

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI



ANA LYGIA DOS SANTOS CÂMARA

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA SOLASODINA
ENCAPSULADA EM NANOCÁPSULAS FURTIVAS**

RECIFE

2013

ANA LYGIA DOS SANTOS CÂMARA

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA SOLASODINA
ENCAPSULADA EM NANOCÁPSULAS FURTIVAS**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências para
a obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Noemia Pereira da Silva Santos

RECIFE

2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Câmara, Ana Lygia dos Santos

Atividade antiproliferativa da solasodina encapsulada em nanocápsulas furtivas / Ana Lygia dos Santos Câmara- Recife: O Autor, 2013.

78 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientadora: Noemia Pereira da Silva Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2013.

Inclui referências e anexos

- 1. Nanotecnologia 2. Agentes antineoplásicos 3. Toxicidade-
testes I. Magalhães, Nereide Stela Santos (orientadora) II. Santos,
Noemia Pereira da Silva (coorientadora) III. Título**

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-245

ANA LYGIA DOS SANTOS CÂMARA

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA SOLASODINA
ENCAPSULADA EM NANOCÁPSULAS FURTIVAS

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em 27 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos (1º EXAMINADORA)

Profa. Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva (2º EXAMINADORA)

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (SUPLENTE)

Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti (SUPLENTE)

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz e Maria pela constante orientação e as minhas irmãs Julia e Camila por todo amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus por não me deixar desistir nos momentos mais difíceis desse trabalho;

Aos meus pais, Luiz e Maria pela constante dedicação e auxílio nas minhas escolhas profissionais e pessoais;

As minhas irmãs por estarem sempre presentes em qualquer momento da minha vida, mesmo que distantes;

A minha avó que sonha em me ver doutora, ao meu tio Jailson que sabe o quanto representa uma titulação e os demais familiares pelo amor infinito;

A minha orientadora Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães pela oportunidade, embora eu tenha caído literalmente do 'céu', agradeço imensamente por isso, pela confiança imposta e por me permitir fazer parte da família SLC. Levarei esse aprendizado para o resto da vida;

A minha co-orientadora Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos por todo empenho em me auxiliar na parte crucial deste trabalho;

A minha colaboradora Dra. Jaqueline Rodrigues por me ajudar a salvar esse projeto aos 45 do segundo tempo. Muito obrigada pela PACIÊNCIA, esforço e empenho realizado nesse projeto. Serei eternamente grata por todo esse aprendizado;

As Profas. Dras. Mariane Lira e Isabella Macário por toda assistência nas partes finais do projeto;

Ao meu aluno de Iniciação científica Victor Passos, por ter sido fundamental na realização dos experimentos, pelo constante auxílio e dedicação;

A Larissa Morgana por todas as experiências compartilhadas nos últimos dois anos em prol da solasodina, levaremos isso para o resto das nossas vidas;

A doutoranda Rafaela Ferraz pela amizade, paciência e todo auxílio prestado na elaboração dessa dissertação. Rafinha, você foi uma 'mãe' de verdade;

Aos que integrantes do Grupo Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos (SLC) e que representa uma grande família para mim. Os meus amigos que estiveram comigo durante os dois últimos anos tanto nos momentos felizes quanto durante as dificuldades: Rafinha, Bella, Mi, Fábio, Cathy, Rebecca, Thiers, Lari Chavis, Katy, Sah, Laércio, Tiago, Camis, Jotinha, Hannahzinha, PHzinho, Miguel, Bárbara, Andreza, Taci, Marcela, Cássia, Laís.

