial anticâncer do TPD na nanoformulação foi superior à sua forma em solução, além de não expressar toxicidade orgânica em camundongos portadores de EAT (Dubey *et al.*, 2016).

A natureza hidrofóbica e meia vida sistemática relativamente curta são apontadas por Selepe e colaboradores (2024) como obstáculos para aplicação clínica do BA. Para contornar essas dificuldades, os autores projetaram um sistema de administração de fármacos empregando nanopartículas de BA encapsuladas em poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)

(PLGA-BA NPs). O tamanho médio das nanopartículas obtidas foi de $196 \pm 6,80$ nm. A eficácia terapêutica do BA contra células tumorais de mama e pulmão mostrou-se aumentada no sistema encapsulado em comparação à sua forma livre.

Um estudo *in vitro* realizado para testar a atividade anticâncer de uma microcápsula contendo BA foi recentemente desenvolvido, a qual se baseou em alginato de sódio e goma guar. Essa cápsula foi desenvolvida para liberação controlada. O trabalho estudou a citotoxicidade de microcápsulas carregadas com BA contra células HL-60 (Leucemia Humana), cujos resultados apontaram atividade anticâncer significativa com um valor de IC_{50} de $2,52 \pm 0,23$ $\mu\text{g/ml}$ (Rebouças *et al.*, 2023), além de se mostrar altamente seletivo, com $IC_{50} > 500$ $\mu\text{g/ml}$ (não detectável) em fibroblastos normais. Para os autores, ativos encapsulados podem ser protegidos do contato direto com fluidos estomacais e a liberação controlada pode diminuir sua toxicidade em células saudáveis, reduzindo os efeitos colaterais comuns em quimioterapia. Neste mesmo sentido, um estudo associou a liberação lenta de administração de metformina com a redução de efeitos colaterais gastrointestinais (TARRY-ADKINS *et al.*, 2021).

Foi desenvolvido um trabalho para observar a bioatividade *in vivo* de uma nanoemulsão contendo BA e lecitina em um modelo murino de carcinogênese de pele em camundongos K14E6 modificados geneticamente. Foi observada inibição completa do desenvolvimento do tumor, após o tratamento com 50 mg/kg da nanoemulsão contendo o BA, além de reduzir a expressão do gene da cinase 4, dependente de ciclina (CDK4) e da caspase-8. Por sua vez, o BA livre limitou-se a inibir apenas 70% do crescimento do tumor (Agame-Lagunes *et al.*, 2021). Estes dados sugerem uma clara vantagem da bioatividade do BA encapsulado em relação à sua forma livre.

Várias estratégias nanoestruturadas foram relatadas na literatura para o carreamento de ácido betulínico como magnetolipossomas à base de Fe_3O_4 e AB que foram testados em duas linhagens de células de melanoma - células A375 e B164A5 exibindo citotoxicidade significativa nas linhas celulares de melanoma (LU *et al.*, 2020).

Outro trabalho relata o desenvolvimento de nanopartículas de AB em γ -ciclodextrina à base de gelatina para aumentar sua solubilidade e prolongar o tempo de circulação *in vivo*, apresentando um melhor efeito de inibição tumoral do que o composto de inclusão de ácido betulínico/ γ -ciclodextrina (LU *et al.*, 2020).

Um estudo mostra o processo de incorporação de AB em sílica mesoporosa mostrando o potencial de uso dessas nanopartículas como mais uma abordagem em sistemas de liberação de fármacos para esses tipos de compostos (BOCALON *et al.*, 2022).

Uma nanoemulsão à base de óleo de linhaça e ácido betulínico foi projetada e sua citotoxicidade *in vitro* foi testada por ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), a fim de avaliar sua eficácia contra células HCT-116 (carcinoma colorretal). Os resultados do estudo mostraram uma seletividade aumentada do BA em emulsão em relação à sua forma livre, com valor de IC₅₀ em uma faixa de 3,2 a 3,7 µM para (HCT-116) e > 16,5 µM para fibroblastos normais (REBOUÇAS *et al.*, 2022).

Mais recentemente, um estudo desenvolveu uma nanoemulsão baseada em óleo de *C. procera* para encapsular e avaliar o potencial de bioatividade do BA nessa formulação, contra células PC3 (câncer de próstata). Os resultados demonstraram que a nanoemulsão teve alta capacidade de transporte do ácido betulínico (7500 µg/g), alta eficiência de encapsulamento e (99,98%) e estabilidade termodinâmica. O BA encapsulado apresentou excelente atividade biológica contra câncer de próstata, com valores de IC₅₀ variando entre 4,6 e 6,2 µg/mL (PC3). Além disso, o bioativo apresentou baixa citotoxicidade contra células saídas, com IC₅₀ >75 µg/mL, sugerindo ser seletivo para células tumorais (SOUSA *et al.*, 2025).

3.3 Nanoemulsões

Emulsões são sistemas líquidos bifásicos. Nesse sistema, a fase em menor quantidade é chamada de dispersa, ou interna, sendo dispersada na segunda fase como pequenas gotículas. A segunda fase, presente em maior quantidade, é conhecida como fase externa ou contínua. As emulsões são de grande importância para a produção de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos, pois permitem misturar moléculas não polares e polares, alterar propriedades físicas de produtos como gosto e cheiro, além de melhorar a eficácia de tratamentos médicos (LANGAROUDI & KAZEMI, 2019; ATANASE, *et al.*, 2022).

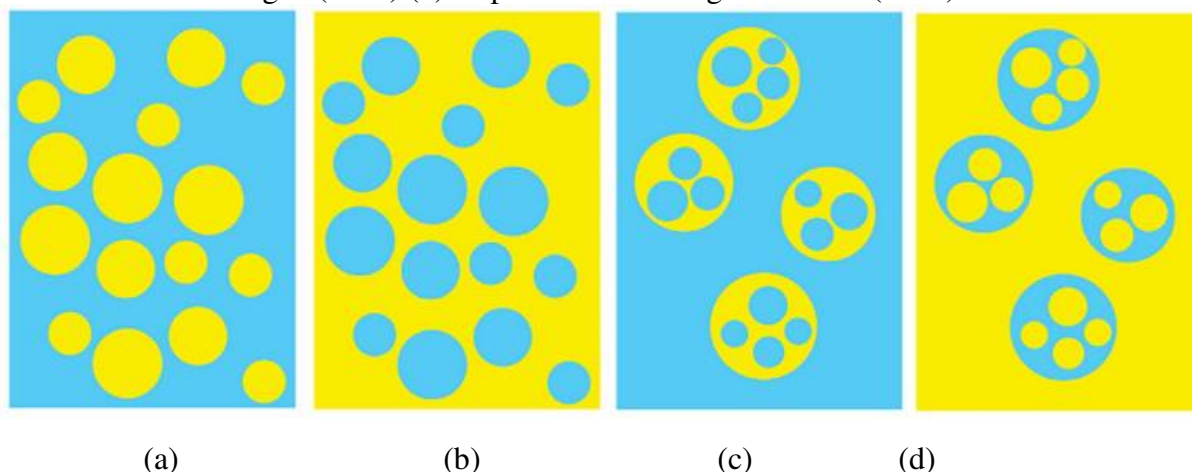
Nanoemulsões são dispersões coloidais de dois líquidos imiscíveis, que possuem tamanho de partícula variando de 20 a 500 nm, clareza óptica, estabilidade cinética e alta capacidade de melhorar a dissolução e a biodisponibilidade de ingredientes ativos lipofílicos encapsulados (ALGAHTANI *et al.*, 2022).

Essas gotículas permitem o encapsulamento de bioativos hidrofóbicos em uma nanoemulsão óleo-em-água, que podem aumentar a biodisponibilidade do fármaco e promover liberação controlada, mantendo a concentração dentro da faixa terapêutica (SOUSA *et al.*, 2025).

As gotículas em nanoemulsões podem variar entre dezenas e centenas de nanômetros. Possuem aspecto transparente, translúcido ou leitoso, dependendo do diâmetro das

gotas e são classificadas em três tipos, água em óleo (a/o), óleo em água (o/a) ou múltiplas (o/a/o ou a/o/a), como ilustrado na Figura 3, de acordo com a proporção e a natureza química dos componentes (VALDIVIA-OLIVARES *et al.*, 2023).

Figura 2 - Tipos de emulsão classificadas por suas fases dispersas e contínuas (a) dispersão óleo em água (o/a) (b) dispersão água em óleo (a/o) (c) dispersão água em óleo em água (a/o/a) (d) dispersão óleo em água em óleo (o/a/o)



Fonte: Valdivia-Olivares *et al.*, 2023, com adaptações.

3.3.1 Preparo de nanoemulsões

Por serem termodinamicamente instáveis, os diversos métodos de preparo das nanoemulsões incluem o uso de energia que podem ser provenientes de equipamentos ou pelo potencial químico da composição.

Em geral, as técnicas para a obtenção de nanoemulsão podem ser divididas entre as que usam alta ou baixa energia. Em métodos que usam alta energia, a entrada intensa de energia mecânica se dá por agitação de extremo cisalhamento e, um aparelho de alta potência é geralmente usado para quebrar a fase interna em pequenas gotículas, sendo o método usado no preparo de emulsões convencionais e nanoemulsões, envolvendo a homogeneização a alta pressão, sonicação e microfluidização. Os métodos de baixa energia, utilizam energia química potencial dos componentes, alterando a curvatura espontânea do tensoativo; são baseados no controle e ajuste das propriedades entre as fases oleosa e aquosa que, em geral, são usadas para fazer microemulsões, envolvendo a emulsificação espontânea ou autoemulsionante, composição de inversão de fases e o método da inversão de fases (BARZEGAR *et al.*, 2018; RODRÍGUEZ-BURNEO *et al.*, 2017).

3.3.2 Estabilidade das nanoemulsões

A estabilidade de nanoemulsões, de forma simplificada, está relacionada à capacidade de resistência à coalescência de suas gotículas. A temperatura é um dos fatores que afeta a estabilidade das nanoemulsões, pois provoca um aumento de movimento e colisão entre as gotículas, induzindo-as à coalescência. Os tensoativos usados nas formulações, colaboram para impedir esse processo, pois criam uma barreira estérica na interface óleo/água, reduzindo a tendência de colisão e conferindo maior estabilidade à formulação (ROMES *et al.*, 2022).

As nanoemulsões apresentam estabilidade física de longo prazo, como consequência direta do tamanho reduzido das partículas produzidas, que dificultam o desencadeamento de fenômenos de desestabilização como cremação, sedimentação e coalescência. A ação da gravidade, induz à instabilidade cinética das nanoemulsões, favorecendo a ocorrência de cremação e sedimentação. Entretanto, o movimento Browniano nas nanoemulsões é forte o suficiente para compensar a instabilidade decorrente da força gravitacional (SINGH *et al.*, 2017).

A distribuição do tamanho de partícula é outro fator importante para a estabilidade de nanoemulsões, quanto mais uniforme, mais estável será a formulação. Essa uniformidade é medida pelo Índice de Polidispersão (PDI), em que nanoemulsões com $PDI < 0,2$ serão classificadas de monodispersas. Quanto ao tamanho das gotas, quanto maiores e mais esféricas, maior será a fluidez do material, ao contrário de gotas pequenas e amorfas (RAI *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2017). Por outro lado, gotas menores com formatos esféricos requerem maior energia para deformação, requerendo o uso de método de alta energia para sua formação, como agitação ou vibrações ultrassônicas.

Portanto, o uso apropriado de tensoativos, o tamanho e distribuição de partículas e a carga superficial são variáveis que estão diretamente relacionadas à estabilidade de nanoemulsões. O efeito unificados desses três parâmetros determinam a produção ótima de uma nanoemulsão (RAI *et al.*, 2018).

O uso adequado de emulsificantes confere uma relação elástica entre os líquidos imiscíveis e mantém a fase dispersa suspensa no meio dispersor, na forma de pequenas gotículas elásticas que suportam alto grau de tensão relativo no processo de deformação. Além disso, pequenas gotas sofrem muito menos os efeitos gravitacionais, permanecendo suspensas no meio de dispersão (KOMAIKO & MCCLEMENTS, 2016).

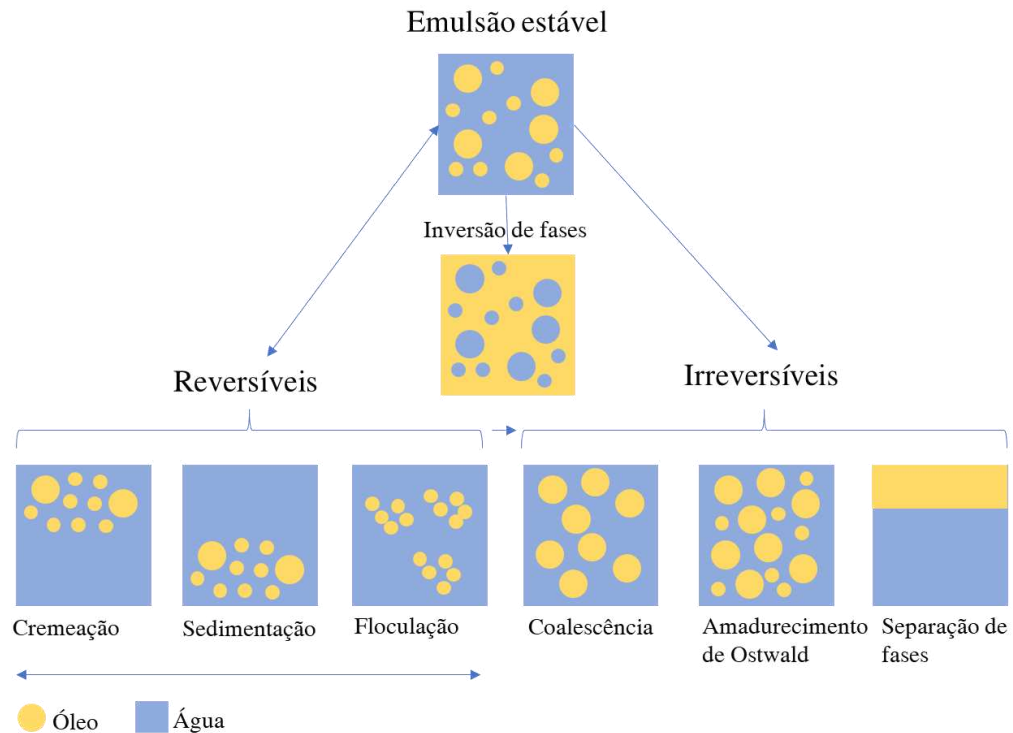
Uma maior carga superficial sobre as gotículas, confere elevada força repulsiva intermolecular no sistema nanométrico, sentida pelas pequenas gotas no momento em que se

aproximam e, ao colidirem, se afastam, mantendo-se em movimento browniano (Mishra *et al.*, 2009). Quando a nanoemulsão é produzida com o uso de um único tensoativo, sua estabilização ocorre por meio da repulsão de cargas de mesmo sinal (VILASAU *et al.*, 2011).

A força gravitacional está envolvida no processo de estabilidade da nanoemulsão a depender do tamanho e peso das gotículas, enquanto a força eletrostática depende do valor do potencial zeta. Valores de potencial zeta de ± 20 mV, conferem boa estabilidade a emulsões elaboradas com tensoativos de alto peso molecular, ao contrário dos de baixo peso molecular, que requerem valores maior que ± 30 mV. Esse tamanho reduzindo de potencial zeta se dá pelo fato de que esses emulsificantes deslocam o plano de cisalhamento para uma distância maior. Entretanto, um efeito combinado entre impedimento estérico e força repulsiva, acabam por compensar o baixo valor de carga superficial, conferindo maior estabilidade ao material produzido com tensoativos de alto peso molecular, a exemplo do Pluronic F127 (RAI *et al.*, 2018).

3.3.3 Problemas de estabilidade encontrados no desenvolvimento da nanoemulsão

Apesar de cineticamente estáveis, as nanoemulsões podem apresentar problemas de estabilidade, sendo os principais: floculação, cremação, sedimentação, amadurecimento de Ostwald, coalescência e separação de fases (Figura 4 e Tabela 1). Esses fenômenos podem ocorrer tanto durante o processo de elaboração como no período armazenamento (RAVERA *et al.*, 2021; TADROS *et al.*, 2004).

Figura 3 - Mecanismos de desestabilização de nanoemulsões

Fonte: o autor

Tabela 1 - Mecanismos de desestabilização de nanoemulsões

Processo de desestabilização	Mecanismo e características do processo
Cremação e Sedimentação	Processo essencialmente governado pela diferença de densidade entre as fases dispersa e contínua, culminando para a migração das gotas para a parte inferior (sedimentação) ou superior (cremação). O processo é reversível por meio de agitação. Não modificam a distribuição do tamanho das gotas, mas as torna mais compactas, induzindo à floculação e coalescência.
Floculação	Consiste na formação de agregados de gotículas, impulsionada pela interação das camadas adsorvidas na superfície das gotículas. Não modifica a distribuição do tamanho das gotas. Mantém a integridade da interface. Pode ser revertida por agitação. A presença de carga superficial interfacial é essencialmente relevante para o impedimento desse processo.
Amadurecimento de Ostwald	Decorrente da dissolução parcial da fase líquida dispersa, induzida pela pressão capilar, culminando em uma transferência de massa de gotas pequenas para grandes. Processo rápido e irreversível em nanoemulsões. Tensoativos não-iônicos

	podem ser eficazes a estabilização de emulsões contra esse processo e contra a coalescência.
Coalescência	É a fusão de duas gotículas em uma única, em função do afinamento e ruptura do filme líquido interfacial, sendo altamente influenciada pelas propriedades interfaciais das camadas adsorvidas. Ocorre quando duas gotículas entram em contato e a força de repulsão é menor que a de atração, ou como consequência da floculação. O processo é irreversível e leva à separação de fases.

Fonte: (TADROS *et al.*, 2004; RAI *et al.*, 2018; RAVERA *et al.*, 2021)

A cremeação e a sedimentação ocorrem em função, respectivamente, das forças centrífuga e da gravidade. O processo de floculação pode ser reversível, enquanto a coalescência é a associação irreversível das gotículas. Esses dois processos de desestabilização podem ser minimizados mantendo-se no menor nível as diferenças de densidade entre as fases dispersa e contínua, o menor tamanho de partículas e o meio de dispersão viscoso (KOROLEVA & YURTOV, 2012).

Durante a colisão de duas partículas pode ocorrer floculação ou coalescência. O primeiro caso ocorrerá se as forças intermoleculares repulsivas forem suficientemente grandes para manter as gotículas separadas, mesmo que há uma pequena distância. O segundo caso ocorrerá, se as forças atrativas forem maiores que as repulsivas (RAI *et al.*, 2018) .

Para reduzir a taxa de amadurecimento de Ostwald a fase dispersa deve ser completamente imiscível na fase contínua. Esse processo ocorre porque as gotas pequenas, mais solúveis, se associam às maiores, favorecendo seu crescimento, engrossamento da nanoemulsão e consequente separação de fases. É o processo mais desafiador para a produção de nanoemulsão estáveis com fins práticos, em que são encontradas altas variações nos tamanhos das gotículas (ALI *et al.*, 2013).

Pesquisadores usaram copolímero em bloco anfifílico poli (óxido de etileno) - poli (ϵ -caprolactona) (PEO-b-PCL), solúvel na fase oleosa em temperaturas mais altas, mas que recristaliza quando o sistema retorna à temperatura ambiente (25 °C), evitando a ocorrência do amadurecimento de Ostwald, provando que tensoativos conferem estabilidade a nanoemulsões (FRANZOL & REZENDE, 2015).

Existe ainda a inversão de fases do sistema disperso, que se caracteriza pela conversão da fase interna em fase externa, e vice-versa.

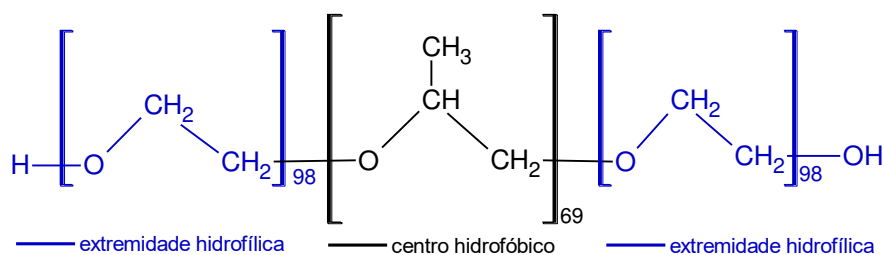
3.4 Pluronic F127

As nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, mas estáveis cineticamente, tendendo à separação de fases após determinado tempo. Nesse sentido, tensoativos são frequentemente utilizados para empreender estabilidade às nanoemulsões.

Devido às suas aplicações farmacêuticas, em alimentos ou na medicina, os tensoativos e os óleos precisam ser compatíveis e não tóxicos. Um bom tensoativo deve ser capaz de reduzir a tensão interfacial, ser adsorvido rapidamente na interface e promover a estabilização da superfície através de relações eletrostáticas ou estéricas. Diversos tipos de tensoativos têm sido usados no preparo de nanoemulsões, como proteínas, tensoativos não iônicos (Tween 40, 60, 80), surfactantes iônicos (dodecil sulfato de sódio, alginato láurico), fosfolipídios e Pluronic® (FANG *et al.*, 2009; GHARIBZAHEDI & MOHAMMADNABI, 2016).

Várias pesquisas têm projetado nanoemulsões estabilizadas com Pluronic F127. Rebouças e colaboradores (2022), desenvolveram uma nanoemulsão à base de óleo de linhaça e ácido betulínico, estabilizada com Pluronic F127 e poliricinoleato de poliglicerol, para aplicações contra carcinoma colorretal. Um estudo recente formulou uma nanoemulsão à base de óleo de *C. procera* e ácido betulínico, usando Pluronic F127 como tensoativo, com o objetivo terapêutico contra células de câncer de próstata (SOUZA *et al.*, 2025). Outra pesquisa propôs a melhoria da estabilidade físico-química e aumento da atividade antioxidante do β -caroteno durante o trânsito gastrointestinal, projetando dois tipos de sistemas de entregas, nanopartículas e nanoemulsão, estabilizadas por Pluronic F127 e lecitina (Chuacharoen & Sabliov, 2016b). Também foi investigada a estabilidade e liberação controlada de luteína, um poderoso antioxidante, em nanopartículas de zeína, com e sem os tensoativos lecitina e Pluronic F127. O objetivo do trabalho foi buscar estabilidade físico-química das nanopartículas e bioativos aprisionados (CHUACHAROEN & SABLIOV, 2016a).

