



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CAMPUS BLUMENAU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA, PROCESSOS E MATERIAIS
AVANÇADOS

Allana Batista

**Desenvolvimento de sistemas bioinspirados em Canais de Íon de Detecção Ácida (ASICs)
utilizando sistema micelar de poliestireno-b-poli(ácido acrílico) (PS-b-PAA)**

Blumenau

2021

Allana Batista

**Desenvolvimento de sistemas bioinspirados em Canais de Íon de Detecção Ácida (ASICs)
utilizando sistema micelar de poliestireno-b-poli(ácido acrílico) (PS-b-PAA)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Nanociência, Processos e Materiais Avançados.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Bulegon Brondani

Coorientador: Prof. Dr. Ismael Casagrande Bellettini

Blumenau

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Batista, Allana

Desenvolvimento de sistemas bioinspirados em Canais de Íon de Detecção Ácida (ASICs) utilizando sistema micelar de poliestireno-b-poli(ácido acrílico) (PS-b-PAA) / Allana Batista ; orientadora, Patrícia Bulegon Brondani, coorientador, Ismael Casagrande Bellettini, 2022.

89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Nanociência, Processos e Materiais Avançados. 2. Química. 3. Bioquímica. 4. Físico-Química Biológica. 5. Farmacologia. I. Bulegon Brondani, Patrícia . II. Casagrande Bellettini, Ismael. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados. IV. Título.

Allana Batista

**Desenvolvimento de sistemas bioinspirados em Canais de Íon de Detecção Ácida (ASICs)
utilizando sistema micelar de poliestireno-b-poli(ácido acrílico) (PS-b-PAA)**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Aldo Sena de Oliveira
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Larissa Nardini Carli
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Joel Savi dos Reis
Universidade Federal Fluminense

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Nanociência, Processos e Materiais Avançados.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.^a Dr.^a Patrícia Bulegon Brondani
Orientadora

Blumenau, 2022.

AGRADECIMENTOS

À minha família, agradeço o incentivo, apoio moral e amor incondicional. À minha mãe Albertina, obrigada por sempre me mostrar que educação é o melhor caminho. Ao meu pai Veneri, por todas as palavras de afeto e encorajamento. À minha irmã Gabrielli, obrigada pelo apoio emocional, por escutar minhas dores e risos. Vocês são o motivo deste resultado.

Ao meu companheiro Vitor, que me apoiou nesse processo exaustivo de estudo, muito obrigada pela força que me concedeu para chegar até aqui e por todo amor dado quando eu chegava em casa.

Aos meus mestres, agradeço por serem tão pacientes comigo. Em especial, agradeço à minha orientadora Patrícia, que me auxiliou em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, do papel ao laboratório. Obrigada por caminhar ao meu lado, muitas vezes me carregando até aqui. Agradeço também ao meu coorientador Ismael, que nos guiou e ajudou a colocar em prática este trabalho. Sua contribuição para esse trabalho o tornou completo.

À minha amiga e colega Morgana Sofia, muito obrigada pelas tardes de escrita, telas compartilhadas e revisões. Não poderia esquecer das falas aleatórias, vozes afinadas e risadas. Agradeço todo o percurso que vivemos juntas, uma apoiando a outra.

À minha amiga e colega de laboratório Gabriele, agradeço por estar ao meu lado desde a graduação, pelas instalações de programas, edições de vídeos e slides. Obrigada por aturar minhas reclamações. “Elemento Hélio” será eterno.

À minha amiga Andressa que, mesmo distante, fez-se presente virtualmente (as vezes presencialmente) para desabafos, palavras de estímulos e repreensão da famosa frase “eu não vou conseguir”. Obrigada por me fazer lembrar que sou capaz.

Aos meus amigos Natan e Paola, que estavam sempre próximos dando o apoio necessário, e ao Keller, pelos cafés e risadas descontraídas no laboratório

Aos meus amigos Ana Caroline, Fernanda e Humberto, que apesar de não saberem, fizeram este trabalho menos árduo com suas mensagens de incentivo.

Ao meu psicólogo Vinicio de Alexandria, que foi mais do que um profissional. Foi amigo nas horas necessárias e me mostrou meu potencial para continuar. Obrigada por mostrar as opções para eu escolher meu caminho.

À Prof^a. Dr^a. Lidiane, que me aceitou como sua estagiária de docência, contribuindo com minha formação profissional e pessoal. Agradeço pelo seu auxílio quando precisei e pelo carinho, sempre estando disposta a ajudar.

Ao Cesar, obrigada por me auxiliar nos equipamentos no laboratório, pela companhia nas tardes do bloco B vazio e pelas gambiarras que facilitaram meu trabalho.

Aos professores que contribuíram durante a banca de qualificação, Prof. Dr. Aldo, Prof. Dr. André e Prof^a. Dr^a Claudia, muito obrigada pelas sugestões para aperfeiçoar esse projeto.

Aos professores que contribuíram durante a banca de dissertação, Prof. Dr. Aldo, Prof. Dr. Joel e Prof^a. Dr^a Larissa, agradeço os apontamentos e sugestões para tornar este trabalho sua melhor versão.

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar, da Universidade Regional de Blumenau (FURB), pela doação de material enzimático e disponibilização de análises para acrescentar ao trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de fomento e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para esta pesquisa.

“São as nossas escolhas as que melhor definem o que somos, muito mais que nossas habilidades.”

(Harry Potter e a Câmara Secreta)

RESUMO

Estímulos prejudiciais ao corpo estão associados à dor via sistema nociceptivo, por meio de receptores sensoriais especializados, chamados nociceptores. Os nociceptores detectam a dor através da ativação de receptores e canais iônicos presentes em sua superfície. Por exemplo, os chamados ASICs, ou canais iônicos sensíveis a ácido, são ativados por pequenas variações de pH que estão relacionadas a muitos distúrbios diferentes. Drogas que cessam o estímulo (e a dor) antagonizam esse processo. Exemplos de antagonistas que atuam nos ASICs são o ibuprofeno, o ácido acetilsalicílico (AAS) e o diclofenaco. O tratamento da dor é um grave problema de saúde pública e por isso há um grande esforço para o desenvolvimento de novas drogas antinociceptivas. As pesquisas nessa área geralmente ocorrem por meio de experimentos que causam dor e são realizados predominantemente em mamíferos como ratos e camundongos. Apoiado na importância do tema, o objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um teste de triagem micelar polimérico bioinspirado em canais ASIC. Este teste pode ser usado para acelerar o desenvolvimento de novas drogas antinociceptivas. Para atingir o objetivo, a dispersão micelar de poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) (PS-*b*-PAA) foi testada na tentativa de encapsular algumas moléculas orgânicas e os resultados foram acompanhados por espectroscopia UV-Vis. Os melhores resultados foram observados quando a dispersão de PS-*b*-PAA encapsulava butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NFB) na presença de lipase isolada de *Pseudomonas fluorescens*. Quando o *p*-NFB é liberado, na presença da lipase, ele é convertido no fenol correspondente, deslocando o comprimento de onda máximo de absorbância. Desta forma, a resposta analítica é clara. Para avaliar a influência de uma droga antagonista, o ibuprofeno foi aplicado ao sistema. O sistema desenvolvido foi testado em diferentes pHs (5 - 7,4) a 37 °C. Foi observada maior liberação de *p*-NFB durante os experimentos aplicando pH 7,4-6,5, sendo responsivo ao pH como esperado para um sistema ASIC bioinspirado. Também como o esperado, a presença de ibuprofeno reduziu a liberação de *p*-NFB. Portanto, o sistema desenvolvido parece ser eficaz para a triagem de novos fármacos na faixa de pH fisiológico. Além disso, o sistema é estável, com baixo custo associado e fácil de usar.

Palavras-chave: Nocicepção. Sistemas bioinspirados responsivos. Micelas poliméricas. Canais de Íon de Detecção Ácida (ASICs).

ABSTRACT

Harmful stimuli to the body are associated with pain via the nociceptive system, through specialized sensory receptors, called nociceptors. Nociceptors detect pain through the activation of receptors and ion channels present on its surface. For example, the so-called ASICs, or acid-sensing ion channels, are activated by small pH variations that are related to many different disorders. Drugs that cease the stimulus (and pain) antagonize this process. Examples of antagonists that act on ASICs are ibuprofen, acetylsalicylic acid (AAS), and diclofenac. The treatment of pain is a serious issue in public health and because of that, there is a huge effort for the development of new antinociceptive drugs. The research in this field usually occurs through experiments that cause pain and are predominantly conducted in mammals such as rats and mice. Supported on the significance of the theme, the main objective of this paper was to develop a polymeric micellar screening test bioinspired on ASIC channels. This test can be used to accelerate the development of new antinociceptive drugs. To achieve the objective, micellar dispersion of polystyrene-*b*-poly (acrylic acid) (PS-*b*-PAA) was tested in an attempt to encapsulate some organic molecules and the results were followed up through UV-Vis spectroscopy. The best results were observed when the PS-*b*-PAA dispersion encapsulated *p*-nitrophenyl butyrate (*p*-NFB) in the presence of lipase isolated from *Pseudomonas fluorescens*. When the *p*-NFB is released, in the presence of the lipase, it is converted to the corresponding phenol, dislocating the maximum absorbance wavelength. In this way the analytical response is clear. To evaluate the influence of an antagonist drug, ibuprofen was applied to the system. The developed system was tested in different pHs (5 - 7,4) at 37 °C. It was observed a larger release of *p*-NFB during the experiments applying pH 7.4-6.5, being pH-responsive as expected for an ASIC bioinspired system. As well as expected, the presence of ibuprofen reduced the *p*-NFB release. Therefore, the developed system seems to be effective for the screening of new drugs in the physiological pH range. Besides that, the system is stable, with associated low cost, and easy to use.

Keywords: Nociception. Responsive Bio Inspired Systems. Polymeric Micelles. Acid-Sensing Ion Channels (ASICs).

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reação de formação do ácido acetilsalicílico (AAS).....	33
Esquema 2. Reação de (II) formação do complexo tris(2,2'-bipiridina) Ferro (II) (22) com BPY (16) e (I) Fe ²⁺ reduzido pelo AA (20).	41
Esquema 3. Reação de hidrólise do éster butirato de p-nitrofenila ao fenol p-nitrofenol utilizando lipase.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática baseada na estrutura do ASIC1a de frangos, de acordo com o modelo de uma mão segurando uma bola.....	22
Figura 2. Fórmulas estruturais dos compostos amilorida (1) e diminazeno (2).	24
Figura 3. Fórmulas estruturais dos compostos (3) flurbiprofeno, (4) ibuprofeno, (5) AS, (6) AAS, (7) diclofenaco, (8) tetracaína e (9) lidocaína.	24
Figura 4. Modelo de um agregado micelar de (a) surfactantes e (b) copolímero, onde as partes pretas representam a cadeia hidrofóbica e as partes azuis a cadeia hidrofílica, em um meio aquoso.	27
Figura 5. Fórmulas estruturais dos surfactantes (12) CTAB, (13) SDod e do composto (14) cumarina.	34
Figura 6. Fórmula estrutural do copolímero Poliestireno-b-Poli(ácido acrílico).	35
Figura 7. Micela de surfactantes como uma estrutura dinâmica.	39
Figura 8. Fórmulas estruturais dos compostos (14) cumarina, (16) 2,2'-bipiridil, (17) fenolftaleína, (18) curcumina e (19) butirato de p-nitrofenila.	40
Figura 9. Gráfico de coeficiente de correlação em função do tempo e distribuição de tamanho (diâmetro hidrodinâmico (DH)) para a dispersão de PS-b-PAA com o composto p-NFB encapsulado, em água destilada a 25°C.....	42
Figura 10. Resumo gráfico da bioinspiração e funcionamento do sistema idealizado, onde há a liberação de p-NFB (19) e sua hidrólise ao p-nitrofenol (23) através da ação da lipase (<i>Pseudomonas fluorescens</i>) com e sem ibuprofeno (4). Em pH 5,0, o p-NFB absorve em 275 nm e o p-nitrofenol em 315 nm. ^a	43
Figura 11. Estudo do deslocamento da banda de absorbância do composto p-nitrofenol através de espectrofotometria de UV-Vis em diferentes pHs. ^a	44
Figura 12. (a) Espectros gerados pelas enzimas imobilizadas avaliadas. (b) Espectros gerados pelas três enzimas mais apropriadas para o sistema. ^a	45
Figura 13. Espectros de UV-Vis dos fármacos antagonistas diclofenaco, ácido salicílico (AS), ácido acetilsalicílico (AAS) e ibuprofeno. ^a	47
Figura 14. Representação dos quatro grupos de experimentos em microcentrifugas contendo tampão e a dispersão (I) com ibuprofeno e sem Lipase (II), com Lipase e sem ibuprofeno (III) e com Lipase e Ibuprofeno (IV).....	48
Figura 15. Espectros de absorbância da dispersão micelar em tampão fosfato (a) pH 7,4 após 3 h de incubação e (b) pH 7,0 após 6 h de incubação. ^a	49
Figura 16. Espectros de absorbância da dispersão micelar em tampão fosfato em pH 6,5 após 12 h de incubação. ^a	49
Figura 17. Comparação dos espectros de absorbância da dispersão micelar (Grupo IV) após 3 h em tampão citrato pH 6,0 e em tampão fosfato pH 7,4. ^a	51
Figura 18. Espectros de absorbância da dispersão micelar em tampão citrato pH 6,0 após 12 h de incubação. ^a	51
Figura 19. Espectros de absorbância da dispersão micelar em tampão citrato em (a) pH 5,5 após 24 h de incubação e (b) pH 5,0 após 12 h de incubação. ^a	52
Figura 20. Espectro de absorbância dos grupos I, II, III e IV em pH 5,0 após 6 h de incubação. ^a	53
Figura 21. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H do composto Ácido acetilsalicílico (6, AAS).	66
Figura 22. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹³ C do composto Ácido acetilsalicílico (6, AAS).	67
Figura 23. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H do composto Ibuprofeno (4)..	68

Figura 24. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C do composto Ibuprofeno (4).	69
Figura 25. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H do composto Diclofenaco (7).	70
Figura 26. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C do composto Diclofenaco (7).	71
Figura 27. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 3 h em pH 5,0.	73
Figura 28. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 6 h em pH 5,0.	73
Figura 29. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 12 h em pH 5,0.	74
Figura 30. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 24 h em pH 5,0.	74
Figura 31. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 3 h em pH 5,5.	75
Figura 32. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 6 h em pH 5,5.	75
Figura 33. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 12 h em pH 5,5.	76
Figura 34. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 24 h em pH 5,5.	76
Figura 35. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 3 h em pH 6,0.	77
Figura 36. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 6 h em pH 6,0.	77
Figura 37. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 12 h em pH 6,0.	78
Figura 38. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 24 h em pH 6,0.	78
Figura 39. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 3 h em pH 6,5.	79
Figura 40. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 6 h em pH 6,5.	79
Figura 41. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 12 h em pH 6,5.	80
Figura 42. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 24 h em pH 6,5.	80
Figura 43. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 3 h em pH 7,0.	81
Figura 44. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 6 h em pH 7,0.	81
Figura 45. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 12 h em pH 7,0.	82
Figura 46. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 24 h em pH 7,0.	82
Figura 47. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 3 h em pH 7,4.	83
Figura 48. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 6 h em pH 7,4.	83
Figura 49. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 12 h em pH 7,4.	84
Figura 50. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 24 h em pH 7,4.	84

LISTA DE SIGLAS

AA	Ácido Ascórbico
AAS	Ácido Acetilsalicílico
AS	Ácido Salicílico
ASIC	Canais de Íons de Detecção Ácida
ASIC1	Isoforma 1 de Canais de Íons de Detecção Ácida
ASIC3	Isoforma 3 de Canais de Íons de Detecção Ácida
BPY 2,2'	Bipiridil
CMC	Concentração Micelar Crítica
CTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
DEG/ENaC	Canais Próticos/Na ⁺ Epiteliais
D _H	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmica
DMSO-D ₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
D238:D350	Ácido aspártico nas posições 238 e 350 da sequência de aminoácidos
ELS	Espalhamento de Luz Eletroforético
E239:D346	Ácido glutâmico na posição 239 e ácido aspártico na posição 346 no
sítio ativo	
E80:E417	Ácido glutâmico na posição 239 e ácido aspártico na posição 346 na
parte interna	
MC	Simulações de Monte Carlo
MD	Dinâmica molecular combinada
PAA	Poli(ácido acrílico)
PMCP-b-PDPA	Poli(2-(metacriloiloxi)etilcolina fosfato)-b-poli(2(diisopropilamino)etil
metacrilato	
<i>p</i> -NFB	Butirato de <i>p</i> -nitrofenila
PS	Poliestireno
PS-b-PAA	Poliestireno-b-poli(ácido acrílico)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotação Por Minuto
SDod	Dodecanoato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
THF	Tetrahidrofurano

TRP

Receptores de Potencial Transitório

UV-Vis

Ultravioleta-Visível

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Preparação das dispersões micelares controle e do sistema.	37
Tabela 2. Valores de atividade da lipase isolada de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em vários pHs, na presença de ibuprofeno e da dispersão micelar. ^a	46
Tabela 3. Valores de detecção de p-nitrofenol em % calculados a partir da concentração detectada dos espectros de absorção nos sistemas III e IV em tampão fosfato pH 7,4, 7,0 e 6,5 após 3, 6, 12 e 24 h. ^a	50
Tabela 4. Valores de detecção de p-nitrofenol em % calculados a partir da concentração detectada dos espectros de absorção nos sistemas III e IV em tampão citrato pH 6,0, 5,5 e 5,0 após 3, 6, 12 e 24 h. ^a	52
Tabela 5. Valores em % calculados pela concentração de detecção de p-nitrofenol nos grupos I, II, III e IV. ^a	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	SISTEMA NOCICEPTIVO	21
3.1.1	Canais de Íon de Detecção Ácida ou <i>Acid Sensing Ion Channels</i> (ASICs)	21
3.1.2	Farmacologia relacionada aos canais ASICs.....	23
3.2	SISTEMAS BIOINSPIRADOS	25
3.3	SISTEMAS RESPONSIVOS POLIMÉRICOS	26
3.4	ENZIMAS E APLICAÇÕES.....	29
4	METODOLOGIA	32
4.1	MATERIAIS	32
4.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	33
4.2.1	Obtenção dos fármacos antagonistas	33
4.2.2	Preparação das dispersões micelares	34
4.2.3	Seleção das enzimas	36
4.2.4	Testes das dispersões micelares como sistemas bioinspirados.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
5.1	OBTENÇÃO DE COMPOSTOS ANTAGONISTAS	38
5.2	PREPARAÇÃO DAS DISPERSÕES MICELARES	38
5.2.1	Sistemas micelares baseados em surfactantes	39
5.2.2	Sistemas micelares baseados em copolímero PS-b-PAA	40
5.3	AVALIAÇÃO DAS LIPASES	44
5.4	AVALIAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTAGONISTAS	46
5.5	AVALIAÇÃO DO SISTEMA BIOINSPIRADO EM ASICs.....	47
5.6	CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS APLICANDO O IBUPROFENO <i>IN VIVO</i> E NO SISTEMA BIOINSPIRADOS DESENVOLVIDO	54
6	CONCLUSÃO	55
7	REFERÊNCIAS	57
8.	APÊNDICE A – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos compostos antagonistas.....	65

9. APÊNDICE B – Espectros de Absorção dos Grupos I, II, III e IV após incubação em diferentes pHs 72

10. APÊNDICE C – Valores em % de detecção de *p*-nitrofenol nos grupos I, II, III e IV.

1 INTRODUÇÃO

A dor é um mecanismo de sobrevivência que tem por objetivo notificar estímulos nocivos ao corpo. Esses estímulos podem ser provenientes de danos teciduais contínuos ou iminentes (COHEN, Steven P.; MAO, 2014; YAM et al., 2018), originados por diversas desordens, como a fibromialgia, o câncer, a enxaqueca, os processos inflamatórios, entre outras (YAM et al., 2018). Estes danos originam dor através de um sistema sensorial complexo denominado sistema nociceptivo, que pode detectar estímulos nocivos de origem térmica, mecânica e química. Essa detecção ocorre por intermédio de terminações nervosas especializadas, denominados nociceptores (SCHOLZ; WOOLF, 2002).

O processo que causa dor em uma inflamação, por exemplo, é iniciado pela liberação de mediadores inflamatórios que sensibilizam, ou seja, agonizam os nociceptores (MCENTIRE et al., 2016). Quando os agonistas entram em contato com os receptores e/ou canais iônicos presentes nos nociceptores, ocorrem alterações químicas nesses. Após, ocorre a conversão dessas alterações em sinal elétrico, o que é chamado de transdução. A transdução faz parte do mecanismo básico da dor, sendo o primeiro de três estágios, dentre eles transdução, transmissão e modulação. O processo final de geração da dor leva a uma experiência multidimensional, ou seja, com componentes emocionais, sensoriais-discriminatórios e comportamentais (COHEN, Mitchell J.; JANGRO; NEFF, 2018; YAM et al., 2018).

Assim, a nocicepção e a dor possuem diferentes definições, já que a dor também pode ser provocada por causas psicológicas. A nocicepção é de um processo no qual sinais são levados ao sistema nervoso central (SNC), ativando os nociceptores e fornecendo informações sobre o dano tecidual (FEIN, 2010; TRACEY, 2017). A dor nociceptiva, portanto, é a consequência fisiológica da transdução de um estímulo danoso em um sinal neural que ativa vias aferentes (COHEN, Mitchell J.; JANGRO; NEFF, 2018).

A transdução de estímulos nociceptivos podem ocorrer por várias vias e, por isso, os processos de estímulos da nocicepção são muito mais complexos do que os processos envolvidos em outros sistemas sensoriais, como a visão e o olfato. O sistema nociceptivo é o único que detecta várias modalidades de estímulos, incluindo aqueles de natureza física e química (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Como já comentado, esses estímulos diversos são detectados por receptores e canais iônicos especializados, presentes nos nociceptores. Esses receptores ou canais são diferenciados de acordo com sua atividade responsiva (JULIUS; BASBAUM, 2001). Exemplos de canais que

detectam estímulos no sistema de nocicepção são os canais de receptores de potencial transitório, ou *Transient Receptor Potential* (TRP), que conferem sensibilidade ao calor, dentre outros estímulos. Outro exemplo são os Canais de Íon de Detecção Ácida ou *Acid Sensing Ion Channels* (ASICs), que detectam a acidificação do meio (MCENTIRE et al., 2016).

Os ASICs são amplamente expressos nos gânglios da raiz dorsal e amplamente distribuídos por todo o cérebro no SNC, onde participam da transmissão e modulação dos sinais de dor no nível da medula espinhal. Estes canais são membros de uma família de canais próticos/Na⁺ epiteliais (DEG/ENaC) e são particularmente sensíveis a acidificação do meio, podendo ser ativados por pequenas mudanças de pH (DOROFEEVA et al., 2008; LYNAGH et al., 2018; SHAIKH; TAJKHORSHID, 2008; WALDMANN; LAZDUNSKI, 1998). Isso quer dizer, que no caso dos ASICs, o evento agonista, ou seja, que estimula esses canais, é a protonação do meio. A acidificação do meio extracelular ocorre em diferentes condições patológicas, como isquemia e convulsões (DOROFEEVA et al., 2008).

Esse processo pode ser antagonizado, por exemplo, pela utilização de alguns fármacos que são utilizados para cessar o estímulo, e com isso a dor. Alguns exemplos de fármacos antagonistas comerciais que podem agir nos ASICs são o ibuprofeno, o flurbiprofeno, o ácido salicílico (AS), o ácido acetil salicílico (AAS) e o diclofenaco (DEVAL et al., 2010; VOILLEY et al., 2001).

Vários medicamentos podem ser utilizados, nessa ou em outras vias do sistema nociceptivo, para o tratamento clínico, auxiliando no cessar da dor. A prevenção e o tratamento da dor têm se tornado um importante tópico de saúde, pois muitas pessoas são afetadas e, consequências físicas e emocionais podem ser geradas. Aproximadamente de 20 a 30% da população mundial apresenta algum tipo de dor. A dor crônica na população com 30 anos ou mais é apresentada por 50 a 75% das pessoas, dependendo da faixa etária específica (BAMPS et al., 2021; FIALHO et al., 2017; WALKER et al., 2017; XU, Longsheng et al., 2019).

Para o tratamento da dor, os fármacos indicados são, principalmente, analgésicos opióides, anti-inflamatórios não esteroidais, anticonvulsivantes, antidepressivos e anestésicos locais. Infelizmente, os fármacos disponíveis comercialmente podem causar efeitos adversos como vício, tolerabilidade e efeitos colaterais de longo prazo. Além disso, muitos pacientes ainda continuam com sintomas dolorosos não controlados por estes fármacos (XU, Longsheng et al., 2019). Por este motivo, a indústria farmacêutica necessita do desenvolvimento constante de novos medicamentos com reações adversas leves e com fortes efeitos analgésicos (WALKER et al., 2017; XU, Longsheng et al., 2019).

Para o desenvolvimento de novos fármacos, vários métodos são utilizados nos testes. Quando possível, um dos testes utilizados para seleção de fármacos são os testes *in vitro*, que consistem basicamente na utilização de frações subcelulares, células primárias, linhagens celulares ou fatias de tecido em placas de vidro. Essas células são expostas a concentrações variadas de substâncias químicas e as alterações moleculares e celulares são avaliadas para obter estimativas de dosagem e toxicidade dos fármacos (GROOTHUIS et al., 2015).

De acordo com Subramanian e colaboradores (2021), os modelos *in vitro* não imitam com precisão a fisiopatologia de um ambiente clínico ou *in vivo*, além de possuírem baixa sensibilidade (SUBRAMANIAM et al., 2021). Devido a isso, ainda se faz necessária a utilização dos testes *in vivo* (GROOTHUIS et al., 2015).

Os testes *in vivo* são utilizados na maioria das pesquisas que têm por objetivo desenvolver novos fármacos antinociceptivos. Esses testes são conduzidos em animais, como ratos (*Rattus norvegicus*), camundongos (*Mus musculus*), primatas não humanos, e humanos. O grande problema da sua utilização está relacionado à submissão dos animais à dor, que pode ser dor abdominal induzida por via oral, queimadura por chapa metálica quente ou a incisão na pele da fáscia, por exemplo (TRACEY, 2017). Outras barreiras são as altas taxas por instalações e necessidade profissionais especializados para os cuidados com os animais, bem como regras e regulamentos rígidos para a obtenção e utilização desses animais em pesquisa (SHERWIN, 2007).

Embora, no momento, seja impossível testar fármacos antinociceptivos completamente sem usar animais, a utilização de testes prévios poderia melhorar esse cenário. Testes de triagem poderiam acelerar a etapa de seleção dos candidatos, diminuindo o número de fármacos candidatos a serem empregados nos testes com utilização de animais, o que, por consequência, diminuiria o número de testes em animais (KILKENNY et al., 2009; TRACEY, 2017). Sendo assim, os testes de triagem poderiam diminuir o tempo total de desenvolvimento de um novo fármaco e os custos associados a esses processos.

Nesse sentido, sistemas bioinspirados têm sido desenvolvidos para diferentes aplicações em bioquímica ou análise clínica. A detecção de diferentes moléculas ou eventos químicos pode ser utilizada para criar sistemas químicos biosensoriais, auxiliando no desenvolvimento de novos testes *in vitro* que podem ser utilizados para avaliação prévia de novos candidatos a fármacos. Uma contribuição adicional desses sistemas é a criação de testes seguros que poderiam ajudar no desenvolvimento de novos fármacos, capazes de interferir no curso da dor com grande efetividade e poucos efeitos adversos (LÖFFLER; LIBBERTON; RICHTER-DAHLFORS, 2015).

Materiais comumente utilizados para sistemas bioinspirados são os polímeros e copolímeros, devido a sua capacidade responsiva. Os polímeros podem ser responsivos à luz, temperatura e pH, por exemplo (JOCHUM; THEATO, 2013; KOCAK; TUNCER; BÜTÜN, 2017; LAVANYA et al., 2020). Além disso, os copolímeros quando possuem cadeias organizadas em blocos podem formar agregados micelares, tornando seu interior disponível para encapsular moléculas e assim, serem atrativos para uma gama de aplicações (KOCAK; TUNCER; BÜTÜN, 2017; LINDMAN; ALEXANDRIDIS, 2000; PALAO-SUAY et al., 2016; TORCHILIN, 2005; YANG et al., 2020).