Aos funcionários do LIKA, Rafael e Otaviano pelo auxílio técnico, e Ilma pela amizade e momentos de descontração;

Ao Diretor do LIKA, Prof. Dr. José Luiz pelo suporte estrutural para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Ricardo de Azevedo Bentes por permitir o desenvolvimento de parte deste projeto no Laboratório de Nanobiotecnologia na Universidade de Brasília e por todo auxílio prestado e amizade de seu grupo de pesquisa;

As minhas amigas de pós, as novinhas, que acompanharam todo o processo. Sofremos e vencemos juntas: Pri Salles, Anni, Lou, Ana Felix, Clarinha, Xilvany, Aline, Rafael, Alberto e todos os outros;

Aos amigos pelos incontáveis momentos de descontração e que por mais que não entendessem nada sempre me deram apoio: Ellinha, Karla, Godah, Valzinho, Bibi, Raciny, Didi, Marcela, Thiane, Jessikita e todos os outros;

A FACEPE pelo apoio financeiro, através da bolsa de estudos, durante a elaboração desse trabalho;

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse projeto, a amizade, paciência, momentos de incentivo e amor dedicado a mim. Muito obrigada, vocês foram essenciais!

*“Se existe uma forma de fazer
melhor, descubra-a.”*

Thomas Edison

RESUMO

A solasodina, alcalóide esteroide obtido principalmente de plantas do gênero *Solanum*, pertencente à família *Solanaceae*, que apresenta duas formas glicosiladas: solamargina e solasonina. A potente ação antitumoral da solasodina frente tumores malignos e benignos de pele, é decorrente da presença de uma mistura de glicosídeos presentes na molécula e já vem sendo comercializado como Curadem®. A porção glicosídica, portanto, viabiliza o reconhecimento de receptores de membrana induzindo sua internalização e viabilizando sua ação biológica. As limitações de rendimento na extração dos glicosídeos da solasodina permite a extração da aglicona em maior rendimento. Assim sendo, este trabalho visa o desenvolvimento de um nanosistema mais efetivo na entrega da solasodina e avaliação da ação antiproliferativa frente a diferentes linhagens celulares. Nanocápsulas furtivas contendo solasodina (SSD-NC) foram obtidas pelo método de precipitação de um polímero pré-formado e caracterizadas através da avaliação da morfologia por microscopia eletrônica de varredura, determinação do pH, tamanho médio, índice de polidispersão e carga de superfície de partículas. A atividade antiproliferativa da solasodina nanoencapsulada foi avaliada frente às linhagens celulares NIH 3T3 (fibroblastos normais), 4T1 (câncer de glândula mamária de murino) e MCF-7 (câncer de tumor de mama). A citotoxicidade das SSD-NCs foi determinada pelo método MTT após tratamento de 48 horas, utilizando concentrações de 100 a 0,78 µg/mL de SSD-NC. O mecanismo de morte celular avaliado através da marcação com anexina V e iodeto de propídio, a determinação do potencial de membrana mitocondrial e a fragmentação de DNA das células tratadas com SSD-NC (3,125 e 6,25 µg/mL) foram realizados por citometria de fluxo. As células 4T1 e MCF-7 apresentaram uma redução significativa dose e tempo-dependente na viabilidade, enquanto que as células NIH 3T3 apresentaram citotoxicidade reduzida até concentrações ≥ 25 µg/mL. Os valores de IC₅₀ de SSD-NC nas linhagens 4T1 e MCF-7 foram de 5,31 e 4,14 µg/mL, respectivamente. Aumento na fragmentação do DNA das células 4T1 e na MCF-7 foi observado em função do aumento da concentração de SSD-NC. As células foram marcadas apenas pelo iodeto de propídio, demonstrando perda da permeabilidade da membrana celular, sugerindo necrose como mecanismo de morte celular. A análise do potencial de membrana mitocondrial revelou que o tratamento com SSD-NC induziu alterações na membrana dessas organelas, confirmando os resultados obtidos através do método MTT, onde as células apresentaram alteração em sua viabilidade. Estes achados sugerem que o tratamento das células 4T1 e MCF-7 com SSD-NC induz o processo de necrose associado a severas alterações morfológicas nas células. A encapsulação da solasodina apresentou um potencial efeito antiproliferativo, viabilizando futuros estudo *in vivo* da ação antitumoral.

Palavras-chave: Solasodina. Nanocápsulas furtivas. Citotoxicidade. Mecanismo de morte celular.