O Pluronic® F127 é um copolímero tribloco anfifílico composto de por E₉₈P₆₉E₉₈ (Figura 5), com massa molar de 12.500 Daltons, sendo E, óxido de etileno (de caráter hidrofílico) e P, óxido de propileno, de caráter lipofílico (Pradines *et al.*, 2015). Essa substância é não tóxica e foi aprovada pela *Food Drug Administration* (FDA), o que permite seu uso para fins biológicos. As nanoemulsões formuladas com esse tensoativo têm a vantagem de não serem capturadas por macrófagos, devido à barreira estérica provenientes de frações de de óxido de polipropileno, aumentando seu tempo de contato com o sangue, permitido uma liberação controlada e maior disponibilidade de bioativos e (LIN *et al.*, 2018).

Figura 4 - Estrutura do Pluronic F127

Fonte: o autor

Quando aplicado na forma de hidrogel, o Pluronic F127 permite uma adesão prolongada na superfície de mucosas, funcionando como um veículo e controle de liberação de medicamentos, como M48U1, usado como molécula anti-HIV-1 (PRADINES *et al.*, 2015).

Autonanoemulsões foram preparadas para aumentar a biodisponibilidade oral e eficácia da floretina (Ph), pouco solúvel em água. A avaliação das propriedades físicas da nanoemulsão indicou um aumento da solubilidade de triglicerídeos emulsionados em 3000 vezes, em relação à solubilidade em solução de Ph. Houve ainda, aumento de 7,9 vezes na biodisponibilidade do Ph e 6,8 vezes na sua ação anti-inflamatória. O Pluronic F127 apresenta elevado impedimento estérico, que aumenta a permeabilidade e reduz a degradação enzimática da nanopartícula no trato gastrointestinal, melhorando a absorção do bioativo (Y. WANG *et al.*, 2020).

Curcuminóides foram incorporados em nanoemulsão contendo ácido oleico como fase dispersa e Pluronic F127 como estabilizador, para aumentar sua solubilidade e biodisponibilidade. A bioatividade do ativo encapsulado foi aumentada e apresentou promissora ação contra células de cânceres colorretal, glioblastoma, leucemia, e especialmente, de próstata (COELHO *et al.*, 2022).

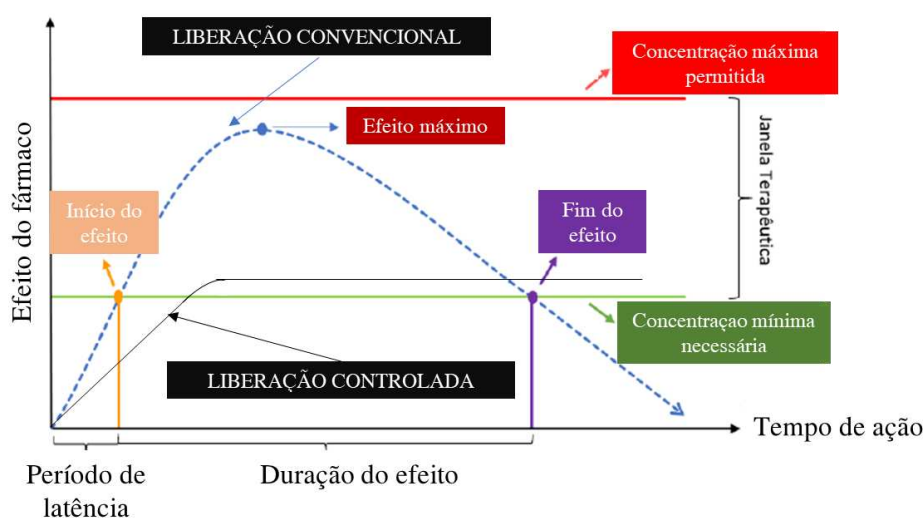
O aumento da expressão do citocromo-C, caspase 6 e caspase 9, demonstrou que a ação contrária do Pluronic em células cancerígenas multirresistentes, em comparação com células normais, promovendo a sinalização pro-apoptótica e reduzindo a defesa antiapoptótica (NUGRAHA *et al.*, 2022; ZARRINTAJ *et al.*, 2020).

3.5 Liberação controlada de fármacos e bioativos

A liberação de fármacos de forma tradicional, em sua maioria, emprega sistemas diluentes com o objetivo de dissolver o ativo, mantendo sua concentração nos sistemas

biológicos dentro da faixa apropriada para o tratamento. Isso não é fácil de se conseguir, uma vez que a concentração dos ativos no organismo tende a crescer até um certo limite, determinado por sua solubilidade e então, decresce, requerendo a administração de nova dosagem a fim de se manter a concentração de interesse (Figura 6).

Figura 5 – Janela terapêutica farmacológica



Fonte: (TOSIN; COSTA; VIEIRA, 2023), adaptado

Quando mais altas as concentrações, maior a toxicidade, enquanto que, quando abaixo dos níveis terapêuticos, os ativos não surtem eficientemente seus efeitos e, alguns, passam a enfrentar problemas de resistência do organismo ao seu uso (TOSIN; COSTA; VIEIRA, 2023).

O avanço da nanotecnologia tem se mostrado uma alternativa promissora para contornar esses problemas relacionados à administração de ativos, pois permitem sua liberação de forma controlada, prolongando seu tempo de permanência no organismo, sendo eficaz a uma concentração muito menor que quando administrado por meios convencionais, conferindo vários benefícios orgânicos, como a redução dos efeitos colaterais e melhora na eficácia do tratamento pelo aumento da biodisponibilidade do medicamento (LEI *et al.*, 2023; ZHOU; SONG; GIUBELLINO, 2019).

Os mecanismos de que depende a cinética de liberação de ativos estão relacionados à composição da matriz, geometria e tamanho de partículas, método de preparação e meio de dissolução (PATRA *et al.*, 2018).

Ativos hidrofóbicos, com solubilidade $< 0,01$ mg/mL, apresentam liberação lenta, ou incompleta, ao contrário daqueles com alta solubilidade, que apresentam rápida liberação. Essa taxa ou coeficiente de difusão, além de depender da massa e tamanho da molécula do soluto e da viscosidade do meio difusor, depende ainda de quão hidratada está a matriz, indo de quase zero a um máximo, à medida que a hidratação aumenta (PAARAKH *et al.*, 2018).

É indispensável a ocorrência da difusão do ativo através do polímero, ou a própria erosão desse, para que ocorra a liberação. A proporção do polímero na matriz também influencia na velocidade de liberação. Quando maior for essa proporção, maior será o caminho a ser percorrido pelo fármaco na matriz e menor será o coeficiente de difusão e da sua taxa de liberação no sistema biológico. Outros fatores relacionados ao polímero como inchaço, relaxamento da cadeia, hidratação, molhamento e alterações de entalpia, afetam a liberação do fármaco (PAARAKH *et al.*, 2019).

Esses mecanismos podem ser descritos por modelos matemáticos. Em geral, para polímeros que não possuem matrizes complexas, os modelos cinéticos utilizados são: cinética de liberação de ordem zero, primeira ordem e modelo de Higuchi. Já para sistemas complexos, o mecanismo de liberação é determinado pelo método proposto por Korsmeyer-Peppas (PAARAKH *et al.*, 2018; REHMAN *et al.*, 2020; THAKUR & MOHAN, 2022).

3.5.1 Modelo Cinético de liberação de Ordem Zero

A taxa de reação no modelo cinético de ordem zero é constante e independente da concentração do reagente. A liberação de ordem zero pode ser representada por:

$$Q = Q_0 + k_0 t$$

Sendo Q , a quantidade de ativo liberado no tempo t , Q_0 a quantidade inicial de ativo na solução (normalmente zero), e k_0 a constante de liberação de ordem zero (Paarakh *et al.*, 2018).

Ao traçar a curva dos valores do ativo liberado pelo tempo, obtém-se uma reta, de coeficiente angular k_0 . A maioria dos sistemas de administração de bomba osmótica, sistemas de administração transdérmica e sistema de matriz para medicamentos com baixa solubilidade seguem modelos cinéticos de ordem zero, confirmando ser esse, o comportamento ideal para formulações, levando a variações mínimas nos níveis do fármaco no organismo, imprimindo segurança na sua administração e menos efeitos adversos (REHMAN *et al.*, 2020).

Nos casos em que a solubilidade do ativo na matriz polimérica é baixa ou está em alta concentração, e o ativo é disperso em vez de dissolvido, é preferível a aplicação dos modelos de Higuchi ou de Peppas (TROJER *et al.*, 2013; BRUSCHI, 2015).

3.5.2 Modelo Cinético de liberação de Primeira Ordem

O modelo matemático de liberação de primeira ordem descreve o sistema de liberação em que a taxa de liberação do ativo é dependente da concentração, como segue:

$$\log Q = \log Q_0 - K_1 t / 2,303$$

Em que Q é a quantidade do ativo liberado no tempo t , Q_0 é a quantidade inicial do ativo no sistema receptor e k_1 é constante de primeira ordem. Como a quantidade liberada é proporcional à concentração do ativo, a taxa de liberação diminui com o tempo. O gráfico obtido a partir dos dados de percentual de ativo remanescente contra o tempo, fornece uma reta cujo coeficiente angular é dado por $K_1/2,303$ (PAARAKH *et al.*, 2018).

As matrizes porosas em formas farmacêuticas que contêm fármacos solúveis em água seguem uma cinética de primeira ordem, pois sua liberação é proporcional à concentração do fármaco (REHMAN *et al.*, 2020).

3.5.3 Modelo de Higuchi

Este foi o primeiro exemplo de um modelo matemático proposto com o objetivo de descrever a liberação de fármacos de um sistema de matriz baseado em polímeros, sendo aplicável para a liberação de fármacos solúvel ou pouco solúvel em água, agregados a matrizes semissólidas ou sólidas. Esse modelo é expresso por:

$$Q = K_H t^{1/2}$$

Em que Q é a concentração do ativo liberado no tempo t , K_H é a constante de Higuchi. Plotando-se os dados obtidos como porcentagem cumulativa do fármaco liberado versus o raiz quadrada do tempo, obtém-se uma reta de coeficiente angular K_H , que é a constante de dissolução de Higuchi. No estudo de Higuchi, permitiu a quantificação da liberação do fármaco de filmes finos de pomada contendo fármaco finamente disperso. Estabeleceu que há uma proporcionalidade direta entre a quantidade cumulativa de fármaco liberado e a raiz quadrada do tempo. Com significado específico e fisicamente realista, a constante de Higuchi facilita a utilização do dispositivo e colabora para o entendimento dos mecanismos envolvidos na liberação de fármacos (PAARAKH *et al.*, 2018).

3.5.4 Modelo de Korsmeyer-Peppas

Korsmeyer e sua equipe desenvolveram uma equação simplificada para descrever a liberação controlada de fármacos em sistemas poliméricos. Uma equação empírica foi formulada por Korsmeyer e Peppas para analisar a liberação tanto Fickiana quanto não-Fickiana de fármaco de sistemas de distribuição poliméricos intumescentes e não intumescentes (Rehman *et al.*, 2020). O mecanismo de liberação do fármaco pode ser obtido após o ajuste dos primeiros 60% dos dados de liberação do fármaco no modelo Korsmeyer-Peppas:

$$M_t / M_\infty = K_{KP} t^n,$$

Em que M_t / M_∞ é a quantidade de fármaco liberado ao longo do tempo t , M_∞ é a quantidade de fármaco no estado de equilíbrio, K_{KP} é uma constante que incorpora características geométricas e modificações e n é o expoente de liberação relacionado ao mecanismo de liberação do fármaco.

Para ilustrar, quando n tem um valor $\leq 0,45$ (Caso I), apenas a difusão predomina no mecanismo de liberação, conforme o modelo Fickiano. Quando n for um valor de 0,89 (Caso II de transporte), a liberação do fármaco terá cinética de liberação de ordem zero, e o mecanismo de liberação do fármaco será regido pelo relaxamento de cadeias poliméricas ou inchaço. Se o valor de n estiver entre 0,45 e 0,89 o modelo não será Fickiano, e o mecanismo de liberação será determinado por uma combinação de inchaço e difusão com taxas parecidas. Por fim, quando o valor de n é $> 0,89$ (Super Caso II de transporte), haverá uma forma excepcional de liberação, devido à tensão e à quebra do polímero, causadas pela fissuração do solvente. Os valores de n mudam, dependendo da geometria de fronteira do sistema (Martín-Camacho *et al.*, 2023). A Tabela 2 resume os processos envolvidos no modelo de Korsmeyer-Peppas:

Tabela 2 – Mecanismo de liberação de ativos seguindo o modelo de Korsmeyer-Peppas

COEFICIENTE DIFUSIONAL (N)	MECANISMO DE TRANSPORTE	MECANISMO DE LIBERAÇÃO
$\leq 0,45$	Difusão Fickiana	Difusão molecular do fármaco através da matriz polimérica
0,89	Caso II de transporte	Intumescimento da matriz polimérica
$0,45 < n < 0,89$	Transporte não-Fickiano	Difusão molecular do ativo com intumescimento da matriz polimérica

> 0,89	Super Caso II de transporte	Relaxamento, erosão, difusão e intumescimento simultâneos.
--------	-----------------------------	--

Fonte: Rehman *et al.* (2020)

Os modelos Korsmeyer-Peppas e de Higuchi são apontados por Rehman *et al.* (2020) como os melhores modelos cinéticos para a avaliação da estabilidade de sistemas avançados de administração de medicamentos, por descrevem a liberação *in vitro* do medicamento do sistema de matriz, além de também explicarem o comportamento da estabilidade.

3.6 Bioatividade da *C. procera*

C. procera (Figura 7) é uma espécie de planta integrante da família *Apocynaceae*, originária da África e da Ásia, podendo ser encontrada em diversas outras partes da Terra, como Austrália, México e América Central e do Sul. Essa planta era usada medicinalmente pelos antigos egípcios, havendo ainda, relatos de seu uso na medicina tradicional sudanesa, da África do Norte e Central, da Ásia Central e do Oriente Médio (SULAIBI *et al.*, 2020).

Figura 6 - Ilustração da planta *C. procera*



Fonte: O autor.

C. procera tem recebido grande atenção de cientistas. Tanto extratos brutos como compostos purificados de várias partes dessa planta foram relatados como de extensa atividade biológica como: antimicrobiana, anti-helmíntica, antioxidante, antimalárica, nematocida, anti-inflamatória e antitumoral (GHRAMH *et al.*, 2021; ELSAYED *et al.*, 2020; KAUR *et al.*, 2021; BALUHYA & JOSEPH, 2021).

El Aali e colaboradores (2019) descrevem a indicação biomédica de cada parte da planta. Relatam que o caule é usado para tratar doenças de pele, vermes intestinais, lepra e leucoderma; as raízes são usadas para o tratamento de lepra, asma, tosse, elefantíase, reumatismo e diarreia; o látex e as folhas são usados para inchaço e dor nas articulações; o suco de *C. procera* era usado para purgação; já a massagem com óleo, pode ser usada para reabilitar partes paralisadas do corpo.

Um estudo concluiu que os compostos químicos presentes nas sementes e folhas de *C. procera* podem ser benéficos para fins terapêuticos e dietéticos, atribuindo à planta, forte potencial para ser usada como medicamento e fortificante alimentar (OGUNDOLA *et al.*, 2021).

Percebe-se que as sementes de *C. procera* receberam menor atenção dos pesquisadores, relativamente às outras partes da planta. Seus frutos possuem 350 a 500 sementes, caracterizados por apresentar alto teor de óleo fixo, cerca de 23%, (KAUR *et al.*, 2021).

O óleo extraído das sementes de *C. procera* é constituído principalmente pelos ácidos graxos oleico (33,3%) e linoleico (35,3%). Contém também os ácidos palmítico (15,8%), esteárico (9,5%), elaidico (4,2%) e palmitoleico (1,7%). Portanto, possui um teor elevado de ácidos graxos insaturados, cerca de 70% (SOUSA *et al.*, 2018; SULAIBI *et al.*, 2020).

Os ácidos graxos, especialmente os insaturados, exercem uma importância fundamental na permeabilidade das membranas celulares, das quais são os principais constituintes. Isso pode ter implicações em certas funções celulares como o transporte de proteínas.

O óleo fixo das sementes de *C. procera* tem um alto teor de ácidos graxos poli-insaturados (75,25%), sendo os ácidos oleico e linoleico, os mais abundantes, respectivamente. Através da modulação de citocinas inflamatórias, o óleo fixo da semente de *C. procera* apresenta duas importantes bioatividades: anti-inflamatórias e imunomoduladoras *in vivo* (METTWALLY *et al.*, 2022).

Mettwally e associados (2022) testaram o potencial anti-inflamatório do óleo de *C. procera* e identificaram relevante bioatividade, uma vez que o uso do óleo reduziu os níveis séricos de MPO, TNF- α e IL-6, usados para tratar artrite reumatóide, doença hepática, aterosclerose, para melhorar o perfil do fígado e para tratar doenças inflamatórias associadas à quimioterapia em diversos órgãos.

Um estudo recente preparou uma nanoemulsão à base do triterpeno ácido betulínico e óleo da semente da *C. procera*, copolímero em bloco de poli(óxido de etileno) poli(óxido de propileno) e água, para aplicação em terapia de câncer de próstata. Este sistema apresentou citotoxicidade *in vitro* contra células de PC3 (câncer de próstata) além de alta seletividade antitumoral em comparação com as células não tumorais. A composição foi estrategicamente desenvolvida para unir as propriedades bioativas já comprovadas do triterpeno ácido betulínico, às potentes bioatividades do óleo de *C. procera* que, também atuou como encapsulante do ativo, em um sistema nanométrico seletivo a linhagem celular PC3 (SOUSA *et al.*, 2025).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas e reagentes

Sementes de frutos de *C. procera* foram colhidos nas coordenadas 3°4'46" S; 3°3'41" W, à Rua Professor Armando Farias, Bairro Campos do Pici – Fortaleza/CE. Partes da planta, incluindo folhas, flores e frutos, foram depositadas, para fins de excicata, no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará (UFC), obtendo o registro EAC 68161 – *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton. O material foi previamente cadastrado no SISGEN sob nº AC3BA66; hexano P. A., acetato de etila P.A., hidróxido de potássio P.A. (85%), cloreto de sódio P. A. e sulfato de sódio anidro P.A. (99%) todos da marca Synth; Pluronic F127, BHL 22 (BASF, Alemanha); Ácido Betulínico 98,13% (Quanao Biotech, China); Hidróxido de Sódio P.A. (Synth, Brasil), Metanol P.A. (Vetec, Brasil); Água ultra-pura estéril (Isofarma, Brasil); Brometo de Potássio, grau espectrofotométrico; Acetonitrila, grau CLAE (Vetec, Brasil); MTT brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (Sigma-Aldrich, Alemanha).

4.2 Linhagens celulares

As linhagens celulares HCT-116 (carcinoma de cólon humano), SNB-19 (glioblastoma humano) e PC3 (carcinoma de próstata humano) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA) e a linhagem celular não tumoral L929 (fibroblastos de murino) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

4.3 Equipamentos

Sistema extrator Soxhlet utilizado na extração do óleo das sementes de *Calotropis procera*; Centrífuga, modelo 80-2B, marca Centribio utilizada no teste de estresse mecânico; Rotaevaporador, modelo RV 10, marca IKA utilizado no preparo das nanoemulsões; Cromatógrafo gasoso acoplado à Espectrômetro de Massa (CG-EM), modelo QP2010 SE, equipado com uma coluna capilar Rtx-SMS (30 m, ID 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm) e auto injetor AOC-20i, marca Shimadzu, utilizado para obter o perfil de ácidos graxos; Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier, modelo IRTracer-100, marca Shimadzu; Viscosímetro digital, modelo DA300, marca Anton Paar; Densímetro digital, modelo DMA 4500, marca Anton Paar; Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu,

modelo LC20AD, coluna Phenomenex Luna C18 (5 μ M, 150 mm x 4,6 mm), bomba de alta pressão CTO20A, detector SPD-20A, UV-VIS, utilizado para quantificar o ácido betulínico; pHmetro, modelo Q400AS, marca Quimis; Ultrassom com sonda, modelo W-450D, marca Branson Sonifier, utilizado no preparo das nanoemulsões; Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 500 MHz, modelo Avance DRX-500, marca Bruker, utilizado na obtenção dos espectros do ácido betulínico; Banho ultrassônico, modelo Q335d, marca Quimis; Zetasizer Nano, modelo ZS ZEN 90, marca Malvern, utilizado para obter o índice de polidispersão, potencial zeta e tamanho de partícula; estufa de secagem, modelo SL-101, marca Solab, utilizada no estudo de estabilidade.

4.4 Extração e caracterização do óleo de *C. procera*

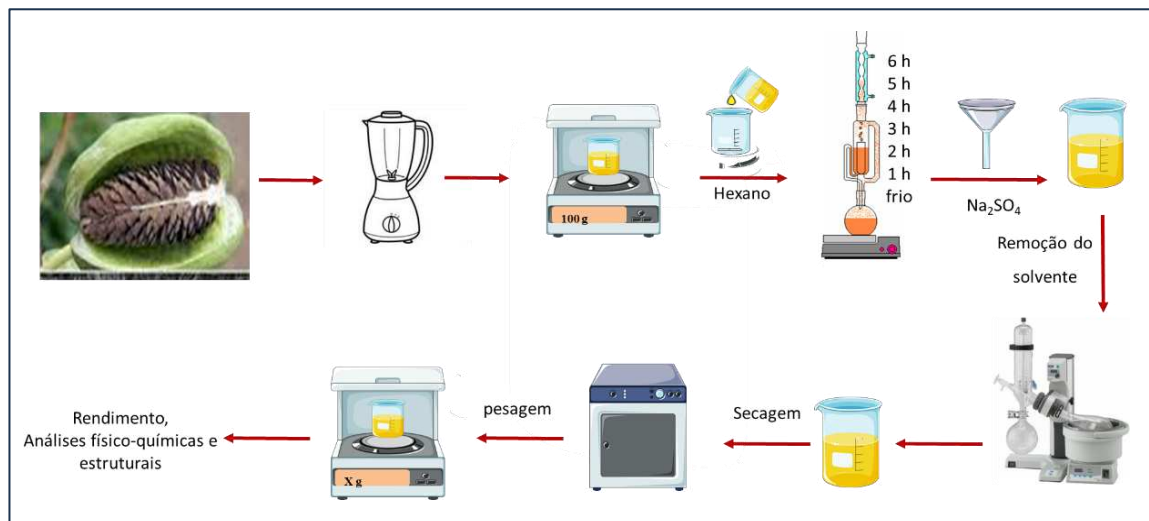
O óleo de *C. procera* foi extraído e caracterizado quanto ao perfil de ácidos graxos, Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, determinação da viscosidade e densidade, índice de acidez, índice de saponificação e índice de iodo.

