

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CARREGADAS COM 4-(FENILSELANIL)-2H-CROMEN-2-ONA: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO PARA O TRATAMENTO DA DOR

CAREN ALINE RAMSON DA FONSECA¹; JAINI JANKE PALTIAN²; RICARDO FREDERICO SCHUMACHER³; FELIX ALEXANDRE ANTUNES SOARES⁴; LETÍCIA CRUZ⁵; ETHEL ANTUNES WILHELM⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – carenramson@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – jaini_paltian@hotmail.com

³Universidade Federal de Santa Maria – ricardo.schumacher@ufsm.br

⁴Universidade Federal de Santa Maria – felix@ufsm.br

⁵Universidade Federal de Santa Maria – leticia.cruz@ufsm.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – ethelwilhelm@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A dor é um sintoma prevalente e incapacitante que impulsiona os indivíduos a procurar atendimento médico, impactando significativamente no seu bem-estar e qualidade de vida. A dor aguda envolve trauma e inflamação tecidual, com a resposta inflamatória auxiliando na regeneração dos tecidos lesionados (CASTROMAN et al., 2022). Essa sensação desconfortável afeta todas as populações, contribuindo para uma parcela significativa das visitas ao pronto-socorro (CASTROMAN et al., 2022). Extensas pesquisas conduzidas ao longo dos anos conquistaram o reconhecimento das propriedades farmacológicas dos compostos orgânicos de selênio e derivados cumarínicos. Uma infinidade de relatórios científicos destaca seus efeitos biológicos, que incluem atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias, ressaltando seu potencial como valiosos agentes terapêuticos (SALEEM et al., 2021; NOGUEIRA et al., 2021).

Considerando a importância primordial de melhorar a qualidade de vida dos pacientes, surgiram novas estratégias terapêuticas. Os mecanismos de analgesia monomodal muitas vezes são insuficientes, necessitando de combinações de medicamentos, para aliviar a dor e ao mesmo tempo atenuar os efeitos adversos (HYLAND et al., 2023). Os sistemas nanoestruturados destacam-se como promissores na otimização das propriedades dos medicamentos, com impactos mínimos à saúde. Essas abordagens oferecem caminhos potenciais para superar desafios nas áreas de farmacocinética, farmacodinâmica, e especificidade tecidual ou celular. Além disso, os sistemas nanoestruturados oferecem uma proposta eficaz para contornar as limitações associadas aos atributos físico-químicos das moléculas orgânicas e reduzir a toxicidade (LIMA et al., 2022).

Diante das promissoras propriedades dos compostos orgânicos de selênio e derivados cumarínicos, o presente estudo buscou elucidar os efeitos do composto 4-(fenilselanil)-2H-cromen-2-ona (4-PSCO) na sua forma livre e veiculada em suspensões de nanocápsulas poliméricas como um possível candidato para o tratamento da dor e inflamação em modelos pré-clínicos de dor aguda. Além disso, foram realizadas avaliações toxicológicas, contribuindo assim para uma compreensão mais abrangente do perfil multifacetado desse composto.

2. METODOLOGIA

Para a realização dos experimentos de dor aguda foram utilizados camundongos machos com 60 dias de idade, da raça Swiss provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Todos os

experimentos com animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 13049-2021) da UFPel. Os ensaios de toxicidade foram realizados utilizando Cepas de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) adquiridas do *Caenorhabditis Genetics Center*. As cepas utilizadas foram derivadas da cepa Bristol N2 do tipo selvagem e foram cultivadas em placas de ágar *Nematode Growth Medium* (NGM), suplementadas com *Escherichia coli* (*E. coli*) OP50 como fonte de alimento. O composto 4-PSCO (Figura 1) foi sintetizado de acordo com metodologia descrita por PADILHA et al. (2017). As suspensões de nanocápsulas foram produzidas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, de acordo com a metodologia previamente descrita por FERREIRA et al. (2018). O ensaio de sobrevivência foi realizado utilizando vermes na fase adulta jovem e eles foram expostos a 4-PSCO livre (300 µg/mL), NC B (300 µg/mL) e 4-PSCO NC em concentrações de 50, 150 e 300 µg/mL por 1 hora (BISCHOF et al., 2006). Os ensaios comportamentais, como o do bombeamento faríngeo, cabeçadas (do inglês, *Head thrashes*), ciclo de defecação e a resposta ao toque foram realizados após 1 hora de exposição dos animais à 4-PSCO livre e às formulações NC B e 4-PSCO NC na concentração de 300 µg/mL, conforme metodologias descritas anteriormente (KAPLAN et al., 1993; RAIZEN et al., 2012; WU et al., 2018; BRUNS et al., 2020).