Até o momento, nenhum sistema bioinspirado para triagem de fármacos baseado nos caminhos de nocicepção foi desenvolvido. Por se tratar de um sistema sensorial bastante complexo, a melhor estratégia foi desenvolver sistemas bioinspirados em partes do sistema nociceptivo, por exemplo a via relacionada aos canais ASICs, importantes detectores de estímulos e envolvidos na sinalização de algumas desordens importantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema bioinspirado em canais ASICs. Para tal, estudou-se a utilização de micelas copoliméricas responsivas ao pH, para a encapsulação de algumas moléculas orgânicas conjugadas, das quais sua liberação foi acompanhada através de modificação no padrão de absorbância na região do UV-Vis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral deste projeto, alguns objetivos específicos foram traçados:

- Investigar a preparação de micelas a partir do copolímero poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) (PS-*b*-PAA) que contém grupos sensíveis à mudança de pH para mimetizar os canais ASICs;
- Analisar o tamanho hidrodinâmico das micelas por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e a carga superficial por Espalhamento de Luz Eletroforético (ELS) a fim de avaliar a estabilidade das micelas;
- Estudar o encapsulamento, nas dispersões micelares, de alguns compostos orgânicos conjugados, que sejam capazes de gerar uma resposta analítica apropriada quando submetidos a análises em espectrofotômetro na região do UV-Vis;
- Investigar e otimizar a utilização de enzimas no sistema micelar para hidrólise quando o butirato de *p*-nitrofenila for a molécula encapsulada. Dessa forma, ao ser liberado o éster pode ser transformado em seu fenol, correspondente facilitando a análise de liberação;
- Analisar o sinal gerado por espectrofotometria de UV-Vis com o intuito de identificar e mensurar a liberação das moléculas encapsuladas em diferentes pHs e, na presença e ausência do fármaco ibuprofeno;
- Avaliar e otimizar a aplicação do sistema desenvolvido como sistema bioinspirado nos canais ASICs da resposta nociceptiva através de comparação entre os diversos testes e controles;
- Correlacionar os resultados com estudos sobre os mecanismos envolvidos na via de resposta dos canais ASICs.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SISTEMA NOCICEPTIVO

O sistema de nocicepção é um sistema sensorial cujo mecanismo permite que animais sintam e evitem estímulos potencialmente danosos ao organismo, sendo crucial para a sobrevivência. O processo ocorre através de nociceptores, que são neurônios especializados em detectar esses estímulos potencialmente danosos. Eles podem ser ativados por calor ou frio intensos, estímulos de ordem mecânica e uma variedade de estímulos químicos. Os nociceptores cumprem esse papel devido à presença de vários tipos de receptores ou canais presentes em sua superfície. Os axônios também presentes nos nociceptores estão conectados por uma rede neural à espinha dorsal, que transmite ao cérebro os impulsos. É no cérebro que a percepção de dor ocorre (JULIUS; BASBAUM, 2001; MCENTIRE et al., 2016; TRACEY, 2017).

O processo total ocorre em três etapas - transdução, transmissão e modulação. A transdução ocorre nas terminações livres dos nociceptores e possibilita a comunicação das informações com o sistema nervoso central. O segundo estágio ocorre quando há a comunicação de sinais elétricos dos nociceptores, passando as informações através das células da medula espinhal aos centros cerebrais superiores. Por último, a modulação é o estágio de conversão dos eventos elétricos nos neurônios à eventos químicos nas sinapses (COHEN, Mitchell J.; JANGRO; NEFF, 2018; YAM et al., 2018).

Dentre os canais presentes nos nociceptores os Canais de Íon de Detecção Ácida ou *Acid Sensing Ion Channels* (ASICs) detectam condições relacionadas a mudanças no pH, como atividade neuronal, isquemia e inflamação sendo cruciais para a resposta nociceptiva (VULLO et al., 2017).

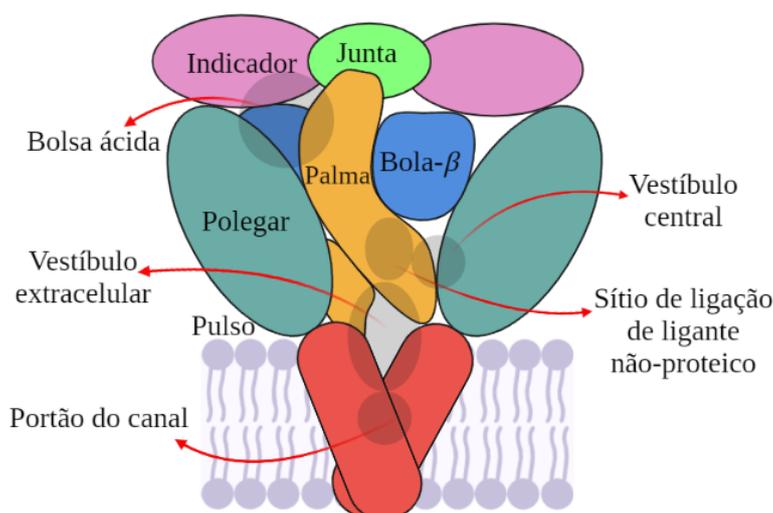
3.1.1 Canais de Íon de Detecção Ácida ou *Acid Sensing Ion Channels* (ASICs)

Os ASICs são membros de uma família de canais próticos/ Na^+ epiteliais (KUDUK et al., 2009). Eles são particularmente sensíveis a acidificação do meio e, alguns membros, são capazes de serem ativados com alterações pequeníssimas (escala de pH 0,2) gerando e mantendo uma corrente despolarizada compatível com a detecção de dor não adaptativa (modificações a nível espinhal e supraespinhal) (DEVAL et al., 2010; SHAIKH; TAJKHORSHID, 2008).

Os canais ASICs são conhecidos por seis isoformas: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 e ASIC4, sendo os mais sensíveis à diferença de pH os ASIC1 e ASIC3. Estes são capazes de serem ativados devido à acidificação muito pequena, por exemplo, alteração do pH fisiológico de 7,4 para 7,2 (DOROFEEVA et al., 2008; LYNAGH et al., 2018; SHAIKH; TAJKHORSHID, 2008; WALDMANN; LAZDUNSKI, 1998).

A estrutura dos ASICs possui três subunidades homólogas. Essas subunidades, que podem ser observadas na Figura 1, possuem o formato similar ao de uma mão segurando uma bola pequena e, por isso, os domínios foram nomeados fazendo referência a isso. O domínio da palma forma a parte interna do canal ao longo do eixo central. O polegar e o dedo apontam para o exterior do canal e fecham, juntos com a bola- β , o sítio ácido, uma região que possui muitos resíduos ácidos. Apesar do sítio ácido ter sido inicialmente relacionado à ativação através do pH, resíduos responsivos ao pH também foram identificados fora desse sítio. Mesmo não sendo o único sítio sensível ao pH, o sítio ácido é importante, pois é o sítio específico de ligação de várias toxinas (VULLO et al., 2017). Após a acidificação do meio extracelular, estes resíduos ácidos são protonados, o que ocasiona a ativação dos canais ASICs. Após a detecção da acidificação extracelular, os canais ASICs transitam para um estado funcional não-condutor, conhecido como dessensibilizado (VULLO et al., 2017).

Figura 1. Ilustração esquemática baseada na estrutura do ASIC1a de frangos, de acordo com o modelo de uma mão segurando uma bola.



Fonte: Adaptado de Baron e Lingueglia (2015).

Uma série de simulações moleculares dinâmicas para o ASIC1 em diferentes estágios de protonação foram realizadas. A partir de todos os estudos, foi proposto que, pelo menos seis

pares de resíduos são importantes para a detecção de mudanças no pH. Os seis pares são D238:D350 (ácido aspártico nas posições 238 e 350 da sequência de aminoácidos) e E239:D346 (ácido glutâmico na posição 239 e ácido aspártico na posição 346), ambos no sítio ácido; E80:E417 (na parte interna); E299:D332, E339:E343 e D290:E363 (superfície da proteína) (DEVAL et al., 2010; KUDUK et al., 2009; SHAIKH; TAJKHORSHID, 2008).

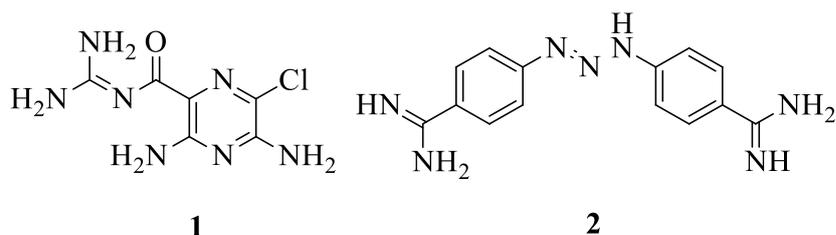
Além disso, a estrutura cristalina do ASIC1 em frangos demonstrou que cada subunidade do homotrímero é composta por terminais amino e pares de carboxila-carboxilato. Esses grupos e as interações carboxila-carboxilato estão envolvidos na detecção do pH e na ativação dos canais ASIC1 (JASTI et al., 2007). Portanto, os grupos químicos citados e presentes nos canais ASICs são ativados, através da protonação causada pela diminuição do pH. Essa diminuição de pH é causada por algum estímulo nocivo, e é o agonista dessa via (DEVAL et al., 2010; KUDUK et al., 2009; SHAIKH; TAJKHORSHID, 2008; VOILLEY et al., 2001).

3.1.2 Farmacologia relacionada aos canais ASICs

Os canais ASICs estão envolvidos em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, como nocicepção e dor. Por isso, a farmacologia dos canais ASIC é diversa e tem despertado muito interesse nos últimos anos. Dentre os muitos estudos relacionados, estão aqueles com o objetivo de testar fármacos conhecidos ou desenvolver novos fármacos antagonistas dessa via (BARON; LINGUEGLIA, 2015). Um fármaco antagonista tem a função de cessar o aumento de expressão para todos os ASICs, como fazem alguns fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (VOILLEY et al., 2001; VULLO; KELLENBERGER, 2020).

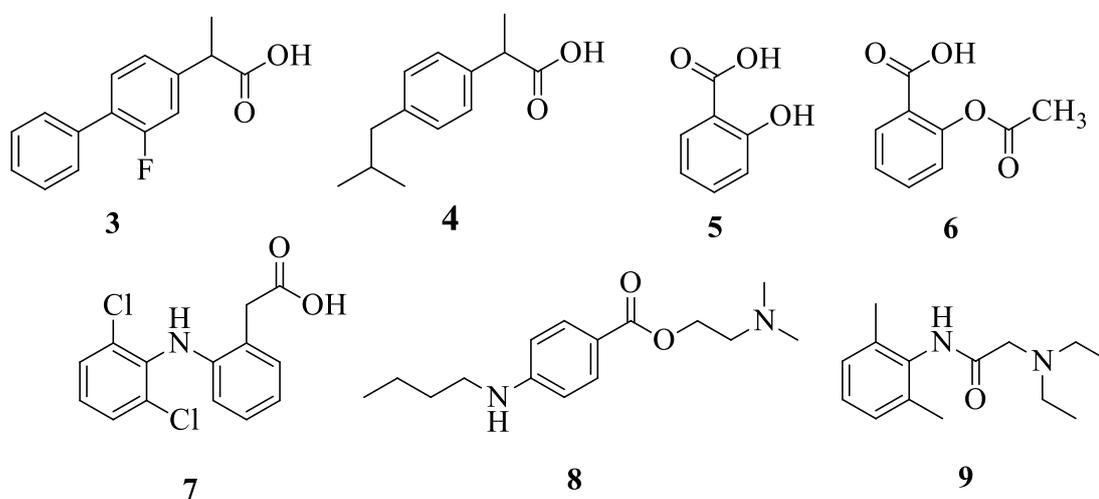
Alguns fármacos antagonistas dos ASICs e já estudados contam com grupamentos amina, guanidina ou até mesmo resíduos de arginina, os quais possuem afinidade com grupos ácidos. Estas características estão presentes em moléculas como a amilorida (1), o diminazeno (2) (Figura 2) e algumas toxinas animais que são ricas em resíduos básicos, os quais podem estabelecer ligações com os resíduos envolvidos na ativação dos canais dependentes de H^+ . A amilorida tem sido usada como inibidor de ASICs em estudos experimentais em humanos. No entanto, está longe de ser um inibidor ideal devido às concentrações micromolares necessárias, nas quais também inibe a atividade de outros canais e vários transportadores. O diminazeno, um fármaco antiprotozoário, mostrou inibir os ASICs em concentrações micromolares, agindo como um bloqueador de poro (KELLENBERGER; SCHILD, 2015; VULLO; KELLENBERGER, 2020).

Figura 2. Fórmulas estruturais dos compostos amilorida (1) e diminazeno (2).



Além dos fármacos citados, há relatos de que vários antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) inibem as correntes geradas nos ASICs com valores de IC_{50} em concentrações μM . Além de sua conhecida habilidade de inibir a ciclooxigenase, esses fármacos também inibem diretamente a atividade das isoformas ASIC1a e ASIC3. A aspirina, o diclofenaco e o ibuprofeno mostraram prevenir a regulação positiva induzida por inflamação do mRNA de ASIC em neurônios sensoriais em doses terapêuticas (BARON; LINGUEGLIA, 2015; KELLENBERGER; SCHILD, 2015; VULLO; KELLENBERGER, 2020). Dentre os AINEs mais conhecidos, o flurbiprofeno (3) e ibuprofeno (4) inibem o canal ASIC1a com valores de $IC_{50} \sim 350 \mu M$ e a corrente sustentada de ASIC3 é bloqueada pelo AS (5), AAS (6) e diclofenaco (7) em IC_{50} , 90-260 μM (Figura 3). A corrente gerada nos ASICs é também inibida pelos anestésicos locais tetracaína (8) e lidocaína (9) com valores de IC_{50} de 10 mM e 12 mM, respectivamente. Enquanto a tetracaína (8) age nas isoformas ASIC3 e ASIC1b, a lidocaína (9) age na isoforma ASIC1a (BARON; LINGUEGLIA, 2015).

Figura 3. Fórmulas estruturais dos compostos (3) flurbiprofeno, (4) ibuprofeno, (5) AS, (6) AAS, (7) diclofenaco, (8) tetracaína e (9) lidocaína.



Fonte: Autoria própria

Pode-se encontrar antagonistas que agem de diferentes formas na inibição, como os antagonistas parciais, no qual a molécula se liga a poucos receptores, porém outros receptores não tão específicos ficam livres, não anulando parcialmente a afinidade do agonista, como é o caso da amilorida (1) e do diminazeno (2). Outro exemplo são os antagonistas alostéricos, como o ibuprofeno, que ao se ligarem em um local (não sendo o sítio ativo), provocam uma mudança conformacional que diminui a afinidade do receptor do agonista (ALEXANDER et al., 2021; LYNAGH et al., 2017).

O desenvolvimento da farmacologia dos ASICs se tornou um desafio chave para estudar sua estrutura, sua função molecular e celular e seu papel fisiopatológico (BARON; LINGUEGLIA, 2015). Segundo o guia conciso de farmacologia 2021/22, publicado na *British Journal of Pharmacology*, em geral, moléculas pequenas conhecidas como inibidores dos ASICs são não seletivas, enquanto algumas toxinas podem ter maior seletividade e potência. Vários fármacos utilizados clinicamente são conhecidos por inibir os ASICs, mesmo que, geralmente, sejam mais potentes em outros alvos (ALEXANDER et al., 2021) e, a farmacologia dos ASICs é limitada a algumas drogas não seletivas (DIOCHOT et al., 2007). Sendo assim, o desenvolvimento de sistemas bioinspirados que possam agilizar a triagem de candidatos a fármacos inibidores dessa via podem contribuir muito com a celeridade dos estudos. Isso seria possível, se esses sistemas fossem utilizados como testes prévios para selecionar alguns candidatos a serem empregados nos testes subsequentes.

3.2 SISTEMAS BIOINSPIRADOS

A bioinspiração preocupa-se em compreender os princípios que fundamentam os processos naturais e, em seguida, aplicar esses princípios em ambientes não biológicos. Enquanto a biomimética envolve formalmente uma replicação direta de processos ou técnicas que são empregados pela natureza, a bioinspiração envolve um “desenho de ideias” mais indireto da natureza (SWIEGERS, 2012).

A bioinspiração pode ser utilizada em diversas áreas, como a arquitetura. Um exemplo é a catedral em Exeter no Reino Unido, bioinspirada nas costelas e espaços intercostais do corpo humano, possui abóbadas com vigas fortes, reduzindo o peso do teto (BHUSHAN, 2019).

Além da arquitetura, compreender a natureza e seus mecanismos pode conduzir pesquisas e projetos com o intuito de produzir materiais, dispositivos e processos (BHUSHAN, 2019). Utilizar a natureza para inspiração em materiais e processos e, aplicar a ideia em designs e funcionamentos pode ser uma alternativa eficaz para a resolução de problemas em várias

áreas, como na indústria de alimentos, na purificação de águas, na saúde pública e na obtenção de energia limpa. No entanto, as características vitais para a funcionalidade dessas estruturas naturais distintas e complexas, oferecem combinações de propriedades físico-químicas e mecânicas difíceis de alcançar com rotas tradicionais de síntese de materiais (CHU et al., 2018; WEGST et al., 2015).

Nos últimos anos, o campo da ciência de materiais progrediu no desenvolvimento de materiais biocompatíveis que são capazes de imitar aspectos das complexas características do microambiente celular *in situ* (CEMBRAN et al., 2020). Alguns desses materiais podem ser produzidos, por exemplo, através do reconhecimento molecular e da autoassociação (NAIK; SINGAMANENI, 2017). Apesar disso, alguns materiais e suas propriedades ainda representam um desafio para mimetização, como o osso, que têm capacidade de cicatrização, autorreparação e adaptação às mudanças nos padrões de uso mecânico (WEGST et al., 2015).

Dentre os materiais com potencial para aplicações em sistemas bioinspirados, os materiais poliméricos responsivos têm atraído grande atenção, principalmente por serem capazes de formar vários arranjos, como micelas (KALHAPURE; RENUKUNTLA, 2018a).

3.3 SISTEMAS RESPONSIVOS POLIMÉRICOS

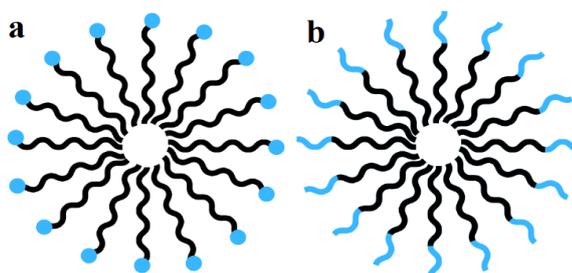
A classe dos materiais responsivos à variação de estímulos externos, como pH, temperatura, umidade, campos elétricos ou magnéticos, luz ou compostos químicos, pode gerar um comportamento macroscópico diferenciável e notável. A resposta a um estímulo é um dos processos mais básicos encontrados nos sistemas vivos e pode ser aplicada em dispositivos inteligentes (CLEGG et al., 2019; GUO et al., 2020; STUART et al., 2010). Dependendo do estímulo responsivo, o material pode atrair interesse na medicina, na farmacologia e demais áreas (CHU et al., 2018). Muitos sistemas responsivos ao pH, por exemplo, utilizam micelas poliméricas em sua construção.

As micelas poliméricas fazem parte das formas de agregação de um copolímero, por exemplo. Um copolímero consiste em uma cadeia polimérica que contém diferentes meros (CANEVAROLO JR., 2002). Os copolímeros podem ser classificados de diferentes maneiras, de acordo com a disposição dos meros, sendo que na forma em bloco podem possuir uma parte da cadeia hidrofílica e outra hidrofóbica, apresentando propriedades anfífilas (LINDMAN; ALEXANDRIDIS, 2000).

A seletividade do solvente é importante para a autoassociação na forma micelar, visto que um solvente “ruim” para um bloco e “bom” para o outro, influencia na forma de agregação,

bem como na interação entre os blocos. Neste caso, quando a concentração atinge um determinado valor, denominada Concentração Micelar Crítica (CMC), que é distinta para cada copolímero, o sistema tende a se organizar de maneira a diminuir sua energia livre (LINDMAN; ALEXANDRIDIS, 2000; PALAO-SUAY et al., 2016; TORCHILIN, 2005). As micelas (Figura 4) ocorrem em formas esféricas, cilíndricas ou elipsoidais e, quando em meio aquoso, possuem suas partes hidrofílicas constituintes na parte externa da micela, com as cadeias hidrofóbicas empacotadas no interior. Esse arranjo pode ser invertido em meio orgânico (DILLT; FLORY, 1981).

Figura 4. Modelo de um agregado micelar de (a) surfactantes e (b) copolímero, onde as partes pretas representam a cadeia hidrofóbica e as partes azuis a cadeia hidrofílica, em um meio aquoso.



Fonte: Autoria própria

As cadeias poliméricas que formam as micelas podem possuir grupos que são hidrolisáveis, que podem ser protonados ou mesmo desprotonados, gerando um material responsivo ao pH. As micelas poliméricas com cadeias sensíveis ao pH podem ser estáveis em ambiente neutro devido à estrutura núcleo-casca formada em solução aquosa. Quando possuem grupos que podem ser protonados em ambiente ácido, a estrutura das micelas pode ser desestabilizada causando liberação de fármacos carregados (KOCAK; TUNCER; BÜTÜN, 2017; YANG et al., 2020).

A estratégia de utilização de sistemas responsivos ao pH vêm sendo estudada devido à sua possível aplicação no corpo humano, por exemplo. Logo, o uso desses sistemas torna-se propício em microambientes extracelulares dos tumores (pH = 5,7–7,8), compartimentos endossomais (pH = 5,5–6,0) e lisossomais (pH = 4,5–5,0), que são mais ácidos do que sangue e tecido normal (PANG et al., 2016; ZHENG et al., 2013). Desta forma, muitos estudos que envolvem sistemas responsivos ao pH podem ser aplicados para entrega e liberação de fármacos (MANCHUN; DASS; SRIAMORNSAK, 2012; PANG et al., 2016; SONAWANE; KALHAPURE; GOVENDER, 2017; YAN et al., 2020; ZHAO et al., 2020).

Materiais poliméricos, na forma de hidrogéis e nanopartículas já foram relatados com comportamento estímulo-responsivo ao pH e à temperatura (AKIMOTO; NAKAYAMA; OKANO, 2014; DANILOVTSEVA et al., 2015; FU et al., 2018; GANDHI et al., 2015; HE et al., 2016; KALHAPURE; RENUKUNTALA, 2018b; LAVANYA et al., 2020; YANG et al., 2020). Trabalhos aplicando hidrogéis de quitosana, pH e termo-responsivos, como o de Lavanya e colaboradores (2020), por exemplo, podem ser utilizados na engenharia de tecidos ósseos. Outro exemplo, foi publicado por Kalhapure e Renukuntla (2018) que aplicaram micelas e nanopartículas poliméricas pH- e termo-responsivas para transporte e liberação de fármaco.

Wang, Ma e Yu (2017) sintetizaram o copolímero poli(2-(metacrilóiloxi)etilcolina fosfato)-b-poli(2(diisopropilamino)etil metacrilato (PMCP-b-PDPA) por polimerização radicalar por transferência de átomo. O copolímero foi desenvolvido com o objetivo de formar vesículas para encapsulamento de doxorubicina. A eficiência de encapsulamento foi calculada, sendo aproximadamente 32%. Os testes em diferentes pHs mostraram que o copolímero era pH-responsivo, sendo que a vesícula permaneceu estável em pH corporal (7,4) e a liberação da droga ocorreu em pH 5. Além disso, o estudo se mostrou promissor para aplicação em células tumorais, visto que o estudo de citotoxicidade *in vitro* mostrou efeito inibitório significativo (WANG; MA; YU, 2017).

Hu e colaboradores (2019) projetaram e sintetizaram o copolímero em bloco poli(metil metacrilato-co-ácido metacrílico)-b-poli(2-amino-etil metacrilato), para formação de micelas catiônicas responsivas ao pH para encapsular insulina. A liberação da insulina se mostrou dependente do pH, tendo maior liberação no fluido intestinal. O estudo se mostrou promissor para a utilização de micelas copoliméricas responsivas ao pH para entrega de insulina administrada via oral (HU et al., 2019).

O trabalho de Eichhorn e colaboradores (2021) apresentou a correlação da abordagem experimental e teórica da estrutura interna de micelas sensíveis ao pH de um sistema construído com bloco de poliestireno (PS) hidrofóbico e de poli (ácido acrílico) (PAA) hidrofílico com (2-(4-(4'-metil-2,2'-bipiridil) etil acrilato)). O copolímero foi sintetizado por polimerização mediada por nitróxido e possui uma fração definida de locais de ancoragem para a formação de complexos metálico. O uso de dinâmica molecular combinada (MD) e simulações de Monte Carlo (MC) para modelar tais micelas elucidou um copolímero responsivo ao pH, confirmado também pelas análises de DLS, as quais apresentaram dependência de tamanho de acordo com o pH. O ajuste do pH realizado pelos pesquisadores também permitiu alternar a coroa micelar entre o comportamento de polieletrólito e polianfolito (EICHHORN et al., 2021).

Outros estudos envolvendo copolímeros e sua natureza de autoassociação combinados aos grupos responsivos ao pH, foram publicados constituindo-se em uma área promissora de estudos (XU, Zhigang et al., 2017; YAN et al., 2020; ZHANG et al., 2018). Desta forma, os sistemas responsivos utilizando polímeros e copolímeros, bem como a implementação de sistemas bioinspirados possuem uma ampla gama de propriedades. Estes materiais podem expressar grande importância em várias áreas, podendo fornecer características e aplicações diversas (LEE, 2008; TORCHILIN, 2005; TUZAR, 1996).

3.4 ENZIMAS E APLICAÇÕES

As enzimas possuem especificidade, reatividade e propriedades físico-químicas, catalíticas e biológicas diversificadas, podendo catalisar reações orgânicas com boa seletividade e em condições brandas de temperatura, pH e pressão. Estas características são atrativas para as mais diversas aplicações, mesmo em escala industrial (BURK, 2003; DEVINE et al., 2018; JAEGER, 2004; MOLDOVAN et al., 2004; SHELDON; BRADY, 2018; XU, Feng, 2005). Atualmente, as enzimas são sistematicamente utilizadas e desenvolvidas como biocatalisadores economicamente viáveis, acompanhando o desenvolvimento e a expansão da biotecnologia moderna. O número de processos em que biocatalisadores estão envolvidos está constantemente crescendo. Agregado a este aumento na implementação, observa-se também o aumento do número de biocatalisadores disponíveis no mercado (BURK, 2003; DEVINE et al., 2018; MEYER et al., 2013; OZYILMAZ; CETINGUNEY; YILMAZ, 2019; SHELDON; BRADY, 2018; TORRES PAZMIÑO et al., 2007; XU, Feng, 2005; YI et al., 2017).

Dentre os biocatalisadores, as lipases, pertencentes à classe das hidrolases, são as enzimas mais utilizadas em síntese orgânica. A razão para a sua grande utilização está relacionada com sua alta estabilidade, ao fato de não necessitarem de cofatores para serem ativas e ao fato de estarem disponíveis comercialmente em grande número (KAPOOR; GUPTA, 2012). Estas enzimas podem ser encontradas comercialmente até mesmo imobilizadas, o que facilita a sua utilização.

As lipases, e outras triacilglicerol éster hidrolases, atuam na interface orgânico-aquosa catalisando a hidrólise de triacilgliceróis, principais componentes de óleos e gorduras, com a liberação de ácidos graxos, diacilgliceróis e glicerol (BEISSON; RIVIÈRE, 2000; CAVALCANTE et al., 2021; OLIVEIRA CARVALHO et al., 2003). Além dos triacilgliceróis, outras moléculas como ésteres, amidas e álcoois também são substratos para estas enzimas, que podem promover a catálise de reações de esterificação, transesterificação, aminólise e

lactonização, por exemplo (MARTINS; KALIL; COSTA, 2008; OLIVEIRA CARVALHO et al., 2003; PAQUES; MACEDO, 2006; SUN; XU; WANG, 2009) Para a maioria das lipases, o seu centro catalítico hidrofóbico é coberto por uma “tampa”. Em ambientes ricos em água, esta “tampa” permanece, na maioria do tempo, fechada. A abertura dessa “tampa” ocorre na presença de uma interface hidrofóbica/hidrofílica. O mecanismo exato para a abertura da tampa depende do tipo de lipase empregada (BAYRAMOGLU et al., 2022; LINDHOUD; NORDE; STUART, 2010; RODRIGUES et al., 2019).