4.4.1 Extração do óleo de *C. procera*

Para a extração do óleo, as sementes de *C. procera* foram retiradas dos frutos, secas em estufa a 48 °C por 48 horas (BARBOSA *et al.*, 2014) e em seguida moídas. Cerca de 100 g do material triturado foi transferido para um cartucho de papel e introduzido num extrator do tipo Soxhlet. Foram adicionados 500 mL de hexano de grau analítico, o sistema será aquecido e mantido sob refluxo por um período de 6 horas.

Após a extração foi adicionado ao solvente com o material extraído, sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), para retirada de água, posteriormente o hexano foi recuperado em evaporador rotativo à vácuo por aquecimento de aproximadamente 40 °C. O óleo obtido, após concentrado, será aquecido em estufa a 105 °C por 1 hora para retirada de umidade remanescente e, após resfriamento o óleo será pesado e calculado o rendimento. O Figura 8 ilustra o procedimento de extração do óleo de *C. procera*.

Figura 7 - Esquema de obtenção do óleo da *C. procera*



Fonte: o autor.

4.4.2 Otimização da extração do óleo das sementes de *C. procera*

Com o fim de avaliar os efeitos do tempo de extração sobre o rendimento e o índice de acidez do óleo das sementes de *C. procera*, foram realizadas extrações adotando-se os tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h de duração, bem como extração com hexano, a frio, por 48 h.

4.5 Perfil de ácidos graxos do óleo de *C. procera*

Inicialmente, o óleo de *C. procera* foi transesterificado segundo a metodologia adotada por Ferreira *et al.* (2019) com adaptação. A metodologia consiste no preparo de uma solução alcoólica contendo 1% (m/m) de hidróxido de sódio e 30% de metanol (m/m), ambos em relação à massa inicial de óleo utilizada na síntese. Para o preparo da solução foi utilizado como referência 10 g do óleo de *C. procera*. Na sequência, 0,10g do catalizador foi pesado em um erlemeyer e solubilizado em 4 mL de metanol sob agitação contínua. Após solubilização da base, o óleo foi adicionado lentamente ao conjunto reacional e mantido sob agitação constante por 1 h 30 min, à temperatura ambiente (25 °C). Após o tempo de reação a glicerina foi removida do meio reacional e o óleo transesterificado foi lavado com água destilada em um funil de decantação, até sua neutralização. O produto obtido foi recolhido em um Becker e

mantido em estufa a 105 °C por duas horas para remoção de traços de água. A conversão foi confirmada através de CCD (cromatografia de camada delgada) utilizando como revelador I2. Uma alíquota de 1 mg do óleo transesterificado foi adicionada a um *vial* e 1 mL de acetato de etila.

O conteúdo de ácidos graxos do óleo de *C. procera* foi determinado por meio da análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG/MS) em um equipamento SHIMADZU QP-2010 ULTRA utilizando coluna capilar DB-5 (30 m × 0,25 mm) e hélio como gás de arraste (fluxo de 0,6 mL/min). A temperatura inicial do forno foi ajustada em 120 °C e em seguida elevada até 300 °C a uma taxa de 10 °C/min, sendo mantida à temperatura final por 10 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 and 300 °C , respectivamente. O analisador quadrupolo foi ajustado para ionização por elétron (EI) e a leitura feita a uma na faixa entre 50 a 450 m/z.

4.5.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

O equipamento a ser utilizado para obtenção dos espectros de absorção das amostras na região do infravermelho será o espectrômetro Shimadzu modelo IRTracer-100, no modo ATR (Refletância Total Atenuada), os quais serão expressos pela relação transmitância (%) por número de onda (cm^{-1}), sendo as análises realizadas na faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.5.2 Determinação da viscosidade dinâmica e densidade

A determinação da viscosidade dinâmica do óleo extraído foi realizada utilizando o equipamento viscosímetro digital. As determinações foram realizadas em triplicata a 20 °C. A metodologia de análise utilizada foi a NBR-10441. Para a determinação de densidade do óleo extraído foi utilizado um densímetro digital. As determinações foram realizadas em triplicata a 20 °C. A metodologia de análise utilizada foi a NBR-14065.

4.5.3 Determinação dos índices de acidez, saponificação e iodo

As determinações dos índices de acidez, saponificação e de iodo foram realizadas em triplicata seguindo às metodologias oficiais da *American Oil Chemist's Society* (AOCS) e

American Society for Testing and Materials (ASTM). Foram utilizados reagentes grau analítico para a realização das análises. Segue na Tabela 3, as metodologias utilizadas na determinação dos referidos índices:

Tabela 3 - Métodos de análise para determinação de propriedades físicas

Análise	Metodologia
Índice de acidez	ASTM D-1298
Índice de saponificação	Cd 3-25 AOCS
Índice de iodo	Cd 1 - 25 AOCS

Fonte: o autor.

4.6 Caracterização do ácido betulínico

O estudo de caracterização do ácido betulínico foi realizado por meio da técnica de RMN ^1H , RMN ^{13}C e FTIR.

4.6.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para o BA

O espectro de transmitância no infravermelho do BA foi obtido na faixa entre 400 e 4.000 cm^{-1} , por meio de um analisador de infravermelho com transformada de Fourier, utilizando a técnica com o uso de pellets de KBr contendo 0,1% (m/m) da amostra. Os espectros foram registrados usando o software Opus 6,5.

4.6.2 Ressonância Magnética Nuclear – RMN ^1H e RMN ^{13}C

Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C do BA foram obtidos em espectrômetro operando na frequência ^1H a 500,6 MHz e do ^{13}C a 125,75 MHz. Para dissolução da amostra utilizou-se como solvente a piridina- d_5 deuterada. Preparou-se uma solução de ácido betulínico na concentração de 20 mg/0,6 mL de solvente. O espectro de ^1H foi referenciado pelo sinal em δ 8,69 da fração não deuterada da Piridina- d_5 e de ^{13}C pelo pico central do tripleto do sinal em δ 149,98 da Piridina- d_5 .

4.7 Desenvolvimento da formulação das nanoemulsões

4.7.1 Estabelecimento dos parâmetros para preparação

Foram preparadas 9 (nove) formulações diferentes para determinar as quantidades do óleo de *C. procera* e do surfactante Pluronic F127 que resultasse na formulação com características coloidais favoráveis à estabilidade da emulsão. As concentrações do óleo na solução foram 4, 8 e 12% (m/m) combinadas com as concentrações do surfactante de 1, 3 e 6% (m/m).

As combinações das formulações estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Formulações para determinação da condição ideal de obtenção das emulsões do óleo de *C. procera* com Pluronic F127

Formulação	Óleo de <i>C. procera</i> (%)	Pluronic F127 (%)
F1.1	4	1
F1.2	4	3
F1.3	4	6
F2.1	8	1
F2.2	8	3
F2.3	8	6
F3.1	12	1
F3.2	12	3
F3.3	12	6

Para cada formulação foi adicionado em cada tubo a quantidade de Pluronic F127 descrita na Tabela 4 seguida da quantidade de água e levados ao refrigerador a 5 °C até que o Pluronic F127 fosse totalmente solubilizado. Posteriormente foi adicionado em outro conjunto de tubos, as quantidades equivalentes de óleo de *C. procera* e submetido a aquecimento de 60 °C. Após solubilizada, cada solução de Pluronic F127 foi vertido sobre o óleo no outro tubo, sob agitação em turrax por 3 min. Em seguida o conteúdo de cada tubo foi submetido a sonicação em sonicator de sonda com amplitude de 70%, sob potência de 100-105 W, por 2 min (10 s *on*/ 10 s *off*). O experimento para cada formulação foi realizado em triplicata.

As quantidades de óleo e de F127 para 15 g de solução estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição das formulações projetadas para escolha da melhor combinação de óleo de *C. procera* e de Pluronic F127

Formulação	Óleo de <i>C. procera</i> (g)	Pluronic F127 (g)	Água (g)
F1.1	0,6	0,15	14,25
F1.2	0,6	0,45	13,95
F1.3	0,6	0,90	13,50
F2.1	1,2	0,15	13,65
F2.2	1,2	0,45	13,35
F2.3	1,2	0,90	12,90

Tabela 5 - Composição das formulações projetadas para escolha da melhor combinação de óleo de *C. procera* e de Pluronic F127

(continua)			
Formulação	Óleo de <i>C. procera</i> (g)	Pluronic F127 (g)	Água (g)
F3.1	1,8	0,15	13,05
F3.2	1,8	0,45	12,75
F3.3	1,8	0,90	12,30

Fonte: o autor.

Após o preparo, as emulsões foram submetidas ao teste de resistência ao estresse mecânico por centrifugação. As amostras também foram submetidas às análises de potencial zeta (mV), diâmetro hidrodinâmico (nm) e índice de polidispersão (PDI).

4.7.2 Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

Estas foram realizadas conforme a metodologia proposta por Carpenter e colaboradores (2016). Alíquotas de 10 µL de cada amostra de emulsão foram coletadas e diluídas 1000 vezes com água ultrapura. O produto dessa diluição foi homogeneizado em banho ultrassônico por 1 minuto. A partir destas amostras preparadas foram feitas as análises de potencial zeta através da técnica microeletroforese doppler a laser, índice de polidispersão e tamanho de partícula através da técnica ELD (Espalhamento de Luz Dinâmico).

Todas as medições foram feitas a 25 °C e investigadas através de varreduras automáticas com tempo de 60 s para estabilização da amostra. As análises foram realizadas em triplicata e seus valores expressos como a média aritmética das leituras dos dados. Após essas análises e teste de resistência ao estresse mecânico, considerou-se como a nanoemulsão preferencial aquela com valores característicos de soluções estáveis para potencial zeta e índice de polidispersão, bem como menor valor de tamanho de partícula, além de não apresentarem alteração do aspecto visual no teste de estresse mecânico.

4.7.3 Estresse mecânico

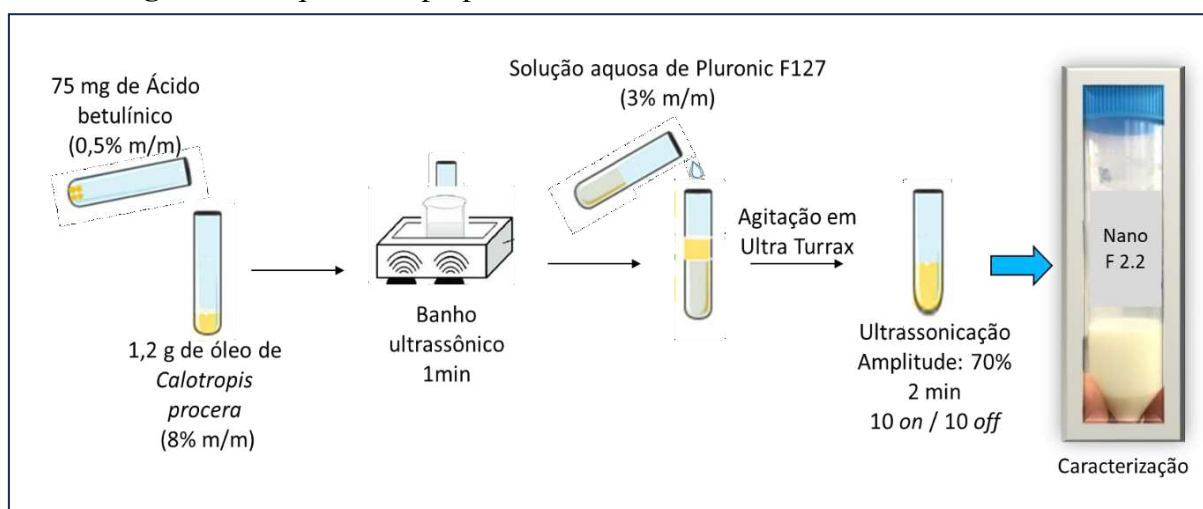
Para realização deste teste, foram coletadas alíquotas de 5 mL de cada amostra, colocadas em frascos e submetidas a condições de estresse mecânico, através da centrifugação a uma rotação de 3000 rpm, por 30 min conforme descrito por Sugumar, Mukherjee e Chandrasekaran (2015).

Ao final do teste o aspecto visual das amostras foi avaliado quanto à presença de cremação, precipitação, coalescência e separação ou não de fases das preparações.

4.8 Preparo e caracterização das nanoemulsões contendo ácido betulínico

Dentre as nove formulações foi selecionada a NE-F2.2, contendo 8% de óleo de *C. procera* e 3% de Pluronic F127. Com o uso desses parâmetros foi preparada a nanoemulsão contendo o ácido betulínico na proporção de 0,5% (m/m) de solução. A escolha dessa formulação se deu em função dos valores dos parâmetros obtidos após sua caracterização, tendo apresentado valores de Índice de Polidispersão, Tamanho de Partícula e Potencial Zeta, condizente com aqueles necessários à uma boa estabilidade coloidal. Além disso, essa formulação foi a que possibilitou carrear a maior quantidade do ativo BA. O produto obtido foi caracterizado quanto ao tamanho hidrodinâmico das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de ativo e eficiência de encapsulação conforme descrito a seguir (Figura 9).

Figura 8 - Esquema de preparo da nanoemulsão contendo o Ácido Betulínico



Fonte: o autor.

4.8.1 Método de obtenção da nanoemulsão com ativo

As nanoemulsões foram preparadas conforme as quantidades descritas na Tabela 5. A massa de 75 mg do BA (0,5% m/m) foi solubilizada em banho ultrassônico em 1,2 g de óleo de *C. procera* em um tubo de Falcon. A quantidade de ácido betulínico adicionada foi de 0,0750 g considerando uma pureza de 98,13% do ativo. Pluronic F127 (0,45g) foi pesado em outro tubo de Falcon e adicionado 13,35g de água, em seguida a mistura foi levada ao refrigerador a

5 °C até que todo o Pluronic fosse solubilizado. Na sequência, a solução com Pluronic foi vertida no tubo com o óleo e o ativo e mantida sob agitação no turrax por 3 min. Por fim, a formulação foi submetida a sonicação em um processador ultrassônico Branson Sonifier W-450D com sonda, com amplitude de 70%, potência de 100-105 W, por 2 min 10 s *on*/ 10 s *off* em banho de gelo. As formulações foram feitas em triplicata.

Tabela 6 - Composição da nanoemulsão contendo o ativo e controle

Formulação	Óleo (g)	Pluronic F127 (g)	Ac. Betulínico (g)	Água (g)
NE-F2.2	1,2	0,4500	0,075	13,275
Controle NE-F2.2	1,2	0,4500	0	13,350

Fonte: o autor.

4.8.2 Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

As análises de tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão das formulações foram realizadas nas condições descritas em 4.7.2.

4.8.3 Quantificação do ativo

A análise da solução de ácido betulínico foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV-VIS, marca/modelo Shimadzu CBM20A, bomba LC20 AD, Detector UV vis SPD29A, forno CTO20A. A coluna usada foi Luna 5 C18 (150 mm x 4,6 mm).

A metodologia usada seguiu o método proposto e validado no trabalho de Taralkar e Chattopadhyay (2012). Entretanto, o método foi revalidado devido a alteração da fase móvel. As figuras de mérito avaliadas para a validação foram: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e repetibilidade do método cromatográfico de acordo com a Resolução RDC n° 166 de 2017 (ANVISA) e o documento orientativo DOQCGCRE-008 do INMETRO.

4.8.4 Preparo da amostra

O BA foi quantificado, após o método validado, na formulação F2.2 por CLAE UV-VIS. A partir da nanoemulsão preparada a uma concentração de 7500 ppm, foi colhida uma alíquota de 20 µL e diluída em 2 mL de metanol obtendo uma concentração aproximada de 50

ppm para a realização da leitura. A solução foi filtrada em filtro de 0,45 μm para ser injetada no cromatógrafo.

4.8.5 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram: vazão de 1 mL/min à temperatura de 28 °C, fase móvel composta de 80% em acetonitrila e 20% em metanol em modo isocrático, volume de injeção de 20 μL e comprimento de onda de 210 nm.

4.8.6 Preparo dos padrões

Foram preparadas de forma independente 6 padrões de ácido betulínico em metanol com correção da massa considerando 98,13% de pureza nas concentrações de 5 ppm, 30 ppm, 60 ppm, 90 ppm e 180 ppm para obter a curva de calibração.

4.8.7 Validação do método analítico

4.8.7.1 Linearidade

Para demonstrar a linearidade de um método, deve-se estudar sua capacidade de fornecer respostas analíticas que tenham relação diretamente proporcional à concentração de um analito em uma amostra. Neste trabalho, o método analítico teve sua linearidade avaliada por meio da construção de curvas analíticas, em triplicata, nas concentrações de 5 ppm, 30 ppm, 60 ppm, 90 ppm e 180 ppm.

A curva analítica foi obtida plotando-se um gráfico de concentração versus área. Após a obtenção dos valores de área, a variância foi determinada em cada nível de concentração a fim de que fosse identificada a homocedasticidade (variâncias homogêneas) ou a heterocedasticidade (variâncias heterogêneas) através do Teste C de Cochran (teste de homogeneidade de variâncias) pelo qual é feita a comparação entre um valor crítico tabelado e um valor calculado pela razão entre o maior valor de variância e a soma de todas as variâncias. Depois de confirmado o comportamento homocedástico a equação da curva foi obtida, por meio de regressão linear, com o uso do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). O coeficiente de determinação R^2 foi determinado.

4.8.7.2 Limite de quantificação e limite de detecção

O limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2005).

Limite de detecção (LD) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio (ICH, 2005; NATA, 2013).

O limite de quantificação e de detecção foi estimado pela relação sinal/ruído. A relação sinal/ruído é determinada pela comparação dos sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos dos brancos de amostras, definindo-se a concentração mínima em que o analito pode ser detectado com confiança (BRASIL, 2020).

A relação sinal/ruído típica para a estimativa do limite de quantificação é de 10:1. Uma relação sinal/ruído de 3:1 é considerada aceitável para a estimativa do limite de detecção. É importante ressaltar que a região do ruído do branco deve ser a mesma do sinal medido (BRASIL, 2020).

4.8.7.3 Seletividade

Conforme o BRASIL (2020), a seletividade de um método instrumental de separação é medido pela capacidade que ele deve apresentar de medir com exatidão um composto diante de impurezas ou outros componentes, resultados de degradação de compostos e componentes da matriz e deve ser comprovada por meio da sua capacidade de identificação e quantificação do analito de interesse, de modo inquestionável, na presença de componentes que podem fazer parte da solução e/ou do solvente, como diluentes, impurezas e outros possíveis componentes da matriz (ANVISA, 2017).

A fim de determinar a seletividade do método foram feitas injeções do branco (sem o ativo) das nanoemulsões, as nanoemulsões F2.2 contendo o ativo, somente o solvente metanol e uma solução em metanol do padrão de ácido betulínico em três níveis de concentração, em triplicata. Foram então identificados os tempos de retenção do ácido betulínico na amostra e observadas a presença ou ausência de picos no mesmo tempo de retenção para o branco das nanoemulsões e do solvente. Os resultados foram comparados através do teste F de Snedecor e Teste T.

4.8.7.4 Recuperação

Para obtenção dos ensaios de recuperação os brancos das nanoemulsões foram fortificados em três níveis de concentração. Após a quantificação a recuperação foi calculada segundo a equação 3:

$$\text{Recuperação (\%)} = C1 - C2 / C3$$

Em que: C1 é a concentração do analito na amostra fortificada, C2 representa a concentração do analito na amostra não fortificada e C3, a concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

4.8.7.5 Repetibilidade

Brasil (2020) define como condição de repetibilidade de medição, a condição de medição em um conjunto de condições, que incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, as mesmas condições de operação, o mesmo local e o mesmo sistema de medição, bem como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos semelhantes por um curto espaço de tempo. A repetibilidade foi dada em função do desvio padrão relativo (DPR) obtido da quantificação do ativo, em triplicata, da F2.2.

4.9 Eficiência de Encapsulação

Para a amostra F2.2, determinou-se a eficiência de encapsulação (EE%) do ácido betulínico com o uso de um filtro de centrifugação 3000 MWCO Vivaspin turbo 15 - Sartorius.

Foi selecionado o corte de 3000 MWCO seguindo-se a recomendação do fabricante (SARTORIUS, 2016) de ser o filtro menor ou igual à metade do tamanho da espécie a ser recolhida. De fato, segundo Jagdale e colaboradores (2014), o tamanho aproximado das cápsulas obtidas na formulação com Pluronic F127 é de 12,5 KDa.

Utilizou-se a metodologia adaptada de Yu e colaboradores (2017), em que foi adicionada cerca de 0,8 g de emulsão nos tubos com filtro e depois centrifugada a 8000 rpm durante 30 minutos. Neste processo, separou-se o ácido betulínico encapsulado do não encapsulado. Na sequência foi analisado por CLAE, como descrito na seção 3.6.4.2. As

amostras foram separadas em triplicata para análise. Utilizou-se a equação 4 para o cálculo da EE (%):

$$EE(\%) = \frac{M}{M_0} \times 100$$

Sendo M a quantidade encapsulada do ativo e M_0 a quantidade adicionada do ativo.

4.10 Estudo de estabilidade coloidal

Duas amostras de 10 mL da nanoemulsão NE-F2.2 foram colocadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e testadas em incubadora 25 ± 2 °C e 45 ± 2 °C em triplicata, durante 90 dias, conforme metodologia adaptada de Teo *et al.* (2015). A aparência física, o tamanho das partículas, quantificação do ativo, o índice de polidispersão e o potencial zeta foram registrados para as amostras em intervalos de 30, 60 e 90 dias.