O efeito da 4-PSCO NC na nocicepção induzida por glutamato foi realizado conforme metodologia descrita por BEIRITH et al. (2002). O edema da pata foi avaliado comparando a diferença de peso entre a pata injetada com glutamato e o peso da pata contralateral (tratada com solução salina 0,9%). Os resultados obtidos foram representados em peso (mg). Para a realização da curva de tempo-resposta em um modelo de dor inflamatória os animais receberam uma única injeção intraplantar do adjuvante completo de Freund (CFA, do inglês – *Complete Freund's Adjuvant*, 20 µL) na pata traseira direita e solução salina (0,9%, 20 µL/pata) na pata esquerda. Após 24 horas, os animais receberam óleo de canola (10 mL/kg, via intragástrica (i.g.)), 4-PSCO livre (1 mg/kg, i.g.), NC B (10 mL/kg, i.g.) ou 4-PSCO NC (1 mg/kg, i.g.). A resposta nociceptiva foi verificada em 0,5, 2, 4, 24, 48 e 72 horas após os tratamentos, utilizando um analgesímetro digital conforme método descrito por Alamri et al. (2018) com algumas modificações. Os dados foram expressos como limiar de retirada da pata (g).

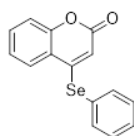


Figura 1. Estrutura química do 4-PSCO.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nosso estudo revelou que a exposição dos animais à NC B (300 µg/mL) e à 4-PSCO NC (50, 150 e 300 µg/mL) por 1 hora não afetou a sobrevivência dos *C. elegans* (Figura 2A). Entretanto, quando os nematoides foram expostos à 4-PSCO livre na concentração de 300 µg/mL houve uma diminuição no número de vermes vivos em comparação ao grupo controle (Figura 2A). Em relação aos testes comportamentais, a exposição dos vermes adultos jovens à 4-PSCO livre, NC B e 4-PSCO NC na concentração de 300 µg/mL não induziu alterações nos parâmetros de motilidade avaliados no teste de batimentos faríngeos (Figura 2B), cabeçadas (Figura 2C) e ciclo de defecação (Figura 2E). No teste de resposta ao toque, foi

observada uma diminuição significativa na resposta ao toque na cepa Bristol N2 após o tratamento com 4-PSCO NC (300 µg/mL) em comparação ao grupo controle. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na resposta ao toque após o tratamento com 4-PSCO livre e NC B (Figura 2D).