Por serem muito versáteis, as lipases não são empregadas somente em pesquisas relacionadas à síntese orgânica, mas em diversos setores da indústria, como na formulação de detergentes, na produção de fármacos, de cosméticos, de alimentos, de aromas e fragrâncias e de biosurfactantes (PANDEY et al., 1999; PAULA; BARBOZA; CASTRO, 2005).

Para aumentar ainda mais utilidade, estabilidade e atividade das lipases, elas já foram relatadas sendo utilizadas em sistemas micelares dos mais diversos tipos. A grande maioria dos trabalhos envolvendo sistemas micelares e lipases tem por objetivo o encapsulamento das lipases. Muitas vezes o encapsulamento ocorre através da formação de micelas reversas, ou seja, micelas contendo a parte hidrofóbica na parte externa. Essas micelas são espontaneamente formadas quando surfactantes são colocados em meio não polar e, aprisionam pequenas quantidades de água em seu interior criando, para as enzimas, um ambiente aquoso em meio não aquoso. Dessa forma, as enzimas podem ser encapsuladas em seu interior e ativadas interfacialmente, na interface óleo-água. As enzimas tendem a se localizar na interface esférica com o seu sítio ativo orientado para a fase hidrofóbica, devido a uma grande região hidrofóbica associada. As enzimas ficam, então, imobilizadas formando uma partícula autoorganizada. Esta estratégia é utilizada para enzimas hidrofílicas serem utilizadas em reações no meio orgânico, evitando sua desnaturação e melhorando sua eficiência de recuperação e reutilização (CARVALHO; CABRAL, 2000; OZYILMAZ; CETINGUNEY; YILMAZ, 2019; YI et al., 2017).

Outra área de estudos que relaciona sistemas micelares e lipases é a que utiliza micelas responsivas para a entrega controlada de fármacos. Essas pesquisas ocorrem principalmente para o estudo de tratamento antibacteriano, visando melhorar o cenário que apresenta resistência bacteriana a antibióticos. As bactérias estão protegidas por um biofilme composto por uma substância polimérica extracelular que é produzida pelas próprias bactérias. Esse biofilme impede, muitas vezes, a penetração efetiva dos antibióticos e, nesse caso, tratamentos padrão com antibióticos acabam falhando em erradicar esse biofilme (SU et al., 2018).

Nesse sentido, micelas poliméricas são estudadas e desenvolvidas para carrear os antibióticos melhorando a penetração e a biodistribuição dos fármacos. Já é sabido que, em caso de infecções, a adesão bacteriana resulta no aumento de enzimas específicas no local de infecção. Essas enzimas são proteases, lipases e β -lactamases, por exemplo. Sendo assim, lipases são utilizadas para estudar e otimizar os sistemas micelares produzidos para a entrega efetiva de antibióticos no sítio de infecção. As micelas, nesses casos, são formadas por polímeros (poliésteres) que são substratos das lipases, sendo degradadas na presença das lipases e do correto pH (CHEN et al., 2018; SIKDER et al., 2021). Dessa forma, é possível estudar os sistemas micelares de entrega de antibióticos *in vitro* e melhorá-los antes dos testes *in vivo*.

Com todos os detalhes relatados sobre as lipases percebe-se que elas são enzimas com alta versatilidade e aplicabilidade sendo candidatas perfeitas para serem empregadas em sistemas micelares bioinspirados.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

O copolímero em bloco de poliestireno-b-poli(ácido acrílico) (PS-b-PAA) foi adquirido da empresa Polymer Source® cuja massa molar numérica de PS é de $13.000 \text{ g.mol}^{-1}$ e PAA de 1.200 g.mol^{-1} . A cumarina (MM= $146,14 \text{ g.mol}^{-1}$), a fenolftaleína (MM= $318,32 \text{ g.mol}^{-1}$), a curcumina (MM= $368,38 \text{ g.mol}^{-1}$), o butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NFB) (MM= $209,20 \text{ g.mol}^{-1}$), o Ácido Ascórbico (AA) (MM= $173,12 \text{ g.mol}^{-1}$), o 2,2'-bipiridil (BPY) (MM= $156,19 \text{ g.mol}^{-1}$), o Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), o cloreto de ferro III (FeCl_3), bem como o ácido cítrico monohidratado (MM= $210,14 \text{ g.mol}^{-1}$), o citrato de sódio tribásico dihidratado (MM= $294,10 \text{ g.mol}^{-1}$), o fosfato de sódio monohidratado (MM= $119,98 \text{ g.mol}^{-1}$) e o fosfato de sódio dibásico (MM= $146,96 \text{ g.mol}^{-1}$) foram obtidos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich® e utilizados sem prévia purificação. O dodecanoato de sódio (SDod) foi sintetizado em laboratório com base na síntese realizada por Eising e coautores (2008), a partir do ácido dodecanóico. O ácido salicílico (AS) (Dinâmica®) foi obtido comercialmente sem purificação prévia enquanto que o ácido acetilsalicílico (AAS) foi preparado em laboratório, baseado na metodologia de Majedi, Davar e Abbasi (2014).

O ácido (2RS)-2-[4-(2- metilpropil)fenil]propanóico, fármaco presente no ibuprofeno e o ácido 2-[2-(2,6-dichloroanilino)fenil] acético, fármaco presente no diclofenaco, foram obtidos comercialmente (Ibupril® 600 mg Teuto e Diclofenaco Potássico 50 mg Medley®, respectivamente) e purificados em laboratório.

As enzimas testadas foram obtidas da Novozymes ou da Sigma-Aldrich.

Para o preparo e análise das micelas foi utilizado um agitador magnético IKA® C-MAG HS 4, um agitador orbitalar/incubadora SOLAB® Shaker SL-222 à 200 RPM, um condutivímetro e uma centrífuga 6400 RPM da marca Kasvi®, um evaporador rotativo New Lab® NL-85-01 e um espectrofotômetro UV-Vis Shimatzu® UV-Probe 2.5 na faixa de 800-200 nm.

Os espectros de RMN foram registados num espectrômetro Bruker Ultrashield que opera à frequência de 300 MHz (RMN de ^1H) e 75 MHz (RMN de ^{13}C). O DMSO- D_6 foi utilizado como solvente deuterado. Os dados são relatados da seguinte forma: deslocamento químico (δ), multiplicidade (s = singlete, d = dublete, t = tripleto, q = quarteto, m = multiplete) e constantes de acoplamento (J) em Hertz e intensidade integrada.

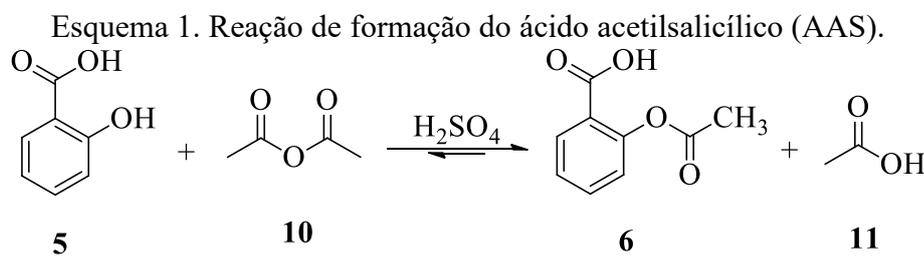
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Obtenção dos fármacos antagonistas

4.2.1.1 Síntese do Ácido Acetil Salicílico (AAS, 6)

Em um frasco, adicionou-se o AS (5) (3,0 g), anidrido acético (10) (5,0 mL) e ácido sulfúrico (5 gotas) (Esquema 1) (MAJEDI; DAVAR; ABBASI, 2014). Agitou-se a mistura a temperatura de 60 °C e em seguida resfriou-se a temperatura ambiente. Adicionou-se 50 mL de água deionizada gelada e aguardou-se a formação de cristais. Filtrou-se a solução a vácuo.

Procede-se à recristalização com etanol sob aquecimento e água gelada. Filtrou-se a vácuo novamente e secou-se os cristais obtidos em estufa a 40 °C por 12 h. Rendimento: 2,05g, 68%.



Fonte: Autoria própria

Ácido acetil salicílico (6): Sólido branco, 2,05 g isolado, rendimento de 68%.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-D₆) (Apêndice A, Figura 20): δ (ppm) = 2,25 (s, 3H), 7,20 (ddd, 1H, J₃ = 0,6 Hz, J₂ = 6,6 Hz, J₁ = 9 Hz), 7,35-7,40 (m, 1H), 7,61-7,66 (m, 1H), 7,93 (ddd, 1H, J₃ = 0,6 Hz, J₂ = 6,6 Hz, J₁ = 9 Hz). RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-D₆) (Apêndice A, Figura 21): δ (ppm) = 21,1, 124,0, 124,3, 126,3, 130,5, 134,0, 150,4, 165,9, 169,4.

4.2.1.2 Extração e purificação do Ibuprofeno (4)

Comprimidos contendo como princípio ativo o ibuprofeno (4) foram obtidos comercialmente e, a partir deles, realizou-se extração e purificação.

Em um almofariz, dois comprimidos de ibuprofeno (4) (1,2 g) foram macerados e diluídos em acetona (25,0 mL). Agitou-se a mistura em uma centrífuga e em seguida retirou-se o sobrenadante e este foi rotaevaporado sob vácuo à 60 °C.

Filtrou-se a vácuo novamente e secou-se o sólido obtido em dessecador por 48 h. Rendimento: 0,96g, 80%.

Ibuprofeno (4): Sólido branco, 0,96 g isolado, rendimento de 80%.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- D_6)(Apêndice A, Figura 22): δ (ppm) = 0,86 (d, 6H, J = 6,6 Hz), 1,35 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 1,74-1,87 (m, 1 H), 2,41 (d, 2H, J = 6,9 Hz, 3,63 (qua, 1H, J , 7,2 Hz), 7,1 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,2 (d, 2H, J = 8,1 Hz). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- D_6)(Apêndice A, Figura 23): δ (ppm) = 18,7, 22,3, 29,8, 44,4, 127,3, 129,1, 138,7, 139,7, 175,7.

4.2.1.3 Extração e purificação do Diclofenaco (7)

Comprimidos contendo como princípio ativo o diclofenaco (7) foram obtidos comercialmente e, a partir deles, realizou-se extração e purificação.

Em um almofariz, dez comprimidos de diclofenaco (7) (500,0 mg) foram macerados e diluídos em etanol (30,0 mL). Filtrou-se a mistura e em seguida o filtrado foi rotaevaporado sob vácuo à 65 °C.

Lavou-se o sólido duas vezes com acetona (10,0 mL). Filtrou-se novamente e secou-se o sólido obtido em dessecador por 48 h. Rendimento: 0,26g, 53%.

Diclofenaco (7): Sólido branco, 0,26 g isolado, rendimento de 53%.

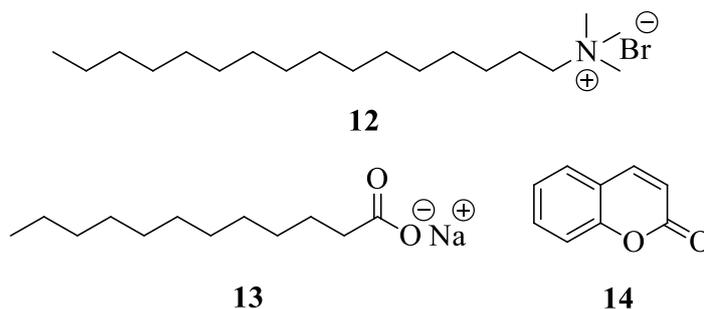
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- D_6)(Apêndice A, Figura 24): δ (ppm) = 3,36 (s, 2H), 6,22 (d,d, 1H, J_2 = 1,2 Hz, J_1 = 7,8 Hz), 6,7-6,75 (m, 1H), 6,89-6,94 (m, 1H), 7,03-7,08 (m, 2H), 7,44 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 10,37 (s, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- D_6)(Apêndice A, Figura 25): δ (ppm) = 45,0, 115,7, 119,6, 124,0, 126,3, 128,5, 129,5, 130,4, 138,2, 143,8, 174,7.

4.2.2 Preparação das dispersões micelares

4.2.2.1 Preparação das dispersões micelares de surfactantes

Foram preparadas dispersões de surfactantes utilizando CTAB (12), SDod (13) e CTAB/SDod (12 e 13) (Figura 5) em água deionizada na presença de 2×10^{-3} mol/L de cumarina (14) a temperatura ambiente de 25 °C.

Figura 5. Fórmulas estruturais dos surfactantes (12) CTAB, (13) SDod e do composto (14) cumarina.

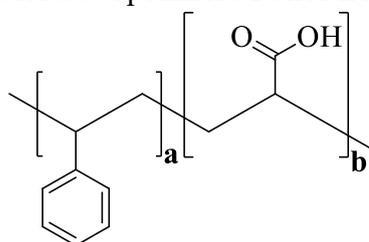


Fonte: Autoria própria

4.2.2.2 Preparação das dispersões micelares de copolímero PS-b-PAA

As micelas de PS-b-PAA (estrutura representada na Figura 6) foram preparadas conforme metodologia utilizada por Porto (2011) (PORTO, 2011).

Figura 6. Fórmula estrutural do copolímero Poliestireno-b-Poli(ácido acrílico).



15

Fonte: Autoria própria

Foram preparadas dispersões micelares, utilizando 5,0 mg do copolímero para cada dispersão e 5 diferentes moléculas para tentativa de encapsulamento: 2,2'-bipiridil (BPY), fenolftaleína, curcumina, cumarina e butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NFB).

As dispersões foram primeiramente diluídas em 250 μL do solvente tetrahydrofurano (THF), mantendo-as em um agitador magnético *overnight*. Em cada dispersão foram adicionados 2,0 mL de água deionizada gota a gota durante 4 h. As dispersões finais foram diluídas adicionando água até obter um volume final de 20 mL. A com BPY, foi mantida em diálise tampão citrato 0,1 mol.L⁻¹ em pH 5,0 contendo 0,1 mg de AA e 0,3 mg de FeCl₃ por 24 h. As dispersões contendo fenolftaleína, curcumina e cumarina foram submetidas à diálise em água deionizada e a dispersão contendo *p*-NFB, foi testada sem diálise prévia.

4.2.2.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

As medidas para a determinação do diâmetro hidrodinâmico (D_H) e potencial zeta (ζ) das micelas de PS-b-PAA foram realizadas em temperatura de 25,0°C, utilizando o equipamento Zetasizer ZS, da Malvern Instruments, equipado com um laser He-Ne e operação em comprimento de onda de 633,0 nm e com ângulo de detecção de 173°. As amostras foram colocadas numa cubeta adequada para análise.

4.2.3 Seleção das enzimas

As enzimas imobilizadas testadas foram: lipase (*Thermomyces lanuginosus*), lipase CalB, lipase PS-C Amano II, Lipozyme 435, Novozym 435 e lipase (*Pseudomonas fluorescens*).

4.2.3.1 Análise de região de absorção

Para essas medidas, foi utilizado 3 mg de cada enzima em 1,0 mL de tampão citrato 0,1 mol.L⁻¹ em pH 5 e em tampão fosfato salino 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,4 para a hidrólise de 3 µL de *p*-NFB. As medidas foram realizadas no espectrofotômetro de UV-Vis em modo varredura de 200 a 800 nm.

4.2.3.2 Atividade da lipase (*Pseudomonas fluorescens*)

Para a enzima selecionada e aplicada nos experimentos com a dispersão, foram realizados testes de atividade em todos os pH de interesse, adicionando 3 µL de *p*-NFB, 3 mg da enzima em 1,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ (pH 7,4, 7,0 e 6,5) e em tampão citrato 0,1 mol.L⁻¹ (pH 6,0, 5,5 e 5,0). De forma similar, a atividade também foi calculada adicionando 3 mmol do fármaco antagonista.

Para a atividade da enzima na presença da dispersão, foram adicionados 3 mg da enzima, 3 µL de *p*-NFB, 900 µL de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ (pH 7,4, 7,0 e 6,5) ou tampão citrato 0,1 mol.L⁻¹ (pH 6,0, 5,5 e 5,0) e 100 µL de dispersão micelar sintetizadas sem adição de *p*-NFB para encapsulamento.

As medidas foram realizadas na função cinética do espectrofotômetro de UV-Vis durante 300 segundos em comprimento de onda de 316 nm.

4.2.4 Testes das dispersões micelares como sistemas bioinspirados

4.2.4.1 Dispersões micelares de surfactantes

Foi realizada a diluição das dispersões dos surfactantes em água deionizada, posteriormente foram agitadas e analisadas em um espectrofotômetro de UV-Vis. A solução externa à diálise das dispersões foi acompanhada por análise condutimétrica e espectrofotométrica de UV-Vis. A dispersão mista, cuja liberação dos surfactantes em diálise

não foi identificada por condutimetria, foi utilizada para testes posteriores. Duas dispersões de surfactantes mista foram dialisadas separadamente na presença e ausência de 3 mmol de ibuprofeno. A condutividade foi medida em um período de 6 h em intervalos de 30 minutos.

4.2.4.2 Dispersões micelares de PS-*b*-PAA

As dispersões micelares de PS-*b*-PAA, separadamente contendo cumarina (14) (Figura 5), e *p*-NFB, foram analisadas em um espectrofotômetro de UV-Vis. Elas foram mantidas em um agitador orbital durante 24h a 37 °C, na presença e na ausência de 3 mmol do antagonista ibuprofeno.

Para a dispersão contendo *p*-NFB, a molécula de fato detectada é o *p*-nitrofenol, devido a isso, as curvas de calibração para a determinação da concentração do composto liberado foram construídas com a massa de *p*-nitrofenol. O valor da concentração encontrada foi descontada do valor adicionado do éster, pois o que não foi convertido ainda está encapsulado na micela.

A dispersão contendo *p*-NFB foi avaliada em tampão citrato 0,1 mol.L⁻¹ em pH 5,0; 5,5 e 6,0 e em tampão fosfato salino 0,1 mol.L⁻¹ em pH 6,5; 7,0 e 7,4, na presença e na ausência de ibuprofeno e lipase.

Foram preparadas em tubos de microcentrífuga quatro soluções distintas para cada pH, mantendo-as em um agitador orbital a 37 °C durante períodos de 3, 6, 12 e 24 h. Os quatro grupos foram preparados conforme apresentado na Tabela 1. As soluções foram realizadas em triplicata e analisadas por espectrofotometria de UV-Vis. Os grupos I e II foram elaborados para controle e os grupos III e IV são o sistema contendo apenas a lipase e a lipase e ibuprofeno respectivamente. O branco foi realizado com uma dispersão sintetizada de forma similar à dispersão de interesse, entretanto sem a adição do éster *p*-NFB.

Tabela 1. Preparação das dispersões micelares controle e do sistema.

Grupo	Volume Tampão (µL)	Volume Dispersão (µL)	Ibuprofeno (mmol)	lipase (mg)
I	900	100	-	-
II			3	-
III			-	3
IV			3	3

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 OBTENÇÃO DE COMPOSTOS ANTAGONISTAS

A primeira etapa do trabalho foi dedicada a identificar, através da literatura, os fármacos antagonistas dos ASICs, obtê-los comercialmente ou prepará-los. Alguns fármacos comerciais com conhecida atividade antagonista nos ASICs são o AAS, o ibuprofeno e o diclofenaco. Esses fármacos foram escolhidos para serem aplicados no sistema por serem facilmente obtidos comercialmente ou preparados em laboratório. Os dois últimos estão disponíveis comercialmente na forma de comprimidos e foram purificados conforme metodologia (4.2.1). O AAS (3) foi preparado a partir do precursor orgânico AS (2), através de metodologia já descrita na literatura (MAJEDI; DAVAR; ABBASI, 2014).

Os compostos foram obtidos e purificados para serem aplicados nos testes dos sistemas bioinspirados. Os fármacos antagonistas são necessários para a verificação do correto funcionamento dos sistemas propostos.

5.2 PREPARAÇÃO DAS DISPERSÕES MICELARES

Tendo como base o funcionamento e a estrutura química reativa dos canais ASICs, (FEIN, 2010) foi idealizada a formação de sistemas micelares, os quais contivessem grupos químicos passíveis de protonação, quando em meio ácido.

Ao serem ativados, os canais ASICs traduzem uma modificação química, nesse caso a protonação de certos grupos, em um sinal elétrico que é, então, passado adiante na resposta nociceptiva. No caso do sistema proposto, foi idealizado o encapsulamento de uma molécula que, quando sob influência da variação do pH, fosse liberada da micela em um sistema responsivo. Essa molécula deveria gerar uma resposta analítica apropriada e diferenciada ao ser liberada. A resposta seria mensurada, por exemplo, através de acompanhamento por espectrofotometria de UV-Vis, deslocando o comprimento de onda ou alterando a intensidade de absorção. Nesse caso, a modificação química em resposta a mudança de pH geraria uma resposta analítica no lugar de um sinal elétrico, para assim se fazer o acompanhamento da resposta do sistema a determinadas condições. No caso de adição de um fármaco antagonista à dispersão micelar, o comportamento esperado seria a diminuição da liberação da molécula encapsulada que se relaciona a diminuição do sinal elétrico gerado nos ASICs.

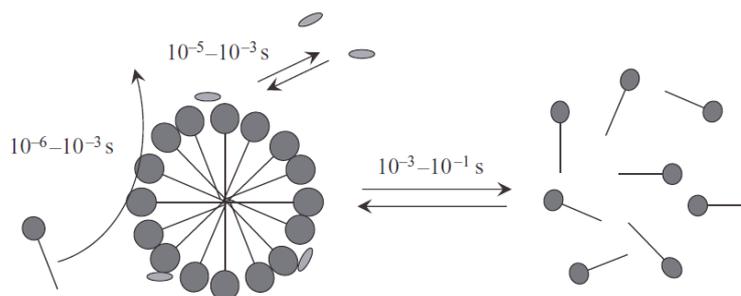
5.2.1 Sistemas micelares baseados em surfactantes

Os surfactantes CTAB e SDod e o copolímero PS-b-PAA foram escolhidos de acordo com suas estruturas, as quais contêm grupos terminais similares aos grupos funcionais reativos presentes no sítio ácido dos canais ASICs, ou seja, grupos carboxilatos e grupos amino, respectivamente.

Foram realizados testes com os surfactantes na tentativa de encapsulamento da cumarina (14). Durante as análises de condutividade e espectrofotometria de UV-Vis, foi constatado que as dispersões utilizando somente um surfactante não foram estáveis, mas a dispersão mista, ou seja, contendo micelas formadas pelos dois surfactantes, foi estável. A estabilidade pode ser atribuída pela mistura de surfactantes promover um sistema denominado cataniônico, devido às forças de atração entre essas moléculas. Isso acontece pois o CTAB é um surfactante catiônico, enquanto que o SDod é aniônico (BRYANT et al., 2020). Entretanto, quando testada na presença de ibuprofeno, o sistema não apresentou diferença na resposta analítica na comparação das dispersões, demonstrando não ser um sistema responsivo promissor para as condições testadas.

Uma explicação possível para o resultado observado pode ter relação com a dinâmica das dispersões micelares. As micelas em si são dinâmicas e estão em processo de equilíbrio com os monômeros livres em dispersão. Como apresenta a Figura 7, os monômeros livres estão disponíveis para serem trocados com os monômeros que formam a estrutura micelar em uma escala de tempo de 10^{-6} - 10^{-3} s. Como essas micelas possuem tamanho de 2-20 nm, a troca de monômeros gera uma instabilidade na sua estrutura e, conseqüentemente, no encapsulamento (LEE, 2008).

Figura 7. Micela de surfactantes como uma estrutura dinâmica.



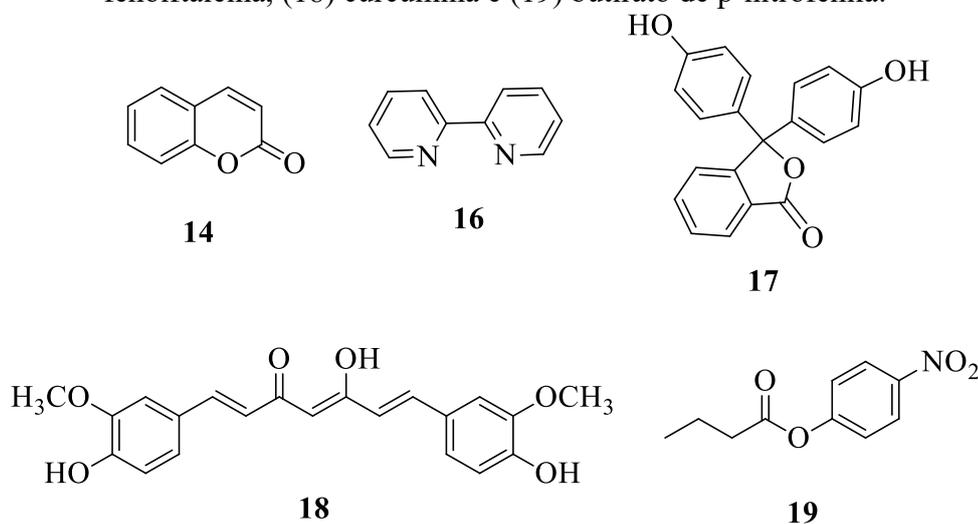
Fonte: Lee (2008).

5.2.2 Sistemas micelares baseados em copolímero PS-b-PAA

Para tentar reduzir o problema observado no sistema apresentado no item 5.2.1, houve a substituição dos surfactantes pelo copolímero PS-b-PAA (15). O copolímero PS-b-PAA (15) (Figura 6) possui um grupo carboxila idealizado para ser o grupo responsivo, nesse caso. Dessa forma, haveria a formação de micelas de maior tamanho e com maior estabilidade (LINDMAN; ALEXANDRIDIS, 2000), mantendo-se a característica química necessária.

A nova estratégia visava a utilização das dispersões micelares do copolímero PS-b-PAA para encapsulamento de algumas moléculas orgânicas com potencial de detecção analítica através de espectroscopia na região do ultravioleta-visível. Os experimentos foram conduzidos separadamente para encapsular cumarina (14), 2,2'-bipiridil (BPY) (16), fenolftaleína (17), curcumina (18) e butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NFB) (19) (Figura 8).

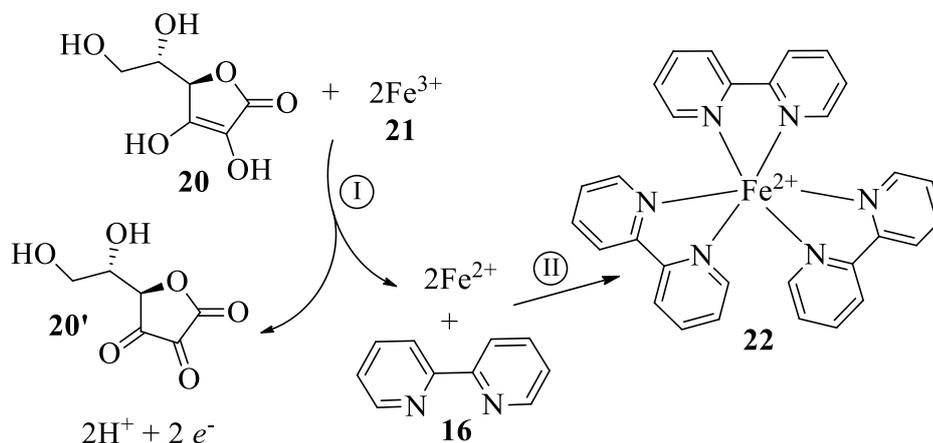
Figura 8. Fórmulas estruturais dos compostos (14) cumarina, (16) 2,2'-bipiridil, (17) fenolftaleína, (18) curcumina e (19) butirato de *p*-nitrofenila.