4.11 Caracterização das nanoemulsões por FTIR

Este estudo foi realizado por meio da análise de FTIR do ácido betulínico (ativo), da formulação F2.2 sem o ativo (branco) e da formulação contendo o ácido betulínico com o objetivo de caracterizar a formulação, conforme metodologia proposta por Ce associados (2015). As análises de FTIR foram descritas na seção 3.4.2. Para a análise de FTIR as formulações com e sem o ativo foram liofilizadas anteriormente.

4.12 Testes de segurança não clínicos *in vivo* em peixe-zebra

Para avaliar a segurança não clínica da nanoemulsão NE-F2.2, testes foram realizados para avaliar a atividade locomotora (teste de campo aberto) de animais (*Danio rerio*) e toxicidade aguda de acordo com as diretrizes ARRIVE, OECD (OECD, 1992) e Diretiva da UE 2010/63/EU.

A nanoemulsão contendo BA (NE-F2.2) e a nanoemulsão controle (sem BA) foram analisadas. As amostras foram testadas em condições assépticas e previamente esterilizadas. Uma solução de nanoemulsão sem ingrediente ativo (controle-NE) em água foi utilizada.

4.12.1 Animais

Neste estudo, foram utilizados peixes-zebra selvagens adultos (*Danio rerio*), machos e fêmeas, com idades entre 60 e 90 dias, aprovado pelo CEUA-UECE parecer 05299177/2021. Esses peixes foram obtidos da Agroquímica - Comércio de Produtos Veterinários LTDA (Ceará, Brasil). Os peixes mediam $3,5 \pm 0,5$ cm de comprimento e pesavam $0,4 \pm 0,1$ g. Grupos de 50 peixes-zebra foram aclimatados às condições de laboratório por 24 h em aquários de vidro ($40 \times 20 \times 25$ cm). Os aquários foram preenchidos com água desclorada com ProtecPlus® e equipados com bombas de ar e filtros submersos. A temperatura da água foi mantida a 25 °C e o pH foi de 7,0. Os peixes foram expostos a um ciclo circadiano de 14:10 h.

Os peixes receberam ração Spirulina® ad libitum 24 h antes dos experimentos. Ao final dos experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (2 a 4 °C) por 10 minutos até que a perda dos movimentos operculares fosse observada (CONCEA, 2016). No dia dos experimentos, os peixes foram selecionados aleatoriamente, transferidos para uma esponja úmida e imediatamente tratados com amostras de teste ou controle por via oral (a.o.) (COLLYMORE *et al.*, 2015).

4.12.2 Teste de campo aberto

Após a aclimação, os peixes-zebra foram transferidos individualmente para béqueres de vidro de 250 mL contendo 150 mL de água do aquário por um breve período de descanso. Os tratamentos orais foram administrados com uma micropipeta estéril de 20 µL de volume variável.

Para avaliar potenciais alterações na atividade motora, sedação e/ou relaxamento muscular, o teste de campo aberto foi conduzido conforme descrito na literatura (Ahmad & Richardson, 2013). Grupos de seis peixes-zebra ingeriram 20 µL da amostra ($4, 8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $16 \mu\text{g mL}^{-1}$) ou um controle veículo (20 µL). Um grupo controle não tratado também foi incluído (Naive).

Uma hora após o tratamento, os peixes-zebra foram colocados em placas de Petri de vidro de 10×15 cm preenchidas com água do aquário. As placas foram divididas em quadrantes, e a atividade locomotora foi avaliada pela contagem do número de linhas de cruzamento (LC) para cada peixe durante um período de observação de 5 minutos.

4.12.3 Toxicidade aguda

Peixes (n = 6/cada) foram tratados com 20 μL (*o.a.*) de NE-F2.2 (4 ou 8 ou 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ou NE-controle e mantidos em repouso para avaliar a mortalidade (Y. HUANG *et al.*, 2014). O grupo tratado com o veículo foi utilizado como controle negativo. Após um período experimental de 96 horas, os peixes mortos em cada grupo experimental foram contados. A partir desses dados, foi determinada a concentração letal mediana (CL50), a concentração da substância capaz de causar a morte de 50% dos peixes. Para esse cálculo, utilizou-se o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber, com nível de confiança de 95%, conforme descrito por (ARELLANO-AGUILAR, *et al.*, 2015).

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA - UECE), sob número de protocolo 05299177/2021.

4.13 Estudo cinético de liberação *in vitro*

O ensaio de liberação de ácido betulínico em nanoemulsão NE-F2.2 foi realizado em células de difusão do tipo Franz, com membrana de difusão de nitrato de celulose hidrofílica (Millipore). A área de difusão foi de 1,55 cm^2 , o compartimento receptor foi preenchido com um volume de 12,0 mL de PBS tamponado em etanol/fosfato, pH 7,4, 50:50, e agitado magneticamente a 200 rpm (Machado *et al.*, 2013; Cardia *et al.*, 2019). A amostra da nanoemulsão (0,25 mL) e a solução etanólica contendo BA livre foram colocadas em compartimentos doadores separados, e a temperatura foi mantida a $37,0 \pm 0,5$ °C durante as 72 horas do experimento. Para quantificar a substância ativa liberada, alíquotas de 1 mL foram coletadas do compartimento receptor em intervalos de tempo para quantificação por HPLC, e o mesmo volume foi substituído por um novo meio receptor. O estudo foi realizado em triplicata para a nanoemulsão e para a solução de BA livre, ambas com a mesma massa de substância ativa.

Para avaliar a cinética de liberação, foram aplicados os modelos matemáticos de primeira ordem, Higuchi e ordem zero, e o mecanismo de liberação foi avaliado com base no valor do coeficiente de difusão (n) da equação de Korsmeyer-Peppas (CRACIUM *et al.* 2019), cujas equações dos modelos estudados são apresentadas a abaixo:

$$\text{Ordem zero: } Q = k_0 t + Q_0 \quad (1)$$

$$\text{Higuchi: } Q = k_H t^{1/2} \quad (2)$$

$$\text{Primeira ordem: } \ln Q = \ln Q_0 + k_1 t \quad (3)$$

Korsmeyer-Peppas: $M_t/M_\infty = k_{KP} t^n$ (4)

Em que, Q é a quantidade cumulativa de fármaco liberada no tempo t , Q_0 é a quantidade inicial de fármaco na solução, M_t/M_∞ é a fração do fármaco liberada no tempo t , n é o expoente de difusão, k_0 , k_1 , kH e k_{KP} são as constantes de liberação para o modelo de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas, respectivamente (BUDINČIĆ *et al.*, 2021).

4.14 Avaliação do potencial citotóxico *in vitro*

A avaliação do potencial citotóxico da nanoemulsão F2.2, do controle negativo da formulação F2.2 e do ácido betulínico foi realizada no Laboratório de Oncologia Experimental localizado no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC (NPDM).

Para determinação do potencial citotóxico, foi realizado o Teste do MTT em células não tumorais de L-929 (fibroblastos de murino), em células tumorais de HCT-116 (carcinoma colorretal), em células tumorais de SNB-19 (glioblastoma) e em PC3 (carcinoma de próstata humano) após 72 h de incubação.

Desenvolvido por Mossmann em 1983, o teste de MTT é baseado na capacidade da succinato desidrogenase, uma das enzimas do Ciclo de Krebs presentes somente nas células mitocondriais metabolicamente ativas, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Essa técnica permite analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula (GHASEMI *et al.*, 2021).

As linhagens HCT-116 (carcinoma de cólon humano), SNB-19 (glioblastoma humano), PC3 (carcinoma de próstata humano) e L929 (fibroblasto murino) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). As linhagens tumorais foram cultivadas em meio RPMI 1640 e a linhagem L929 foi cultivada em meio DMEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina), mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Foram testadas as amostras de ácido betulínico em solução de DMSO, ácido betulínico em óleo de *C. procera*, nanoemulsão F2.2, branco da nanoemulsão F2.2. O ácido betulínico e o óleo de *C. procera* contendo o ácido betulínico foram testados nas concentrações de 5 µg/mL em todas as linhagens. As formulações das nanoemulsões foram testadas com a proporção do princípio ativo encapsulado 7,5 µg/mL.

As células foram plaqueadas nas concentrações de 7×10^4 , 10×10^4 , 10×10^4 , 7×10^4 cels/mL para as linhagens HCT-116, SNB-19 e PC3 e L929, respectivamente, sendo as amostras adicionadas posteriormente.

As placas foram então incubadas com os compostos em estufa e mantidas a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 e 95% de umidade por 72 h. Após a incubação o conteúdo foi centrifugado e o sobrenadante foi removido. Em seguida foi adicionado 100 μL da solução de MTT (sal de tetrazolium) em cada poço e novamente incubada por mais 3.

Após a incubação as placas foram centrifugadas e retirada a solução de MTT. A absorbância a 595 nm foi lida após dissolução do precipitado de formazan com 100 μL de DMSO no espectrofotômetro VICTOR® Nivo™ Multimode Microplate Reader.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e caracterização do óleo de *C. procera*

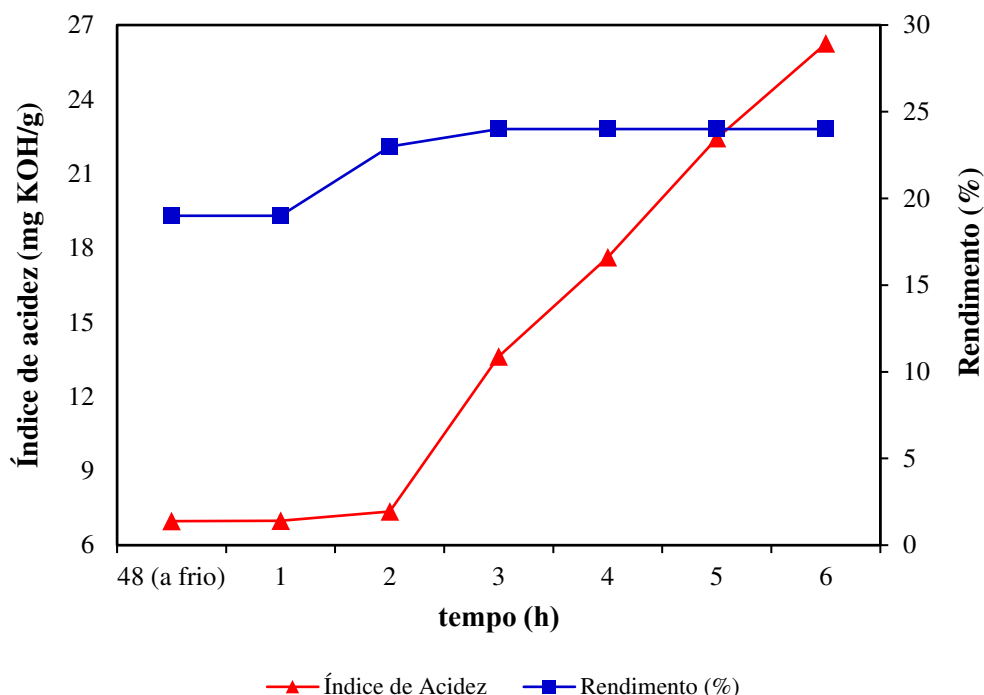
Após a extração do óleo por Soxhlet durante 6 horas a partir de 100 gramas de semente de *C. procera* obteve-se um rendimento médio 24%. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Suilabi *et al.* (2020), em pesquisa conduzida sobre o óleo de *C. procera* na região Nordeste do Brasil. Outro resultado de estudos do teor de óleo dessas sementes na região Nordeste apontou um rendimento entre 21% e 24% (MAZEN *et al.*, 2020), confirmando a tendência desse percentual de óleo da espécie. Os resultados para os 6 (seis) tempos de extração utilizados, bem como para a extração a frio, são mostrados na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7 - Avaliação da variação dos rendimentos de extração e índices de acidez do óleo das sementes de *C. procera* para diferentes tempos de extração e extração a frio com hexano

Tempo de extração (h)	Rendimento (% m/m)	Índice de acidez (mg de KOH g ⁻¹)
1	19	6,98
2	23	7,36
3	24	13,61
4	24	17,62
5	24	22,43
6	24	26,25
48 (a frio)	19	6,97

Fonte: o autor.

A Figura 10 mostra que o tempo de extração de 4 horas é o suficiente para extrair todo o óleo das sementes de *C. procera*. Esse mesmo tempo também foi relatado por Sousa *et al.* (2018) e muito semelhante ao encontrado por Barbosa *et al.* (2014).

Figura 9 - Percentual de óleo extraído e índice de acidez *versus* tempo de extração

Fonte: o autor.

Entretanto, o índice de acidez calculado para o óleo extraído no tempo de 4 horas foi de 13,61 mg KOH g⁻¹ amostra, contra 7,36 mg de KOH g⁻¹ obtido com a extração no tempo de 3 horas. Essa grande elevação da acidez com o aumento de 1 hora no tempo de extração, sugere uma maior vantagem do procedimento de extração a 3 horas em comparação ao de 4 horas, visto que, muitas aplicações com óleos vegetais consideram a baixa acidez um fator determinante. Além disso, a extração após 2 horas, elevou o rendimento em apenas 1%, não sendo vantajosas, portanto, extrações com tempo maiores, considerando a elevação brusca do Índice de Acidez. Portanto, tendo o processo de extração do óleo de *C. procera* utilizado neste trabalho (extração a frio, com hexano, por 48 h), apresentado índice de acidez de 6,97 mg KOH g⁻¹, mostrou-se adequado, quando comparado ao valor estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2005), de 4,0 mg KOH g⁻¹, para óleos prensados a frio e não refinados.

5.1.1 Perfil dos ácidos graxos do óleo de *C. procera*

A composição química dos ácidos graxos foi obtida por CG-EM cujos resultados estão listados na Tabela 8. Conforme mostrou a análise de GCMS, o óleo de bombardeira é composto majoritariamente por ácidos graxos insaturados (63,64%), sendo em grande parte monoinsaturados (52,24%), dos quais 46,21% é ácido oleico e 6,03% é de ácido palmitoleico.

O percentual de poli-insaturados corresponde ao ácido linoleico, com 11,40%. A porção de ácidos saturados encontrados foi de 30,20%, sendo 20,16% de ácido palmítico e 10,04% de ácido esteárico.

Tabela 8 - Composição percentual da massa dos ácidos graxos no óleo de *C. procera* e comparação com dados da literatura

Composto	Composição (%)	Valores reportados (%)		
		Barbosa e Oliveira, 2014	Sousa <i>et al.</i> , 2018	Rao <i>et al.</i> , 1983
Ácido oleico 18:1	46,21	31,9	33,30	47,20
Ácido palmitoleico 16:1	6,03	2,00	1,70	0,00
Ácido linoleico 18:2	11,40	38,70	35,30	27,10
Ácido palmítico 16:0	20,16	15,10	15,80	16,70
Ácido esteárico 18:0	10,04	7,90	9,50	9,00
Outros	6,16	4,40	4,40	-
Ácidos graxos saturados	30,20	23,00	25,30	25,70
Ácidos graxos insaturados	63,64	72,30	70,30	74,30
Total	93,84	95,60	95,60	100

Os dados obtidos estão de acordo com a literatura (Barbosa *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2018; Mazen *et al.*, 2020) segundo a qual, o óleo extraído das sementes de *C. procera* é constituído principalmente pelos ácidos graxos oleico (33,3%) e linoleico (35,3%), contendo também, os ácidos: palmítico (15,8%), esteárico (9,5%), elaidico (4,2%) e palmitoleico (1,7%).

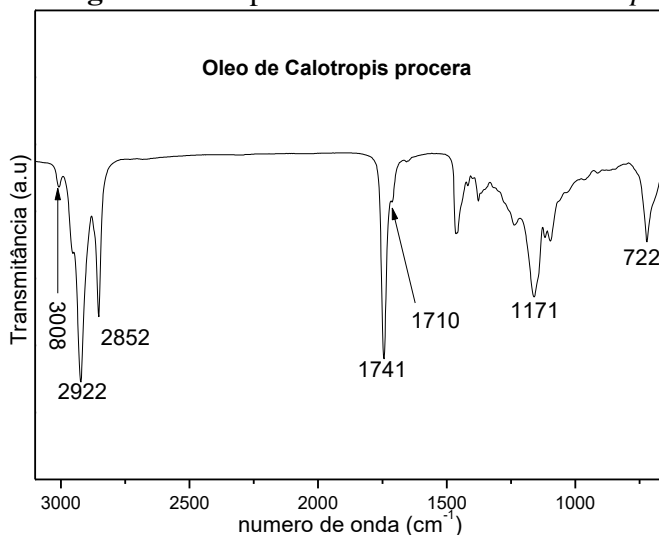
5.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de FTIR do óleo de *C. procera* extraído e respectivas bandas, encontram-se representados na Figura 11.

O óleo de *C. procera*, mostrou duas fortes bandas de absorção, uma a 1741 cm^{-1} próprias do grupo carbonila (-C=O) e outra a 1435 cm^{-1} , equivalente a dobramento de ligações CH_2/CH_3 . As bandas a 1097 , 1171 e 1236 cm^{-1} referem-se aos grupos C-O de ésteres, equivalentes a estiramento axial simétrico e assimétrico. No espectro, as bandas a 3008 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} , se referem ao estiramento das vibrações de -C-H , -CH_2 e -CH_3 , respectivamente. Também se observa o estiramento correspondente aos carbonos olefínicos na banda em 722 cm^{-1} , o que evidencia a presença de insaturações, uma vez que não foram feitas reações para eliminação de ligações duplas (FERREIRA *et al.*, 2019; SOUSA *et al.* 2020).

Devido à acidez relativamente elevada do óleo de *C. procera* (número de acidez total de 26,7 mgKOH/g), aparece uma banda fraca a 1710 cm⁻¹ correspondente ao estiramento das vibrações dos grupos carbonílicos de ácido carboxílicos.

Figura 10 - Espectro de FTIR do óleo de *C. procera*



Fonte: o autor.

5.1.3 Análise físico-química do óleo de *C. procera*

O índice de iodo avalia o grau de insaturação do óleo e é expresso em número de centigramas de iodo absorvido pela amostra (percentual de iodo absorvido). A importância da determinação do teor de iodo do óleo é que através dele tem-se uma ideia do teor de ácidos graxos insaturados e da propensão ao ranço oxidativo da substância.

Ao avaliar-se os principais índices analíticos do óleo de *C. procera*, conforme mostrado na Tabela 9, confirma-se a identidade do óleo extraído. Observa-se que o índice de iodo encontrado, de 83.51 ± 0.8 g I₂. 100 g⁻¹, foi relativamente baixo quando comparado a outros óleos como o da castanha do Pará (100.2 g I₂.100 g⁻¹) e o da semente da seringueira (133 g I₂.100 g⁻¹) descritos por Sousa *et al.* (2018) e KAMALAKAR *et al.* (2013). Entretanto, esse valor é considerado alto quanto ao critério que define óleos com alto grau de insaturações (Moura *et al.*, 2019), confirmando que o óleo de *Calotropis procera* possui um teor elevado de ácidos graxos insaturados, conforme resultados obtidos por CG-EM neste estudo.

Tabela 9 - Propriedades físico-químicas do óleo de *C. procera* e comparação com o óleo de outras espécies de plantas

Propriedades	Óleo de <i>C. procera</i>	Óleo de Moringa *	Óleo de pequi**
Índice de acidez total (mg de KOH g ⁻¹)	25,90 ± 1,87	-	3,24 ± 0,14
Índice de iodo (mg I ₂ 100 g ⁻¹)	83,51 ± 0,80	-	71,97 ± 19,32
Índice de saponificação (mg KOH g ⁻¹)	176,81 ± 0,50	-	-
Massa específica a 20 °C (g cm ⁻³)	0,89	0,91	0,92
Viscosidade cinemática a 40 °C (mm ² s ⁻¹)	16,76	33,60	34,61
Viscosidade cinemática a 100 °C (mm ² s ⁻¹)	4,37	7,40	-
Índice de viscosidade	183,90	195,60	-

* (MOREIRA *et al.*, 2020)** (FERREIRA *et al.*, 2019)

O índice de saponificação (IS) encontrado (176,81 ± 0,5 mg KOH g⁻¹) está próximo ao de outros óleos vegetais citados por Sousa *et al.* (2018) como o de soja (189 a 195 mg KOH g⁻¹) e de canola (182 a 193 mg KOH g⁻¹), entretanto, ainda menor que esses. O índice de saponificação refere-se a todos os ácidos graxos presentes na amostra, livres e esterificados. Essa medida depende da massa molecular e da concentração percentual de componentes de ácidos graxos presentes em ésteres metílicos do óleo estudado. Os óleos láuricos, de cadeia média, têm uma porcentagem maior de ligações éster (IS = 240-250 mg KOH g⁻¹) do que os óleos de cadeia longa como o de soja (IS = 189 a 195 mg KOH g⁻¹). Assim, o valor do índice de saponificação do óleo analisado, aponta que se trata de uma substância composta por ácidos graxos de cadeia longa, como confirmado pela análise de CG-EM feita neste estudo.

O óleo de *C. procera* apresentou alto índice de viscosidade (IV). Essa medida indica a dimensão da variação na fluidez do óleo conforme varia a temperatura, quanto maior for o índice de viscosidade, menor a variação do valor da viscosidade com a temperatura. O IV do óleo de *C. procera* foi de 183,9, indicando que esse material não sofre grandes alterações em sua viscosidade com a variação de temperatura, o que pode ser percebido nas análises de viscosidade cinemática cujos valores a 40 °C e 100 °C, foram de 16,756 mm² s⁻¹ e 4,3675 mm² s⁻¹, respectivamente.