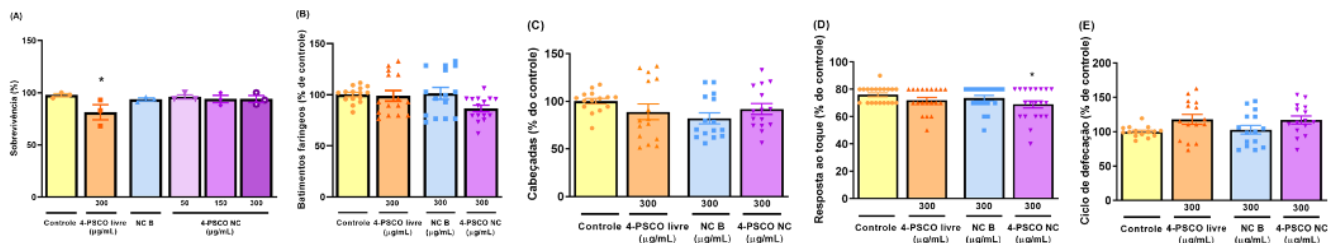


Figura 2. Avaliação da exposição de *C. Elegans* adultos jovens da cepa N2 à nanocápsula polimérica contendo a 4-(fenilselanil)-2H-cromen-2-ona (4-PSCO) (4-PSCO NC) e 4-PSCO livre durante 1 hora por meio do ensaio de (A) sobrevivência, (B) batimentos faríngeos, (C) cabeçadas, (D) resposta ao toque e (E) ciclo de defecação. Três experimentos independentes foram realizados. Cada coluna representa a média ± E.P.M. (*) $p < 0,05$ denotam níveis de significância entre os grupos (ANOVA de uma via seguido de post-hoc de Dunnett).

A Figura 3 ilustra os efeitos da administração da 4-PSCO NC e 4-PSCO livre na resposta comportamental no teste de glutamato e no processo inflamatório desencadeado pelo CFA no teste de sensibilidade mecânica em camundongos. A análise dos dados revelou que tanto a 4-PSCO livre (1 e 5 mg/kg) quanto a 4-PSCO NC (1 mg/kg) diminuiriam significativamente a resposta nociceptiva em comparação com os grupos controle e NC B (Figura 3A). No entanto, a 4-PSCO livre (0,1 mg/kg) e o meloxicam (5 mg/kg) não foram capazes de reduzir a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato (Figura 3A). Pode-se observar que a 4-PSCO livre teve um efeito antinociceptivo mais forte em comparação com a 4-PSCO NC. O efeito menos pronunciado da 4-PSCO NC pode ser devido à liberação gradual do composto no tecido alvo, causando potencialmente efeitos a longo prazo (Figura 3A). Além disso, a 4-PSCO livre reduziu significativamente a formação de edema da pata induzido por glutamato em 37% (1 e 5 mg/kg) (Figura 3B) em comparação com o grupo controle. O efeito antiedematogênico também foi observado nos animais pré-tratados com o meloxicam (5 mg/kg) (20%) (Figuras 3B). Entretanto, a 4-PSCO livre na dose de 0,1 mg/kg e a 4-PSCO NC (1 mg/kg) não reduziram o edema induzido pelo glutamato (Figura 3B).

Em relação a curva de tempo-resposta, os camundongos tratados com a 4-PSCO livre (1 mg/kg) e a 4-PSCO NC (1 mg/kg) apresentaram redução na hipersensibilidade mecânica induzida por CFA após 0,5 horas de tratamento em comparação com os grupos controle e NC B (Figura 3C). De 0,5 a 72 horas após os tratamentos, tanto a 4-PSCO livre quanto a 4-PSCO NC continuaram a exibir um efeito antinociceptivo em comparação com o grupo CFA. Destaca-se que em 48 horas e 72 horas, a 4-PSCO NC foi mais eficaz na redução da hipersensibilidade a estímulos mecânicos induzidos por CFA em comparação com o composto na forma livre (Figura 3C).

