UNIVERSIDADE FEEVALE

MESTRADO ACADÊMICO EM TOXICOLOGIA E ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vivo* do efeito hipnótico-sedativo e da toxicidade aguda de nanocápsulas contendo o fármaco diazepam

Julia Gabriele de Jesus Ferreira

Linha de pesquisa: Toxicologia experimental

Orientador: Prof. Dr. Andresa Heemann Betti
Coorientador: Prof. Dr. Cristiane Bastos de Mattos

Novo Hamburgo, março de 2023

JULIA GABRIELE DE JESUS FERREIRA

Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vivo* do efeito hipnótico-sedativo e da toxicidade aguda de nanocápsulas contendo o fármaco diazepam

Dissertação apresentada para obtenção do GRAU DE MESTRE em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela Universidade Feevale.

Orientador: Prof. Dr. Andresa Heemann Betti
Coorientador: Prof. Dr. Cristiane Bastos de Mattos

Novo Hamburgo, março de 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Ferreira, Julia Gabriele de Jesus
Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vivo do efeito hipnóticosedativo e da toxicidade aguda de nanocápsulas contendo o fármaco diazepam / Julia Gabriele de Jesus Ferreira – 2023.
71 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Prof. Dr. Andresa Heemann Betti.
Coorientadora: Prof. Dr. Cristiane Bastos de Mattos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Feevale – Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Novo Hamburgo, 2023.

1. Nanotecnologia. 2. Nanotoxicologia. 3. Diazepam. 4. Avaliação in vivo. I. Betti, Andresa Heemann, orient. II. Cristiane Bastos de Mattos, coorient. III. Título.

CDU 615.9
CDD 615.9

Bibliotecária responsável
Lizete Flores da Silva CRB10/2724

JULIA GABRIELE DE JESUS FERREIRA

Dissertação intitulada Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vivo* do efeito hipnótico-sedativo e da toxicidade aguda de nanocápsulas contendo o fármaco diazepam, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, da Universidade Feevale, como requisito necessário para obtenção do grau de mestre.

Aprovado por:

_____

Orientadora: Prof. Dr Andresa Heemann Betti
Universidade Feevale

_____

Prof. Dr. Simone Gasparin Verza
Banca Examinadora – Universidade Feevale

_____

Prof. Dr. Liz Girardi Müller
Banca Examinadora – Unochapecó

Novo Hamburgo, março de 2023.

AGRADECIMENTO

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

RESUMO

Diazepam**,** considerado o medicamento mais potente da sua classe, tem como efeito adverso predominante o efeito hipnótico-sedativo, em decorrência do longo tempo de meia vida de eliminação. Dado esse cenário, a nanotecnologia se apresenta como uma ferramenta para melhorar as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco, bem como seus efeitos adversos. Para tanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanocápsulas contendo diazepam e avaliar a sua toxicidade aguda e efeito hipnótico-sedativo em camundongos. A fim de quantificar o fármaco a partir das nanocápsulas, foi desenvolvido e validado um método analítico, em Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência em detector de conjunto de fotodiodos (PDA) em 236nm. As nanocápsulas foram produzidas pelo método de nano precipitação e caracterizadas quanto à morfologia, tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulação. Estudos de estabilidade de longa duração e estabilidade acelerada também foram realizados. O estudo de liberação *in vitro* foi realizado em células de difusão de Franz. Neste estudo foram utilizados camundongos isogênicos, Balb C. A avaliação farmacológica foi realizada através do tempo de sono induzido por tiopental e a toxicidade *in vivo* pela toxicidade aguda. O método mostrou-se seletivo e linear na faixa de trabalho de 0,25 a 4 µg/mL (r^2=0,9999). Limites de detecção e quantificação foram de 0,035 e 0,105 µg/mL, respectivamente. A precisão variou de 0,18 a 1,34, enquanto a exatidão, 98,41 a 108,31%. As nanocápsulas apresentaram tamanho de partícula de 180 ± 4,0 nm, índice de polidispersão de 0,119 ± 0,01, potencial zeta de -28,44 ± 3,3 mV, pH de 4,05 ±0,06. O teor variou de 97,05 ± 1,99 %, e a eficiência de encapsulação encontrada foi de 99,56%. O teste de toxicidade aguda sugere que a formulação mostra-se segura, uma vez que não foram evidenciados sinais de toxicidade através dos parâmetros analisados. No teste de sono induzido por tiopental apenas a dose de 1mg/kg da nanocápsula prolongou a duração do sono. Portanto, a formulação desenvolvida é inédita, possuindo boas caracteristicas físico-químicas e tecnológicas, e com potencial para reduzir os efeitos adversos oriundos da utilização do diazepam.

Palavras-chave: Nanotecnologia, Nanotoxicologia, Diazepam, Avaliação *in vivo*.

ABSTRACT

Diazepam, considered the most potent drug in its class, has the hypnotic-sedative effect as its most predominant adverse effect, due to the long elimination half-life. Given this scenario, nanotechnology presents itself as a tool to improve the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of the drug, as well as its adverse effects. Therefore, the objective of this study was to develop and characterize nanocapsules containing diazepam and to evaluate its acute toxicity and hypnotic-sedative effect in mice. To quantify the drug from the nanocapsules, an analytical method was developed and validated, using an Ultra efficiency Liquid Chromatograph in a photodiode array detector (PDA) at 236nm. The nanocapsules were created through the nanoprecipitation method and characterized in terms of morphology, particle size, polydispersion index, zeta potential, pH, content and encapsulation efficiency. Long-term stability and accelerated stability studies were also performed. The *in vitro* release study was carried out in Franz diffusion cells. In this study, isogenic mice, Balb C, were used. The pharmacological evaluation was performed through the sleep time induced by thiopental and the *in vivo* toxicity by the acute toxicity. The method proved to be selective and linear in the working range of 0.25 to 4 µg/mL (r2=0.9999). Limits of detection and quantification were 0.035 and 0.105 µg/mL, respectively. Precision ranged from 0.18 to 1.34, while accuracy 98.41 to 108.31%. The nanocapsules had a particle size of 180 ± 4.0 nm, polydispersion index of 0.119 ± 0.01, zeta potential -28.44 ± 3.3 mV and pH 4.05 ± 0.06. The content ranged from 97.05 ± 1.99%, and the encapsulation efficiency found was 99.56%. The acute toxicity test suggests that the formulation is safe since no signs of toxicity were shown through the analyzed parameters. In the thiopental-induced sleep test, only at a dose of 1mg/kg of the nanocapsule, prolonged sleep duration. Thus, the developed formulation is unprecedented, having good physical-chemical and technological characteristics, and with the potential to reduce the adverse effects arising from the use of diazepam.

Key words: Nanotechnology, Nanotoxicology, Diazepam, *In vivo* evaluation.