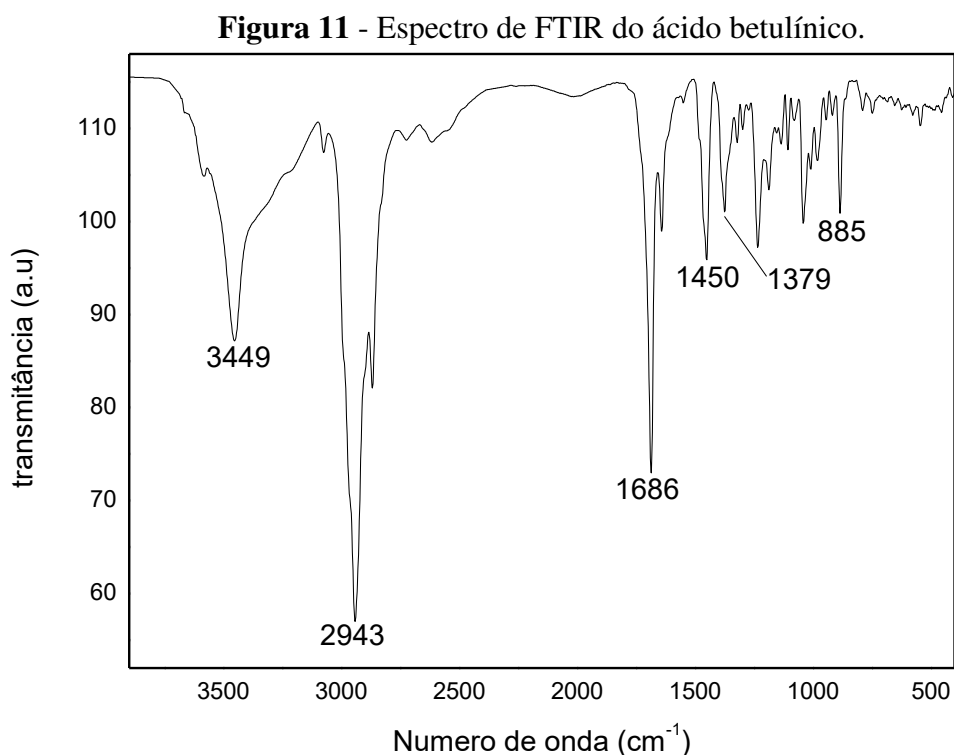
A viscosidade é um fator relevante tanto para a caracterizar-se de um óleo quanto para a prever-se a estabilidade de uma emulsão óleo em água. As viscosidades das fases, dispersa e contínua, influenciam fortemente no resultado do processo de redução de tamanho das gotículas de óleo em uma emulsão. As viscosidades das duas fases não podem ser muito diferentes; assim, óleos muito viscosos, podem ter seus tamanhos de gotículas reduzidos, elevando-se a viscosidade da fase contínua (SINGH *et al.*, 2017).

A massa específica encontrada para o óleo de *C. procera* foi de $0,8862 \text{ g cm}^{-3}$, este valor é similar ao encontrado na literatura para outros óleos vegetais como pequi e moringa (FERREIRA *et al.* 2019; MOREIRA *et al.*, 2020).

5.2 Caracterização do ácido betulínico

5.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de transmitância obtido por FTIR do ácido betulínico, mostrado na Figura 12, apresentou um perfil de absorção condizente com estruturas terpênicas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma banda intensa e outra larga, com absorção máxima em 3449 cm^{-1} própria do estiramento de hidroxila; um grupo de bandas de absorção típicos de estiramentos C-H na região de 2943 cm^{-1} , com intensidade própria da presença de uma cadeia hidrocarbonada longa e não linear. Também, é importante notar-se uma banda fina e intensa em 1686 cm^{-1} , de estiramento

de ligação (C=O). Na Tabela 10, é feita uma comparação com os dados obtidos por PAI *et al.* (2011), cujos resultados corroboram com os obtidos nesta pesquisa.

Tabela 10 - Atribuições das principais bandas de transmitância no infravermelho para o ácido betulínico.

Posição da banda (cm ⁻¹)	Valor de Referência (PAI <i>et al.</i> , 2011) (cm ⁻¹)	Atribuições
3449	3446	ν O–H
2943	2943	ν C–H
1686	1668	ν C=O
1450	1452	δs C–H (–CH ₂ –)
1379	1378	δs C–H (–CH ₃)
1043	1038	va C–OH
885	883	δsp =CH ₂ terminal

Legenda: δ – deformação angular; ν – deformação axial; a – assimétrica, ρ – vibração fora do plano e s – simétrica
Fonte: Pai *et al* (2011) adaptado.

5.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C (Figuras 13 e 14) do ácido betulínico analisado, confirmam as características de uma estrutura triterpênica. O espectro de RMN de ¹H mostrou sinais para 6 grupos metila em δH (3H, s), sinais em 4,92 (1H, s, H-29α) e 4,76 (1H, s, H-29β) correspondente a um grupo metileno sp² (=CH₂) conforme mostrado na Tabela 11 e Figura 12.

Figura 12. Espectro de RMN ¹H do ácido betulínico a 500 mHz

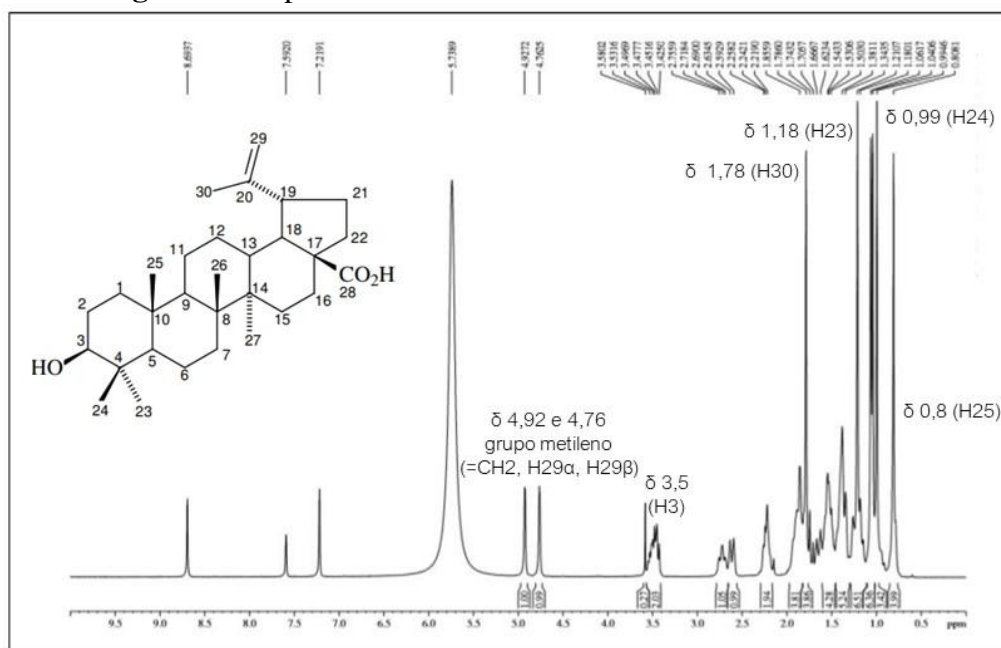


Tabela 11 - Dados do espectro de RMN ^1H para o ácido betulínico a 500 mHz

1H	δ	Valor de Referência (Noviany & Osman, 2021; WANG <i>et al</i> , 2016)	Multiplicidade/Atribuições
3	3,42	3,40	m/1H
13	2,69	2,68	t/1H
16	2,59	2,58	d/1H
21	2,21	2,21	m/1H
29 β	4,92	4,91	s/1H
29 α	4,76	4,74	s/1H
Me27	1,04	1,05	s/3H
Me26	1,04	1,03	s/3H
Me30	1,78	1,77	s/3H
Me23	1,18	1,19	s/3H
Me24	0,99	0,94	s/3H
Me25	0,80	0,80	s/3H

Legenda: s- singlete, d-dublete, m-multipeto, t-triplete

Os sinais mostrados em δ 7,21, δ 7,59 e δ 8,69 se referem à fração não deuterada da Piridina-d5. Observa-se um sinal intenso em δ 5,73 que indica o próton da água presente no solvente. Os deslocamentos obtidos neste estudo são semelhantes aos encontrados por Wang *et al.* (2016) para o espectro de RMN ^1H do ácido betulínico.

O espectro de RMN de ^{13}C do ácido betulínico (Figura 13) apresentou sinais para 29 carbonos, de acordo com os dados da Tabela 12, próprios de triterpenos. Também foi observada a presença dos carbonos sp^2 em (δ 110,17) e (δ 151,62), um oximetínico (δ 78,44) e ainda um carbono carbonílico (δ 179,34), confirmando a estrutura do triterpeno ácido.

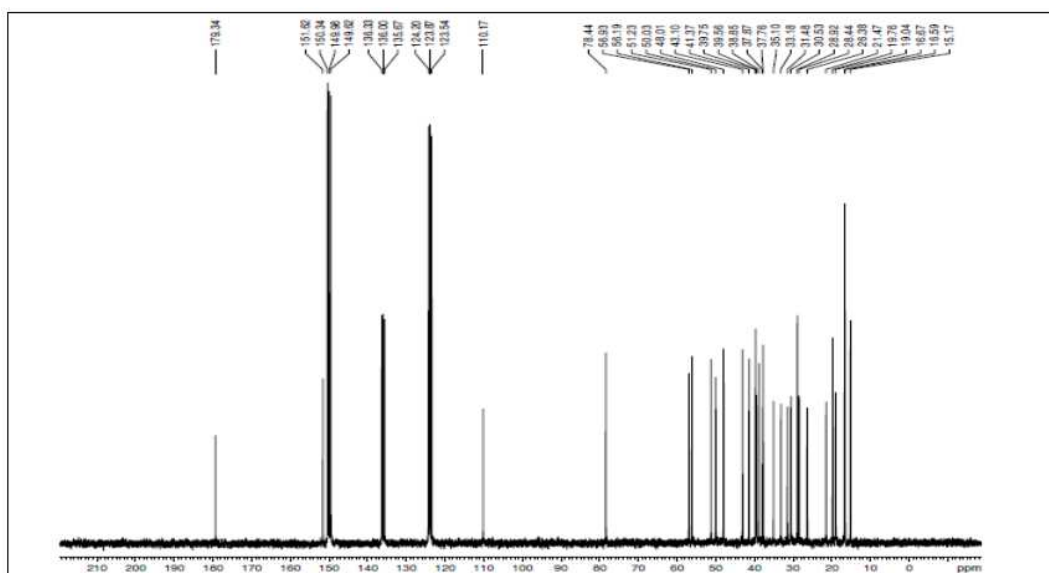
Figura 13 - Espectro de RMN de ^{13}C do ácido betulínico.

Tabela 12 – Dados do espectro de RMN ^{13}C para o ácido betulínico.

^{13}C	Δc	δc (Noviany e Osman, 2021; (Cantanhede <i>et al.</i> , 2017))
1	39,6	39,5
2	28,4	28,4
3	78,4	78,3
4	39,8	39,7
5	56,2	56,1
6	19,0	18,9
7	35,1	35,0
8	41,4	41,3
9	51,2	51,1
10	37,7	37,7 e 37,8
11	21,5	21,4
12	26,4	26,3
13	38,9	38,9
14	43,1	43,0
15	30,5	30,4
16	33,1	33
17	56,9	56,8
18	50,0	49,9
19	48,0	47,9
20	151,6	151,5
21	31,4	31,4
22	37,6	37,7 e 38,8
23	28,7	28,8
24	16,6	16,5
25	16,7	16,6
26	-	16,6
27	15,2	15,1
28	179,3	179
29	110,2	110,1
30	19,7	s/3H

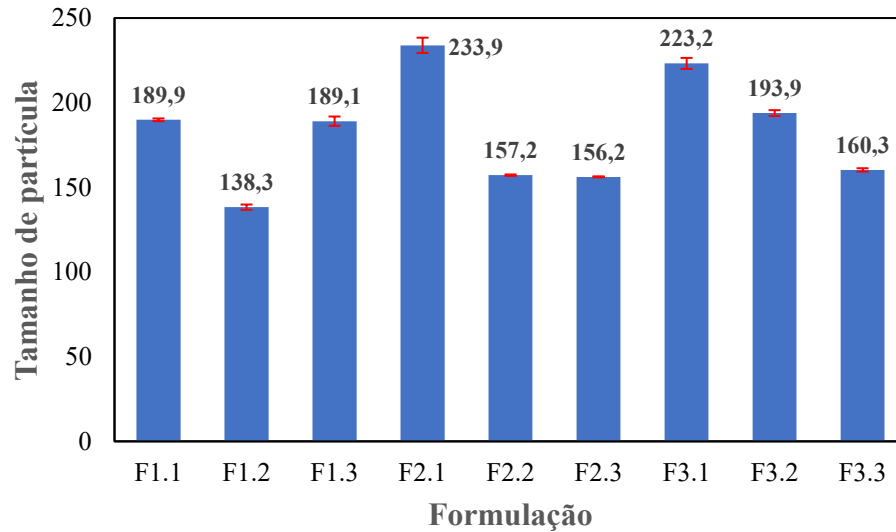
Legenda: δC : deslocamento em ppm dos carbonos

Fonte: Adaptado de (CANTANHEDE *et al.*, 2017).

5.3 Desenvolvimento da formulação das nanoemulsões

Para a obtenção de sistemas nanoemulsionados foi necessário verificar qual a proporção de óleo e de tensoativo que resultasse em uma nanoemulsão com características de estabilidade coloidal, de acordo com os valores de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.

De acordo com a Figura 15, o maior tamanho de partícula foi apresentado pela emulsão F2.1 com 233,9 nm.

Figura 14 - Formulações *versus* tamanho de partícula

Considerando o desvio padrão das medições de tamanho médio de partícula como mostra a Figura 15, os resultados apresentaram-se semelhantes para as formulações F2.2, F2.3 e F3.3, com tamanhos de 157,2 nm, 156,2 nm e 160,3 nm, respectivamente.

As aplicações médicas das nanopartículas são bastante dependentes do tamanho de partícula, condição que muitas vezes está relacionada aos requisitos e características dos sistemas biológicos estudados (RAHN-CHIQUE *et al.*, 2017).

A estabilidade física das emulsões também é dependente do tamanho de partícula, quanto menor a dispersão das partículas, mais estável o sistema. A literatura relata a obtenção de nanoemulsões estáveis, contendo ácido betulínico, cujos tamanhos de partículas se apresentavam entorno de 200 nm (CAVAZOS-GARDUÑO *et al.*, 2015).

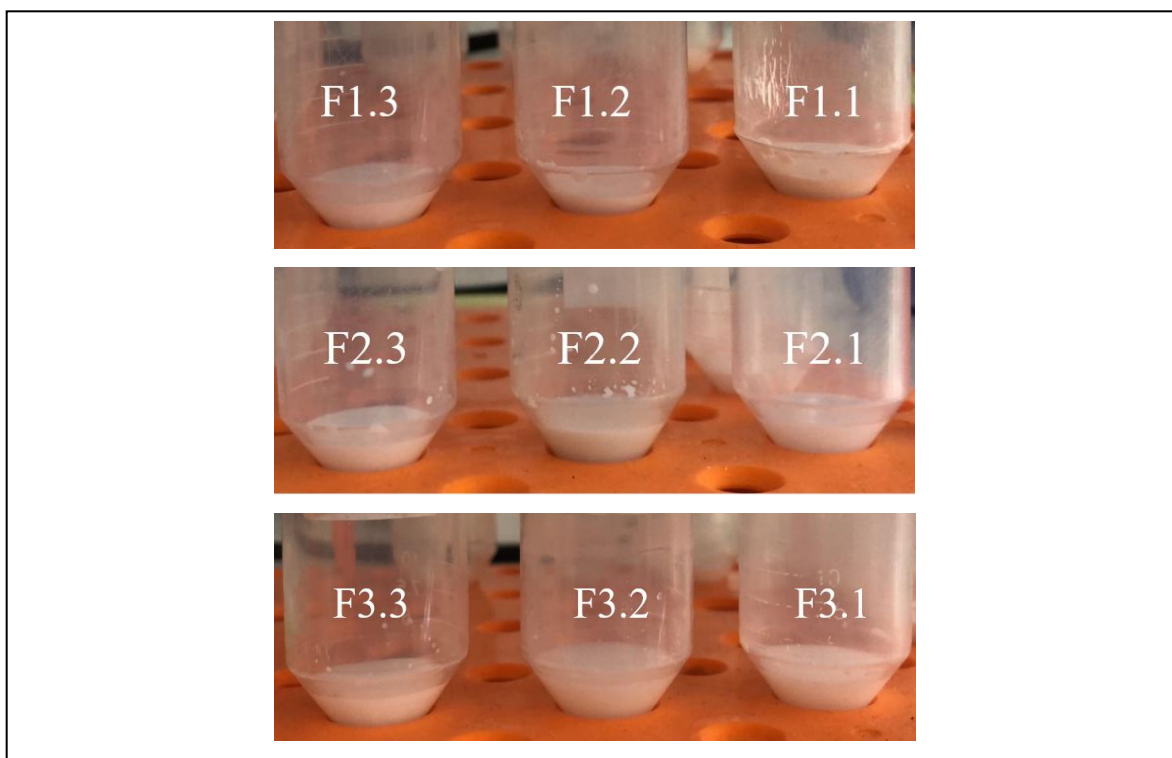
Segundo Mohammed *et al.* (2020) e (Pengon *et al.*, 2013), um indício importante da instabilidade de emulsões, relacionado ao tamanho de partícula, é a *cremeação*, do inglês *creaming* (sedimentação ou ascensão), que é dado pela velocidade de sedimentação (V) em função do raio da gotícula R , da aceleração da gravidade (g), da diferença de densidades entre as fases contínua e dispersa ($\Delta\rho$), segundo a equação de Stokes:

$$V = \frac{2R^2 g \Delta\rho}{9\eta}$$

Em que η é a viscosidade da fase contínua da emulsão.

No teste de estresse mecânico usado para verificar o comportamento das emulsões para esse indicador, nenhuma das emulsões formuladas apresentou *cremeação*, conforme pode-se observar na Figura 16.

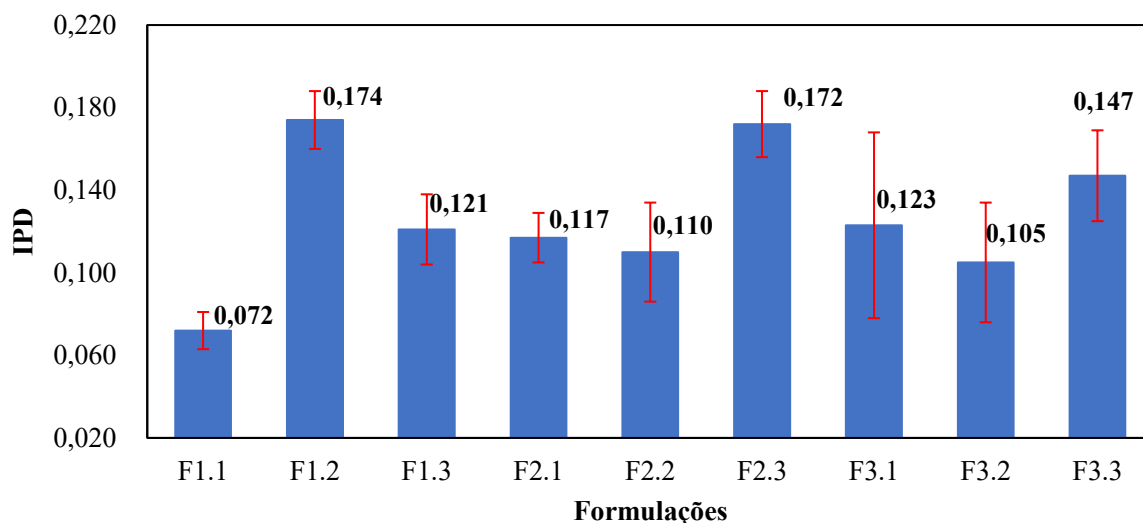
Figura 15 - Aparência das 9 nanoemulsões após o teste de estresse



Conforme os dados da Figura 15, todas as formulações apresentaram tamanhos de partículas com características favoráveis a estabilidade coloidal, o que foi confirmado pela aparência das formulações após o teste de estresse mecânico mostrado na Figura 16.

Outro fator importante para avaliar-se a estabilidade de nanoemulsões é a distribuição do tamanho de partícula ou índice de polidispersão (PDI), medida adimensional cujo valor determina que, quanto mais próximo for de zero, mais homogêneo será o tamanho da população das partículas, e quanto mais próximo de um, mais heterogêneo será o tamanho da população de partículas (COELHO *et al.*, 2016). Com base no PDI, pode-se prever se a emulsão apresentará ou não estabilidade coloidal no decorrer do tempo. O fenômeno denominado de amadurecimento de Ostwald, estabelece que, com o tempo, partículas com tamanhos maiores englobam partículas menores até a coalescência ou separação das fases.

A Figura 17 mostra a variação do PDI em função das 9 formulações testadas neste estudo.

Figura 16 - Formulações versus índice de polidispersão

Segundo Machado e associados (2023), as nanopartículas que possuem valor de PDI entre 0 e 0,1 são classificadas como partícula estreitamente monodispersa, entre 0,1 e 0,4 são definidas como moderadamente polidispersa, e ainda, amplamente polidispersa quando o PDI se achar maior 0,4. Segundo esse critério, observando os valores plotados na Figura 8, percebe-se que, com exceção da formulação F1.1 (PDI=0,072), as demais formulações resultaram em emulsões com tamanhos de partículas entre 0,1 e 0,4 estando, pois, classificadas como partículas moderadamente polidispersas. Portanto, todas as formulações apresentaram tamanhos de partículas que sugerem estabilidade coloidal.

A análise do potencial zeta, cujos dados são mostrados na Figura 17, reflete o potencial de superfície das partículas. As mudanças na relação com o meio dispersante influenciam o potencial zeta. Nessa mudança, ocorre a separação de grupos funcionais na superfície da partícula ou a ocorrência de adsorção de espécies iônicas que podem se encontrar no meio aquoso em dispersão (MAGENHEIM e BENITA, 1991). Esta análise também pode indicar a estabilidade das nanoemulsões, uma vez que, cargas mais elevadas dificultam a união de partículas, reduzindo suas agregações e consequente precipitação. Valores altos de potencial zeta, em módulo, levam à predominância de forças repulsivas (forças de London) favorecendo a dispersão das partículas e dando mais estabilidade ao sistema (Mishra *et al.*, 2009). Entretanto, em valores de potencial zeta baixos, predominam as forças atrativas em relação às repulsivas, o que conduz o sistema à uma aproximação das partículas, podendo resultar em fenômenos de instabilidade da emulsão.