Fonte: autoria própria

A primeira tentativa foi encapsular BPY (16) em um meio contendo ácido ascórbico (AA) (20) e FeCl_3 (21). Esta combinação, apresentada no Esquema 2, resultaria no complexo tris(2,2'-bipiridina) Ferro (II) (22), de coloração avermelhada, formado na etapa II, caso houvesse a liberação de BPY. O teste foi realizado baseado na metodologia de Angarita-Rivera e colaboradores (2019). A análise foi acompanhada por espectroscopia de UV-Vis e pela mudança visual de coloração. Os compostos AA (20) e FeCl_3 (21) foram solubilizados em água no processo de diálise. Na etapa I, o AA (20) age como redutor do Fe^{3+} para Fe^{2+} , sendo que o ferro reduzido forma o complexo.

Esquema 2. Reação de (II) formação do complexo tris(2,2'-bipiridina) Ferro (II) (22) com BPY (16) e (I) Fe^{2+} reduzido pelo AA (20).



Fonte: Adaptado de Angarita-Rivera e colaboradores (2019).

Após as análises através de espectrofotometria de UV-Vis da solução externa à membrana de diálise, bem como a observação da mudança de coloração, foi identificada a formação do complexo, indicando o não encapsulamento do composto BPY.

Em outras abordagens, a fenolftaleína (17, Figura 8), a curcumina (18, Figura 8) e a cumarina (14, Figura 8) foram encapsuladas nas micelas de PS-b-PAA. Dentre os sistemas acima analisados, a dispersão contendo curcumina encapsulada se mostrou mais promissora. Isso se deve ao fato de a curcumina absorver em um comprimento de onda diferente ao do copolímero, ao contrário das demais moléculas. Além disso, a dispersão com curcumina apresentou maior estabilidade de encapsulamento frente às demais.

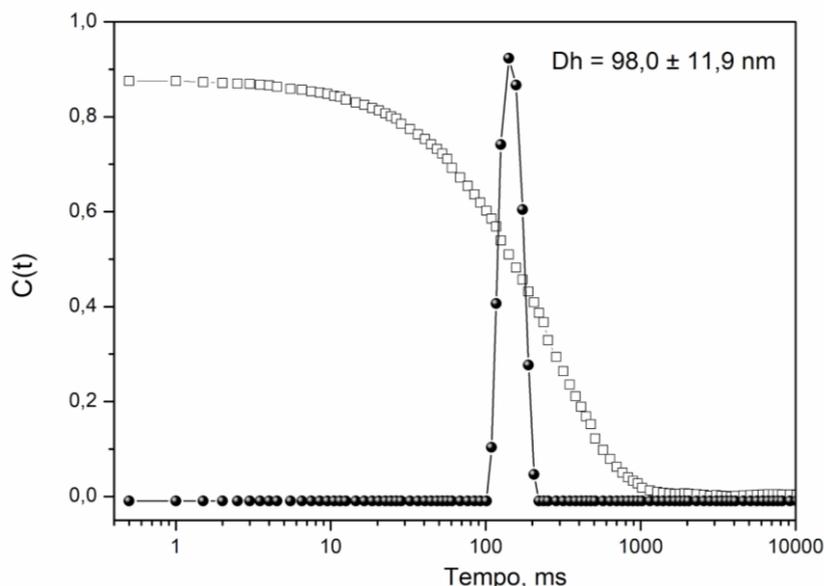
De posse da dispersão contendo a curcumina encapsulada em micelas de PS-b-PAA, foram realizados os testes prévios de resposta em meio ácido, na presença ou não de um fármaco antagonista selecionado, nesse caso o ibuprofeno (4, Figura 3). Entretanto, não foi observada uma diferença significativa na resposta analítica quando os dois testes foram analisados. Sendo assim, os testes não foram continuados para esse sistema.

Em outra tentativa, a dispersão micelar de PS-b-PAA foi testada encapsulando butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NFB, 19) (Figura 8).

O tamanho das micelas de PS-b-PAA foi determinado por Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS) (Figura 9) e também foi determinado o potencial zeta (ζ) por Espalhamento de Luz Eletroforético (ELS). Através da curva de correlação da Figura 9, o diâmetro hidrodinâmico (Dh) calculado foi de $98,0 \pm 11,9$ nm. O valor de potencial zeta foi determinado para prever a carga de superfície das micelas e estabilidade do sistema. O valor foi determinado

como sendo $\zeta = -43,8 \pm 4,9$ mV. Valores muito negativos de ζ são importantes, pois a carga superficial impede a tendência de agregação (SILVA, 2015).

Figura 9. Gráfico de coeficiente de correlação em função do tempo e distribuição de tamanho (diâmetro hidrodinâmico (DH)) para a dispersão de PS-b-PAA com o composto *p*-NFB encapsulado, em água destilada a 25°C.

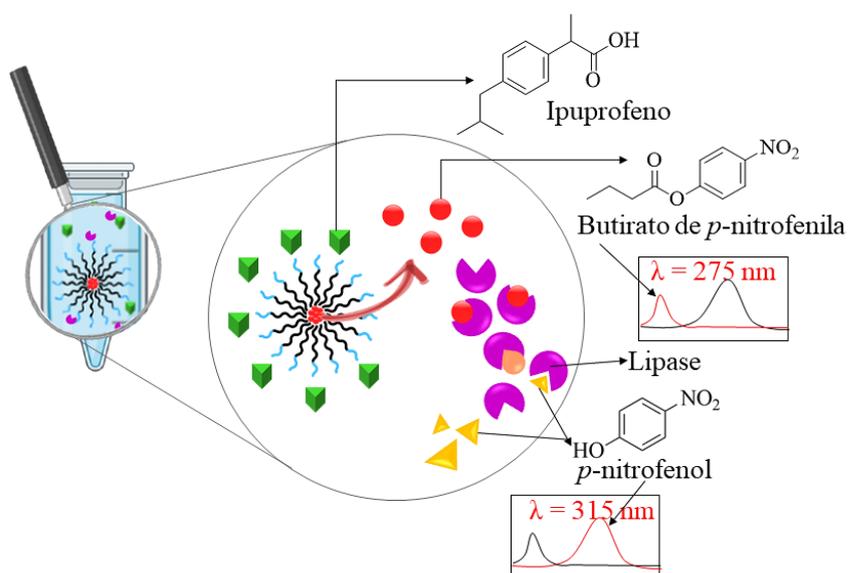


O *p*-NFB foi utilizado devido ao tamanho e estrutura hidrofóbica da molécula, bem como a resposta analítica frente ao sistema. Com base nas características estruturais desse éster, uma alternativa para obtenção de sistema responsivo adequado ao objetivo proposto seria o seu encapsulamento e a realização da sua hidrólise imediata ao ser liberado no meio externo à micela. Dessa maneira, a liberação poderia ser controlada mais facilmente e de maneira inequívoca. Uma das maneiras de se realizar a hidrólise de éster é a utilização de lipases, enzimas da classe das hidrolases, muito utilizadas em síntese orgânica (BASSEGODA; CESARINI; DIAZ, 2012; DE GODOY DAIHA et al., 2015). O conhecimento ainda é bastante restrito a respeito de sistemas micelares correlacionados com a hidrólise do éster *p*-NFB ao seu fenol correspondente, porém existem alguns trabalhos utilizando lipases em dispersões micelares conforme relatado na revisão da literatura (CARVALHO; CABRAL, 2000; YI et al., 2017).

Desta forma, havia um indicativo de que as lipases poderiam ser utilizadas em dispersões micelares sem prejuízo. Além disso, elas são enzimas disponíveis comercialmente em grande variedade, mesmo já imobilizadas, o que facilita a sua recuperação e reutilização (CARVALHO; CABRAL, 2000).

A Figura 10 resume graficamente o funcionamento do sistema idealizado, onde o composto butirato de *p*-nitrofenila (19) é hidrolisado por uma lipase ao *p*-nitrofenol (23). O acompanhamento dos espectros de UV-Vis pode ser realizado através do deslocamento da banda de absorção, de 275 nm à 315 nm quando em tampão citrato 0,1 mol.L⁻¹ em pH 5,0. Esse deslocamento da banda, após a hidrólise, na parte externa da micela, facilita a análise, já que a dispersão contendo *p*-NFB apresenta uma banda de absorbância em um comprimento de onda sem interferência do copolímero. Além disso, sabe-se ao certo quando há liberação, pois uma resposta analítica diferenciada é observada dentro e fora da micela.

Figura 10. Resumo gráfico da bioinspiração e funcionamento do sistema idealizado, onde há a liberação de *p*-NFB (19) e sua hidrólise ao *p*-nitrofenol (23) através da ação da lipase (*Pseudomonas fluorescens*) com e sem ibuprofeno (4). Em pH 5,0, o *p*-NFB absorve em 275 nm e o *p*-nitrofenol em 315 nm.^a

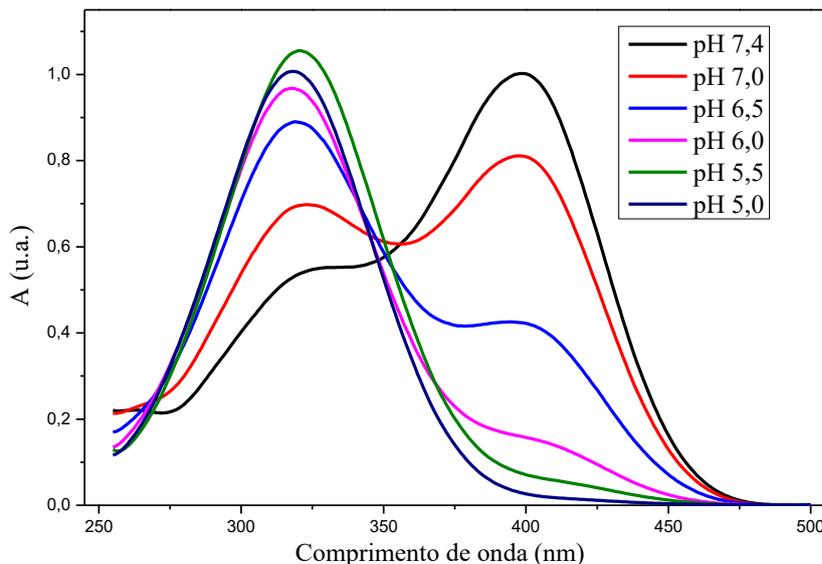


^aConcentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de *p*-NFB e *p*-nitrofenol em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,4.

Para que o desenvolvimento e a otimização do sistema fossem possíveis, um estudo foi realizado para analisar o deslocamento do comprimento de onda do *p*-nitrofenol em diferentes pHs. Esse estudo fez-se necessário para o correto acompanhamento da liberação do *p*-NFB nas condições em que o sistema seria testado.

Foi possível identificar pela Figura 11 que em pH 7,4 e 7,0, a banda de absorbância mais intensa concentra-se em 400 nm, sendo que há um deslocamento hipsocrômico (até 318 nm) conforme o pH diminui. Isso ocorre devido à coexistência do composto *p*-nitrofenol e de sua base conjugada quando o pH é neutro, e tem sua distribuição alterada em função do pH (PENG et al., 2016).

Figura 11. Estudo do deslocamento da banda de absorvância do composto *p*-nitrofenol através de espectrofotometria de UV-Vis em diferentes pHs.^a



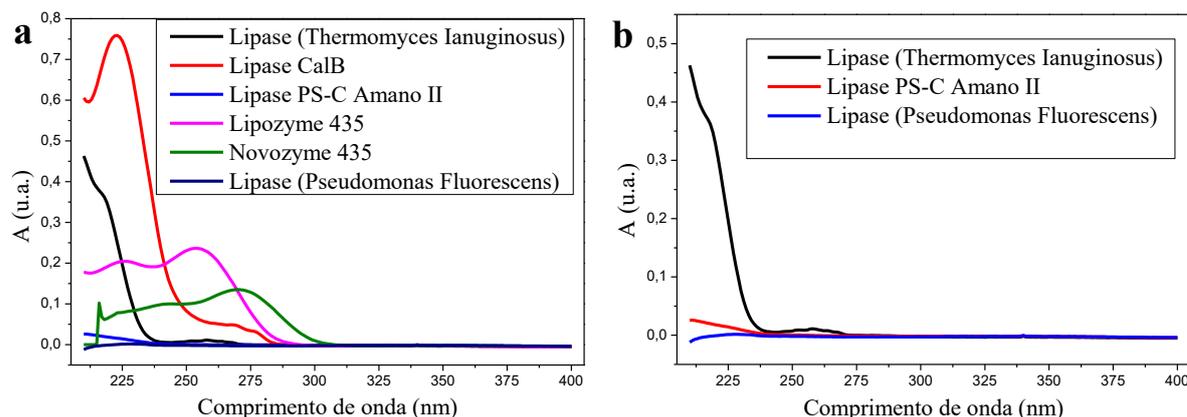
^a Espectro realizado com 1,0 mL do referido tampão na concentração de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de *p*-nitrofenol

5.3 AVALIAÇÃO DAS LIPASES

Utilizando as lipases imobilizadas disponíveis, foram realizadas algumas análises para que a melhor opção fosse selecionada e utilizada no sistema. Optou-se pela utilização de enzimas imobilizadas, pois estas podem ser retiradas do sistema e reutilizadas após a lavagem. Os testes foram realizados com o intuito de detectar o comprimento de onda absorvido pelas enzimas ou seus suportes e, assim, verificar possíveis interferências no sistema. Também foram realizados testes avaliando a ocorrência de deslocamento do comprimento de onda com a mudança de pH. Além disso, a atividade das enzimas foi verificada e calculada em diferentes pHs, na presença do fármaco antagonista escolhido para otimizar o sistema e na presença da dispersão micelar.

Foram adicionadas as respectivas enzimas em tampão fosfato salino em pH 7,4 ou tampão citrato em pH 5. Como pode ser observado na Figura 12.a, as enzimas que obtiveram comprimento de onda de menor interferência no pH 7,4 foram a lipase isolada de *Thermomyces lanuginosus*, a lipase CalB, a lipase PS-C Amano II, a Lipozyme 435, a Novozyme 435 e a lipase isolada de *Pseudomonas fluorescens*. Dentre essas, a lipase isolada de *Pseudomonas fluorescens* foi selecionada para ser utilizada nos testes com o sistema (Figura 12.b) por ter menor interferência no comprimento de onda de interesse, além de sua maior disponibilidade.

Figura 12. (a) Espectros gerados pelas enzimas imobilizadas avaliadas. (b) Espectros gerados pelas três enzimas mais apropriadas para o sistema.^a



^aEspectros realizados em 1,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ em pH 7,4 com 3 mg de cada enzima.

Como próximo teste, a atividade da enzima selecionada foi avaliada na presença e na ausência do fármaco antagonista ibuprofeno e da dispersão micelar em diferentes pHs. Esse dado mostra se a enzima é inibida pela presença do ibuprofeno ou da dispersão. Caso a enzima fosse inibida, a hidrólise ocorreria somente pela ação do meio aquoso, de forma mais lenta, o que poderia dar uma falsa sensação de menor liberação.

A atividade da lipase isolada de *Pseudomonas fluorescens* em tampão fosfato salino em pH 7,4 é de 1,30 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. Nota-se que a maioria dos valores tem sua atividade reduzida na presença de ibuprofeno quando comparado com os valores presentes na Tabela 2, entretanto a diferença é pequena tornando possível a sua utilização. Além disso, em pH 7,0 a presença do ibuprofeno aumentou a atividade da enzima.

Quando na presença da dispersão micelar, a atividade aumentou relativamente, sendo mais nítida em pH 6,5 e menos acentuada em pH 7,4. Isso indica que a lipase selecionada pode ser utilizada sem prejuízo em meio contendo uma dispersão micelar. Esse resultado está de acordo com os trabalhos que utilizam micelas para imobilizar lipases (CARVALHO; CABRAL, 2000; YI et al., 2017). Nesses trabalhos, é usual observar o aumento da atividade e também da estabilidade das lipases, tendo em vista que elas são ativadas em sistemas interfaciais.

A atividade da enzima após a utilização no sistema desenvolvido também foi analisada, em tampão fosfato salino em pH 7,4. Mesmo após a sua utilização a lipase apresentou uma atividade de 1,56 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. Comparando este valor com os valores obtidos em pH 7,4 dispostos na Tabela 2, nota-se que a atividade da lipase (*Pseudomonas fluorescens*) não é comprometida e que essa enzima pode ser reutilizada.

Tabela 2. Valores de atividade da lipase isolada de *Pseudomonas fluorescens* em vários pHs, na presença de ibuprofeno e da dispersão micelar.^a

	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,4
Atividade ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	1,79	1,65	2,06	1,53	0,97	1,30
Atividade ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) com 3 mmol de ibuprofeno	1,41	1,32	1,67	1,45	1,19	1,24
Atividade ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) com a dispersão micelar	2,25	2,13	2,40	2,79	2,10	1,54

^aAtividades calculadas após realização da cinética em espectrofotômetro de UV-Vis utilizando 1,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ ou citrato 0,1 mol.L⁻¹, 3 mg da enzima, 3 μL de substrato *p*-NFB.

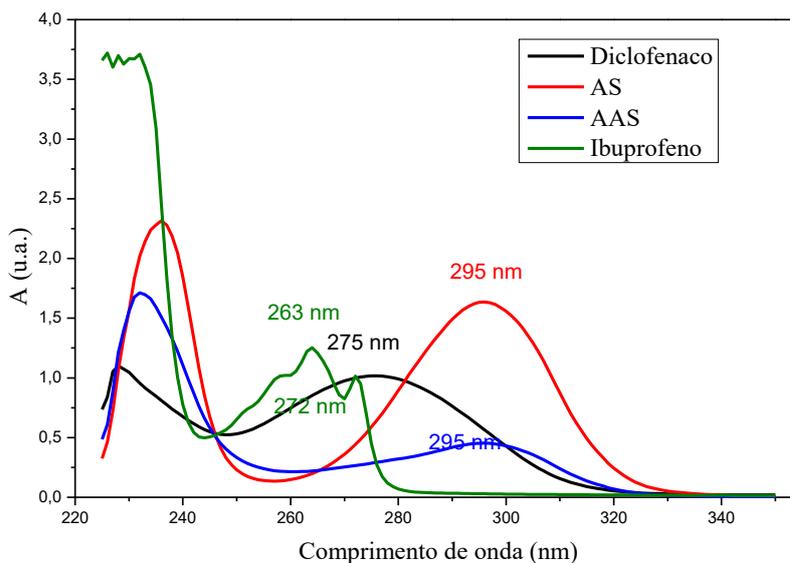
5.4 AVALIAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTAGONISTAS

Para a verificação do funcionamento do sistema, se faz necessária a utilização de um fármaco antagonista. Dessa forma, pode-se avaliar as diferenças quanto a liberação do *p*-NFB na presença ou na ausência do fármaco em diferentes pHs.

Para que isso fosse possível alguns fármacos comercialmente disponíveis ou facilmente sintetizados foram selecionados. São eles: ibuprofeno (4), diclofenaco (7), ácido salicílico (AS, 5) e ácido acetilsalicílico (AAS, 6).

O primeiro ponto a ser avaliado foi a região de absorção dos fármacos, para evitar interferências na avaliação da liberação do *p*-NFB. Sendo assim, o espectro de UV-Vis foi analisado através da utilização de tampão fosfato em pH 7,4. Na Figura 13 podem ser observadas as bandas de absorção do AS (295 nm), do AAS (295 nm) e do diclofenaco (275 nm). Estes possuem bandas de absorção em comprimento de onda próximos aos de interesse, ou seja, dos compostos *p*-NFB (275 nm) e *p*-nitrofenol (400 nm). Logo, estes fármacos não foram selecionados, a princípio, para os testes com a dispersão. O ibuprofeno, apesar de possuir banda de absorção em comprimento de onda próximo ao de interesse (272 nm), possui absorção máxima em 263 nm, com decaimento em 278 nm. Logo, o fármaco escolhido para os testes com a dispersão micelar foi o ibuprofeno.

Figura 13. Espectros de UV-Vis dos fármacos antagonistas diclofenaco, ácido salicílico (AS), ácido acetilsalicílico (AAS) e ibuprofeno.^a

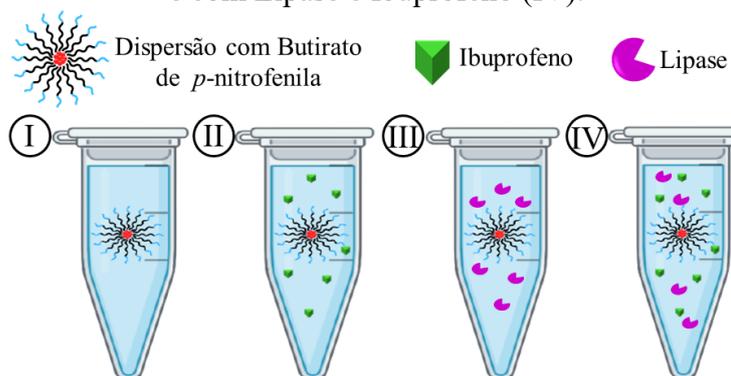


^aEspectros realizados em 1,0 mL de tampão fosfato salino 0,1 mol.L⁻¹ em pH 7,4 utilizando 0,3 mmol do fármaco antagonista.

5.5 AVALIAÇÃO DO SISTEMA BIOINSPIRADO EM ASICs

Os testes com dispersão micelar foram realizados em tampão fosfato salino 0,1 mol.L⁻¹ em pH 7,4, 7,0 e 6,5 e em tampão citrato 0,1 mol.L⁻¹ em pH 6,0, 5,5 e 5,0. Para cada pH, o teste foi realizado em triplicata, gerando quatro grupos de tubos de microcentrífuga, como pode ser observado na Figura 14. Os dois primeiros são os experimentos controle contendo (I) tampão e a dispersão de PS-b-PAA com o composto *p*-NFB, (II) tampão, ibuprofeno e a dispersão de PS-b-PAA com o composto *p*-NFB. O terceiro (III) e o quarto (IV) grupo continham o sistema bioinspirado completo, ou seja, tampão, lipase e dispersão de PS-b-PAA contendo *p*-NFB e tampão, lipase, ibuprofeno e dispersão de PS-b-PAA contendo *p*-NFB, respectivamente. Dessa forma, foi possível avaliar e comparar os resultados do sistema idealizado com um sistema controle sem a presença da lipase. Além disso, foi possível comparar os resultados na presença e na ausência de ibuprofeno para cada pH testado (comparação entre os grupos III e IV). Para cada grupo também foi adicionado um tubo de microcentrífuga replicando a mesma solução, porém contendo uma dispersão produzida sem adição do composto *p*-NFB, a fim de ser utilizado como branco nas análises de espectrofotometria. Esse último foi necessário para evitar possíveis interferências do copolímero, da enzima e do ibuprofeno no espectro. Todos os tubos foram mantidos em um agitador orbital a temperatura constante de 37 °C a 200 rpm, durante 3, 6, 12 e 24 h, e analisados por espectrofotometria de UV-Vis.

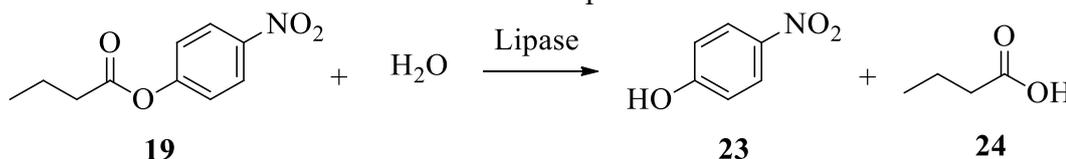
Figura 14. Representação dos quatro grupos experimentos em microcentrífugas contendo tampão e a dispersão (I) com ibuprofeno e sem Lipase (II), com Lipase e sem ibuprofeno (III) e com Lipase e Ibuprofeno (IV).



Fonte: autoria própria.

Como representado no Esquema 3, devido a presença da lipase no meio, a liberação de *p*-NFB pode ser avaliada através de observação do comprimento de onda de absorção referente ao *p*-nitrofenol, seu produto de hidrólise.

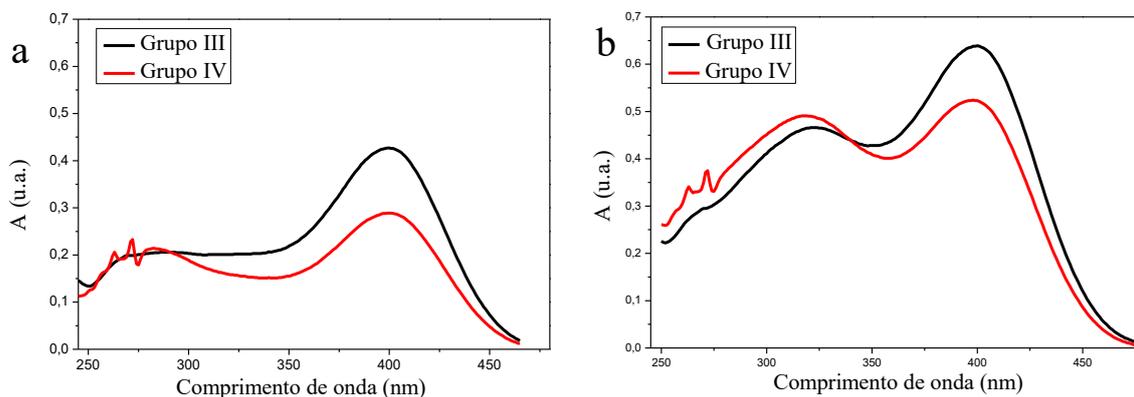
Esquema 3. Reação de hidrólise do éster butirato de *p*-nitrofenila ao fenol *p*-nitrofenol utilizando lipase.



Na tabela 3 podem ser observados os resultados obtidos para os testes com o grupo III e IV em pH 7,4, 7,0 e 6,5, utilizando tampão fosfato.

Em pH 7,4, conforme pode ser observado na Figura 15.a e na Tabela 3 (entrada 1), a maior diferença de liberação ocorreu após 3 h de incubação, diminuindo esta variação após 6, 12 e 24 h. Neste tempo, para o sistema bioinspirado contendo ibuprofeno (grupo IV), detectou-se 2,74% de *p*-nitrofenol em 400 nm, sendo que o sistema bioinspirado sem o ibuprofeno (grupo III) liberou 4,40%, 1,6 vezes mais do que se comparado com o grupo IV. Em pH 7,0 ocorreu uma maior liberação de *p*-NFB quando comparado com pH 7,4, sendo que a maior liberação foi observada após 6 h para esse pH (Figura 15.b). Similarmente ao que ocorreu em pH 7,4, houve uma menor liberação quando na presença de ibuprofeno, exceto em 24 h quando a quantidade liberada no experimento do grupo IV foi maior (Tabela 3, entrada 5). Entretanto, após 12 h, observou-se uma quantidade equivalente sendo liberada em ambos os grupos III e IV (Tabela 3, entradas 7 e 8).

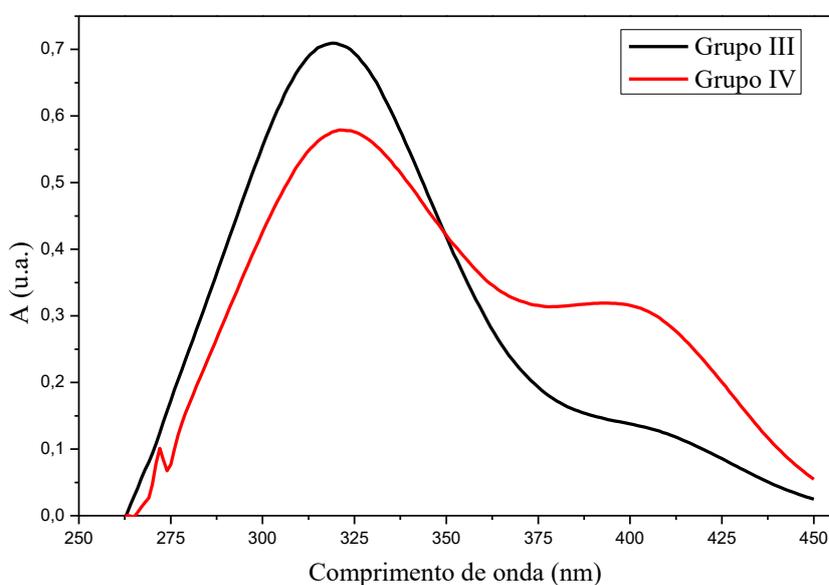
Figura 15. Espectros de absorvância da dispersão micelar em tampão fosfato (a) pH 7,4 após 3 h de incubação e (b) pH 7,0 após 6 h de incubação.^a



^a Espectros realizados com amostras dos grupos III e IV em tampão fosfato salino na concentração de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ após incubação em temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm.