ABSTRACT

Solasodine, a steroidal alkaloid obtained mainly from plants of the genus *Solanum* and *Solanaceae* family, is presented in two glycosylated forms: solamargine and solasonine. The potent antitumor action of solasodine against benign and malignant skin tumors is due to the presence of a mixture of glycosides present in its molecular structure, already being marketed as Curaderm®. A glycoside moiety, therefore, enables the recognition of membrane receptors and induces the cellular internalization allowing the biological activity. The extraction yield of solasodine glycosides is limited, but the extraction of aglycone occurs in higher yield. Thus, this study aims to develop and characterize more effective delivery nanosystems of solasodine and evaluate its antiproliferative activity against different cell lines. Stealth nanocapsules containing solasodine (SSD-NC) were obtained by the method of interfacial precipitation of a preformed polymer and characterized through the morphology using scanning electron microscopy, and measurements of pH, particle size, polydispersity and surface charge. The antiproliferative activity of SSD-NC was evaluated against the cell lines NIH 3T3 (normal fibroblasts), 4T1 (murine breast cancer) and MCF-7 (human breast cancer) at concentrations ranging from 25.0 to 0.78 µg/ml. The cytotoxicity of SSD-NC was determined by MTT assay after treatment of cells with concentrations varying from 25 to 0.78 µg/mL for 48 hours. The mechanism of cell death was evaluated by annexin V or propidium iodide staining, the mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation of cells using flow cytometry at the concentrations of 3.125 and 6.25 µg/mL. A significant reduction in the viability of 4T1 and MCF-7 cells was verified in a dose and time-dependent manner, whereas the normal cells NIH 3T3 showed a lower cytotoxicity up to concentrations ≥ 25 µg/mL. IC₅₀ values of solasodine encapsulated against 4T1 and MCF-7 cells were 5.31 and 4.14 µg/mL, respectively. A slight increase in DNA fragmentation of 4T1 and MCF-7 cells was found with the increase in SSD-NC concentrations. Cells were labeled only with propidium iodide, indicating loss of cell membrane permeability and suggesting necrosis as the death mechanism. Analysis of mitochondrial membrane potential showed that the treatment with SSD-NC induces changes in the organelle membranes, confirming the results of the MTT assay, where the cells presented alterations in viability. These findings suggest that treatment of 4T1 and MCF-7 cells with SSD-NC induces necrosis process associated with severe morphological changes. Encapsulation of solasodine presented a potential antiproliferative effect, allowing future in vivo study of antitumor action.

Keywords: Solasodine. Stealth nanocapsules. Cytotoxicity. Cell death mechanism.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: Fases do processo de carcinogênese	20
Figura 2: Incidência do câncer na população brasileira para os anos de 2012 e 2013	21
Figura 3: Vias de ativação da apoptose	23
Figura 4: Morfologia das células apoptóticas e células necróticas	25
Figura 5: Estrutura química da solasodina e suas formas glicosiladas	26
Figura 6: Aspecto macroscópico da solasodina	27
Figura 7: Nanoescala	30
Figura 8: Farmacocinética de sistemas farmacêuticos	31
Figura 9: Diferentes estruturas das nanocápsulas	32
Figura 10: Estrutura química do PEG	34
Figura 11: Métodos empregados na preparação das nanocápsulas poliméricas	36
Figura 12: Estrutura molecular do PLGA	38

ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1: Microscopia Eletrônica de varredura de SSD-NCs	50
Figura 2: Estabilidade a longo prazo da NC1 em 90 dias	51
Figura 3: Curva dose e tempo-dependente das linhagens 4T1 e MCF-7 com diferentes concentrações de SSD-NCs	53
Figura 4: Efeitos de SSD-NCs no potencial mitocondrial de 4T1 e MCF-7	54
Figura 5: Análises da detecção de anexina V e iodeto propídio por citometria de fluxo	55
Figura 6: Efeitos de SSD-NCs no DNA de 4T1 e MCF-7	56

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1: Características diferenciais entre células apoptóticas e células necróticas	24
Tabela 2: Polímeros usados na constituição das nanopartículas	37
Tabela 3: Fármacos encapsulados em nanopartículas de PLGA e nível de estudo	39