A literatura mostra que valores absolutos de PZ > 30 mV são favoráveis a estabilidade e valores acima de 60 mV são desejáveis. Valores próximos de 20 mV são próprios

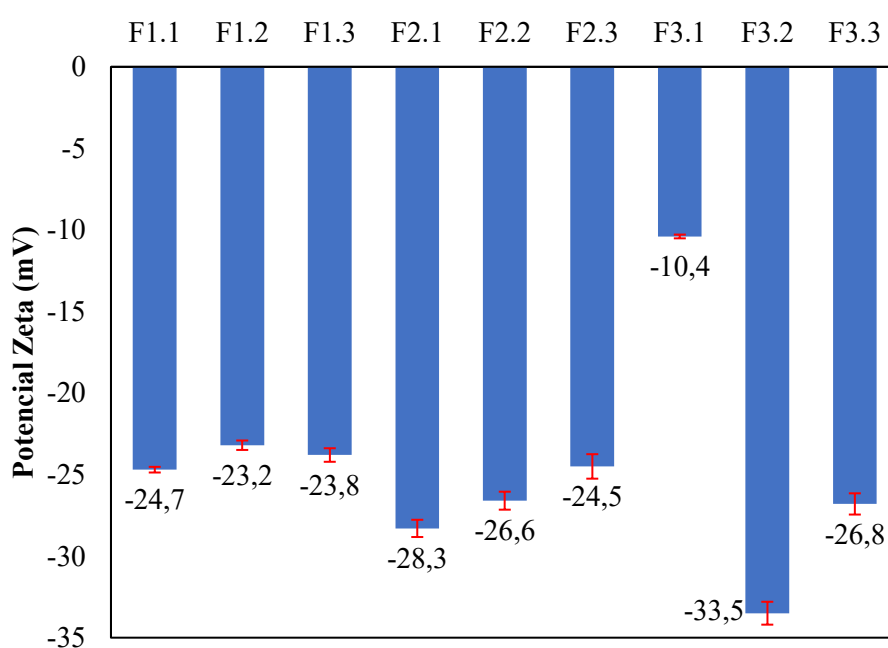
de estabilidade de curto prazo, já aqueles situados na faixa de -5 mV a +5 mV sofrem rápida agregação (HONARY & ZAHIR, 2013).

Entretanto, tais dados são relativos a tensoativos de baixa massa molecular e que não fornecem estabilização estérica. Contudo, o Pluronic F127 usado na nanoemulsão formulada, apresenta alta massa molecular, oferecendo predominantemente estabilidade estérica.

Segunda a literatura (HONARY & ZAHIR, 2013) valores de potencial zeta entorno de 20 mV (em módulo) com o uso de tensoativos poliméricos já são suficientes para trazer estabilidade ao sistema nanométrico.

Os valores de potencial zeta encontrados neste estudo, situaram-se entre -10,4 e -33,5mV, conforme se pode observar na Figura 18:

Figura 17 - Formulações *versus* valores de potencial zeta para as formulações



Observa-se que não há uma tendência regular de aumento ou redução do módulo dos valores de potencial à medida que são alterados parâmetros das formulações. Entretanto, percebe-se que todas as formulações apresentaram valores em módulo de potencial zeta desejáveis, e exceto a formulação F3.1, todas as demais apresentaram o módulo do potencial zeta acima de 23 mV em módulo.

Dados da literatura defendem que a estabilização estérica oferecida por surfactantes de alta massa molecular, como o Pluronic F127, é mais vantajosa do que a estabilização

eletrostática, considerando que, mesmo na presença de cargas na emulsão, a estabilidade das partículas é mantida (KARAMI & HAMIDI, 2016).

Neste trabalho, com poucas exceções, todas as formulações apresentaram resultados para as características físico-químicas estudadas, condizentes com emulsões estáveis.

Entretanto, foi selecionada a formulação F2.2 por apresentar as melhores características quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta. Além disso, a maior quantidade de óleo de *C. procera* nesta formulação possibilitou carrear maior massa de ácido betulínico.

5.4 Caracterização da nanoemulsões NE-F2.2

Após o preparo da nanoemulsão contendo o ácido betulínico foram realizadas as análises de tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão. Além disso, foi realizada a quantificação do ativo na formulação.

5.4.1 Tamanho de Partícula e índice de Polidispersão

As nanopartículas para aplicações médicas, levam em consideração o tamanho de partícula, a depender dos requisitos e características dos sistemas biológicos considerados (RAHN-CHIQUÉ *et al.*, 2017).

Há também uma relação inversa entre a estabilidade física das emulsões e o tamanho de partícula, quanto menor o tamanho de partícula, mais estável a solução e quanto mais rápido o tamanho de partícula aumenta, mais instável se torna o sistema (Ursica *et al.*, 2005).

Já o índice de polidispersão (PDI) é uma grandeza adimensional e se refere à distribuição do tamanho de partícula. Varia de 0 a 1, sendo que, a homogeneidade do sistema se dá quanto próximo de zero for o PDI e, quanto mais próximo de 1, mais heterogênea é a distribuição do tamanho de partícula.

Pelo tamanho de partícula obtido neste trabalho pode-se classificar as emulsões estudadas como moderadamente polidispersas.

5.4.2 Potencial zeta

O valor de potencial zeta para a nanoemulsão obtida da formulação F2.2, em módulo, apresentou-se maior que 20 mV, podendo ser classificada como estável, conforme estudos realizados por Honary e Zahir (2013). Esta característica é reforçada pela estabilização estérica obtida por emulsões preparadas com uso de Pluronic F127.

5.4.3 Quantificação do Ativo

5.4.4 Validação do método de quantificação do ácido betulínico

Para a quantificação do ativo, inicialmente o método adaptado foi validado e foram avaliadas as figuras de mérito de acordo com o guia do INMETRO.

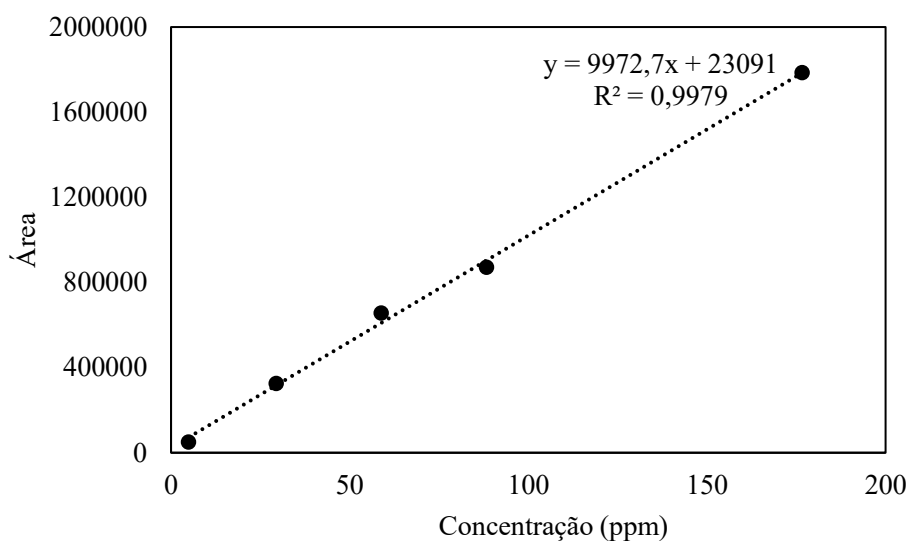
5.4.5 Seletividade

O tempo de retenção para o ácido betulínico puro foi de 4,30 minutos, na formulação F2.2 foi de 4,21 minutos. No controle (branco) da formulação F2.2 não foram encontrados picos entre 4,21 e 4,43 min.

Os tempos de retenção do ácido betulínico encontrado no presente trabalho com método CLAE-UV foi menor em relação ao tempo citado na literatura em 10,92 min (TARALKAR e CHATTOPADHYAY, 2012). Este fato pode ser explicado pelo tipo de coluna utilizada neste trabalho, coluna de 150 mm de comprimento e um fluxo de 1 mL/min, enquanto na literatura de referência foi utilizada uma coluna de 250 mm e um fluxo de 0,5 mL/min.

5.4.6 Linearidade

Através dos valores médios de área foi possível construir a curva analítica apresentada na Figura 19.

Figura 18 - Curva de calibração para o ácido betulínico

A linearidade da curva analítica na faixa de 5 ppm a 180 ppm foi obtida a partir do ajuste de regressão linear ($R^2 = 0,9979$). Segundo a ANVISA (2017), o coeficiente de correlação linear para validação de métodos analíticos para fármacos deve ser igual ou superior a 0,99. Sendo assim, o valor de R^2 obtido na análise do ácido betulínico pelo método CLAE-UV utilizado obedece aos limites estabelecidos.

A equação da curva média foi $y = 9972,7x - 23091$ obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários. Os dados foram validados pela análise de igualdade de variâncias através do Teste de Cochran para verificar se a curva possuía comportamento homocedástico ou heterocedástico, que demonstrou comportamento homocedástico com os valores calculados em três níveis de concentração de 0,44 (baixa), 0,32 (média) e 0,20 (alta) e valor de C crítico de 0,97 para um nível de 95% de confiança considerando 3 concentrações e 3 réplicas para cada concentração, ou seja, $C < C$ crítico. As variâncias não se diferiram muito para as concentrações testadas e o modelo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários é adequado.

5.4.7 Limite de quantificação e limite de detecção

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir das equações 2 e 3, obtendo os valores de 0,19 ppm e 0,61 ppm, respectivamente, como mostra a tabela. O limite de quantificação é importante para a determinação da Eficiência de Encapsulação, pois são quantificados valores muito pequenos.

$$LD = 3R \quad (2)$$

$$LQ = 10R \quad (3)$$

Em que R é a área do ruído. Esses valores são inseridos na curva de calibração para se obter LQ e LD em ppm. A Tabela 13 mostra os valores obtidos de LD, LQ e dados da equação da reta.

Tabela 13 - Resultados de LD e LQ a partir do coeficiente angular e do desvio do intercepto

Coeficiente angular	Desvio do intercepto	LD (ppm)	LQ (ppm)
9972,7	23091	0,19	0,61

Fonte: o autor.

5.4.8 Recuperação

A exatidão é avaliada numericamente por meio da tendência. A recuperação foi testada na nanoemulsão em triplicata em três níveis de concentração. A média dos valores obtidos ficou em 98,70% , 105,7% e 114,7%. Esses resultados estão na faixa de recuperação para a concentração de 5, 50 e 100 ppm, Essa tendência deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível, mas, em ambos os casos, a incerteza associada à determinação da tendência permanece como um componente essencial da incerteza global do método (Brasil, 2020). Os valores obtidos foram considerados aceitáveis para a faixa de 5 e 50 ppm e para 100 ppm deu acima do tabelado o que implica afirmar que para esta concentração deve ser corrigido.

5.4.9 Repetibilidade

O desvio padrão relativo da quantificação de seis réplicas da formulação foi de 4,01%. Este valor está de acordo com os valores tabelados de DPR do guia de validação do INMETRO (Brasil, 2020) de 5,6% e 7,3% para o nível de concentração determinado de 50 ppm.

5.5 Aplicação do método validado na quantificação do ativo nas formulações

A partir do método validado, a formulação NE-F2.2 apresentou uma concentração do ativo de 4858 ppm \pm 32 ppm. Este valor corresponde a 99,02% do doseamento teórico para a nanoemulsões F2.2.

5.5.1 Eficiência de encapsulação

De acordo com a metodologia de Eficiência de Encapsulação usada neste estudo é esperado que o ácido betulínico encapsulado na nanoemulsão fique retido na porção superior do filtro de centrifugação, enquanto que o ácido betulínico não encapsulado escoe para a porção inferior do filtro de centrifugação. Para calcular a eficiência de encapsulação do princípio ativo nas nanoemulsões, foi quantificada a porção de ácido betulínico presente na porção inferior do dispositivo de centrifugação e estimado a concentração de ativo encapsulado.

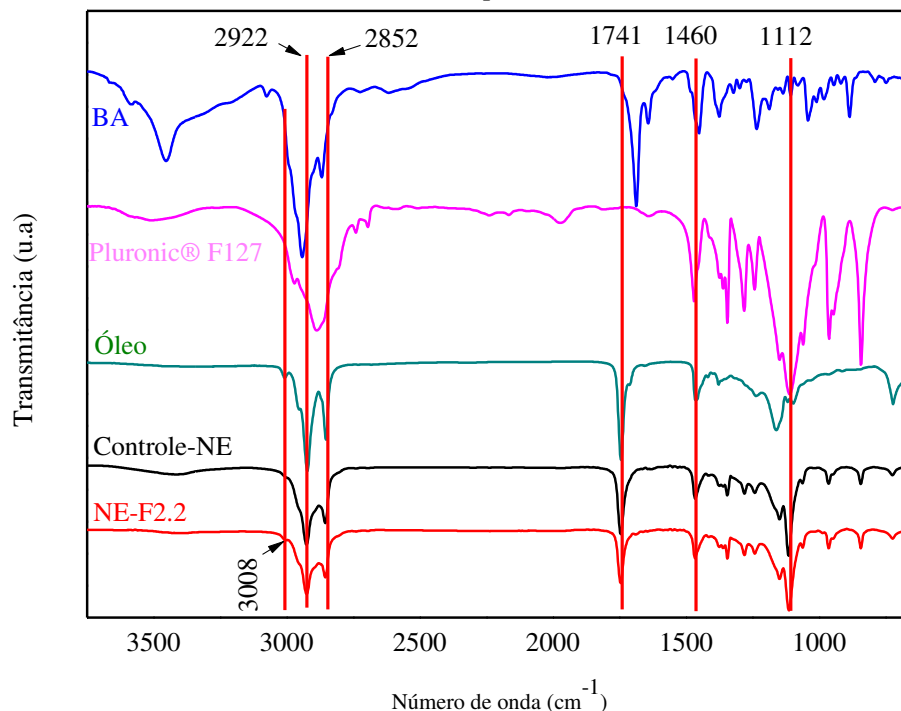
Considerando o limite de quantificação do método de 0,61 ppm e que não foi possível visualizar o pico do ácido betulínico não encapsulado, pode-se afirmar que a eficiência de encapsulação (EE%) para a formulação F2.2 foi superior a 99,99%. A literatura relata valores acima de 90% de eficiência de encapsulação (DEHELEAN *et al.*, 2011).

Em nanoemulsões de ácido betulínico em óleo de linhaça estabilizadas com fosfatidilcolina do ovo utilizando um filtro de ultracentrifugação com o mesmo corte utilizado neste estudo (3000 Da). A alta eficiência de encapsulação da emulsão, pode estar associada à forte interação intermolecular do ativo com o núcleo oleoso, assim como pela sua alta hidrofobicidade e pelo surgimento de uma camada interfacial rígida proveniente do Pluronic F127.

5.6 Caracterização da nanoemulsão por FTIR

Com o objetivo de avaliar o estado físico do ácido betulínico na formulação da nanoemulsão e possíveis interações com outros componentes da formulação foi utilizada a técnica de análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Foram comparados os espectros de transmitância obtidos por FTIR do ácido betulínico (AB) puro, da nanoemulsão contendo o ativo (NANO F2.2), do controle negativo da nanoemulsão (BR F2.2) e do Pluronic F127, como mostra a Figura 20:

Figura 19 - Curvas de FTIR da nanoemulsão NE-F2.2, do branco da nanoemulsão NE-F2.2 (Controle-NE), do óleo de *C. procera*, do Pluronic F127 e do AB



Fonte: o autor.

Os espectros da NANO F2.2, do BR F2.2 e do OCP da Figura 19, mostraram duas fortes bandas de absorção a 1460 cm^{-1} relativa a dobramentos de ligações CH_2/CH_3 e a 1741 cm^{-1} próprias do grupo carbonil ($-\text{C}=\text{O}$). Também é observada uma banda a 1116 cm^{-1} , de estiramento simétrico e assimétrico de ligações C-O. Nesses mesmos espectros também se observam as bandas a 3008 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} , que se referem ao estiramento das vibrações de $-\text{C}-\text{H}$, $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$, respectivamente. Esses espectros evidenciam predominantemente a presença do óleo de *C. procera*. Entretanto, não foram encontradas bandas características e específicas do AB. Tal ausência pode ser explicada por sua baixa concentração na NE-F2.2, ou mesmo por se encontrar encapsulado no sistema. Por outro lado, é possível perceber-se sinais característicos do Pluronic F127 na região em 1112 cm^{-1} , de estiramento C-O (GÓRNIK *et al.*, 2016).

5.7 Estabilidade coloidal

Os valores de variação dos tamanhos de partícula a 25 °C durante os intervalos de tempo de 30, 60 e 90 dias, foram avaliados estatisticamente por meio do teste de Tukey. Os resultados apontaram diferença estatística para todos os intervalos de tempo a que foram

submetidas as amostras, com exceção do intervalo entre 30 e 60 dias, cujos valores foram estatisticamente iguais, com valor de $p > 0.01$.

Quando comparadas as variações dos tamanhos de partículas à temperatura de 45 °C, observou-se que não houve diferença estatística dos valores nos intervalos de tempos entre 30 e 60 dias, nem entre 30 e 90 dias, nem entre 60 e 90 dias, como $p > 0.01$. Entretanto, houve diferença nos tamanhos das partículas nos intervalos de tempos entre o dia 0 e trigésimo dia, entre o dia 0 e o sexagésimo dia, bem como entre o dia 0 e o nonagésimo dia, com $p < 0.01$.

O tamanho de partícula tem implicações diretas em aplicações biológicas devido a propriedades específicas desses. Elas precisam ser entregues do ambiente externo, para a circulação sanguínea ou em fluido intersticial e percorrer membranas celulares para internalização celular. Assim, partículas pequenas são presumivelmente mais fáceis de serem internalizadas. Os valores de tamanho de partícula mantidos abaixo de 170 nm durante o período de 90 dias de avaliação da estabilidade, são condizentes com valores favoráveis à aplicação em sistemas biológicos, especialmente no tratamento de câncer, em que, em geral, as nanopartículas de tamanho < 500 nm na circulação sanguínea podem acumular-se passivamente nas células tumorais (MOK, 2024).

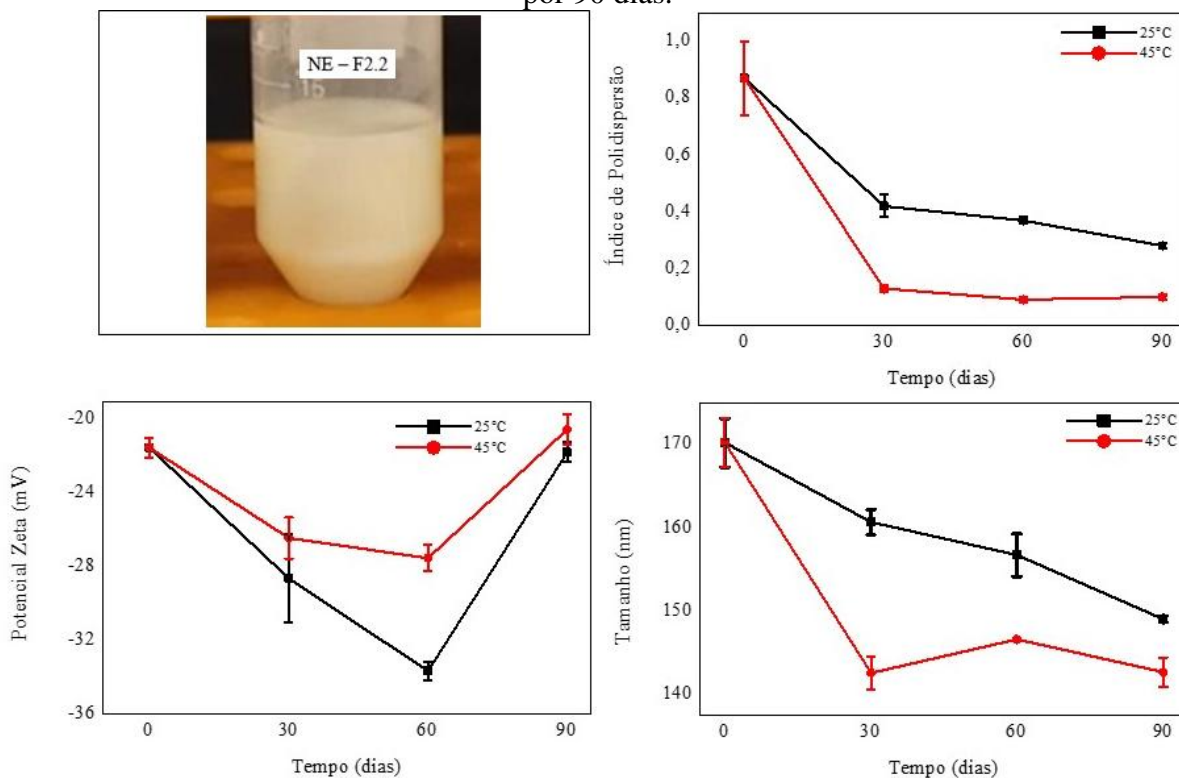
Quanto ao índice de polidispersão, em nenhum dos intervalos de tempo a 25 °C ou a 45 °C houve diferença estatística ($p > 0.01$) mostrando que o material se manteve monodisperso durante todo o tempo de observação.

As partículas se apresentaram moderadamente polidispersas, dentro da faixa 0,1 a 0,4. A polidispersão das partículas são particularmente importantes para a estabilidade de nanoemulsões pois, quanto menor for a dispersão da população de partículas, menor a possibilidade de ocorrência do fenômeno do Amadurecimento de Ostwald, processo de desestabilização rápida e irreversível em nanoemulsões, em que partículas maiores absolvem as menores até à coalescência.

Quanto ao potencial zeta, os valores do teste de Tukey provaram que não houve diferença estatística entre o dia 0 e o dia 90 após o início da análise a 25 °C. Ao realizar-se o experimento a 45 °C, além de não haver diferença entre o potencial zeta do primeiro e do último dia, os resultados do dia 30 e do dia 60, também foram estatisticamente iguais, com valores de $p > 0.01$. Os valores de potencial zeta corroboram com a literatura à medida que apresentam valores absolutos maiores que 20 mV, o que, aliado ao uso de um tensoativo de alta massa molecular (Pluronic F127), adquirem a capacidade de estabilizar a nanoemulsão (HONARY & ZAHIR, 2013).

Os resultados apresentados sugerem que o material se mostrou estável durante os 90 dias de observação às temperaturas de 25 °C e 45 °C apresentando baixa variação dos tamanhos de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta (Figura 21).