Quando foi empregado pH 6,5, houve menor liberação quando comparado ao pH 7,0, e pouca variação de detecção do *p*-nitrofenol quando comparam-se os testes na presença e na ausência de ibuprofeno. Mesmo assim, em todos os pontos de análise houve uma menor detecção de *p*-nitrofenol quando na presença de ibuprofeno e, em 12 h há uma diferença significativa de liberação quando compara-se os grupos III e IV (Figura 16 e Tabela 3, entrada 10).

Figura 16. Espectros de absorvância da dispersão micelar em tampão fosfato em pH 6,5 após 12 h de incubação.^a



^a Espectro realizado com amostra dos grupos III e IV em tampão fosfato salino na concentração de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ após incubação em temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm.

Observando a Tabela 3, percebe-se que na maioria dos testes em pH 7,4 a 6,5 houve a maior liberação de butirato de *p*-nitrofenila quando o sistema não continha ibuprofeno (grupo III), com exceção do teste de 24h em pH 7,0. Comparando os testes em pH 7,4 e 7,0, há uma maior liberação em pH 7,0, indicando uma maior liberação quando em pH menor conforme ocorre com os ASICs. No entanto, esse efeito não é nítido quando se observam os dados em pH 6,5.

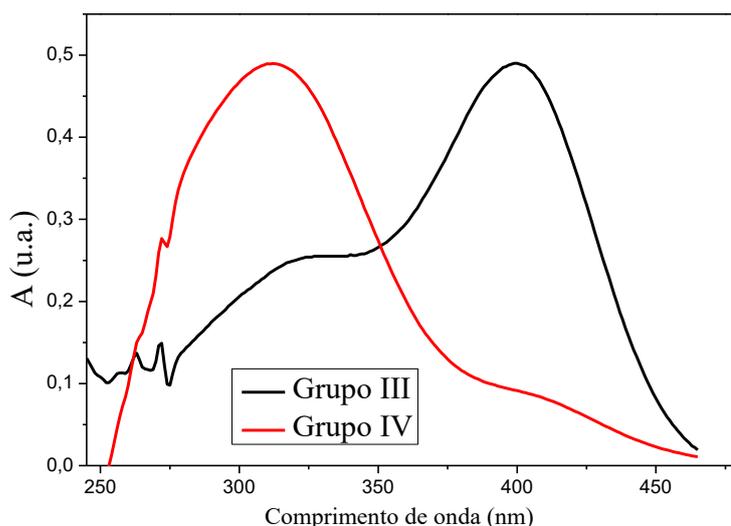
Tabela 3. Valores de detecção de *p*-nitrofenol em % calculados a partir da concentração detectada dos espectros de absorção nos sistemas III e IV em tampão fosfato pH 7,4, 7,0 e 6,5 após 3, 6, 12 e 24 h.^a

Entrada	pH	Tempo	Detecção em % de <i>p</i> -nitrofenol do grupo III	Detecção em % de <i>p</i> -nitrofenol do grupo IV
1	7,4	3 h	4,40±0,37	2,74±0,55
2		6 h	5,19±0,11	4,84±0,11
3		12 h	6,16±0,13	5,16±0,24
4		24 h	6,41±0,18	5,62±0,30
5	7,0	3 h	7,04±0,32	6,83±0,59
6		6 h	7,90±0,18	6,86±0,30
7		12 h	8,95±0,23	8,83±0,05
8		24 h	9,32±0,13	10,06±0,47
9	6,5	3 h	6,44±0,57	5,78±0,29
10		6 h	6,99±0,72	6,44±0,38
11		12 h	7,75±0,23	6,47±0,03
12		24 h	8,47±0,53	7,40±0,29

^a Dados calculados a partir dos valores de absorbância máxima dos espectros dos grupos III e IV em tampão fosfato salino 0,1 mol.L⁻¹ aplicados nas curvas de calibração realizadas nos referidos pHs com o composto *p*-nitrofenol e convertidos em % com o valor de *p*-NFB adicionado (1 mmol.L⁻¹).

Desejando avaliar o sistema desenvolvido em uma faixa mais ampla de pH, o sistema foi submetido a tampão citrato com pHs 6,0, 5,5 e 5,0. Em pH 6,0 (Figura 17), foi possível observar a mudança no comprimento de onda das bandas de absorbância de 400 nm para 318 nm. Essa mudança do comprimento também é observada em pH 5,5 e 5,0. Como explicado na Figura 11 no item 5.2.2, há o deslocamento da banda de absorbância máxima devido a base conjugada do *p*-nitrofenol.

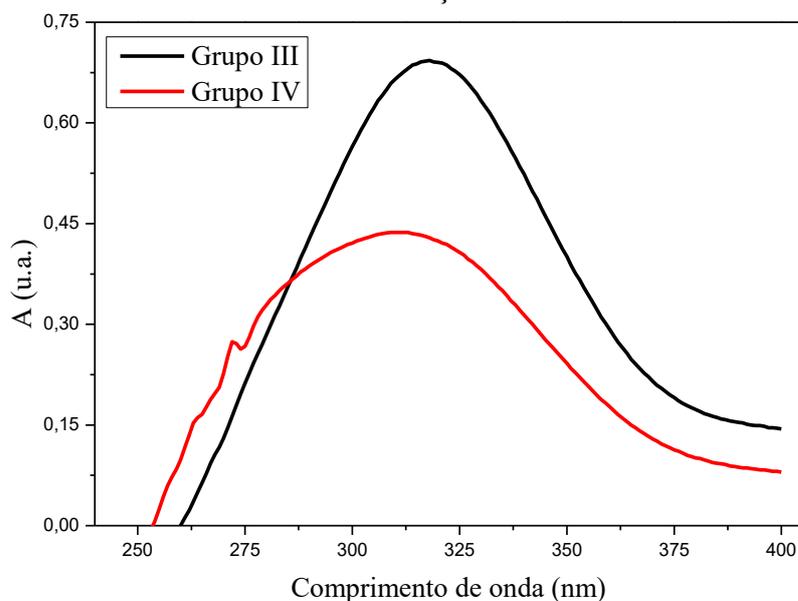
Figura 17. Comparação dos espectros de absorvância da dispersão micelar (Grupo IV) após 3 h em tampão citrato pH 6,0 e em tampão fosfato pH 7,4.^a



^a Espectro realizado com amostra do grupo IV em tampão fosfato salino e tampão citrato na concentração de 0,1 mol.L⁻¹ em pH 7,4 e 6,0, respectivamente, após incubação em temperatura de 37 °C e 200 rpm.

Em pH 6,0 houve liberação de *p*-NFB quase equivalente entre os grupos III e IV. A maior diferença de liberação, nesse caso, foi em 12 h, conforme pode ser observado na Figura 18 e na Tabela 4, entrada 3.

Figura 18. Espectros de absorvância da dispersão micelar em tampão citrato pH 6,0 após 12 h de incubação.^a

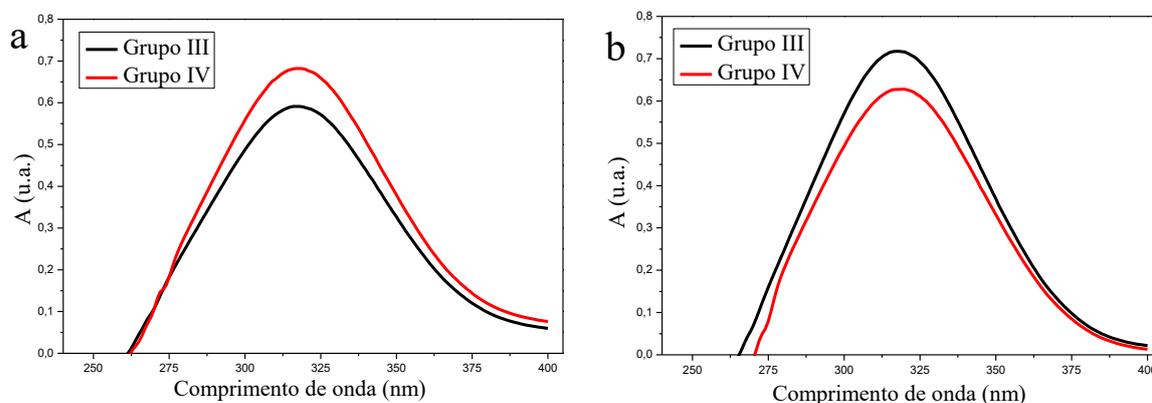


^a Espectro realizado com amostra dos grupos III e IV em tampão citrato na concentração de 0,1 mol.L⁻¹ após incubação em temperatura de 37 °C e 200 rpm.

Em pH 5,5, a maior diferença de liberação ocorreu em 24 h (Figura 19.a e Tabela 4, entrada 8), tendo maior liberação no sistema completo (grupo IV). Porém, em todos os períodos

de incubação, a diferença de liberação na presença ou ausência de ibuprofeno foi pequena. Em pH 5,0, o ibuprofeno parece inibir a liberação do composto *p*-NFB somente após 3 h e 12 h (Figura 19.b), sendo uma diferença de 1,78% e 2,36 % respectivamente (Tabela 4, entradas 9 e 11).

Figura 19. Espectros de absorvância da dispersão micelar em tampão citrato em (a) pH 5,5 após 24 h de incubação e (b) pH 5,0 após 12 h de incubação.^a



^a Espectros realizados com amostra dos grupos III e IV em tampão citrato na concentração de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ após incubação em temperatura de 37°C e 200 rpm.

Tabela 4. Valores de detecção de *p*-nitrofenol em % calculados a partir da concentração detectada dos espectros de absorção nos sistemas III e IV em tampão citrato pH 6,0, 5,5 e 5,0 após 3, 6, 12 e 24 h.^a

Entrada	pH	Tempo	Deteção em % de <i>p</i> -nitrofenol do grupo III	Deteção em % de <i>p</i> -nitrofenol do grupo IV
1	6,0	3 h	$4,80 \pm 0,07$	$4,83 \pm 0,17$
2		6 h	$5,18 \pm 0,03$	$5,30 \pm 0,43$
3		12 h	$6,70 \pm 0,55$	$5,24 \pm 1,06$
4		24 h	$7,63 \pm 0,30$	$7,61 \pm 0,30$
5	5,5	3 h	$4,71 \pm 0,31$	$4,75 \pm 0,23$
6		6 h	$5,33 \pm 0,37$	$5,70 \pm 0,23$
7		12 h	$6,01 \pm 0,16$	$6,21 \pm 0,47$
8		24 h	$6,02 \pm 0,20$	$6,43 \pm 0,59$
9	5,0	3 h	$4,02 \pm 0,42$	$2,28 \pm 0,27$
10		6 h	$3,62 \pm 0,36$	$4,02 \pm 0,51$
11		12 h	$5,59 \pm 0,97$	$2,36 \pm 0,11$
12		24 h	$6,47 \pm 0,70$	$6,17 \pm 0,45$

^a Dados calculados a partir dos valores de absorvância máxima dos espectros dos grupos III e IV em tampão citrato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ aplicados nas curvas de calibração realizadas nos referidos pHs com o composto *p*-nitrofenol e convertidos em % com o valor de *p*-NFB adicionado (1 mmol.L^{-1}).

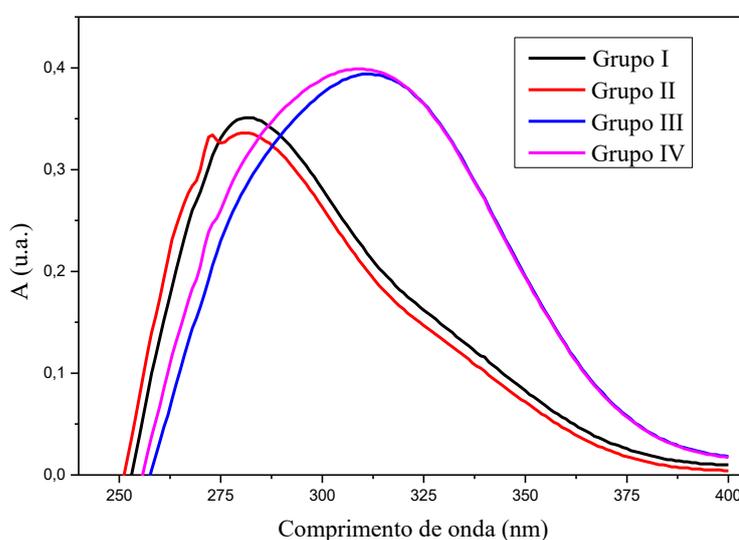
Comparando os resultados das Tabelas 3 e 4, observa-se que não há uma maior liberação de *p*-NFB na faixa de pHs 6-5 quando comparado aos pHs 7,4-6,5. Existem alguns fatores que podem explicar a liberação reduzida do composto. Um deles é que, devido à troca de tampão

fosfato para citrato, as forças iônicas presentes no meio podem afetar os grupos presentes no copolímero. Deve-se considerar que um aumento da força iônica em relação à água deionizada levará a um aumento da blindagem dos grupos carregados, diminuindo assim o pK_a aparente do PAA, que tem pK_a 4,26 em condições normais (pH 7,0). Além disso, ao diminuir o valor de pH até 5,0, as micelas de PS-*b*-PAA exibem uma tendência clara de diminuição do tamanho hidrodinâmico geral (EICHHORN et al., 2021). Logo, a liberação de *p*-NFB pode ser reduzida com a diminuição do raio hidrodinâmico da micela, justificando também a liberação reduzida em pH 5,0.

Outro ponto a ser observado é que, no geral, os resultados da Tabela 3 se mostraram mais promissores do que os da Tabela 4, se for levado em consideração as diferenças de liberação na presença ou na ausência de ibuprofeno. Mesmo assim, a diferença ocorre na maioria dos testes. Sendo assim, a melhor faixa de trabalho para os pHs testados foi 7,4-7,0. Esse dado é condizente com o funcionamento dos ASICs, que detectam e são ativados rapidamente pela diminuição do pH na faixa entre 7,4 a 6,5 (DOROFEEVA et al., 2008; WALDMANN; LAZDUNSKI, 1998).

Por fim, cabe ainda ressaltar que, quando comparam-se os grupos III e IV, em todos os pHs testados, com os controles I e II (Figura 20, Apêndice B e Tabela 5), percebe-se que a hidrólise do éster somente ocorre em velocidade apreciável na presença de lipase, mesmo em pH ácido. Esse resultado mostra que a presença da lipase é indispensável para o correto funcionamento do sistema desenvolvido.

Figura 20. Espectro de absorvância dos grupos I, II, III e IV em pH 5,0 após 6 h de incubação.^a



^a Espectros realizados com amostra dos grupos I, II, III e IV em tampão citrato na concentração de 0,1 mol.L⁻¹ após incubação em temperatura de 37 °C e 200 rpm.

5.6 CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS APLICANDO O IBUPROFENO *IN VIVO* E NO SISTEMA BIOINSPIRADOS DESENVOLVIDO

Os grupos ácidos carboxílicos, presentes em muitos dos fármacos antagonistas dos canais ASICs, incluindo o ibuprofeno, são essenciais para inibição do canal. Essa inibição ocorre por meio de uma interação alostérica entre os grupos carboxilatos, presentes nos fármacos, e o domínio extracelular do canal ASIC, mais especificamente no sítio de transdução agonista. Enquanto a porção do ácido carboxílico parece ser crucial para a inibição, mudanças estruturais na parte hidrofóbica de fármacos testados levaram ao aumento ou diminuição da potência inibitória e, a alteração da seletividade quanto ao subtipo de canais ASICs a terem a resposta antagonizada em testes *in vivo* (LYNAGH et al., 2017). O sistema desenvolvido no presente trabalho possui uma dispersão micelar formada pelo polímero PS-b-PAA (15), possuidor de uma porção polar contendo um grupo ácido carboxílico. Essa porção não só confere sensibilidade à mudança de pH, mas parece estar interagindo com o grupo ácido carboxílico do ibuprofeno (4). Pode estar havendo uma dessensibilização ao pH do meio através da construção de pares carboxila-carboxilato, presentes em maior ou menor extensão a depender do pH aplicado. Sendo assim, mesmo quando aplicado no sistema bioinspirado, o grupo ácido carboxílico/carboxilato parece estar relacionado à ação dessensibilizatória conferida pelo fármaco (ibuprofeno).

Outro aspecto importante a ser observado é que a potência inibitória do ibuprofeno diminui progressivamente em pHs abaixo de 6,9 devido à presença de agonista adicional (H^+) (LYNAGH et al., 2017). A justificativa para isso é a protonação de sua porção carboxilato em maior extensão em pHs mais ácidos (KELLENBERGER; SCHILD, 2015; LYNAGH et al., 2017). Desta forma, a faixa de pH ótima em que o sistema responde na presença do fármaco antagonista (7,4-6,5) está correlacionada com a faixa de pH em que o fármaco antagonista ibuprofeno age de maneira mais efetiva. Esses dados estão alinhados aos melhores resultados observados em pH 7,4-7,0 pela aplicação de ibuprofeno no sistema bioinspirado desenvolvido.

Portanto, o sistema bioinspirado desenvolvido parece estar respondendo de maneira condizente em relação a presença do ibuprofeno no meio e em relação a melhor faixa de pH para sua ação.

6 CONCLUSÃO

Dentre todos os sistemas testados, aquele que se mostrou mais promissor foi utilizando o copolímero Poliestireno-b-Poli(ácido acrílico) (PS-b-PAA) encapsulando a molécula de butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NFB). Esse sistema apresentou estabilidade, de acordo com o valor de potencial zeta (ζ) $-43,8 \pm 4,9$ mV, e o valor de raio hidrodinâmico (R_H) foi de $49,5 \pm 5,9$ nm.

O composto encapsulado (*p*-NFB) absorve em um comprimento de onda de 273-275 nm e, seu produto de hidrólise, o *p*-nitrofenol, absorve em 318 nm na faixa de pH 5,0-6,0 e em 400 nm na faixa de pH 7,4-6,5. Para melhor detecção da liberação do composto em meio ácido, foi realizado um estudo com lipases, para a hidrólise do éster encapsulado. A lipase isolada de *Pseudomonas fluorescens* foi escolhida por ter menor interferência no comprimento de onda de interesse. A atividade da lipase também foi calculada para verificar se a hidrólise ocorre de forma imediata. Os valores obtidos confirmam que não há diminuição da atividade na presença do fármaco antagonista ibuprofeno ou na presença da dispersão. A atividade da enzima após a utilização foi comparável a enzima nunca utilizada, mostrando que a enzima pode ser reutilizada.

Alguns fármacos comercialmente disponíveis e conhecidos antagonistas dos canais ASICs foram avaliados para aplicação e verificação do correto funcionamento do sistema. Dentre os fármacos testados, o ibuprofeno apresentou padrão de absorbância condizente com sua aplicação no sistema e foi utilizado para os testes.

O sistema desenvolvido mostrou resultados interessantes, sendo detectada maior liberação de *p*-NFB em pH 7,0 quando comparado ao pH 7,4, por exemplo. Sendo assim, o sistema parece responder a acidificação do meio, assim como os ASICs, mostrando maior sensibilidade em faixa de pH semelhante. Além disso, quando na presença de ibuprofeno (grupo IV), houve menor liberação de *p*-NFB quando comparado com o sistema na ausência do mesmo (grupo III) para os pHs 7,4, 7,0 e 6,5. Assim, o ibuprofeno apresenta a sua função atribuída de reduzir a liberação do composto *p*-NFB. Até mesmo a melhor faixa de atuação do ibuprofeno quanto ao pH, parece estar alinhada aos resultados observados *in vivo*.

Outro ponto positivo do sistema desenvolvido é a sua viabilidade de execução. O sistema utiliza uma dispersão micelar formada por um copolímero que pode ser sintetizado em laboratório e que permanece estável por longos períodos a temperatura ambiente. Utiliza ainda uma molécula orgânica encapsulada que é de fácil aquisição ou preparo e, uma enzima comercial, imobilizada e passível de reutilização. Além disso, a detecção do sinal gerado é

realizada em equipamento espectrofotômetro de UV-Vis, bastante comum na maioria dos laboratórios de química e bioquímica.

Somado aos resultados interessantes e a facilidade de preparo e utilização do sistema desenvolvido, o sistema pode ser modificado se outras moléculas com hidrofobicidade adequada forem encapsuladas. Sendo assim, o comprimento de onda de detecção pode ser modificado e outros fármacos podem ser testados.

Com base no exposto, pode-se dizer que o sistema bioinspirado aqui apresentado é uma alternativa interessante para ser utilizada em testes de triagem para o desenvolvimento e estudo de novos fármacos antinociceptivos que atuam como antagonistas dos canais ASICs.

7 REFERÊNCIAS

AKIMOTO, Jun; NAKAYAMA, Masamichi; OKANO, Teruo. Temperature-responsive polymeric micelles for optimizing drug targeting to solid tumors. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 2–8, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.062>>.

ALEXANDER, Stephen P.H. et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2021/22: Ion channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 178, n. S1, p. S157–S245, 2021.

BAMPS, Dorien et al. TRP Channel Cooperation for Nociception: Therapeutic Opportunities. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 61, p. 655–677, 2021.

BARON, Anne; LINGUEGLIA, Eric. Pharmacology of acid-sensing ion channels – Physiological and therapeutical perspectives. **Neuropharmacology**, v. 94, p. 19–35, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.005>>.

BASSEGODA, Arnau; CESARINI, Silvia; DIAZ, Pilar. Lipase improvement: Goals and strategies. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. e201209005, 2012.

BAYRAMOGLU, Gulay et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic chitosan beads and application in flavor esters synthesis. **Food Chemistry**, v. 366, n. July 2021, p. 130699, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130699>>.

BEISSON, Frédéric; RIVIÈRE, Claude. Methods for lipase detection and assay : a critical review. **European Journal of Lipid Sciences and Technology**, p. 133–153, 2000.

BHUSHAN, Bharat. Lessons from nature for green science and technology: An overview and bioinspired superliquiphobic/philic surfaces. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 377, n. 2138, 2019.

BRYANT, Saffron J. et al. Catanionic Surfactant Self-Assembly in Protic Ionic Liquids. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 11, n. 15, p. 5926–5931, 2020.

BURK, Mark J. Has Biotechnology Delivered on Expectations? **Advanced Synthesis & Catalysis**, p. 647–648, 2003.

CANEVAROLO JR., Sebastião V. Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. **Artliber editora**, v. 1, p. 282, 2002.

CARVALHO, Cristina M.L.; CABRAL, Joaquim M.S. Reverse micelles as reaction media for lipases. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1063–1085, 2000.

CAVALCANTE, Francisco Thálysson Tavares et al. Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. **Fuel**, v. 288, n. November 2020, 2021.

CEMBRAN, Arianna et al. Biomimetic Materials and Their Utility in Modeling the 3-Dimensional Neural Environment. **iScience**, v. 23, n. 1, p. 100788, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.100788>>.

- CHEN, Maohua et al. Antibacterial Micelles with Vancomycin-Mediated Targeting and pH/Lipase-Triggered Release of Antibiotics. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 43, p. 36814–36823, 2018.
- CHU, Yingying et al. Biomimetic synthesis of coordination network materials: Recent advances in MOFs and MPNs. **Applied Materials Today**, v. 10, p. 93–105, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apmt.2017.12.009>>.
- CLEGG, John R. et al. Modular fabrication of intelligent material-tissue interfaces for bioinspired and biomimetic devices. **Progress in Materials Science**, v. 106, n. January, p. 100589, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2019.100589>>.
- COHEN, Mitchell J.; JANGRO, William C.; NEFF, Daniel. **Pathophysiology of Pain**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48566-1.00001-2>>.
- COHEN, Steven P.; MAO, Jianren. Neuropathic pain: Mechanisms and their clinical implications. **BMJ (Online)**, v. 348, p. 1–12, 2014.
- DANILOVTSEVA, Elena N. et al. Bioinspired thermo- and pH-responsive polymeric amines: Multimolecular aggregates in aqueous media and matrices for silica/polymer nanocomposites. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 446, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.01.021>>.
- DE GODOY DAIHA, Karina et al. Are lipases still important biocatalysts? A study of scientific publications and patents for technological forecasting. **Plos one**, v. 10, n. 6, p. 1–20, 2015.
- DEVAL, Emmanuel et al. Acid-Sensing Ion Channels (ASICs): Pharmacology and implication in pain. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 128, n. 3, p. 549–558, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.08.006>>.
- DEVINE, Paul N et al. Extending the application of biocatalysis to meet the challenges of drug development. **Nature Reviews Chemistry**, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41570-018-0055-1>>.
- DILLT, Ken A.; FLORY, Paul J. Molecular organization in micelles and vesicles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 2, p. 676–680, 1981.
- DIOCHOT, S. et al. Peptides inhibitors of acid-sensing ion channels. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 271–284, 2007.
- DOROFEEVA, Natalia A. et al. Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, n. 1, p. 429–441, 2008.
- EICHHORN, Jonas et al. PH-Dependent Structure of Block Copolymer Micelles Featuring a Polyampholyte Corona: A Combined Experimental and Theoretical Approach. **Macromolecules**, v. 54, n. 4, p. 1976–1991, 2021.
- EISING, Renato et al. Formação de micelas mistas entre o sal biliar colato de sódio e o surfactante aniônico dodecanoato de sódio. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2065–2070, 2008.

FEIN, Alan. Nociceptores: as células que sentem dor. **Dor On Line**, p. 106, 2010. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/nociceptores>>.

FIALHO, Maria Fernanda P. et al. Buddleja thyrsoides Lam. crude extract presents antinociceptive effect on an arthritic pain model in mice. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 17, p. 2993–3010, 2017.

FU, Xiao et al. Multi-Stimuli-Responsive Polymer Particles, Films, and Hydrogels for Drug Delivery. **Chem**, v. 4, n. 9, p. 2084–2107, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.07.002>>.

GANDHI, Arijit et al. Studies on thermoresponsive polymers: Phase behaviour, drug delivery and biomedical applications. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 2, p. 99–107, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.08.010>>.

GROOTHUIS, Floris A. et al. Dose metric considerations in in vitro assays to improve quantitative in vitro-in vivo dose extrapolations. **Toxicology**, v. 332, p. 30–40, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2013.08.012>>.

GUO, Zhaoyang et al. Responsive principles and applications of smart materials in biosensing. **Smart Materials in Medicine**, v. 1, n. July, p. 54–65, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.07.001>>.

HE, Hongming et al. Construction of Thermophilic Lipase-Embedded Metal-Organic Frameworks via Biomimetic Mineralization: A Biocatalyst for Ester Hydrolysis and Kinetic Resolution. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 37, p. 24517–24524, 2016.

HU, Wen Yao et al. Smart pH-responsive polymeric micelles for programmed oral delivery of insulin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 183, n. June, p. 110443, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110443>>.

JAEGGER, Karl-erich. Protein technologies and commercial enzymes White is the hype – biocatalysts on the move Editorial overview. **Current Opinion in Biotechnology**, p. 269–271, 2004.

JOCHUM, Florian D.; THEATO, Patrick. Temperature- and light-responsive smart polymer materials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 17, p. 7468–7483, 2013.

JULIUS, David; BASBAUM, Allan I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–210, 2001.

KALHAPURE, Rahul S.; RENUKUNTLA, Jwala. Thermo- and pH dual responsive polymeric micelles and nanoparticles. **Chemico-Biological Interactions**, v. 295, n. July, p. 20–37, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.016>>.

KALHAPURE, Rahul S; RENUKUNTLA, Jwala. Chemico-Biological Interactions Thermo- and pH dual responsive polymeric micelles and nanoparticles. **Chemico-Biological Interactions**, v. 295, n. March, p. 20–37, 2018b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.016>>.

KAPOOR, Manali; GUPTA, Munishwar Nath. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.011>>.

KELLENBERGER, Stephan; SCHILD, Laurent. International union of basic and clinical pharmacology. XCI. structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na⁺ channel. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 1, p. 1–35, 2015.