ARTIGO CIENTÍFICO

Tabela 1: Características das formulações NC1, NC2, NC3.	49
Tabela 2: Características físico-química e estabilidade acelerada da formulação NC1	51

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

4T1 – Linhagem celular de carcinoma mamário murino

ATCC – *American Type Culture Collection*

AV – Anexina

D.P. – Desvio padrão

DMEM – Dulbecco Modified Eagle Medium (Invitrogen)

IC₅₀ – Concentração do fármaco que inibe 50% da viabilidade celular

IP – Iodeto de propídio

MCF-7 – Linhagem celular de câncer de mama humano

NC-PLGA-PEG – Nanocápsulas furtivas

SSD-NCS – Nanocápsulas furtivas contendo solasodina

NIH 3T3 – Linhagem celular de fibroblasto musculares de ratos

PBS – Tampão fosfato salina

PCS – Espectroscopia de correlação de fótons

PEG – Polietilenoglicol

pH – Potencial hidrogeniônico

PLGA-PEG – Dibloco de copolímero de ácido láctico e glicólico – polietilenoglicol

rpm – Rotação por minuto

SFB – Soro bovino fetal

SFM – Sistema fagocitário mononuclear

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	CÂNCER	18
2.1.1	Aspectos gerais	18
2.2	MORTE CELULAR	20
2.3	SOLASODINA	24
2.3.1	Propriedades físico-químicas da solasodina	24
2.3.2	Propriedades biológicas da solasodina.....	26
2.3.2.1	Atividade antifúngica	26
2.3.2.2	Atividade antiparasitária.....	26
2.3.2.3	Atividade antiinflamatória.....	27
2.3.2.4	Neurogênese	27
2.3.2.5	Atividade citotóxica e antitumoral	27
2.4	NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS.....	28
2.4.1	Sistemas Nanoparticulados	30
2.4.2	Nanocápsulas furtivas	32
2.4.3	Métodos de preparação de nanocápsulas	33
2.4.4	Polímeros utilizados na preparação das nanocápsulas.....	35
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	ARTIGO CIENTÍFICO.....	40
5	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO A – Guide for authors da Biomaterials	67

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), previsões feitas para o ano de 2030 sugerem o aparecimento de 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. Sendo que a maior incidência se dará em países de baixa e média renda (INCA, 2012).

Dentre os tipos de cânceres, o de mama é um dos mais frequentes tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, sendo o responsável pelo maior índice de mortalidade entre as mulheres. As estimativas do INCA para o ano de 2012, e que valem para 2013, indicam o surgimento de mais 53 mil novos casos de câncer de mama no Brasil.

O câncer é ocasionado pela proliferação descontrolada de células levando ao acúmulo e consequentemente a formação de tumores, podendo ou não expandir para tecidos adjacentes provocando metástase. Os processos de proliferação, diferenciação e morte celular são regulados por mecanismos específicos (uma família de fatores de crescimento extracelular) que devem permanecer em equilíbrio. Quando os limites da resposta adaptativa a um estímulo forem ultrapassados ou a adaptação for impossível, a célula entra em processo de morte celular por apoptose ou necrose (ROBBINS et al., 2000). A apoptose é um tipo de morte celular que ocorre de forma organizada e controlada e possui papel fundamental na homeostase dos organismos (KERR et al., 1972). É um processo fisiológico altamente regulado de morte celular desempenhando papel relevante na proteção de organismos contra a carcinogênese (FESIK, 2005; GHOBRIAL et al., 2005; JIN et al., 2005). A necrose é o tipo de morte celular desordenado e não programado iniciado por estímulos ambientais que resultam em rápida desregulação da homeostasia (BRAS et al., 2005).

Apesar das melhorias na quimioterapia, procedimento mais comumente empregado no tratamento do câncer, o agente quimioterápico possui um índice terapêutico estreito e que não permite muitas vezes a administração de uma quantidade suficiente do fármaco para obtenção da eficácia máxima (NIH, 2005). Devido às limitações dos tratamentos, atualmente a comunidade científica tem se empenhado em descobrir moléculas potencialmente efetivas na terapia do câncer e que não induzam efeitos colaterais severos. As plantas tem sido descritas como uma das principais fontes de novas moléculas anticarcinogênicas, dentro desse contexto plantas da família da *Solanaceae* tem atraído interesse (NEWMAN et al., 2007).