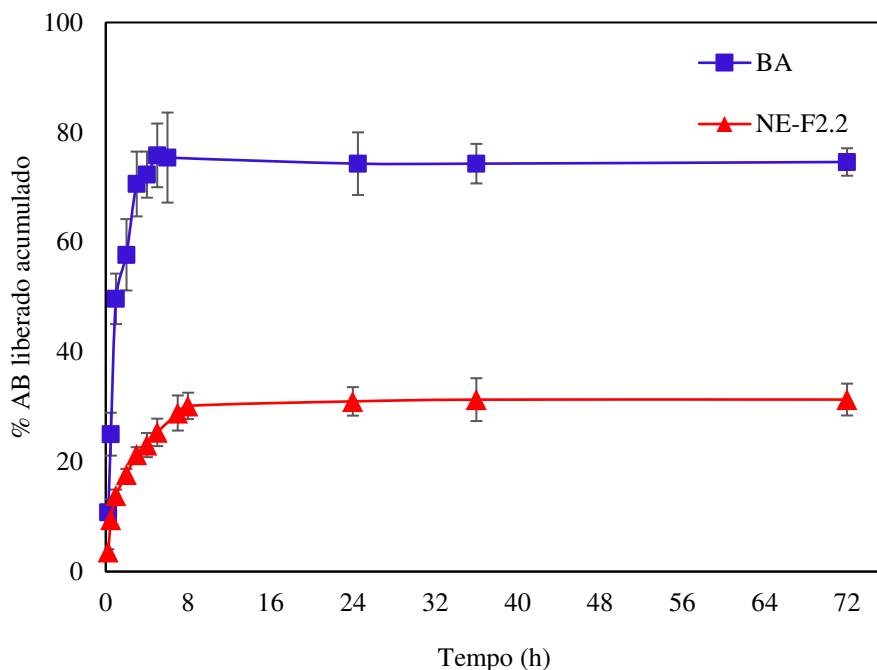
Figura 20 – Tamanho de partícula, PDI e valores de potencial zeta a 25 °C e 45 °C por 90 dias.



Fonte: o autor

5.8 Estudo cinético de liberação *in vitro*

Os resultados do teste de liberação de BA *in vitro* da nanoemulsão e de uma solução de fármaco livre são mostrados no gráfico da porcentagem acumulada liberada em função do tempo (Figura 22).

Figura 21 – Gráfico do percentual cumulativo de liberação da droga em 72 h.

O estudo da cinética de liberação *in vitro* é primordial para o entendimento do mecanismo de liberação e para o desenvolvimento de formulações otimizadas de administração de fármacos. Conforme ilustrado na Figura 22, a amplitude da curva de liberação de BA não encapsulado foi mais acentuada, com uma liberação rápida de 50% na primeira hora do teste. Após 8 h de liberação, o platô foi atingido com liberação de $73,03 \pm 2,40\%$ de BA não encapsulado e apenas $30,17 \pm 1,43\%$ para BA em NE-F2.2. Esses achados demonstram a liberação lenta do ativo na nanoemulsão em comparação à sua forma livre. Entre 8 h ($30,17 \pm 1,43\%$) e 72 h ($31,33 \pm 2,91\%$), as porcentagens acumuladas de BA (livre e encapsulado) permaneceram estatisticamente constantes ($p > 0,05$).

O fato de o platô atingido na liberação da nanoemulsão ser uma porcentagem menor do que a obtida pelo ativo livre pode ser explicado pela afinidade entre o ativo e os ésteres de ácidos graxos do óleo de *C. procera*, devido às interações intermoleculares. A alta capacidade de carga pode indicar a interação entre o ativo e o óleo. Vale ressaltar que mesmo tendo atingido um platô de $31,33 \pm 2,91\%$, essa porcentagem corresponde a uma massa média liberada de 622,80 µg de forma controlada. A liberação do ativo livre da solução etanólica foi de um total de 1460 µg.

Outra consideração para explicar o fato de que a liberação do ingrediente ativo livre é muito maior do que a da nanoemulsão é o fato de que uma solução etanólica concentrada de BA livre foi usada no meio doador, em que o ingrediente ativo foi completamente solubilizado

no meio doador, o que facilitou sua difusão, devido ao diferencial de concentração para o meio receptor até que a estabilização fosse alcançada. A solução de BA livre e a nanoemulsão tinham a mesma massa de ingrediente ativo.

Para identificar o mecanismo de liberação de BA da nanoemulsão NE-F2.2, os dados de liberação de BA foram testados para equações de Korsmeyer–Peppas, Higuchi, de ordem zero e de primeira ordem. O coeficiente de correlação (R^2) representa a qualidade do ajuste e foi usado para identificar o modelo matemático de melhor ajuste. Os valores de R^2 de cada modelo estão listados na Tabela 14.

Vale ressaltar que a equação de Korsmeyer-Peppas não é um modelo matemático de ajuste, mas uma equação que visa identificar o mecanismo e os fenômenos que ocorrem durante a liberação. O maior valor de R^2 foi obtido a partir do ajuste do modelo de Higuchi. O modelo de Higuchi explica a liberação do fármaco por difusão.

Para entender o mecanismo mais detalhadamente, foi utilizado o valor do coeficiente de inclinação da equação de Korsmeyer-Peppas (n), que corresponde ao coeficiente de difusão. De acordo com o valor de n obtido, o mecanismo que melhor explica a liberação de BA da NE-F2.2 foi o mecanismo de transporte Super Case II, no qual ocorrem vários fenômenos que podem explicar como ocorreu a liberação. Em liberações de formatos esféricos, os valores de $n > 0,89$ correspondem ao mecanismo de transporte Super Case II no qual a liberação do fármaco ocorre simultaneamente por difusão, relaxamento das cadeias poliméricas e por dissolução.

Tabela 14 – Parâmetros cinéticos de liberação para o ácido betulínico na NE-F2.2

MODELOS MATEMÁTICOS				
Ordem Zero	Primeira Ordem	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	
R^2	R^2	R^2	(n)	R^2
0,8818	0,9128	0,9921	0,9010	0,9615

Fonte: o autor.

5.9 Avaliação do potencial citotóxico *in vitro*

Os resultados obtidos dos valores de IC_{50} em células PC3 e L929 no ensaio MTT são descritos na Tabela 15.

Os resultados de viabilidade celular indicaram que a nanoemulsão significativamente inibiu o crescimento das células de câncer de próstata em uma dose-dependente.

De acordo com a Tabela 15, o BA não encapsulado apresentou um IC₅₀ em células L929 significativamente maior do que em células PC3, evidenciando a seletividade do BA contra células PC3. A formulação NE-F2.2 contendo o BA encapsulado apresentou IC₅₀ maior que o BA não encapsulado ao avaliar os resultados em células PC3. Esse fato pode ser explicado pela avaliação do perfil de liberação *in vitro* do BA encapsulado e não encapsulado. Quando o BA é encapsulado, as células são expostas a um aumento mais lento e controlado na concentração, enquanto na forma não encapsulada a liberação é mais rápida, expondo as células a um aumento mais rápido na concentração por um determinado período de tempo.

Tabela 15 – Resultado do IC₅₀ em PC3 (carcinoma de próstata humano) e L929 (fibroblastos normais de murinho) por meio do ensaio MTT

AMOSTRAS	IC ₅₀ /(µg/mL) (IC 95%)	
	PC3	L929
BA	0,41 [0,35-0,46]	158,42 [120,16-170,78]
NE-F2.2	4,5 [4,2-6,8]	>75
NE Controle	>75	>75
Dox (Controle positivo)	0,02 [0,01-0,03]	0,99 [0,91-1,1]

PC3: Carcinoma de próstata humano. L929: Fibroblastos de murino (células normais). Controle NE: Nanoemulsão sem o ativo. NE-F2.2: Nanoemulsão contendo o AB. AB: Ácido betulínico livre. Dox (Controle positivo): doxorubicina. CI: Intervalo de confiança.

Esta redução significativa da viabilidade das células cancerígenas sugere que a nanoemulsão penetra facilmente na membrana celular para induzir a morte celular.

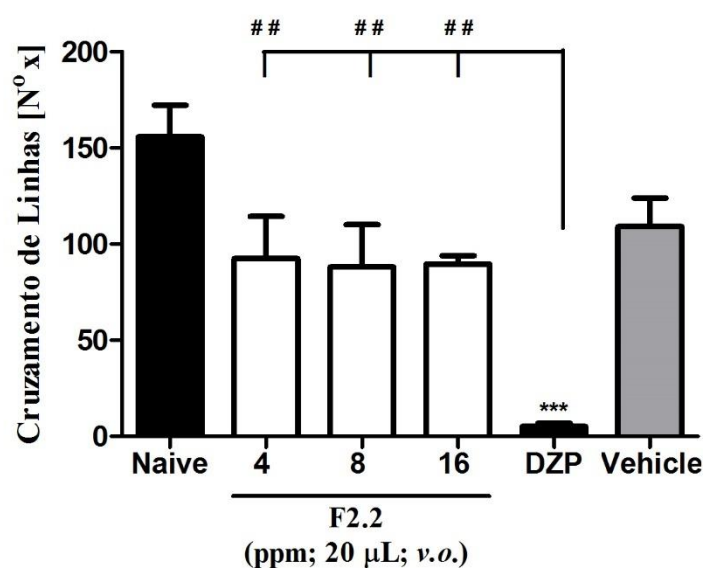
Rebouças e colaboradores (2022) obtiveram resultados semelhantes ao testarem uma nanoemulsão de AB à base de óleo de linhaça, esta formulação apresentou ser mais vantajosa quando comparadas com o desempenho do ácido betulínico puro devido à presença de alta IC₅₀ no L929 (fibroblastos saudáveis células). Tan, Danişman-Kalındemirtaş e Karakuş (2023) também demonstraram que os resultados de IC₅₀ do ácido betulínico em nanotubos de carbono sugerem a redução da citotoxicidade e os efeitos colaterais do ácido betulínico ativo puro.

Estes resultados mostram o potencial antitumoral da nanoemulsão do ácido betulínico com óleo de *C. procera* e o Pluronic F127, especialmente para o tratamento do carcinoma de próstata humano.

5.10 Segurança não-clínica *in vivo*

Por meio do teste de segurança não clínico *in vivo*, foram avaliadas a influência da nanoemulsão NE-F2.2 na atividade locomotora de animais (*Danio rerio*) e toxicidade oral aguda por 96 h. Os resultados são mostrados na Figura 23 e Tabela 16.

Figura 22 - Avaliação do efeito de NE-F2.2 em *zebrafish* adulto no teste de campo aberto



Fonte: o autor.

Tabela 16 - Resultado dos testes de toxicidade aguda das amostras NE-F2.2 e veículo, contra Peixe-zebra adulto.

Amostra	Mortalidade de Peixe-zebra adulto				LC ₅₀ (µg mL ⁻¹) 96 h
	NC	C1	C2	C3	
NE-F2.2	0	0	0	0	>16
Veículo	0	0	0	0	>16

NC - grupo controle negativo: água destilada estéril. NE-F2.2 – nanoemulsão contendo BA C1 – concentração 1 (4,0 µg mL⁻¹; 20 µL); C2 – concentração 2 (8,0 µg mL⁻¹; 20 µL); C3 concentração 3 (16 µg mL⁻¹; 20 µL). Veículo – controle - NE em água. CL50 – concentração letal para matar 50% dos peixes-zebra adultos.

Diferentes técnicas *in vitro* são capazes de medir os níveis de toxicidade da nanoemulsão. O modelo do peixe-zebra é um método incrivelmente eficaz para avaliar a toxicidade da formulação (BEGUM JP *et al.*, 2024). Na faixa de concentração na qual o IC₅₀ no teste de citotoxicidade em células L929 foi testado através do teste MTT, nenhuma morte foi evidenciada no teste de toxicidade aguda no peixe-zebra e nenhuma alteração locomotora significativa foi identificada em relação ao ingênuo e ao veículo.

A atividade locomotora é um parâmetro comportamental importante para a avaliação de peixes-zebra expostos a nanoformulações para aplicação neurofarmacológica pois indica uma ação potencial no nível do sistema nervoso central (SILVA CAMPELO, *et al.*, 2023). Esta avaliação é capaz de medir o nível de excitabilidade ou depressão do sistema nervoso central.

6 CONCLUSÃO

A nanoemulsão NE-F2.2 foi obtida com sucesso a partir da combinação estratégica do óleo das sementes de *Calotropis procera*, ácido betulínico e Pluronic F127, permanecendo estável diante dos testes de estresse mecânico e tempo de armazenamento, apresentando excelente atividade contra células tumorais de câncer de próstata, baixa citotoxicidade em células normais e segurança não clínica *in vivo*, sendo uma formulação promissora para a produção de medicamentos para o tratamento anticâncer com a vantagem potencial de apresentar baixos efeitos adversos.

REFERÊNCIAS

- AALI, Naema M El *et al.* Antioxidant Activity of Leaf Extract of Calotropis Procera Tree in Alkufra City. **Research & Development In Material Science**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1272-1275, 15 nov. 2019. Crimson Publishers. <http://dx.doi.org/10.31031/rdms.2019.12.000786>.
- AGAME-LAGUNES, B. *et al.* Bioactivity of betulinic acid nanoemulsions on skin carcinogenesis in transgenic mice K14E6. **Grasas y Aceites**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. e433, 30 dez. 2021. Editorial CSIC. <http://dx.doi.org/10.3989/gya.0553201>.
- AGHAPOUR, Fahimeh *et al.* Quercetin conjugated with silica nanoparticles inhibits tumor growth in MCF-7 breast cancer cell lines. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 500, n. 4, p. 860-865, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.174>.
- AHMAD, Farooq *et al.* Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. **Behavioural Processes**, [s. l.], v. 92, p. 88-98, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2012.10.014>.
- AIKEN, Catherine *et al.* An Update to the Article “Efficacy and Side Effect Profile of Different Formulations of Metformin: a systematic review and meta-analysis. **Diabetes Therapy**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 2813-2816, 1 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13300-021-01155-2>.
- ATANASE, Leonard I. Nanoemulsions for drug delivery. **Systems Of Nanovesicular Drug Delivery**, [s. l.], p. 17-37, 2022. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-91864-0.00009-7>.
- ALGAHTANI, Mohammed S. *et al.* Investigation of Factors Influencing Formation of Nanoemulsion by Spontaneous Emulsification: impact on droplet size, polydispersity index, and stability. **Bioengineering**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 384, 12 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/bioengineering9080384>.
- ALI, Mohammad Sajid *et al.* Accelerated Stability Testing of a Clobetasol Propionate Loaded Nanoemulsion as per ICH Guideline. **Scientia Pharmaceutica**, [s. l.], v. 81, n. 4, p. 1089-1100, 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3797/scipharm.1210-02>.
- ARELLANO-AGUILAR, Omar *et al.* Use of the Zebrafish Embryo Toxicity Test for Risk Assessment Purpose: case study. **Asian Journal Of Chemistry**, [s. l.], v. 27, n. 9, p. 052-062, 2015.
- BALUHYA, Marco *et al.* Bacterial growth inhibitory effects of Calotropis procera's latex, leaves and roots extracts. **Tanzania Journal Of Science**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 648-654, 19 maio 2021. African Journals Online (AJOL). <http://dx.doi.org/10.4314/tjs.v47i2.20>.
- BANERJEE, Subhasis *et al.* Cellular and molecular mechanisms underlying the potential of betulinic acid in cancer prevention and treatment. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 132, p. 155858, set. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155858>.

BARBOSA, Mariana Oliveira *et al.* Seed Oil Content and Fatty Acid Composition from Different Populations of *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton (Apocynaceae). **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, [s. l.], v. 91, n. 8, p. 1433-1441, 24 abr. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-014-2475-5>.

BARZEGAR, Hassan *et al.* Fabrication of peppermint essential oil nanoemulsions by spontaneous method: effect of preparing conditions on droplet size. **Flavour And Fragrance Journal**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 351-356, 19 jun. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.3455>.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (**Inmetro**). Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro, 2020.

BRUSCHI, Marcos Luciano *et al.* (ed.). Mathematical models of drug release. **Strategies To Modify The Drug Release From Pharmaceutical Systems**, [s. l.], p. 63-86, 2015. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-100092-2.00005-9>.

BUDINČIĆ, Jelena Milinković *et al.* Study of vitamin E microencapsulation and controlled release from chitosan/sodium lauryl ether sulfate microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 251, p. 116988, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116988>.

CANTANHEDE FILHO, Antonio José *et al.* Triterpenoides, fenólicos e efeito fitotóxico de folhas de *Eugenia flavescens* DC (Myrtaceae). **Química Nova**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 252-259, 27 nov. 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160190>.

CARDIA, Maria Cristina *et al.* Trimethyl Chitosan Hydrogel Nanoparticles for Progesterone Delivery in Neurodegenerative Disorders. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 657, 6 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics11120657>.

CAVAZOS-GARDUÑO, A. *et al.* Operating and compositional variables for preparation of betulinic acid nanoemulsions. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 689-703, 6 dez. 2013.

CEKIĆ, Nebojša D. *et al.* A full factorial design in the formulation of diazepam parenteral nanoemulsions: physicochemical characterization and stability evaluation. **Advanced Technologies**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 69-77, 14 maio 2015.

CHADALAPAKA, Gayathri *et al.* Drugs that Target Specificity Proteins Downregulate Epidermal Growth Factor Receptor in Bladder Cancer Cells. **Molecular Cancer Research**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 739-750, 1 maio 2010. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-09-0493>.

CHUACHAROEN, Thanida *et al.* Stability and controlled release of lutein loaded in zein nanoparticles with and without lecithin and pluronic F127 surfactants. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 503, p. 11-18, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.04.038>.

COELHO, Ethanielda de Lima *et al.* Application of curcuminoids-loaded nanoemulsion for cancer therapy. **Journal Of Applied Pharmaceutical Sciences And Research**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 34-39, 13 dez. 2022. Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research. <http://dx.doi.org/10.31069/japsrv5i3.04>.

COLLYMORE, C.; TOLWANI, R. J.; RASMUSSEN, S. The behavioral effects of single housing and environmental enrichment on adult zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 280–285, 2015.

CONCEA-CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Resolução Normativa n. 37 de 15 de fevereiro de 2018. Diretrizes da prática de eutanásia. 2018. Disponível em <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/legislacao/Arquivos/Anexo_Res_Norm_37_2018_CONCEA_Pratica_Eutanasia.pdf>. Acesso em: 16 de ago. 2025.

COUTO, Nádia M. Garcês de *et al.* Betulinic Acid and Brosimine B Hybrid Derivatives as Potential Agents against Female Cancers. **Anti-Cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 622-633, 28 maio 2020. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1871520620666200124111634>.

CAMPELO, Matheus da Silva *et al.* Clove volatile oil-loaded nanoemulsion reduces the anxious-like behavior in adult zebrafish. **Daru Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 183-192, 28 ago. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40199-023-00473-z>.

DEHELEAN, Cristina A. *et al.* Anti-Angiogenic Effects of Betulinic Acid Administered in Nanoemulsion Formulation Using Chorioallantoic Membrane Assay. **Journal Of Biomedical Nanotechnology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 317-324, 1 abr. 2011. American Scientific Publishers. <http://dx.doi.org/10.1166/jbn.2011.1297>.

DUBEY, Ravindra Dhar *et al.* PLGA nanoparticles augmented the anticancer potential of pentacyclic triterpenediol in vivo in mice. **Rsc Advances**, [s. l.], v. 6, n. 78, p. 74586-74597, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra14929d>.

EGBUBINE, Chiedozi O. *et al.* Isolation and characterization of betulinic acid from the stem bark of *Feretia canthioides* Hiern and its antimalarial potential. **Bulletin Of The National Research Centre**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 1-7, 6 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s42269-020-00302-2>.

ELSAYED, Ashraf *et al.* Antibacterial activity of *Calotropis procera* against some common human pathogens. **International Journal Of Research In Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 3016-3022, 21 dez. 2020. GP Innovations Pvt. Ltd.. <http://dx.doi.org/10.26452/ijrps.v11ispl4.4598>.

FABRICANTE, Juliano Ricardo *et al.* Aspectos da ecologia de *Calotropis procera* (Apocynaceae) em uma área de Caatinga alterada pelas obras do Projeto de Integração do Rio São Francisco em Mauriti, CE. **Rodriguésia**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 647-654, set. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-78602013000300015>.

FANG, Jia-You *et al.* Acoustically active perfluorocarbon nanoemulsions as drug delivery carriers for camptothecin: drug release and cytotoxicity against cancer cells. **Ultrasonics**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 39-46, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultras.2008.04.009>.

FERREIRA, Elano Nery *et al.* Investigation of the thermal degradation of the biolubricant through TG-FTIR and characterization of the biodiesel – Pequi (*Caryocar brasiliensis*) as energetic raw material. **Fuel**, [s. l.], v. 245, p. 398-405, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2019.02.006>.

FRANZOL, Angélica *et al.* Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, [s. l.], v. 25, n. , p. 1-9, dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0104-1428.1669>.

MOGHADDAM, Mansour Ghaffari *et al.* Biological Activity of Betulinic Acid: a review. **Pharmacology & Pharmacy**, [s. l.], v. 03, n. 02, p. 119-123, 2012. Scientific Research Publishing, Inc.. <http://dx.doi.org/10.4236/pp.2012.32018>.

GHARIBZAHEDI, Seyed Mohammad Taghi *et al.* Characterizing the novel surfactant-stabilized nanoemulsions of stinging nettle essential oil: thermal behaviour, storage stability, antimicrobial activity and bioaccessibility. **Journal Of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 224, p. 1332-1340, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2016.10.120>.

GHASEMI, Mahshid *et al.* The MTT Assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 23, p. 12827, 26 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312827>.

GHRAMH, Hamed A. *et al.* Antimicrobial, immunomodulatory and cytotoxic activities of green synthesized nanoparticles from Acacia honey and Calotropis procera. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 3367-3373, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.085>.

GIOFFREDI, Emilia *et al.* Pluronic F127 Hydrogel Characterization and Biofabrication in Cellularized Constructs for Tissue Engineering Applications. **Procedia Cirp**, [s. l.], v. 49, p. 125-132, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procir.2015.11.001>.

GÓRNIAK, Agata *et al.* A physicochemical and dissolution study of ketoconazole-pluronic F127 solid dispersions. **Farmacia**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 244-251, set. 2014.

HO, Chung-Han *et al.* Does radiotherapy increase the risk of colorectal cancer among prostate cancer patients? A large population-based study. **Journal Of Cancer**, [s. l.], v. 11, n. 21, p. 6204-6212, 2020. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/jca.44726>.