KILKENNY, Carol et al. Survey of the Quality of Experimental Design, Statistical Analysis and Reporting of Research Using Animals. **Plos one**, v. 4, n. 11, 2009.

KOCAK, G.; TUNCER, C.; BÜTÜN, V. PH-Responsive polymers. **Polymer Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 144–176, 2017.

KUDUK, Scott D. et al. Amidine derived inhibitors of acid-sensing ion channel-3 (ASIC3). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 15, p. 4059–4063, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.06.021>>.

LAVANYA, K. et al. Temperature- and pH-responsive chitosan-based injectable hydrogels for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 111, n. March, p. 110862, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110862>>.

LEE, Yoon S. **Self-assemble and Nanotechnology: a Force Balance Approach**. [S.l: s.n.], 2008.

LINDHOUD, Saskia; NORDE, Willem; STUART, Martien A.Cohen. Effects of polyelectrolyte complex micelles and their components on the enzymatic activity of lipase. **Langmuir**, v. 26, n. 12, p. 9802–9808, 2010.

LINDMAN, Björn; ALEXANDRIDIS, Paschalis. Amphiphilic molecules: small and large. **Amphiphilic Block Copolymers**, p. 1–12, 2000.

LÖFFLER, Susanne; LIBBERTON, Ben; RICHTER-DAHLFORS, Agneta. Organic bioelectronic tools for biomedical applications. **Electronics (Switzerland)**, v. 4, n. 4, p. 879–908, 2015.

LYNAGH, Timothy et al. Acid-sensing ion channels emerged over 600 Mya and are conserved throughout the deuterostomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 33, p. 8430–8435, 2018.

_____. Molecular Basis for Allosteric Inhibition of Acid-Sensing Ion Channel 1a by Ibuprofen. 2017.

MAJEDI, Ali; DAVAR, Fatemeh; ABBASI, Alireza. Sucrose-mediated sol-gel synthesis of nanosized pure and S-doped zirconia and its catalytic activity for the synthesis of acetyl salicylic acid. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 4215–4223, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2014.01.023>>.

MANCHUN, Somkamon; DASS, Crispin R.; SRIAMORNSAK, Pornsak. Targeted therapy for cancer using pH-responsive nanocarrier systems. **Life Sciences**, v. 90, n. 11–12, p. 381–387, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.01.008>>.

MARTINS, Vilásia Guimarães; KALIL, Susana Juliano; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de

óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942–1947, 2008.

MCENTIRE, Dan M. et al. Pain transduction: a pharmacologic perspective. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 8, p. 1069–1080, 2016.

MEYER, Hans Peter et al. The use of enzymes in organic synthesis and the life sciences: Perspectives from the Swiss Industrial Biocatalysis Consortium (SIBC). **Catalysis Science and Technology**. [S.l: s.n.], 2013

MOLDOVAN, Monica et al. Tantalum Oxide Coatings as Candidate Environmental Barriers. **Journal of Thermal Spray Technology**, v. 13, n. March, p. 51–56, 2004.

NAIK, Rajesh R.; SINGAMANENI, Srikanth. Introduction: Bioinspired and Biomimetic Materials. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 20, p. 12581–12583, 2017.

OLIVEIRA CARVALHO, Patrícia de et al. Application of microbial lipases to concentrate polyunsaturated fatty acids. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75–80, 2003.

OZYILMAZ, Elif; CETINGUNEY, Sevilay; YILMAZ, Mustafa. Encapsulation of lipase using magnetic fluorescent calix[4]arene derivatives; improvement of enzyme activity and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 1042–1050, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.182>>.

PALAO-SUAY, R. et al. Self-assembling polymer systems for advanced treatment of cancer and inflammation. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p. 207–248, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.07.005>>.

PANDEY, Ashok et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 29 (Pt 2), p. 119–31, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075908>>.

PANG, Xin et al. PH-responsive polymer-drug conjugates: Design and progress. **Journal of Controlled Release**, v. 222, p. 116–129, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.024>>.

PAQUES, Fernanda Wiermann; MACEDO, Gabriela Alves. Plant lipases from latex: Properties and industrial applications. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, 2006.

PAULA, Ariela V De; BARBOZA, Jayne C. de Souza; CASTRO, Heizir F. de. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 792–796, 2005.

PENG, Yangyang et al. Accurately Determining Esterase Activity via the Isosbestic Point of p-Nitrophenol. **BioResources**, v. 11, n. 4, p. 10099–10111, 2016.

PORTO, Ledilege Cucco. Estudo de filmes finos e de nanopartículas obtidos pela auto-associação de copolímeros em bloco e sua interação com um oligo / polissacarídeo. **Thesis**, p. 171, 2011.

RODRIGUES, Rafael C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746–770, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>>.

SCHOLZ, Joachim; WOOLF, Clifford J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 11s, p. 1062–1067, 2002.

SHAIKH, Saher Afshan; TAJKHORSHID, Emad. Potential cation and H⁺ binding sites in acid sensing ion channel-1. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 11, p. 5153–5164, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.108.141606>>.

SHELDON, Roger A; BRADY, Dean. The limits to biocatalysis: Pushing the envelope. **Chemical Communications**, v. 54, n. 48, p. 6088–6104, 2018.

SHERWIN, C. M. Expand free journal project so poor countries can share Animal-welfare section in papers would be a burden. **Nature**, v. 447, n. May, p. 2007–2007, 2007.

SIKDER, Antara et al. Recent Advances on Stimuli-Responsive Combination Therapy against Multidrug-Resistant Bacteria and Biofilm. **ACS Applied Bio Materials**, v. 4, n. 6, p. 4667–4683, 2021.

SONAWANE, Sandeep J.; KALHAPURE, Rahul S.; GOVENDER, Thirumala. Hydrazone linkages in pH responsive drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 45–65, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.12.011>>.

STUART, Martien A.Cohen et al. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. **Nature Materials**, v. 9, n. 2, p. 101–113, 2010.

SU, Yuling et al. Triclosan loaded polyurethane micelles with pH and lipase sensitive properties for antibacterial applications and treatment of biofilms. **Materials Science and Engineering C**, v. 93, n. June 2017, p. 921–930, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.063>>.

SUBRAMANIAM, Santhni et al. Bioinspired drug delivery strategies for repurposing conventional antibiotics against intracellular infections. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 177, p. 113948, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113948>>.

SUN, Shu Yang; XU, Yan; WANG, Dong. Bioresource Technology Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation : Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2607–2612, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.006>>.

SWIEGERS, Gerhard F. **Bioinspiration and biomimicry in chemistry : reverse-engineering nature**. [S.l: s.n.], 2012.

TORCHILIN, Vladimir P. Block copolymer micelles as a solution for drug delivery problems. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 15, n. 1, p. 63–75, 2005.

TORRES PAZMIÑO, Daniel E. et al. Altering the substrate specificity and enantioselectivity of phenylacetone monooxygenase by structure-inspired enzyme redesign. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 349, n. 8–9, p. 1361–1368, 2007.

TRACEY, W. Daniel. Nociception. **Current Biology**, v. 27, n. 4, p. R129–R133, 2017.

TUZAR, Z. Overview of polymer micelles. In: **Solvents and Self-organization of Polymers**. Springer, Dordrecht, 1996. p. 1-17.

VOILLEY, Nicolas et al. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 20, p. 8026–8033, 2001.

VULLO, Sabrina et al. Conformational dynamics and role of the acidic pocket in ASIC pH-dependent gating. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 14, p. 3768–3773, 2017.

VULLO, Sabrina; KELLENBERGER, Stephan. A molecular view of the function and pharmacology of acid-sensing ion channels. **Pharmacological Research**, v. 154, n. February 2019, p. 104166, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.02.005>>.

WALDMANN, Rainer; LAZDUNSKI, Michel. H⁺-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 8, n. Figure 1, p. 418–424, 1998.

WALKER, Cristiani Isabel Banderó et al. Anti-nociceptive effect of stigmaterol in mouse models of acute and chronic pain. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 11, p. 1163–1172, 2017.

WANG, Wen-liang; MA, Xiao-jing; YU, Xi-fei. pH-responsive Polymersome Based on PMCP- b -PDPA as a Drug Delivery System to Enhance Cellular Internalization and Intracellular Drug Release. **Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)**, v. 35, n. 11, p. 1352–1362, 2017.

WEGST, Ulrike G.K. et al. Bioinspired structural materials. **Nature Materials**, v. 14, n. 1, p. 23–36, 2015.

XU, Feng. Applications of oxidoreductases: Recent progress. **Industrial Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 38–50, 2005.

XU, Longsheng et al. Alpha-7 Nicotinic Receptor-Targeted Cinobufagin Induces Antinociception and Inhibits NF- κ B Signaling Pathway in DRG Neurons. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 497–506, 2019.

XU, Zhigang et al. pH-responsive polymeric micelles based on poly(ethyleneglycol)-b-poly(2-(diisopropylamino) ethyl methacrylate) block copolymer for enhanced intracellular release of anticancer drugs. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 490, p. 511–519, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.11.091>>.

YAM, Mun Fei et al. General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. **International Journal of Molecular Sciences**. [S.l.: s.n.]. , 2018

YAN, Tingsheng et al. Chitosan based pH-responsive polymeric prodrug vector for enhanced tumor targeted co-delivery of doxorubicin and siRNA. **Carbohydrate Polymers**, p. 31, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.291>>.

YANG, Haotong et al. Stimuli-responsive polymeric micelles for the delivery of paclitaxel. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, n. October 2019, p. 101523,

2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101523>>.

YI, Shixiong et al. A reverse micelle strategy for fabricating magnetic lipase-immobilized nanoparticles with robust enzymatic activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

ZHANG, Dongxue et al. Polymeric micelles for pH-responsive lutein delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 45, n. March, p. 281–286, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.03.023>>.

ZHAO, Jingyang et al. Self-assembled pH-responsive polymeric nanoparticles based on lignin-histidine conjugate with small particle size for efficient delivery of anti-tumor drugs. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, n. January, p. 107526, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107526>>.

ZHENG, Haoquan et al. Coordination bonding based pH-responsive drug delivery systems. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 11–12, p. 1933–1944, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.03.007>>.

8. APÊNDICE A – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos compostos antagonistas

Figura 21. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H do composto Ácido acetilsalicílico (6, AAS).

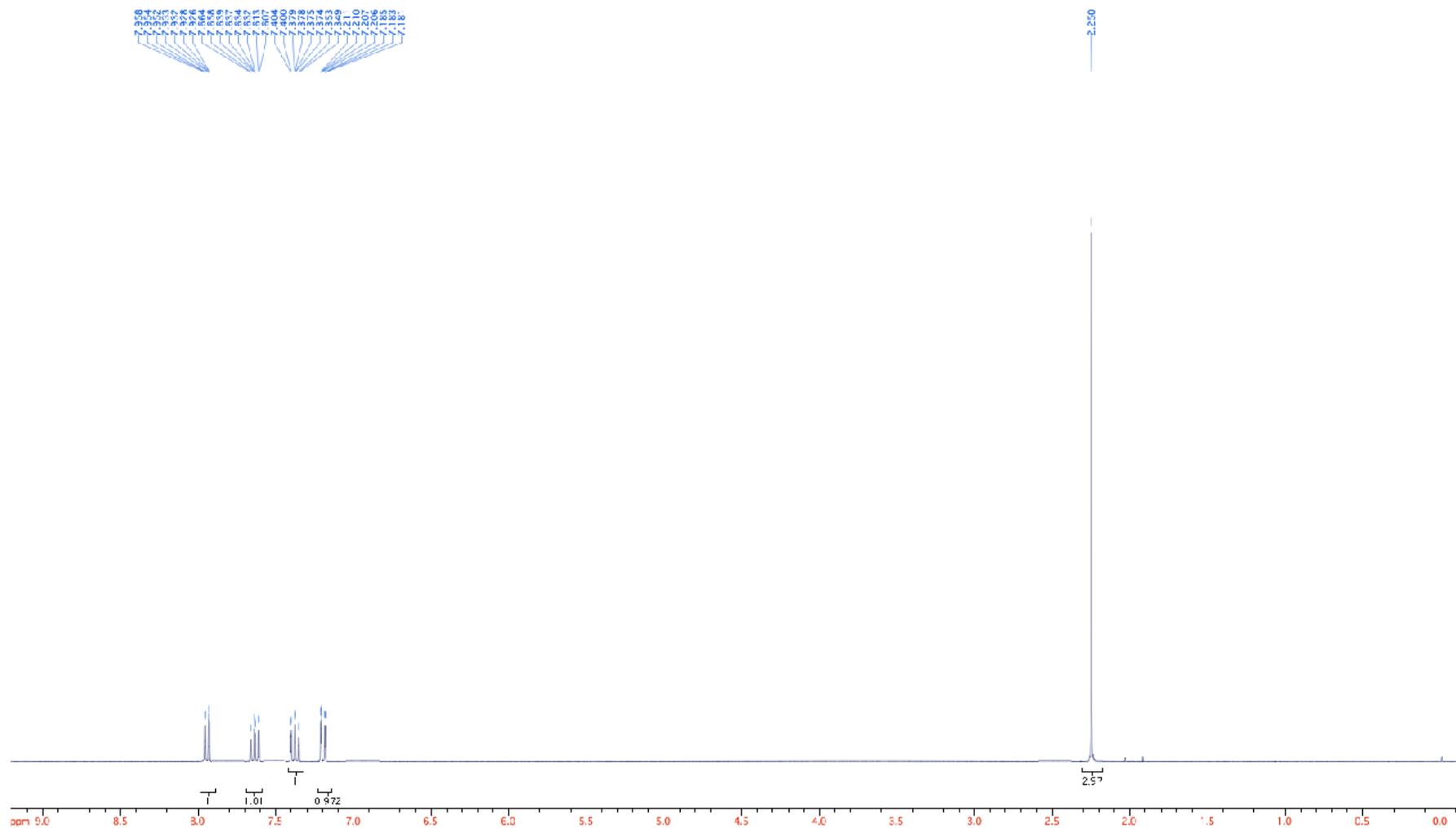


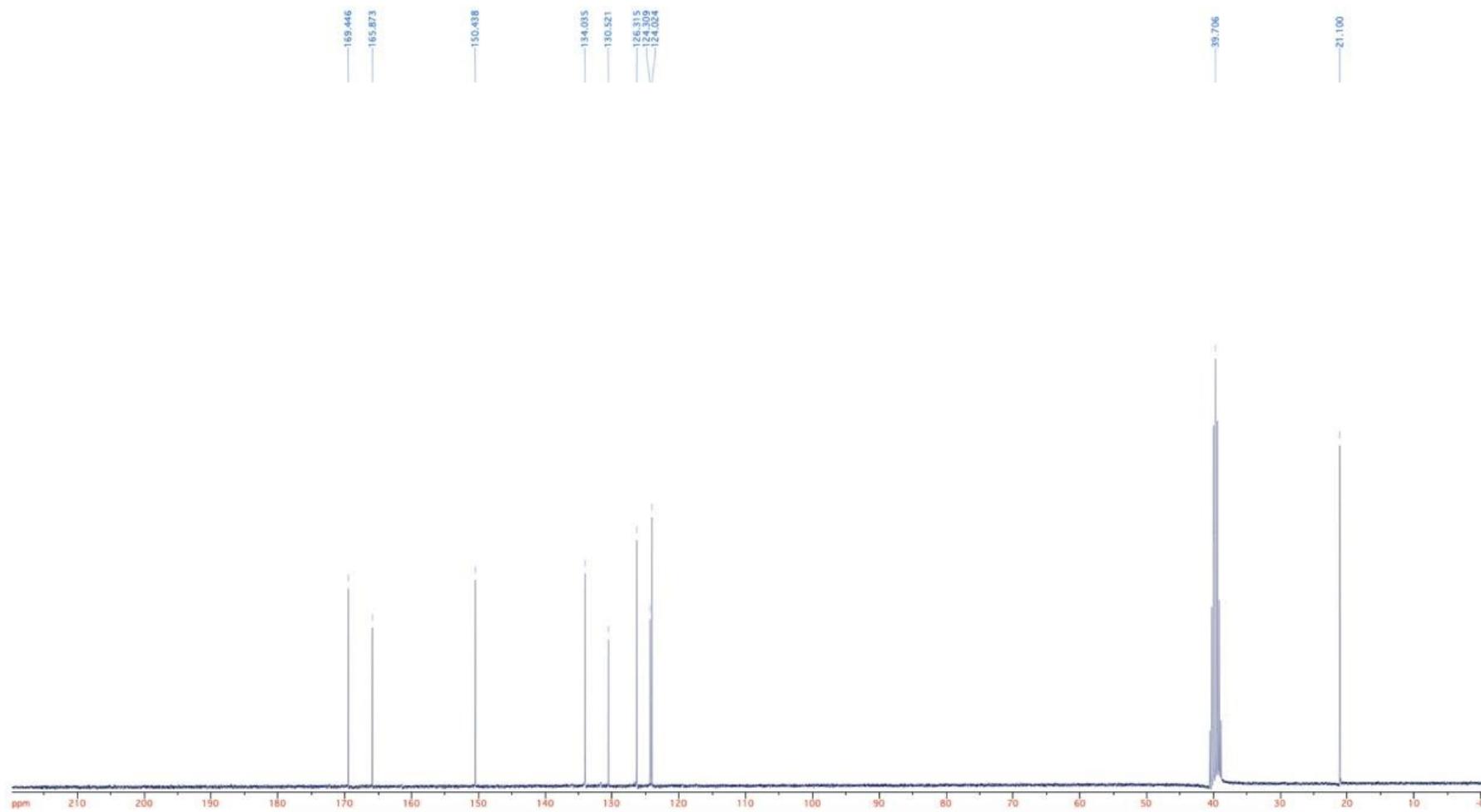
Figura 22. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C do composto Ácido acetilsalicílico (6, AAS).

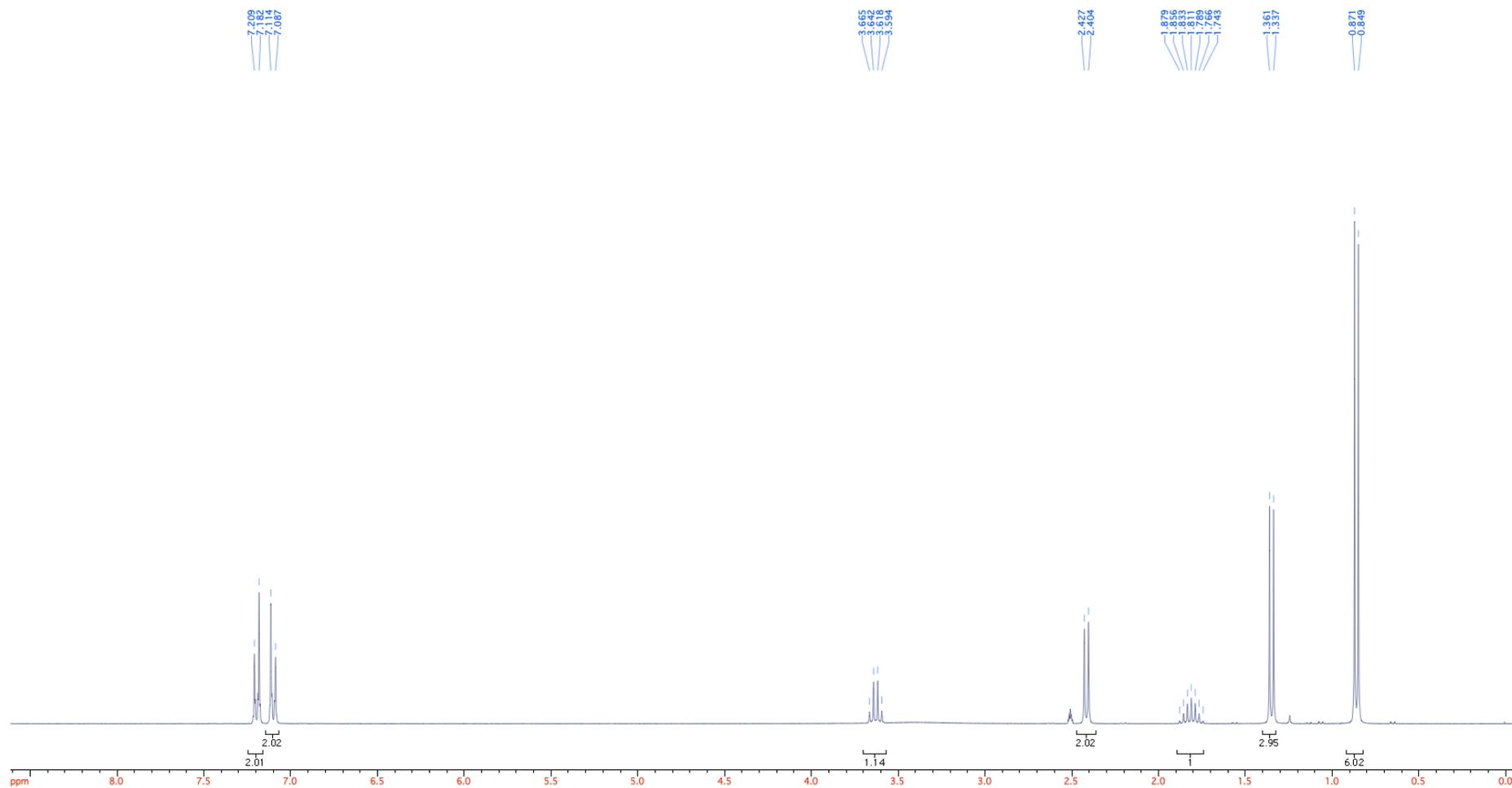
Figura 23. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H do composto Ibuprofeno (4).

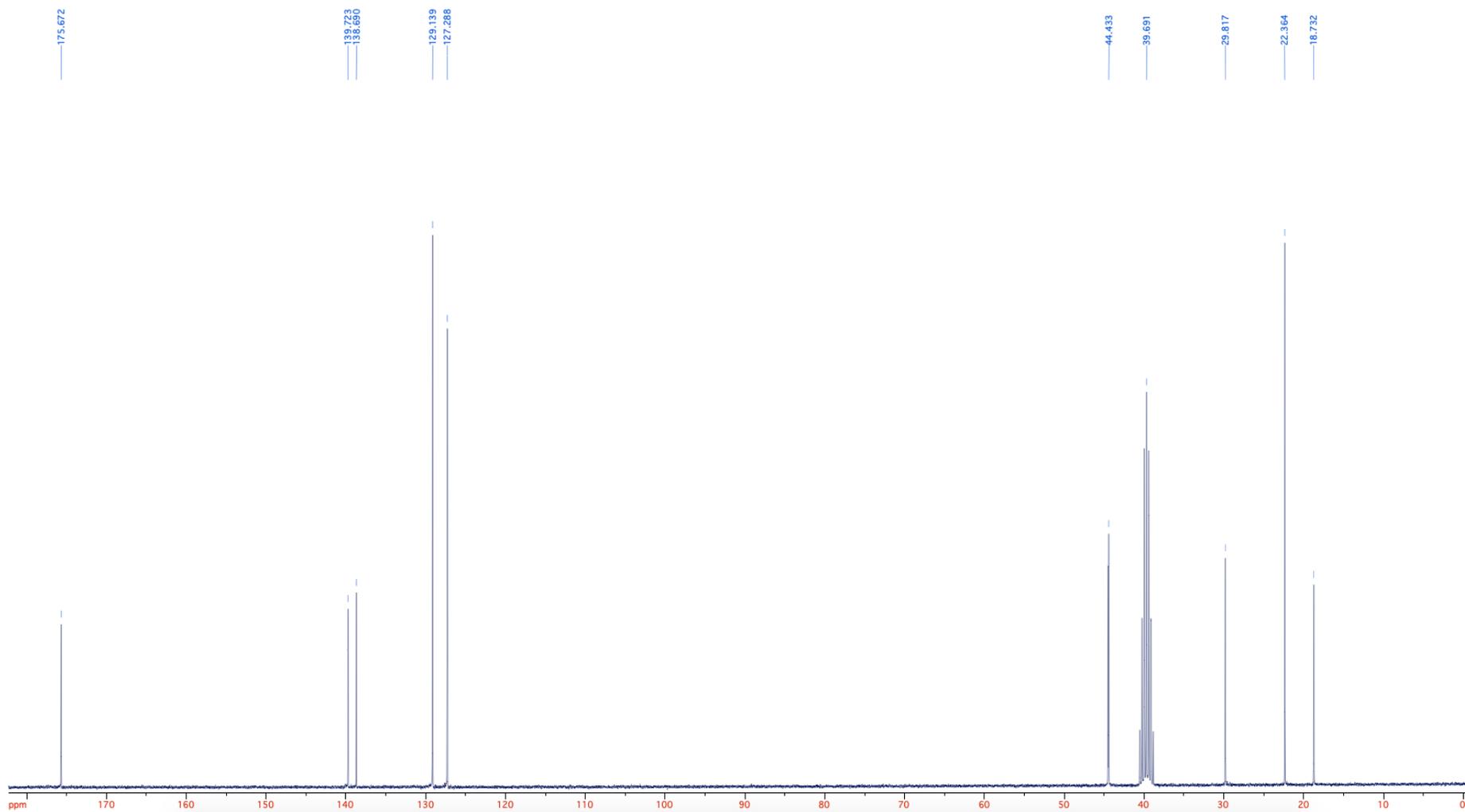
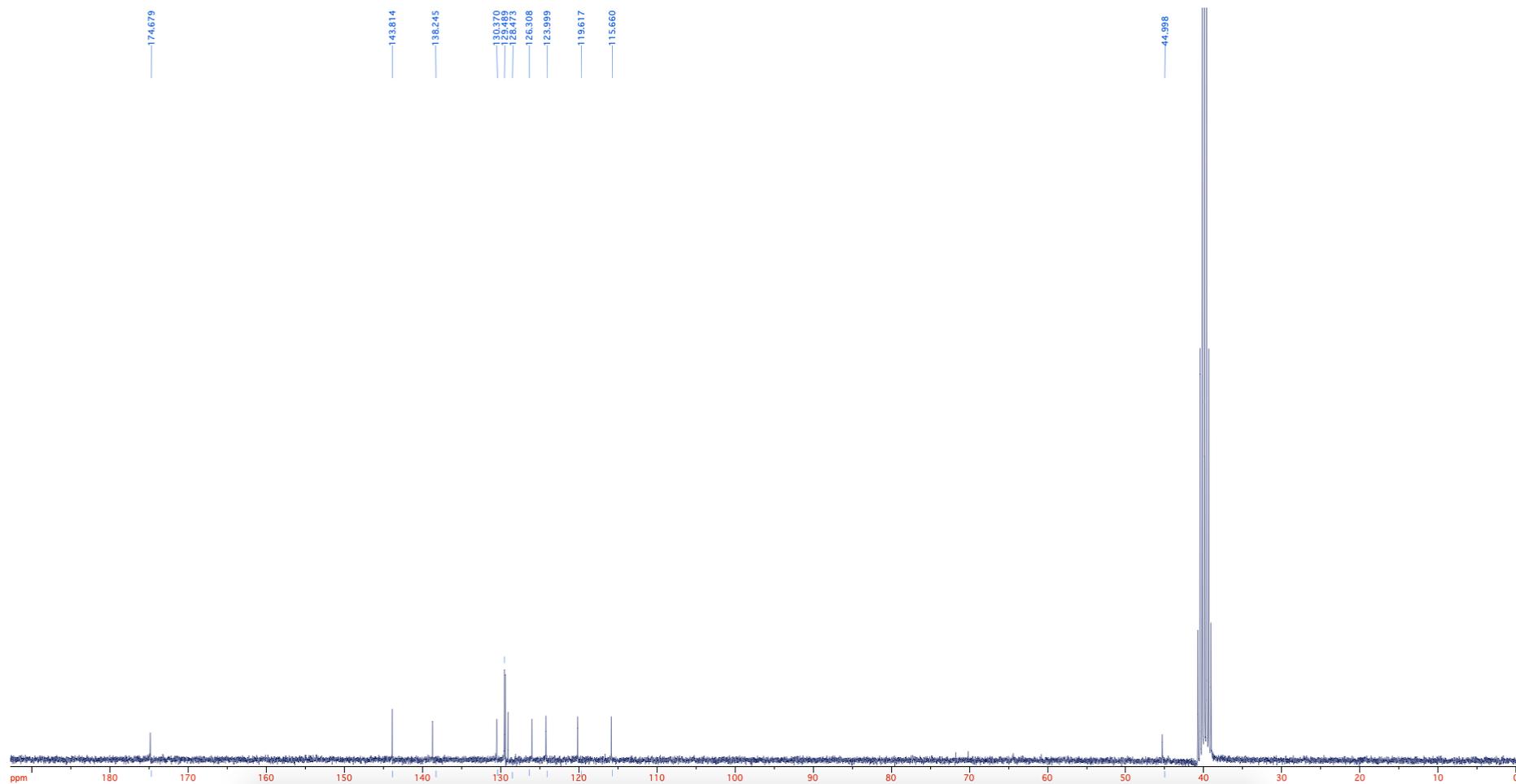
Figura 24. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C do composto Ibuprofeno (4).