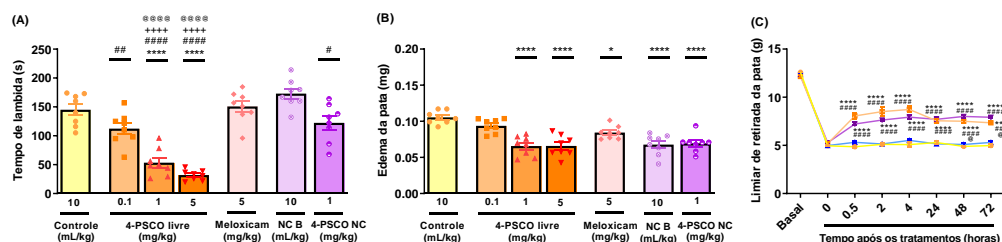


Figura 3. Efeito do tratamento com a 4-(fenilselanil)-2H-cromen-2-ona (4-PSCO) nanoencapsulada (4-PSCO NC) (1 mg/kg), 4-PSCO livre (0,1, 1 e 5 mg/kg), NC B (1 mg/kg) e meloxicam (5 mg/kg) na nocicepção induzida por glutamato (A), na formação do edema da pata (B) e na sensibilidade mecânica induzida pelo CFA (C) em camundongos machos. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 8 camundongos em cada grupo. (*) $p < 0,05$ em comparação com o grupo veículo, (#) $p < 0,05$ em comparação com o grupo NC B, (+) $p < 0,05$ em comparação com o grupo Meloxicam, (@) $p < 0,05$ em comparação com o grupo 4-PSCO NC (ANOVA de uma via seguido de pelo teste de Tukey).

4. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, sugere-se que o composto 4-PSCO livre e nanoencapsulado pode atuar efetivamente na melhora da dor nociceptiva e inflamatória, sem causar toxicidade. Esses resultados fazem parte de um estudo maior e os demais resultados confirmam os potenciais efeitos desse composto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAMRI, F.F.; SHOYAIB, A.A.; BIGGERS, A.; JAYARAMAN, S.; GUINDON, J.; KARAMYAN, V.T. Applicability of the grip strength and automated von Frey tactile sensitivity tests in the mouse photothrombotic model of stroke. **Behavioral Brain Research**, v. 336, p. 250-255, 2018.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Research*, v. 924, p. 219-228, 2002.
- BISCHOF, L.J.; HUFFMAN, D.L.; AROIAN, R.V. Assays for toxicity studies in *C. elegans* with Bt crystal proteins. **Methods Molecular Biology**, v. 351, p. 139-54, 2006.
- BRUNS, N.A.; LO, S.H. Tensin regulates pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 522, p. 599-603, 2020.
- KAPLAN, J.M.; HORVITZ, H.R. A dual mechanosensory and chemosensory neuron in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 2227-2231, 1993.
- CASTROMAN, P.; QUIROGA, O.; MAYORAL ROJALS, V.; GÓMEZ, M. Reimagining How We Treat Acute Pain: A Narrative Review. **Cureus**, v. 14, p. e23992, 2022.
- FERREIRA, L.M.; CERVI, V.F.; SARI, M.H.M. Diphenyl diselenide loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules with selective antimelanoma activity: Development and cytotoxic evaluation. **Materials Science and Engineering C**, v. 91, p. 1-9, 2018.
- LIMA, A.L.; GRATIERI, T.; CUNHA-FILHO, M.; GELFUSO, G.M. Polymeric nanocapsules: A review on design and production methods for pharmaceutical purpose. **Methods**, v. 199, p. 54-66, 2022.
- NOGUEIRA, C.W.; BARBOSA, N.V.; ROCHA, J.B.T. Toxicology and pharmacology of synthetic organoselenium compounds: an update. **Archives of Toxicology**, v. 95, p. 1179-1226, 2021.
- PADILHA G, BIRMANN, P.T.; DOMINGUES, M. Convenient Michael addition/ β -elimination approach to the synthesis of 4-benzyl- and 4-aryl-selenyl coumarins using diselenides as selenium sources. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 10, p. 985-990, 2017.
- RAIZEN, D.; SONG, B.M.; TROJANOWSKI, N.; YOU, Y.J. Methods for measuring pharyngeal behaviors. **WormBook**, v. 18, p. 1-13, 2012.
- SALEEM, M.; ASIF, M.; PARVEEN, A.; YASEEN, H.S.; SAADULLAH, M.; BASHIR, A.; ASIF, J.; ARIF, M.; KHAN, I.U.; KHAN, R.U. Investigation of in vivo anti-inflammatory and antiangiogenic attributes of coumarin-rich ethanolic extract of *Melilotus indicus*. **Inflammopharmacology**, v. 29, p. 281-293, 2021.
- WU, Q.; NOUARA, A.; LI, Y.; ZHANG, M.; WANG, W.; TANG, M.; YE, B. Comparison of toxicities from three metal oxide nanoparticles at environmental relevant concentrations in nematode *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, v. 90, p. 1123-1131, 2018.