HONARY, S *et al.* Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). **Tropical Journal Of Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 255-264, 9 maio 2013. African Journals Online (AJOL). <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>.

HUANG, Gang *et al.* Clinicopathological and immunological profiles of prostate adenocarcinoma and neuroendocrine prostate cancer. **World Journal Of Surgical Oncology**,

[s. l.], v. 20, n. 1, p. 1-9, 27 dez. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12957-022-02841-6>.

HUANG, Yi *et al.* The Use of Zebrafish (*Danio rerio*) Behavioral Responses in Identifying Sublethal Exposures to Deltamethrin. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 3650-3660, 2 abr. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph110403650>.

HUSSEIN-AL-ALI, Samer Hasan *et al.* The in vitro therapeutic activity of betulinic acid nanocomposite on breast cancer cells (MCF-7) and normal fibroblast cell (3T3). **Journal Of Materials Science**, [s. l.], v. 49, n. 23, p. 8171-8182, 13 ago. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10853-014-8526-3>.

JÄGER, Sebastian *et al.* Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. **Molecules**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 2016-2031, 4 jun. 2009. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14062016>.

JÄGER, Sebastian *et al.* Solubility Studies of Oleanolic Acid and Betulinic Acid in Aqueous Solutions and Plant Extracts of *Viscum album* L. **Planta Medica**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 157-162, fev. 2007. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-967106>.

JAISWAL, Manjit *et al.* Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 123-127, 8 abr. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-014-0214-0>.

JIANG, Wenkai *et al.* Betulinic acid in the treatment of tumour diseases: application and research progress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 142, p. 111990, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111990>.

JP, Shabaaz Begum *et al.* Antimicrobial Nanoemulsion: a futuristic approach in antibacterial drug delivery system. **Journal Of Saudi Chemical Society**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 101896, jul. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2024.101896>.

KAMALAKAR, K. *et al.* Rubber seed oil-based biolubricant base stocks: a potential source for hydraulic oils. **Industrial Crops And Products**, [s. l.], v. 51, p. 249-257, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.058>.

KARAKULAK, Ugur Nadir *et al.* Capecitabine-induced coronary artery vasospasm in a patient who previously experienced a similar episode with fluorouracil therapy. **Türk Kardiyoloji Dernegi Arsivi-Archives Of The Turkish Society Of Cardiology**, [s. l.], p. 71-74, jul. 2015. Turkish Society of Cardiology. <http://dx.doi.org/10.5543/tkda.2015.36005>.

KARAMI, Zahra *et al.* Cubosomes: remarkable drug delivery potential. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 789-801, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2016.01.004>.

KAUR, Amarpreet *et al.* An Overview of the Characteristics and Potential of *Calotropis procera* From Botanical, Ecological, and Economic Perspectives. **Frontiers In Plant Science**,

[s. l.], v. 12, p. 1-13, 17 jun. 2021. Frontiers Media SA.
<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2021.690806>.

KAVUMA, Awusi *et al.* Remote Global Radiation Oncology Education and Training: a pathway to increase access to high-quality radiation therapy services in low- and middle-income countries. **Advances In Radiation Oncology**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 101180, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.adro.2023.101180>.

KIM, So Young *et al.* Betulinic Acid Restricts Human Bladder Cancer Cell Proliferation In Vitro by Inducing Caspase-Dependent Cell Death and Cell Cycle Arrest, and Decreasing Metastatic Potential. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 1381, 4 mar. 2021. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules26051381>.

KITSON-MILLS, Doris *et al.* Outcomes and Toxicities After Treatment for Men Diagnosed With Localized Prostate Cancer in Low- and Middle-Income Countries: a systematic review and meta-analysis. **Advances In Radiation Oncology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 101670, jan. 2025. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.adro.2024.101670>.

KOMAIKO, Jennifer S. *et al.* Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: a review of available methods. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 331-352, 8 jan. 2016. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12189>.

KOROLEVA, M Yu *et al.* Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. **Russian Chemical Reviews**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 21-43, 31 jan. 2012. Autonomous Non-profit Organization Editorial Board of the journal Uspekhi Khimii.
<http://dx.doi.org/10.1070/rc2012v081n01abeh004219>.

KUMAR, Pranesh *et al.* Poly(lactic-co-glycolic acid)-loaded nanoparticles of betulinic acid for improved treatment of hepatic cancer: characterization, in vitro and in vivo evaluations. **International Journal Of Nanomedicine**, [s. l.], v. 13, p. 975-990, fev. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s157391>.

LANGAROUDI, Najmeh Najmeh Feizi *et al.* Preparation and characterization of O/W nanoemulsion with Mint essential oil and Parsley aqueous extract and the presence effect of chitosan. **Nanomedicine Research Journal**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 48-55, fev. 2019. Iranian Society of Nanomedicine. <http://dx.doi.org/10.22034/nmrj.2019.01.008>.

LEI, Fenting *et al.* Oral hydrogel nanoemulsion co-delivery system treats inflammatory bowel disease via anti-inflammatory and promoting intestinal mucosa repair. **Journal Of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1-19, 18 ago. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-023-02045-4>.

LIAUW, Stanley L. *et al.* Second malignancies after prostate brachytherapy: incidence of bladder and colorectal cancers in patients with 15 years of potential follow-up. **International Journal Of Radiation Oncology*Biophysics**, [s. l.], v. 66, n. 3, p. 669-673, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.05.016>.

LIN, Yi *et al.* Co-delivery of doxorubicin and itraconazole by Pluronic® P123 coated liposomes to enhance the anticancer effect in breast cancers. **Rsc Advances**, [s. l.], v. 8, n. 42,

p. 23768-23779, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC).
<http://dx.doi.org/10.1039/c8ra03787f>.

LOU, Hanghang *et al.* A Review on Preparation of Betulinic Acid and Its Biological Activities. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 18, p. 5583, 14 set. 2021. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules26185583>.

MACHADO, Adriana Rodrigues *et al.* Avaliação do tamanho de partículas lipossômicas em diferentes ensaios. **Research, Society And Development**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. e24512135104, 10 jan. 2023. Research, Society and Development.
<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v12i1.35104>.

MACHADO, H. A. *et al.* Release of a Wound-Healing Agent from PLGA Microspheres in a Thermosensitive Gel. **Biomed Research International**, [s. l.], v. 2013, p. 1-11, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/387863>.

MARTÍN-CAMACHO, Ubaldo de Jesús *et al.* Weibull β value for the discernment of drug release mechanism of PLGA particles. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 640, p. 123017, jun. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123017>.

MELO, M. *et al.* Estudo fitoquímico da Calotropis procera Ait., sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, [S.L], v. 2, n. 1, p. 15–20, 2001.

METTWALLY, Walaa S.A. *et al.* Calotropis procera (Aiton) seeds fixed oil: physicochemical analysis, gc-ms profiling and evaluation of its in-vivo anti-inflammatory and in-vitro antiparasitic activities. **Arabian Journal Of Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 104085, set. 2022. Scientific Scholar. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104085>.

MISHRA, Prabhat R. *et al.* Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 371, n. 1-2, p. 182-189, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.030>.

MOHAMMED, Nameer Khairullah *et al.* Characterization of nanoemulsion of Nigella sativa oil and its application in ice cream. **Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 2608-2618, 21 abr. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.1500>.

MOK, Zi Hong *et al.* The effect of particle size on drug bioavailability in various parts of the body. **Pharmaceutical Science Advances**, [s. l.], v. 2, p. 100031, dez. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pscia.2023.100031>.

MOLDOVEANU, Serban C. *et al.* Analysis of four pentacyclic triterpenoid acids in several bioactive botanicals with gas and liquid chromatography and mass spectrometry detection. **Journal Of Separation Science**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 324-332, 10 dez. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201501041>.

MOREIRA, Denise Ramos *et al.* Moringa polyesters as eco-friendly lubricants and its blends with naphthalenic lubricant. **Industrial Crops And Products**, [s. l.], v. 158, p. 112937, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112937>.

MOURA, Carla V. R. de *et al.* Physicochemical Characterization of Oleaginous Vegetable Oils Adaptable to the Brazilian Northeast with Potential for Biodiesel Production. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 573-595, 2019. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20190044>.

NEVES, Stephanie Araujo Brasiliense *et al.* Avanços recentes na radioterapia e seus efeitos colaterais associados ao câncer. **Brazilian Journal Of Health Review**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. e75486, 4 dez. 2024. Brazilian Journals. <http://dx.doi.org/10.34119/bjhrv7n9-296>.

NOVIANY *et al.* Structure Elucidation of Betulinic Acid from *Sesbania grandiflora* Root. **Journal Of Physics: Conference Series**, [s. l.], v. 1751, p. 012090, jan. 2021. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/1751/1/012090>.

NUGRAHA, Dwianto Harry *et al.* Mini-Review of Poloxamer as a Biocompatible Polymer for Advanced Drug Delivery. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 58, p. 1-8, 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902022e21125>.

OGUNDOLA, A.F. *et al.* Evaluation of Nutrients in Leaves and Seeds of *Calotropis Procera* (linn). **Journal Of Pharmacy And Nutrition Sciences**, [s. l.], v. 11, p. 33-39, 2 jun. 2021. Set Publishers. <http://dx.doi.org/10.29169/1927-5951.2021.11.05>.

PAARAKH, M. Padmaa *et al.* Release kinetics – concepts and applications. **International Journal Of Pharmacy Research & Technology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 12-20, 1 jan. 2019. SynthesisHub Advance Scientific Research. <http://dx.doi.org/10.31838/ijprt/08.01.02>.

PARK, Cheol *et al.* The anti-cancer effect of betulinic acid in u937 human leukemia cells is mediated through ROS-dependent cell cycle arrest and apoptosis. **Animal Cells And Systems**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 119-127, 4 mar. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19768354.2021.1915380>.

PATRA, Jayanta Kumar *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal Of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1-33, 19 set. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.

PENGON, Sirikarn *et al.* Factors Affecting Formation of Emulsions Containing Soybean Oil. **Advanced Materials Research**, [s. l.], v. 747, p. 725-728, ago. 2013. Trans Tech Publications, Ltd.. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.747.725>.

PETRIOLI, Roberto *et al.* The role of doxorubicin and epirubicin in the treatment of patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. **Cancer Treatment Reviews**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 710-718, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.05.004>.

PISHA, Emily *et al.* Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 10, p. 1046-1051, out. 1995. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1095-1046>.

PRADINES, Bénédicte *et al.* Gelation and micellization behaviors of pluronic® F127 hydrogel containing poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles specifically designed for

mucosal application. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 135, p. 669-676, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.021>.

QIU, Aijun *et al.* Natural Polysaccharide-Based Nanodrug Delivery Systems for Treatment of Diabetes. **Polymers**, [s. l.], v. 14, n. 15, p. 3217, 8 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym14153217>.

RAHN-CHIQUE, Kareem; BARRIENTOS, Oriana; URBINA-VILLALBA, German. Nanoemulsion stability above the critical micelle concentration: a contest between solubilization, flocculation and krafft precipitation. **Arxiv**, [s. l.], v. 6, p. 1-36, out. 2017. ArXiv. <http://dx.doi.org/10.48550/ARXIV.1710.09503>.

RAI, Vineet Kumar *et al.* Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal Of Controlled Release**, [s. l.], v. 270, p. 203-225, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.049>.

RASTOGI, Subha *et al.* Medicinal plants of the genus Betula—Traditional uses and a phytochemical–pharmacological review. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 159, p. 62-83, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.010>.

RAVERA, Francesca *et al.* Emulsification and emulsion stability: the role of the interfacial properties. **Advances In Colloid And Interface Science**, [s. l.], v. 288, p. 102344, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2020.102344>.

REBOUÇAS, Louhana M. *et al.* Linseed Oil Nanoemulsion with Pluronic® F127 Loaded with Betulinic Acid: preparation, rheology, mtt assay and in vitro release kinetics. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 33, n. 11, p. 1319-1331, 2022. Sociedade Brasileira de Quimica (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20220063>.

REBOUÇAS, Louhana M. *et al.* Microcapsules based on alginate and guar gum for co-delivery of hydrophobic antitumor bioactives. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 301, p. 120310, fev. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120310>.

REHMAN, Qudsia *et al.* Role of Kinetic Models in Drug Stability. In: AKASH, Muhammad Sajid Hamid *et al.* (ed.). **Drug Stability and Chemical Kinetics**. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2020. Cap. 11. p. 155-165.

REINER, Teresita *et al.* Betulinic Acid Selectively Increases Protein Degradation and Enhances Prostate Cancer-Specific Apoptosis: possible role for inhibition of deubiquitinase activity. **Plos One**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. e56234, 12 fev. 2013. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056234>.

RÍOS, José *et al.* New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid. **Planta Medica**, [s. l.], v. 84, n. 01, p. 8-19, 4 dez. 2017. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0043-123472>.

RODRÍGUEZ-BURNEO, Nathalia *et al.* Magnetic Nanoemulsions: comparison between nanoemulsions formed by ultrasonication and by spontaneous emulsification. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 190, 22 jul. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano7070190>.

ROMES, Nissha Bharrathi *et al.* D-optimal design-assisted *Elaeis guineensis* leaves extract in olive oil-sunflower seed nanoemulsions: development, characterization, and physical stability. **Journal Of Dispersion Science And Technology**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 289-301, 11 nov. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01932691.2020.1839484>.

SANEJA, Ankit *et al.* Therapeutic applications of betulinic acid nanoformulations. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s. l.], v. 1421, n. 1, p. 5-18, 29 jan. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.13570>.

SANEJA, Ankit *et al.* Development and evaluation of long-circulating nanoparticles loaded with betulinic acid for improved anti-tumor efficacy. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 531, n. 1, p. 153-166, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.076>.

SELEPE, Cyril Tlou *et al.* Development and Evaluation of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Encapsulated Betulinic Acid Nanocarrier for Improved Anti-Tumor Efficacy. **Macromolecular Materials And Engineering**, [s. l.], v. 310, n. 2, p. 1-12, 17 dez. 2024. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mame.202400283>.

SHIN, Jimin *et al.* Suppression of STAT3 and HIF-1 Alpha Mediates Anti-Angiogenic Activity of Betulinic Acid in Hypoxic PC-3 Prostate Cancer Cells. **Plos One**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. e21492, 24 jun. 2011. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021492>.

SHIRODKAR, Samir P *et al.* The risk and prophylactic management of bladder cancer after various forms of radiotherapy. **Current Opinion In Urology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 500-503, set. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mou.0b013e32832eb3b3>.

SHORE, Neal *et al.* Predicting Response and Recognizing Resistance: improving outcomes in patients with castration-resistant prostate cancer. **Urology**, [s. l.], v. 109, p. 6-18, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2017.04.062>.

SINGH, Yuvraj *et al.* Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery. **Journal Of Controlled Release**, [s. l.], v. 252, p. 28-49, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>.

SOARES, A.; RUTKOWSKI, C. P. M. **Doxorrubicina**. Link: Câncer de mama Brasil. 2025. Disponível em: <<https://www.cancerdemamabrasil.com.br/doxorrubicina/>>. Acesso em: 22 jun. 2025.

SOUSA, Gleysiane Gonçalves de; ROCHA, Izaura Maria; VIANA, Deuzuíta dos Santos Freitas. Uso de formulações lipossômicas para entrega controlada de fármacos antineoplásicos. **Research, Society And Development**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. e8899118511, 6 dez. 2020. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i11.8511>.

SOUSA, André L.N. de *et al.* Nanoemulsion based on *Calotropis procera* seed oil to delivery of betulinic acid: in vitro release kinetics, in vivo toxicity and mtt assay in pc3 cells. **Journal**

Of Drug Delivery Science And Technology, [s. l.], v. 106, p. 106746, abr. 2025. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2025.106746>.

SUGUMAR, Saranya; MUKHERJEE, Amitava; CHANDRASEKARAN, Natarajan. Eucalyptus oil nanoemulsion-impregnated chitosan film: antibacterial effects against a clinical pathogen, staphylococcus aureus, in vitro. **International Journal Of Nanomedicine**, [s. l.], p. 67, out. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s79982>.

SULAIBI, Mazen A. M. Al *et al.* Chemical Constituents and Uses of Calotropis Procera and Calotropis Gigantea – A Review (Part I – The Plants as Material and Energy Resources). **Open Chemistry Journal**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1-15, 17 abr. 2020. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1874842202007010001>.

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209-249, 4 fev. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21660>.

TADROS, Tharwat *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances In Colloid And Interface Science**, [s. l.], v. 108-109, p. 303-318, maio 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>.

TAN, Ezgi; DANĐŞMAN-KALĐNDEMIRTAŞ, Ferdane; KARAKUŞ, Selcan. Effective drug combinations of betulinic acid and ceranib-2 loaded Zn: mno2 doped-polymeric nanocarriers against pc-3 prostate cancer cells. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 225, p. 113278, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113278>.

TEO, Siew Yong *et al.* Evaluation of Biosourced Alkyd Nanoemulsions as Drug Carriers. **Journal Of Nanomaterials**, [s. l.], v. 2015, n. 1, p. 1-8, jan. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/537598>.

THAKUR, Sneha; MOHAN, G. Krishna. In Vivo Antiinflammatory Activity of Facile Boswellic Acid Silver Nanoparticles and In Vitro Drug Release Kinetics. **Bionanoscience**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 670-684, 26 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12668-022-00962-6>.

TOSIN, Camila; COSTA, Pedro Henrique Amador; VIEIRA, Isadora Bessa Gonçalves. O outro lado da pílula: a produção e o uso de medicamentos referência versus medicamentos genéricos, com enfoque em fármacos com janela terapêutica curta. **Studies In Health Sciences**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 1205-1220, 9 nov. 2023. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.54022/shsv4n4-008>.

TROJER, Markus Andersson *et al.* Encapsulation of actives for sustained release. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s. l.], v. 15, n. 41, p. 17727, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3cp52686k>.

URSICA, L. *et al.* Particle size analysis of some water/oil/water multiple emulsions. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 931-936, abr. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2004.10.055>.

VALDIVIA-OLIVARES, R.y. *et al.* Innovative multiple nanoemulsion (W/O/W) based on Chilean honeybee pollen improves their permeability, antioxidant and antibacterial activity. **Food Research International**, [s. l.], v. 168, p. 112767, jun. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112767>.

VILASAU, J. *et al.* Phase behaviour of a mixed ionic/nonionic surfactant system used to prepare stable oil-in-water paraffin emulsions. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 384, n. 1-3, p. 473-481, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.05.029>.

WADHWANI, Barkha Darra *et al.* A review on phytochemical constituents and pharmacological potential of *Calotropis procera*. **Rsc Advances**, [s. l.], v. 11, n. 57, p. 35854-35878, 2021. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d1ra06703f>.

WANG, Jianqing *et al.* Identification of the specific characteristics of neuroendocrine prostate cancer: immune status, hub genes and treatment. **Translational Oncology**, [s. l.], v. 54, p. 102320, abr. 2025. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2025.102320>.

WANG, Yiling *et al.* Enhanced oral bioavailability and bioefficacy of phloretin using mixed polymeric modified self-nanoemulsions. **Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 3545-3558, 28 maio 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.1637>.

XIANG, Michael; CHANG, Daniel T.; POLLOM, Erqi L.. Second cancer risk after primary cancer treatment with three-dimensional conformal, intensity-modulated, or proton beam radiation therapy. **Cancer**, [s. l.], v. 126, n. 15, p. 3560-3568, 19 maio 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.32938>.

ZARRINTAJ, Payam *et al.* Poloxamer: a versatile tri-block copolymer for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 110, p. 37-67, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2020.04.028>.

ZHANG, Xia; HU, Jingyu; CHEN, Yan. Betulinic acid and the pharmacological effects of tumor suppression. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 4489-4495, 4 out. 2016. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2016.5792>.

ZHOU, Yan; SONG, Kyu Young; GIUBELLINO, Alessio. The Role of MET in Melanoma and Melanocytic Lesions. **The American Journal Of Pathology**, [s. l.], v. 189, n. 11, p. 2138-2148, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.08.002>.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO

Journal of Drug Delivery Science and Technology 106 (2025) 106746



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst



Nanoemulsion based on *Calotropis procera* seed oil to delivery of betulinic acid: *In vitro* release kinetics, *in vivo* toxicity and MTT assay in PC3 cells

André L.N. de Sousa^a, Louhana M. Rebouças^{a,b}, Francisco M.F. Lemos^c, Ana C.B. Ribeiro^a,
Fernando E.T. Cunha^c, Cláudia Pessoa^d, Sarah L.A. Sales^d, Larissa M.R. Silva^c,
Nágila M.P.S. Ricardo^{a,*}

^a Laboratory of Polymers and Materials Innovation, Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, 60440-900, Brazil

^b Federal Institute of Education, Science and Technology of Ceará, Fortaleza, CE, 60410-426, Brazil

^c Department of Food Engineering, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, 60356-000, Brazil

^d Laboratory of Experimental Oncology, Center for Research and Drug Development, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, 60430-275, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Calotropis procera
Nanoemulsion
Betulinic acid
PC3 cells
Zebrafish

ABSTRACT

The objective of this work was to obtain a nanoemulsion based on *Calotropis procera* oil and betulinic acid, for antitumor applications. The nanoemulsion showed high betulinic acid carrying capacity ($7500 \mu\text{g g}^{-1}$), thermodynamic stability and high Encapsulation Efficiency ($>99.98\%$). *In vitro* cytotoxicity was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (72 h) against PC3 (prostate cancer) and L929 (fibroblasts). *In vivo* tests were carried out in a zebrafish model, revealing that the nanoemulsion did not alter locomotor activity and was not toxic within 96 h of oral administration, suggesting its biological safety. The IC_{50} values for the obtained nanoemulsions ranged from 4.6 to $6.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (PC3) and $>75 \mu\text{g mL}^{-1}$ for fibroblasts. In the 72 h *in vitro* release tests, it presented controlled release by the Higuchi model, releasing 31.33% ($622.80 \mu\text{g}$) of betulinic acid in a controlled manner, representing a possible promising formulation for antitumor applications.

APÊNDICE B – CARTA PATENTE CONCEDIDA



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



IPI
INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
**Assinado
Digitalmente**

CARTA PATENTE Nº BR 102023019624-1

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102023019624-1

(22) Data do Depósito: 25/09/2023

(43) Data da Publicação Nacional: 09/01/2024

(51) Classificação Internacional: A61K 36/24; A61K 31/56; A61K 9/107; A61K 47/60; A61P 35/00; A61P 29/00.