A solasodina, $C_{27}H_{43}NO_2$, peso molecular 413,6358 g.mol⁻¹, é um alcaloide esteroidal obtido principalmente de plantas do gênero *Solanum* pertencente à família *Solanaceae*. Os

alcaloides esteroidais são amplamente conhecidos por suas atividades biológicas, uma vez que, provavelmente, atuam como mecanismo de defesa nos organismos que os produzem. Os alcaloides esteroidais e suas formas glicosiladas do gênero *Solanum* são relatados cientificamente por possuírem atividade antifúngica, antiproliferativa, antitumoral, moluscida, teratogênicos e embriotóxica, além de atividade antioxidante. A porção glicosídica viabiliza o reconhecimento de receptores de membrana induzindo sua internalização e viabilizando sua ação biológica. As limitações de rendimento na extração dos glicosídeos da solasodina permite a extração da aglicona em maior rendimento, sendo a encapsulação da solasodina uma alternativa para aumentar sua atividade biológica.

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos. O principal objetivo de uma forma farmacêutica de liberação controlada é, portanto, manter a concentração plasmática constante do fármaco no nível terapêutico, eliminando as variações que geralmente são observadas no decorrer do tratamento com dose subterapêuticas ou efeitos tóxicos da substância ativa. Dentre esses vetores se destacam as nanocápsulas, nanopartículas que apresentam em sua estrutura uma membrana polimérica, com surfactantes lipofílicos e/ou hidrofílicos na interface, e um núcleo oleoso.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi encapsular a solasodina em nanocápsulas furtivas e avaliar sua atividade antiproliferativa frente a linhagens de câncer de mama, 4T1 e MCF-7.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CÂNCER

2.1.1 Aspectos gerais

Para manutenção da vida os processos de proliferação, diferenciação e morte celular são regulados por mecanismos específicos (uma família de fatores de crescimento extracelular) que devem permanecer em equilíbrio. Quando as células começam a se dividir desordenadamente, devido a alguma mutação genética, pode-se originar uma doença maligna, o câncer. Essa patologia é caracterizada pela proliferação desregulada de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo causando metástase. Essa proliferação desordenada deve-se a uma alteração ou danos no material genético das células que são acumulados ao longo do tempo (ROBBINS et al.,2000).

Embora a proliferação desenfreada de células geneticamente modificadas seja a maior característica, o câncer se desenvolve lentamente, podendo demorar anos para a formação de um tumor após a exposição ao agente carcinogênico. Esse processo, denominado carcinogênese, é dividido em três estágios principais: a iniciação, promoção e progressão (Figura 1). A primeira fase da carcinogênese, a iniciação, é caracterizada pela exposição da célula ao agente cancerígeno (composto químico, radiações X ou ultravioleta, vírus), levando a modificação de alguns genes. No estágio da promoção, as células que já tiverem seus genes alterados, sofrem o efeito dos agentes que não são mutagênicos, mas promovem a expansão da população celular com uma mutação inicial de forma gradual e lenta. A terceira fase, progressão, se caracteriza pela proliferação descontrolada e irreversível das células alteradas, formando uma massa tumoral no local. Algumas células podem se desprender dessa massa e atingir a corrente sanguínea, sendo levadas e instaladas em outros tecidos causando a metástase (POLLOCK, 2006).

Figura 1: Fases do processo de carcinogênese. No estágio de iniciação as células sofrem a ação dos agentes carcinogênicos. Na promoção, agentes não mutagênicos promovem a expansão celular das células previamente alteradas geneticamente. O estágio de progressão se caracteriza pela proliferação descontrolada e irreversível das células.



Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2011.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estimou-se que no ano de 2030 pode-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. Sendo que a maior incidência se dará em países de baixa e média renda (INCA, 2012).