Figura 26. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C do composto Diclofenaco (7).

9. APÊNDICE B – Espectros de Absorção dos Grupos I, II, III e IV após incubação em diferentes pHs

Figura 27. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 3 h em pH 5,0.

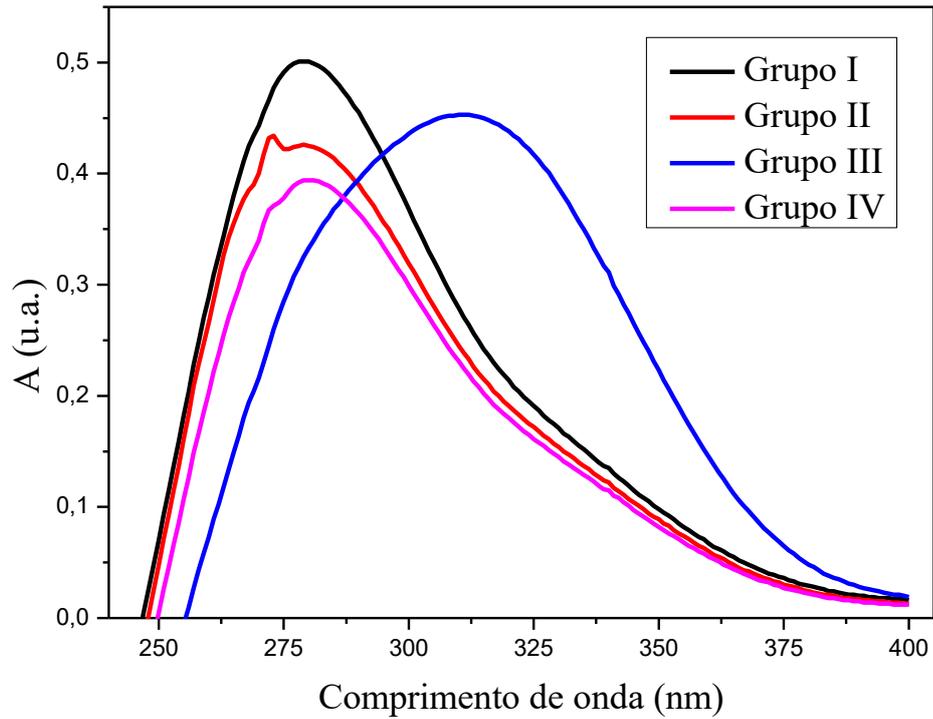


Figura 28. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 6 h em pH 5,0.

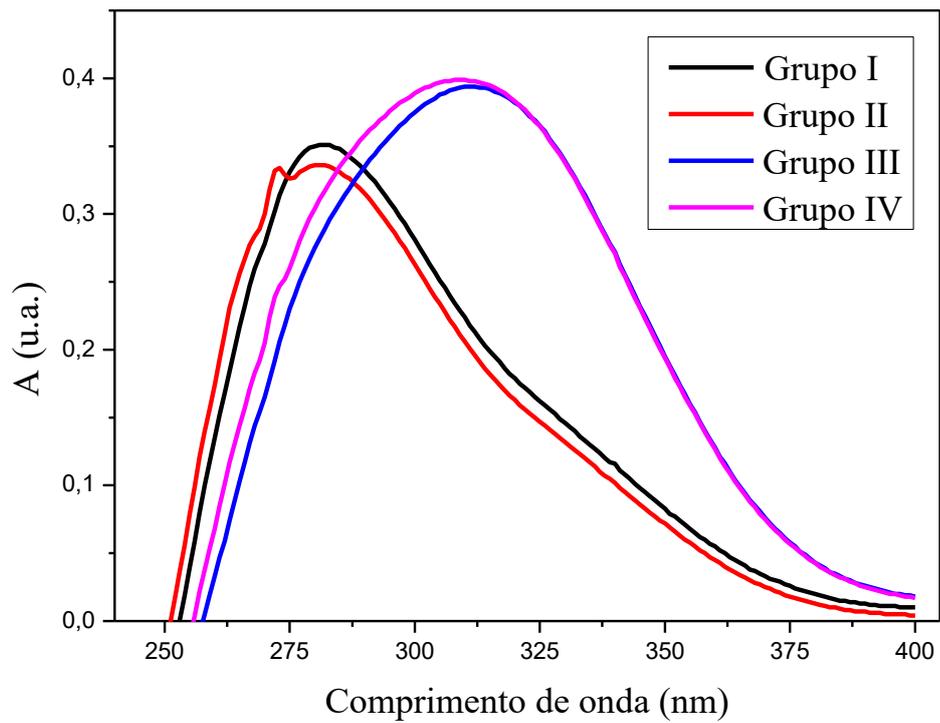


Figura 29. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 12 h em pH 5,0.

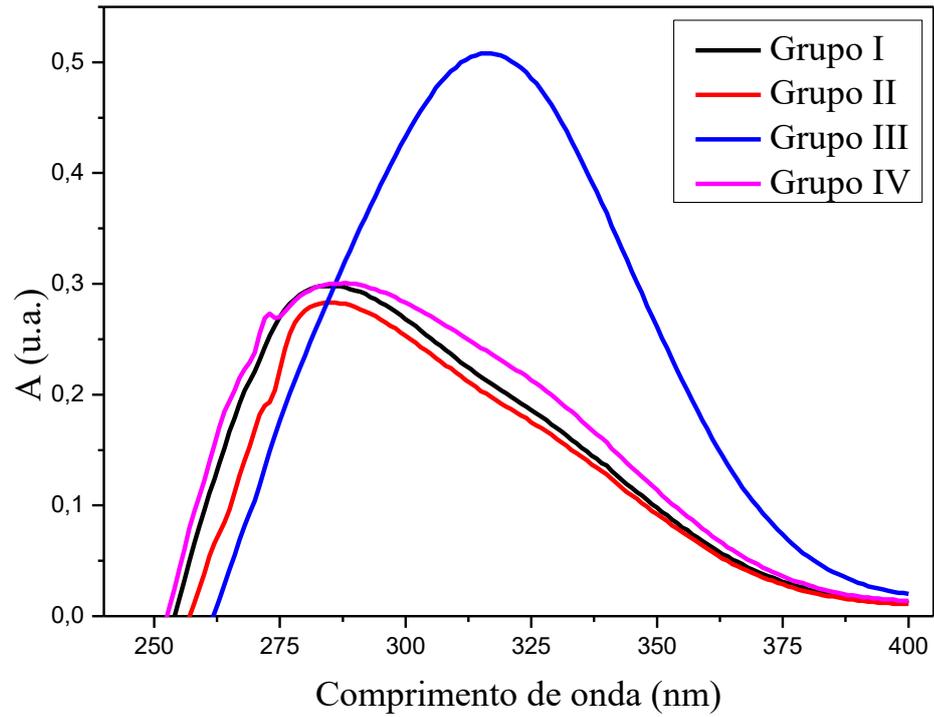


Figura 30. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 24 h em pH 5,0.

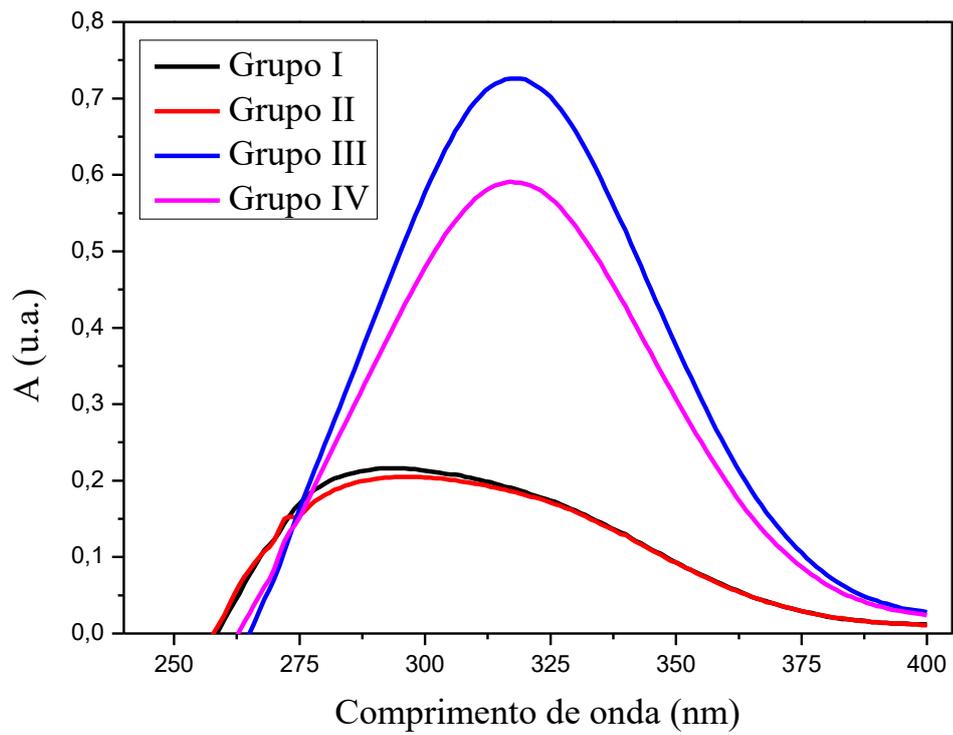


Figura 31. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 3 h em pH 5,5.

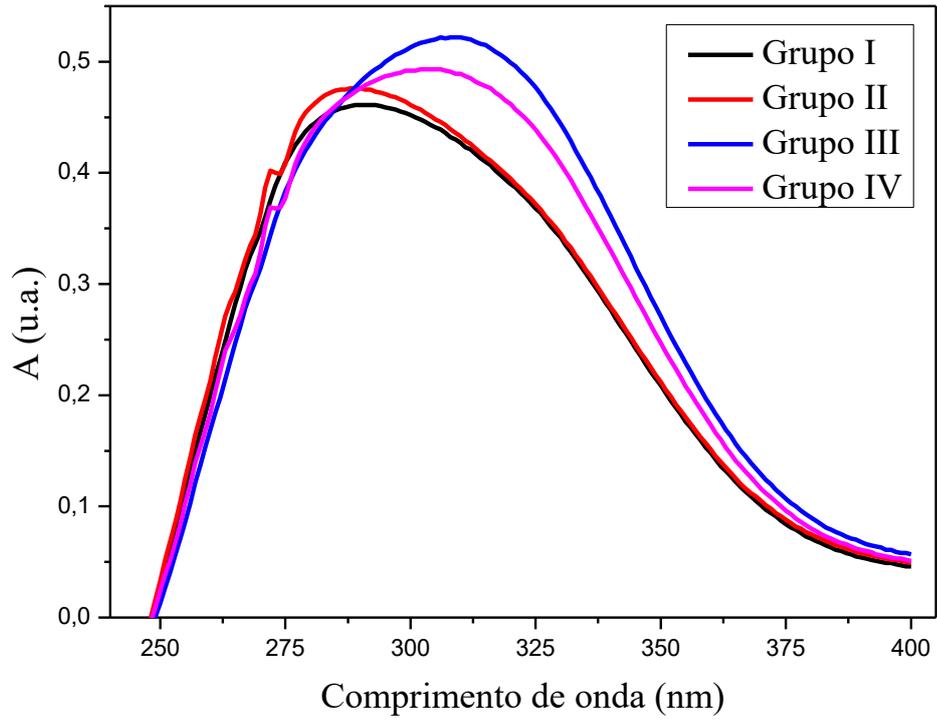


Figura 32. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 6 h em pH 5,5.

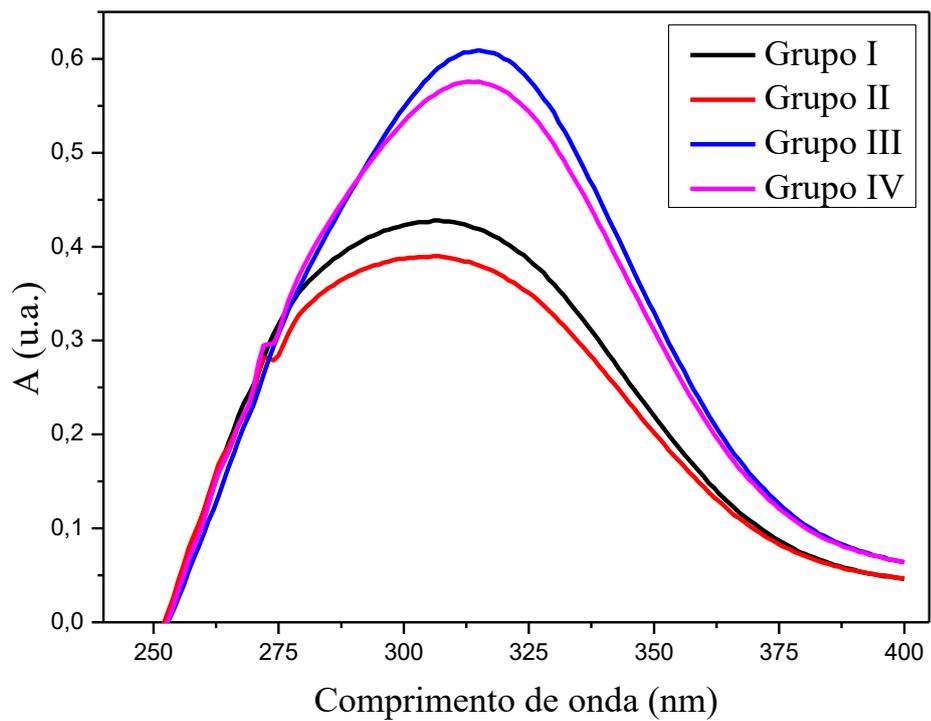


Figura 33. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 12 h em pH 5,5.

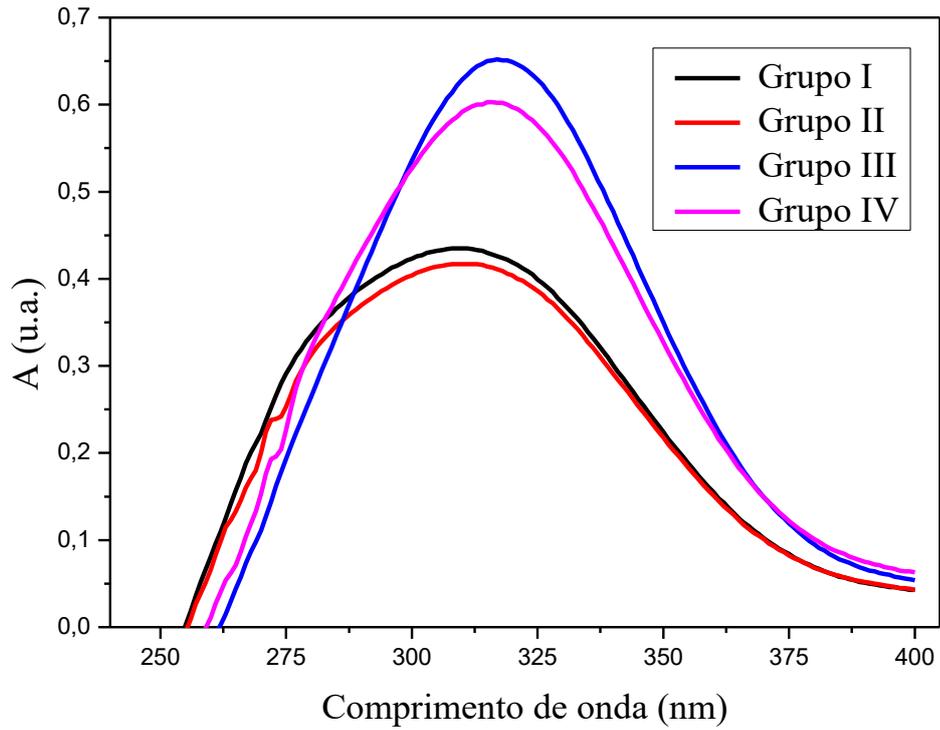


Figura 34. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 24 h em pH 5,5.

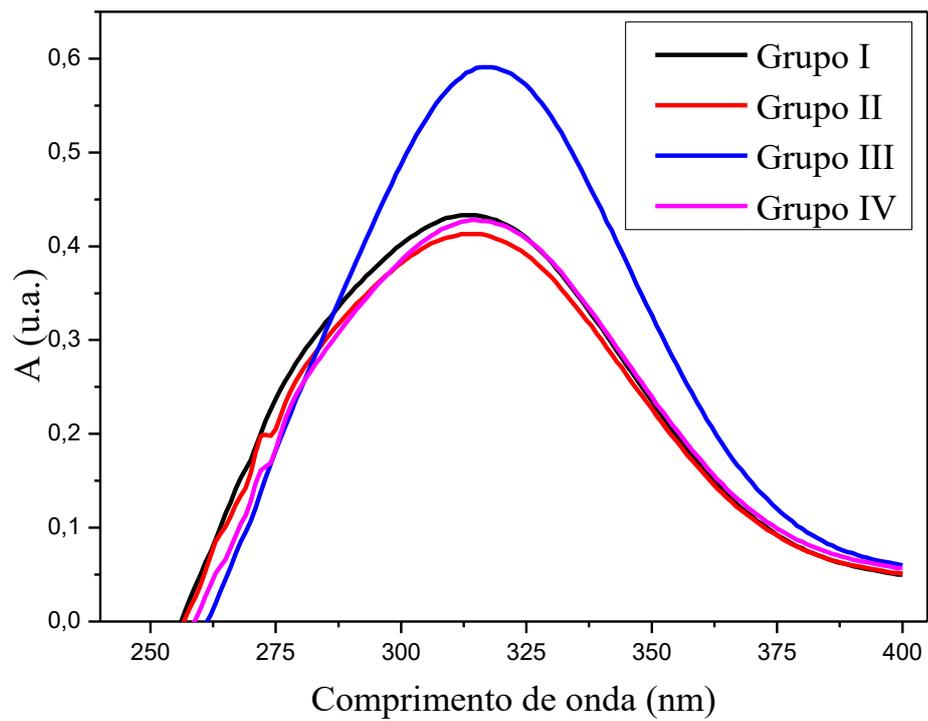


Figura 35. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 3 h em pH 6,0.

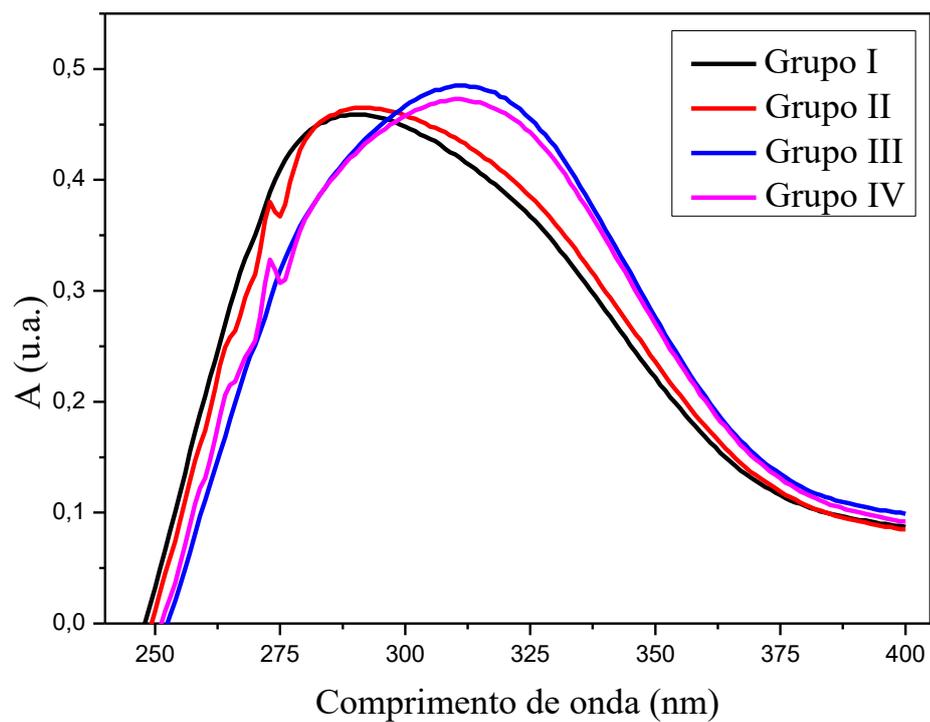


Figura 36. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 6 h em pH 6,0.

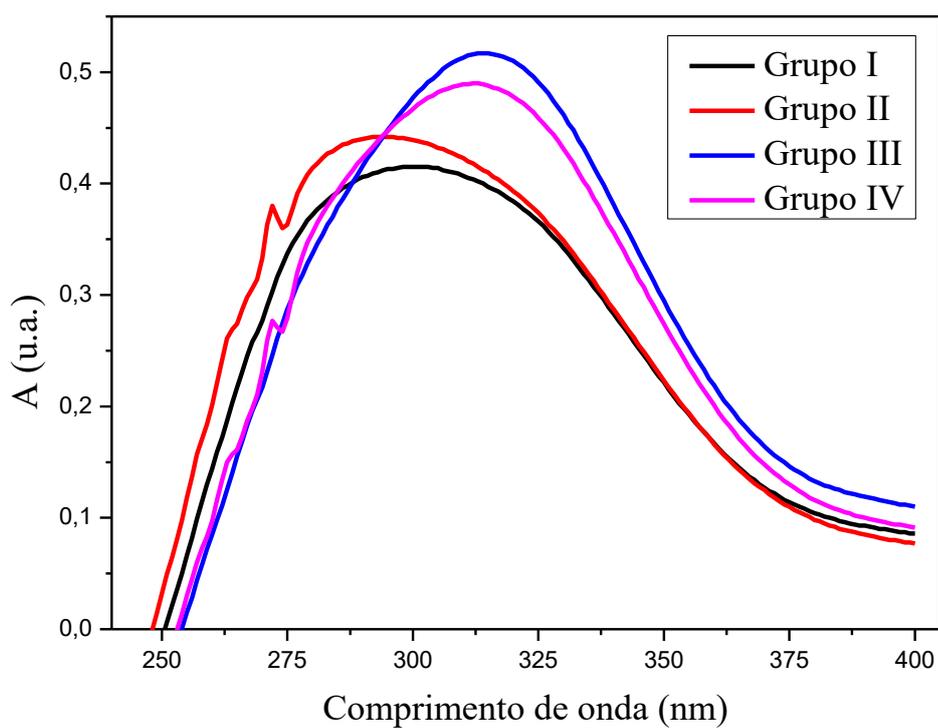


Figura 37. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 12 h em pH 6,0.

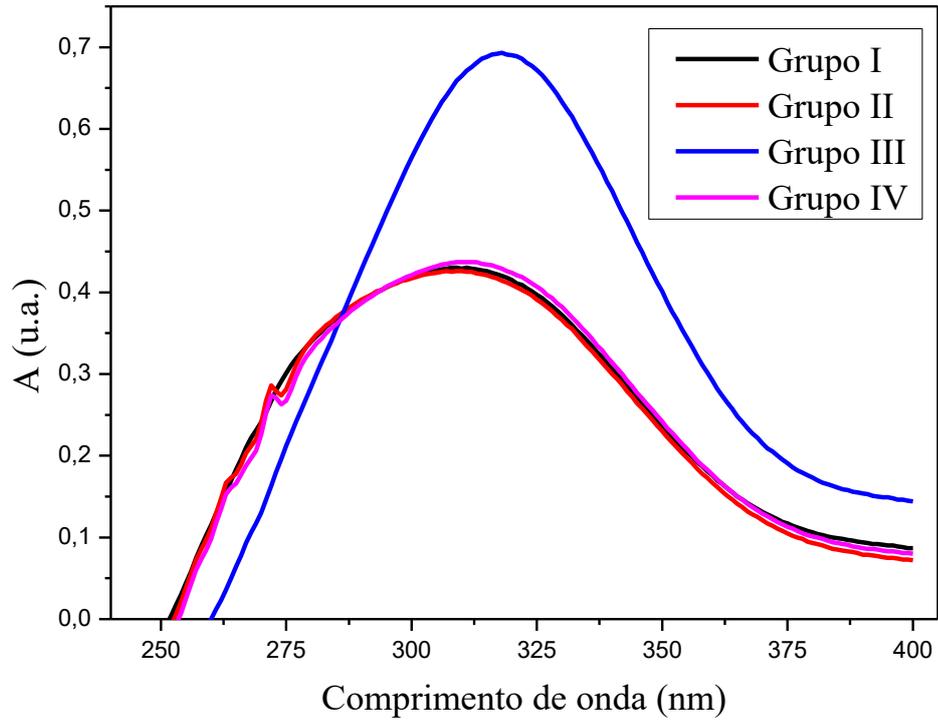


Figura 38. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 24 h em pH 6,0.

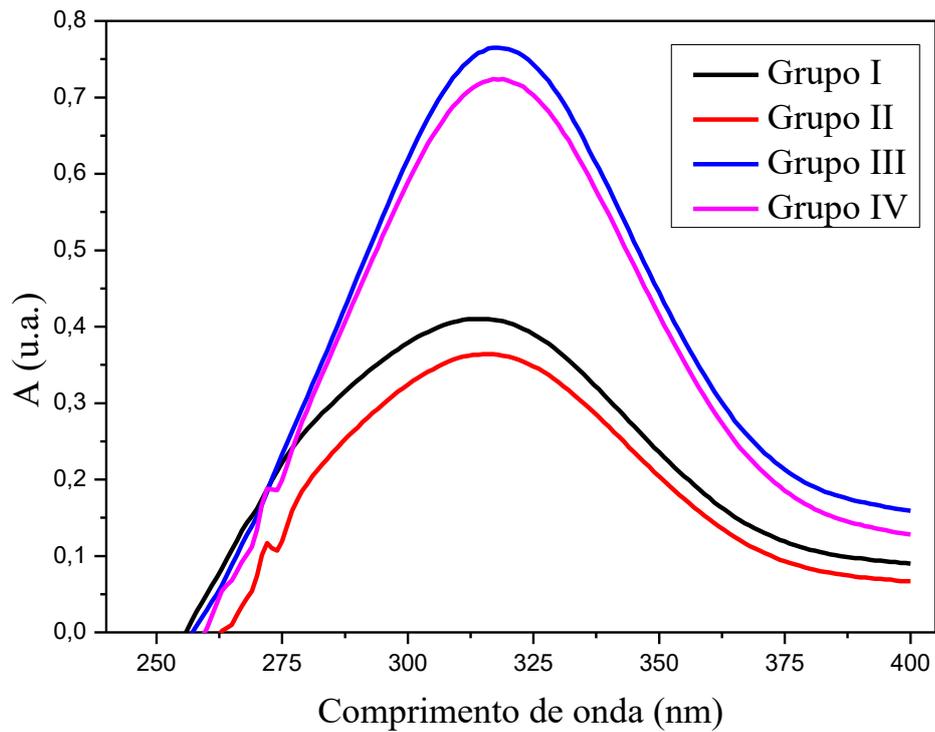


Figura 39. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 3 h em pH 6,5.