Câncer de mama é um dos mais frequentes tipos de cânceres, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, sendo o responsável pelo maior índice de mortalidade entre as mulheres. As estimativas do INCA para o ano de 2012, e que valem para 2013, indicam o surgimento de mais 53 mil novos casos de câncer de mama no Brasil (Figura 2).

Figura 2: Incidência por tipo de câncer na população brasileira para os anos de 2012 e 2013.

Localização primária	casos novos	percentual	Homens	Mulheres	Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%			Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2012

As terapêuticas aplicadas no tratamento de neoplasia as malignas variam entre: procedimentos locais, como cirurgia e radioterapia, e sistêmicas tais como quimioterapia e terapias hormonais (INCA, 2012). Apesar das melhorias na quimioterapia, procedimento mais

comumente empregado no tratamento do câncer, o agente quimioterápico possui um índice terapêutico estreito e que não permite muitas vezes a administração de uma quantidade suficiente do fármaco para obtenção da eficácia máxima. Além disso, esse tratamento possui efeitos colaterais como morte de células sanguíneas, alopecia (queda de cabelo), alterações gastrointestinais (náuseas, vômito e diarreia), perda de apetite e infertilidade (NIH, 2005).

Devido às limitações dos tratamentos, atualmente a comunidade científica tem se empenhado em descobrir moléculas potencialmente efetivas na terapia do câncer e que não induzam efeitos colaterais severos. Cerca de 60% dos fármacos anticâncer utilizados como agentes terapêuticos nas últimas décadas foram desenvolvidas a partir de produtos naturais, dentre eles se destacam a vimblastina (Velban®), a vincristina (Oncovin®) e o paclitaxel (Taxol®) (NEWMAN et al., 2007).

2.2 MORTE CELULAR

O mecanismo de controle da proliferação e diferenciação celular é modulado através de sinais estimulantes ou inibidores que devem permanecer equilíbrio (FOSTER, 2008; MESTER; REDEUILH, 2008). Entretanto, células tumorais perdem a capacidade de regular esses sinais devido a algum dano ou alteração genética, levando a célula a crescer e dividir-se desordenadamente, contribuindo para o desenvolvimento dos tumores. Quando os limites da resposta adaptativa a um estímulo forem ultrapassados ou a adaptação for impossível, a célula entra em processo de morte celular por apoptose ou necrose (BAYLY et al., 1997; COTRAN, et al., 2000; KUWANA; NEWMYER; 2003 FOSTER, 2008).

A apoptose é um tipo de morte celular que ocorre de forma organizada e controlada e possui papel fundamental na homeostase dos organismos (KERR et al., 1972). É um processo fisiológico altamente regulado de morte celular desempenhando papel relevante na proteção de organismos contra a carcinogênese (FESIK, 2005; GHOBRIAL et al., 2005; JIN et al., 2005).