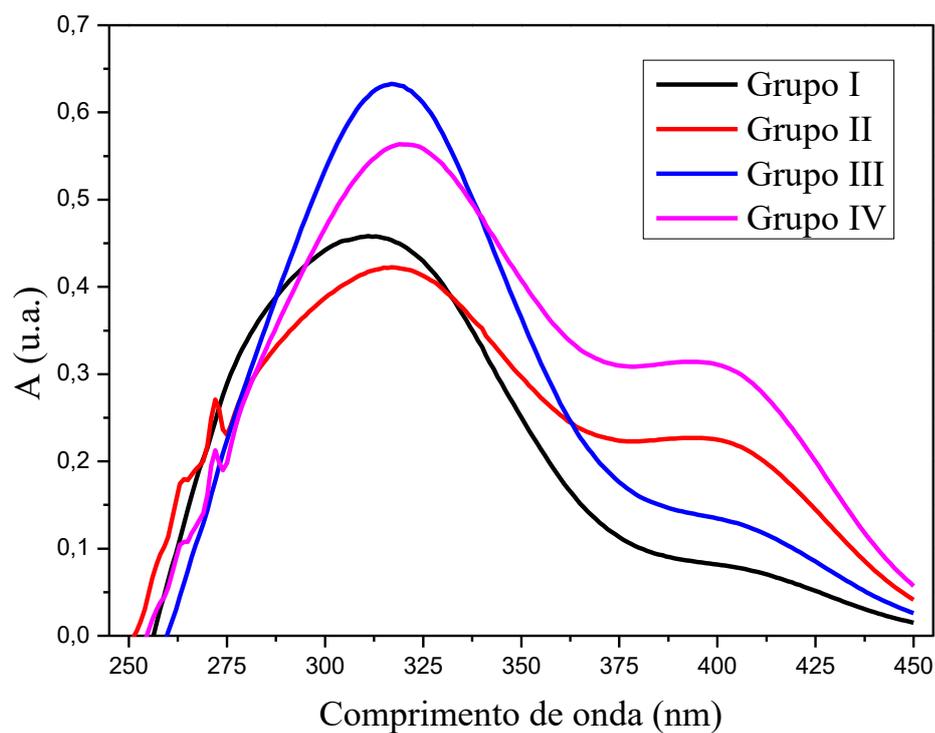


Figura 40. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 6 h em pH 6,5.

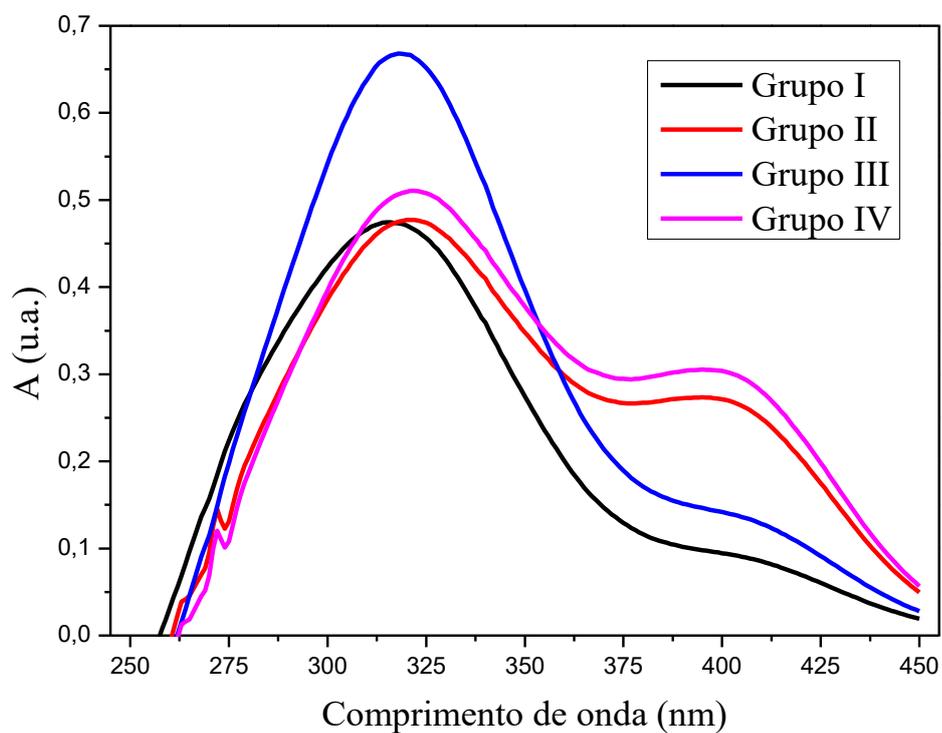


Figura 41. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 12 h em pH 6,5.

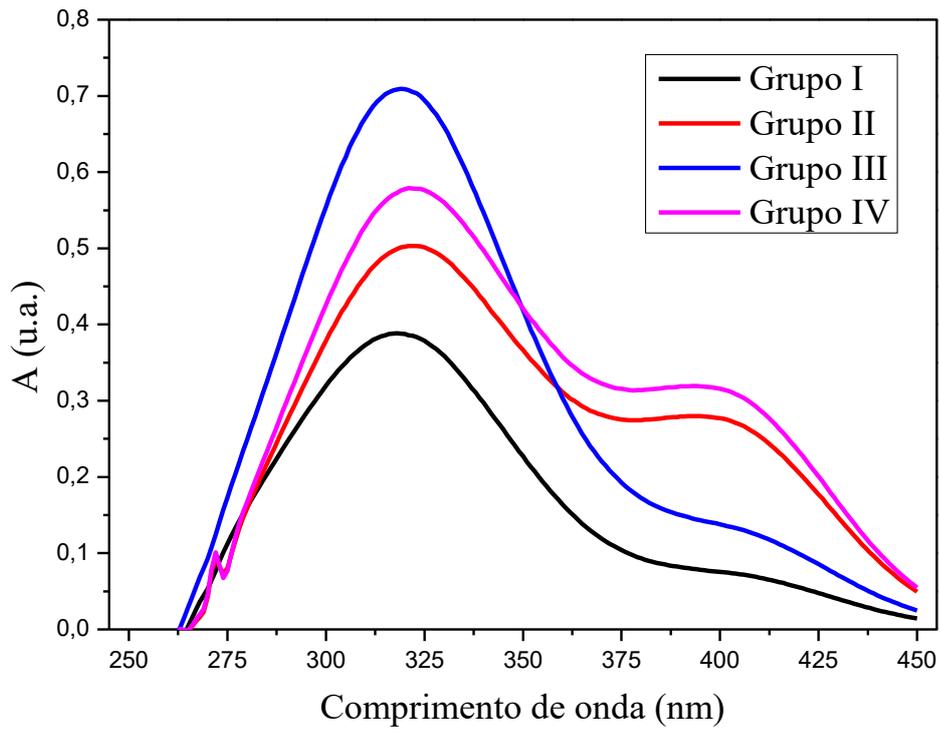


Figura 42. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 24 h em pH 6,5.

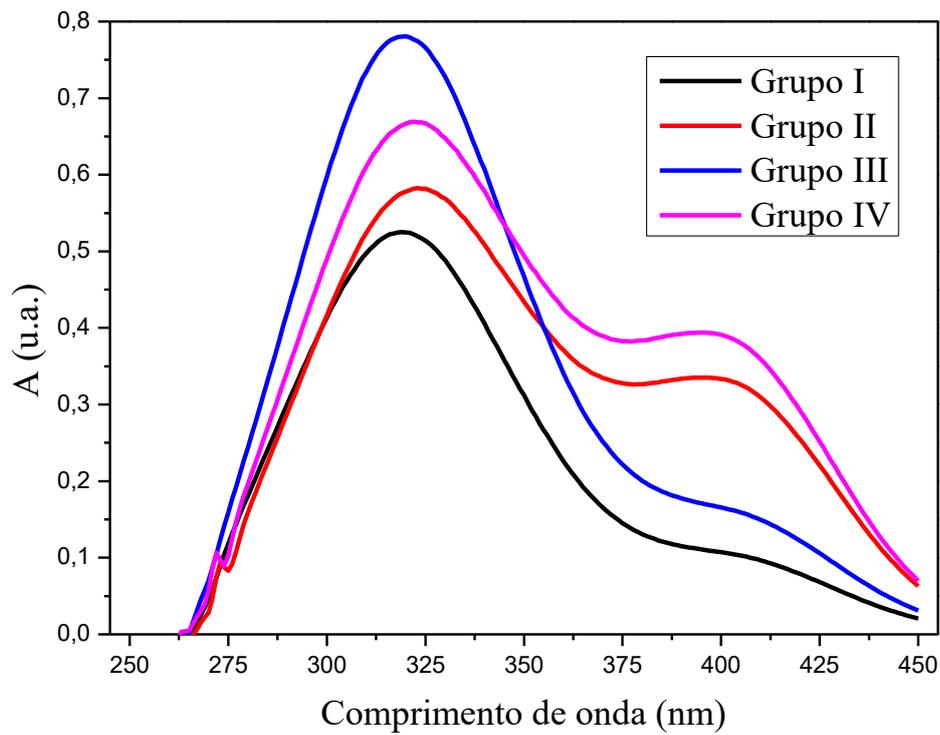


Figura 43. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 3 h em pH 7,0.

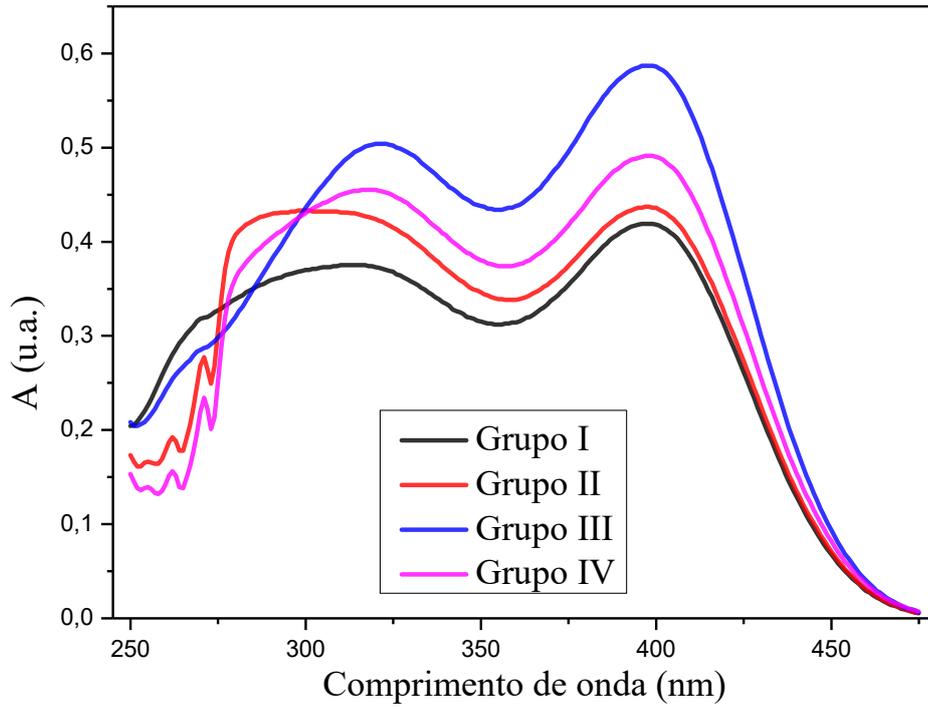


Figura 44. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 6 h em pH 7,0.

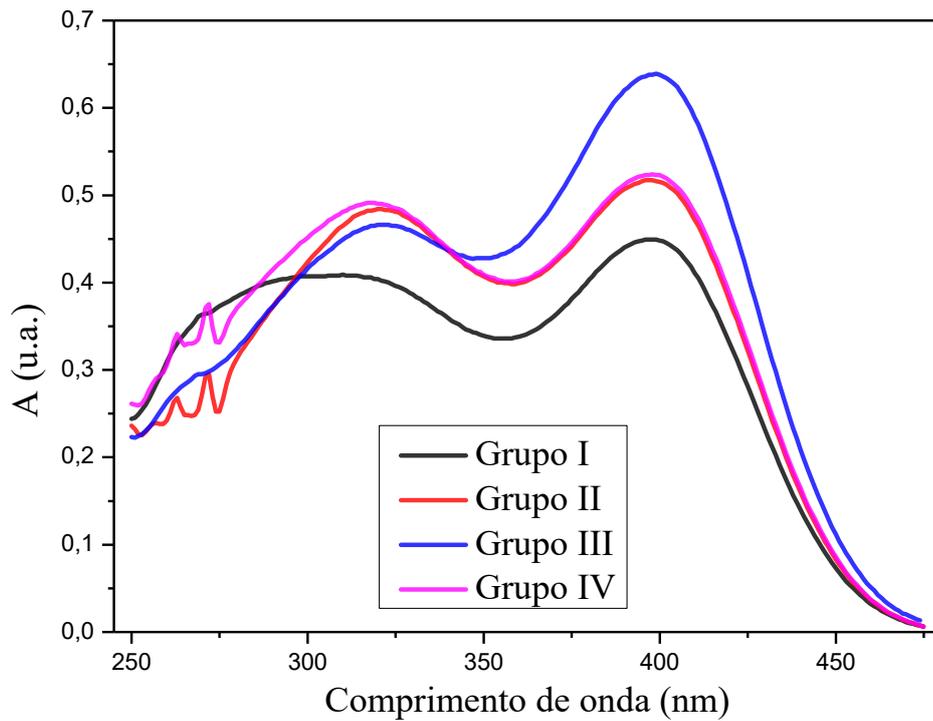


Figura 45. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 12 h em pH 7,0.

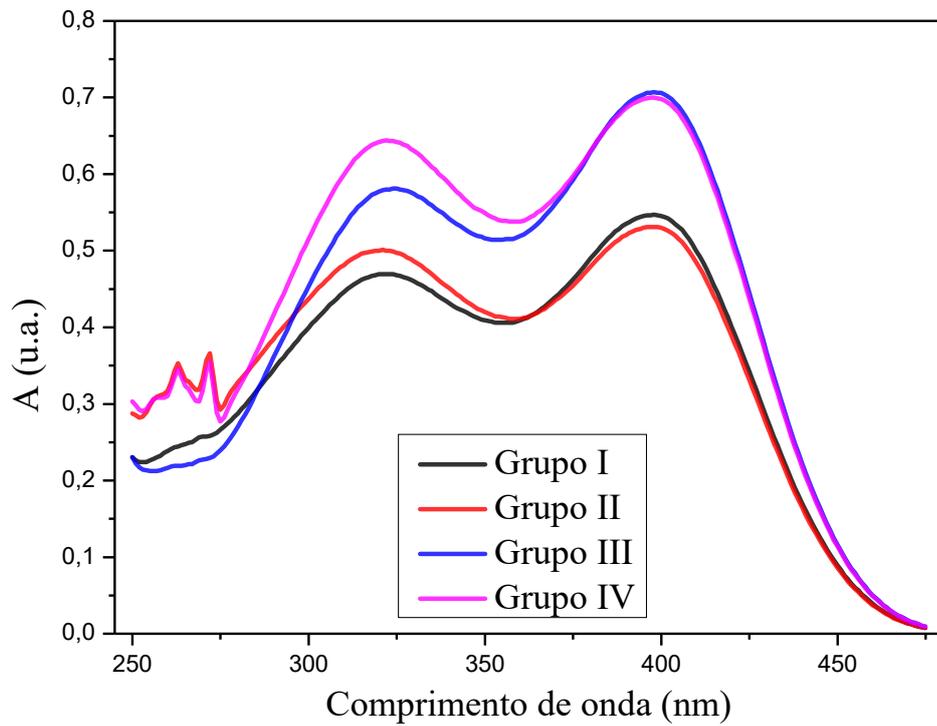


Figura 46. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 24 h em pH 7,0.

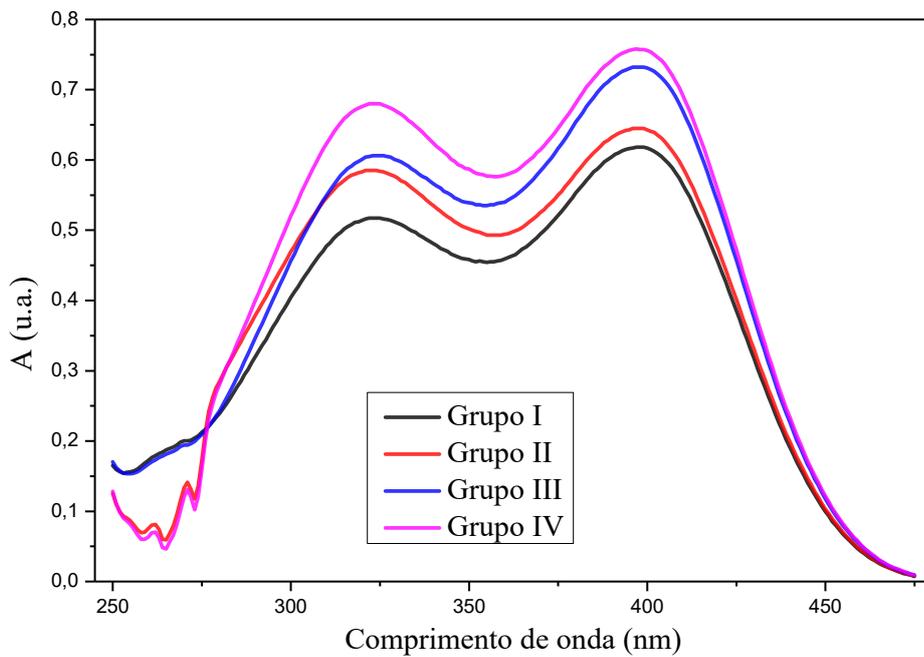


Figura 47. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 3 h em pH 7,4.

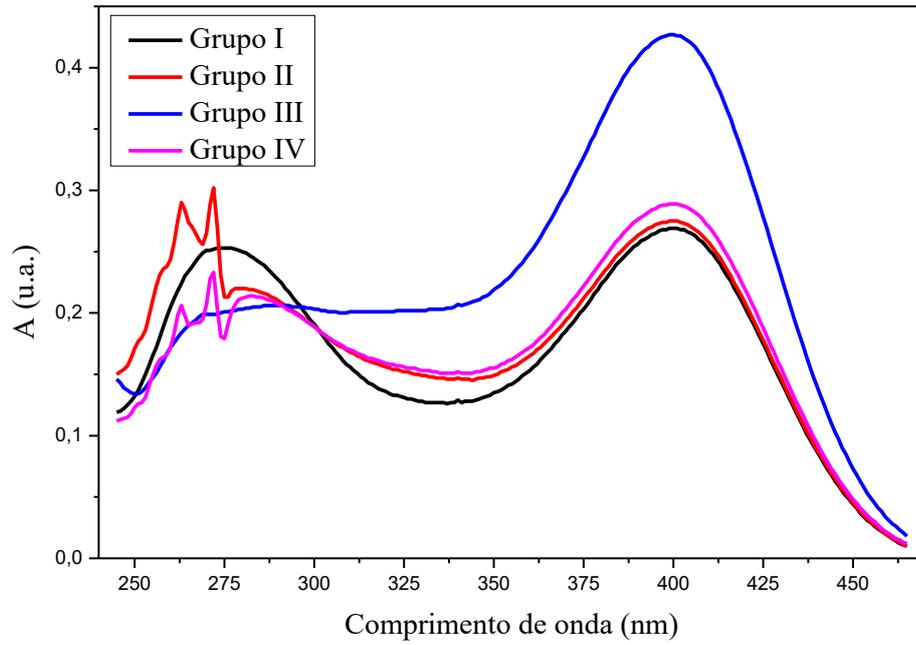


Figura 48. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 6 h em pH 7,4.

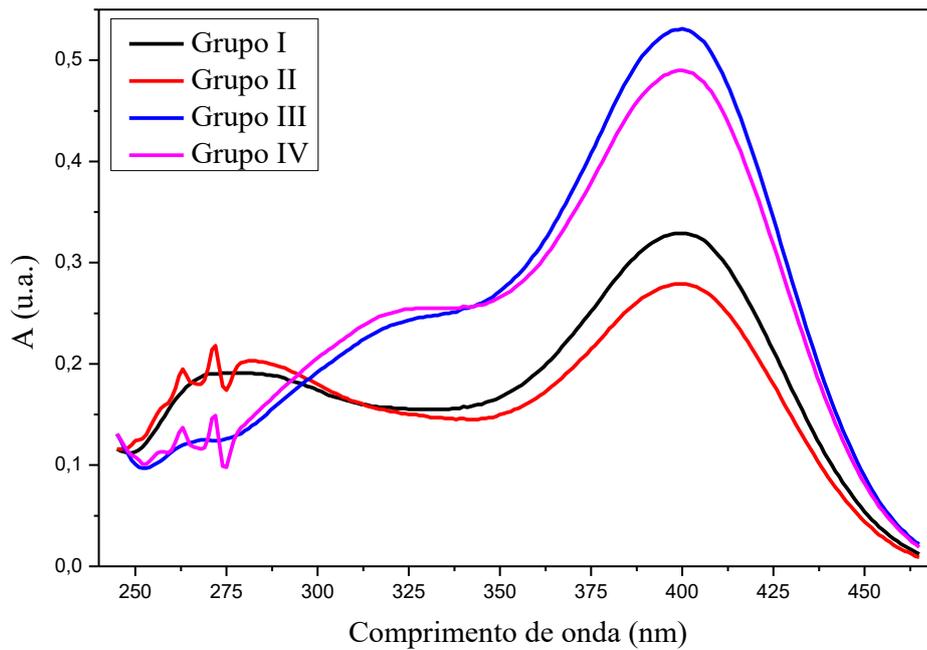


Figura 49. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 12 h em pH 7,4.

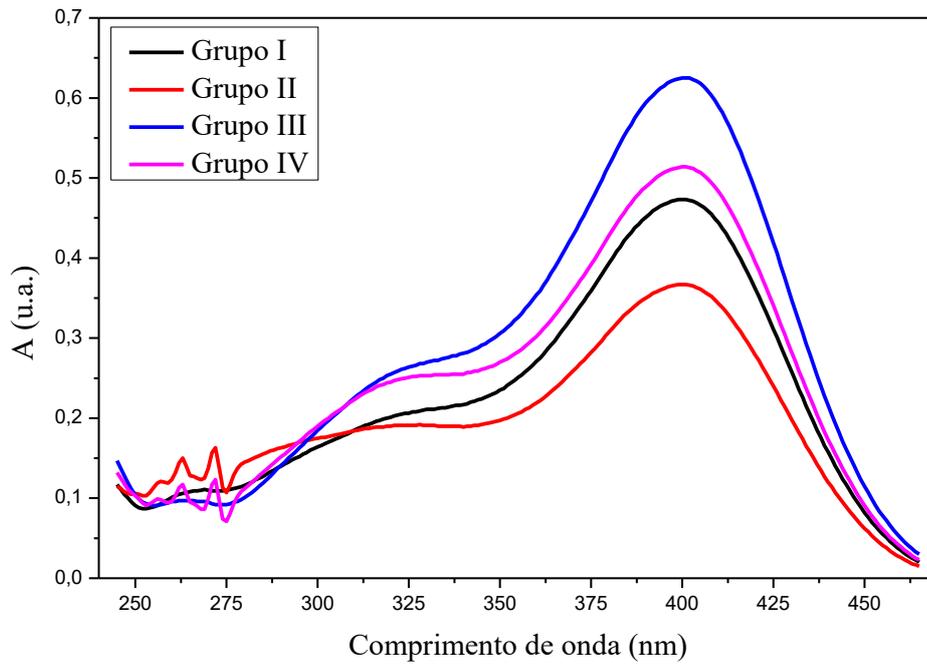
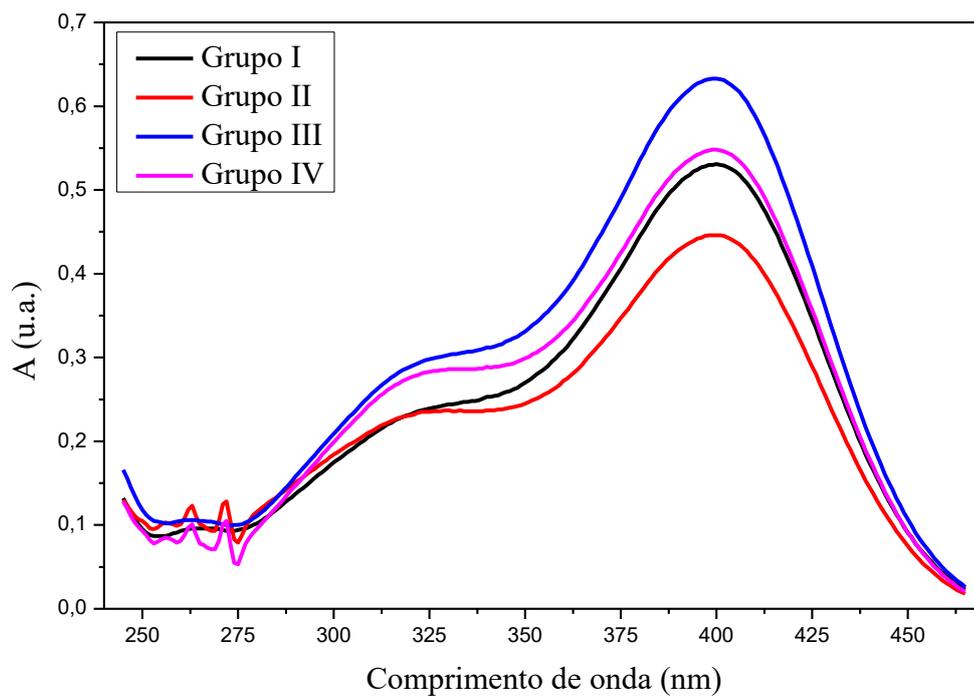


Figura 50. Espectro de absorção dos Grupos I, II, III e IV após 24 h em pH 7,4.



10. APÊNDICE C – Valores em % de detecção de *p*-nitrofenol nos grupos I, II, III e IV.

Tabela 5. Valores em % calculados pela concentração de detecção de *p*-nitrofenol nos grupos I, II, III e IV.^a

			Detecção <i>p</i> -nitrofenol (%)			
Entrada	pH	Tempo	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
1	7,4	3 h	2,54±0,11	2,53±0,40	4,40±0,37	2,74±0,55
2		6 h	3,19±0,03	2,68±0,09	5,19±0,11	4,84±0,11
3		12 h	4,65±0,12	3,60±0,05	6,16±0,13	5,16±0,24
4		24 h	5,38±0,13	4,36±0,09	6,41±0,18	5,62±0,30
5	7,0	3 h	5,51±0,07	5,57±0,09	7,04±0,32	6,83±0,59
6		6 h	5,49±0,11	6,63±0,12	7,90±0,18	6,86±0,30
7		12 h	6,95±0,07	6,59±0,16	8,95±0,23	8,83±0,05
8		24 h	7,99±0,18	8,13±0,01	9,32±0,13	10,06±0,47
9	6,5	3 h	5,22±0,19	4,85±0,20	6,44±0,57	5,78±0,29
10		6 h	5,31±0,24	5,20±0,24	6,99±0,72	6,44±0,38
11		12 h	4,91±0,55	5,76±0,23	7,75±0,23	6,47±0,03
12		24 h	5,95±0,20	6,61±0,09	8,47±0,53	7,40±0,29
13	6,0	3 h	4,34±0,36	4,50±0,40	4,80±0,07	4,83±0,17
14		6 h	3,89±0,04	4,08±0,12	5,18±0,03	5,30±0,43
15		12 h	4,21±0,03	4,21±0,08	6,70±0,55	5,24±1,06
16		24 h	4,22±0,15	3,80±0,19	7,63±0,30	7,61±0,30
17	5,5	3 h	4,32±0,18	3,69±0,39	4,71±0,31	4,75±0,23
18		6 h	3,87±0,15	3,58±0,30	5,33±0,37	5,70±0,23
19		12 h	3,96±0,16	4,25±0,12	6,01±0,16	6,21±0,47
20		24 h	3,95±0,16	3,91±0,11	6,02±0,20	6,43±0,59
21	5,0	3 h	2,47±0,33	2,35±0,08	4,02±0,42	2,28±0,27
22		6 h	2,17±0,28	2,09±0,10	3,62±0,36	4,02±0,51
23		12 h	2,36±0,14	2,17±0,09	5,59±0,97	2,36±0,11
24		24 h	2,19±0,06	1,98±0,03	6,47±0,70	6,17±0,45

^a Dados calculados a partir dos valores de absorbância máxima dos espectros dos grupos I, II, III e IV em tampão fosfato salino e citrato 0,1 mol.L⁻¹ aplicados nas curvas de calibração realizadas nos referidos pHs com o composto *p*-nitrofenol e convertidos em % com o valor de *p*-NFB adicionado (1 mmol.L⁻¹).