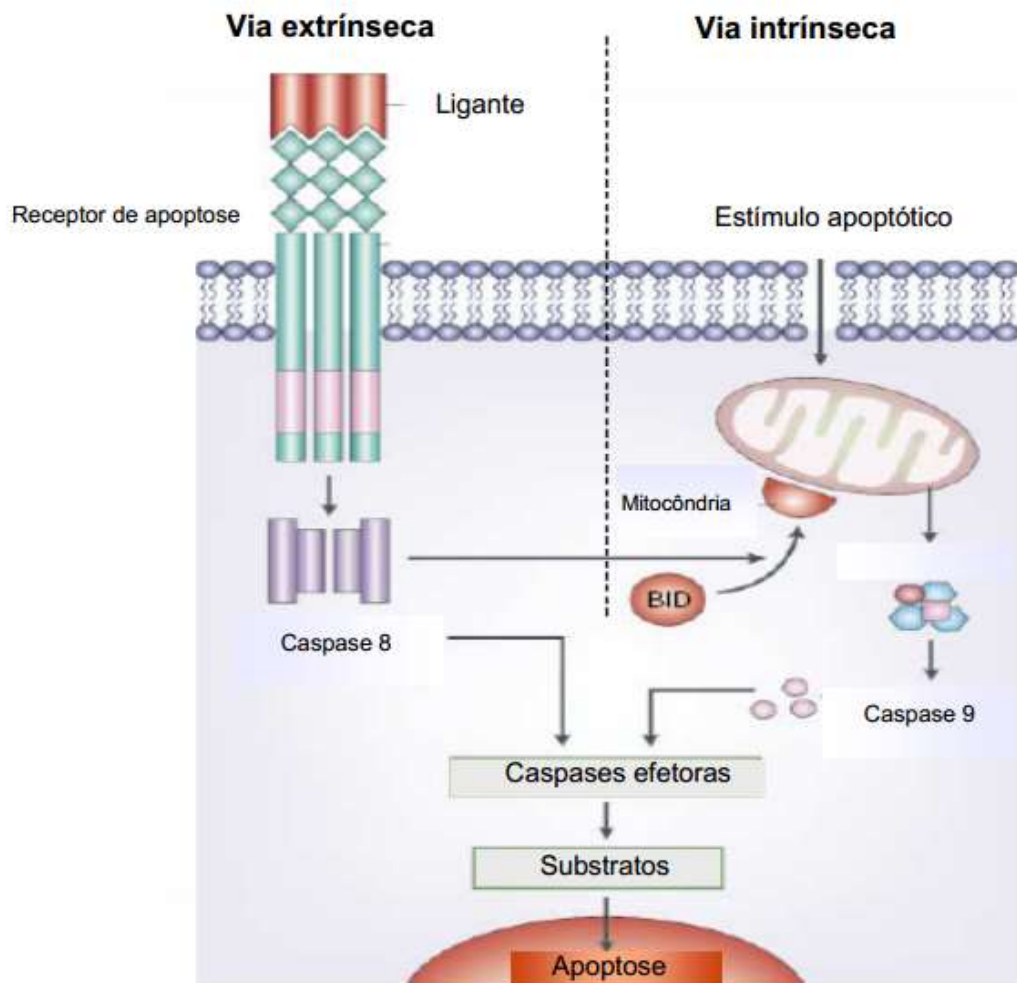
O processo de apoptose é caracterizado por diversas alterações morfológicas e bioquímicas das células como perda do volume, condensação da cromatina levando a aparência de núcleos picnóticos, alterações no citoesqueleto que induzem contração celular, formação de corpos apoptóticos (fragmentos celulares envoltos por membrana plasmática) e degradação do DNA. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos desencadeando uma resposta inflamatória (LAVIN, 1993; MAJNO et al., 1995; YASUHARA et al., 2003; LIAO et al., 2005). Ocorre também a fragmentação de organelas como complexo de Golgi, retículo endoplasmático e mitocôndrias (FRANK et al., 2001; LANE et al., 2002). Essas

alterações morfológicas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (SARASTE; PULKKI, 2000).

As capazes pertencem a família das cisteínas proteases (possuem uma cisteína no sítio ativo) e são as principais enzimas participantes na ativação do processo de apoptose (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997). Essas proteínas são sintetizadas na forma de zimogênios praticamente inativos e quando ativadas após um sinal de morte celular, elas clivam substratos vitais das células causando as alterações bioquímicas e morfológicas características desse processo de morte celular (GHOBRIAL et al., 2005).

A ativação da apoptose pode ser iniciada por duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é desencadeada pela interação de ligantes específicos a um grupo de receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF) localizados na superfície da membrana plasmática iniciando a ativação de caspases (BUDIHARDJO et al., 1999). A via intrínseca é ativada após alterações funcionais e/ou estruturais ocorridas na mitocôndria desencadeando a liberação de moléculas sinalizadoras responsáveis por ativar as caspases (IGNEY et al., 2002)(Figura 3).

Figura 3: Representação das vias de ativação da apoptose.



Fonte: Adaptado de IGNEY et al., 2002.

Uma das alterações morfológicas das células apoptóticas é a exposição da fosfatidilserina A na face externa da membrana plasmática. A fosfatidilserina é um fosfolípide encontrado na face interna da membrana de células viáveis e, quando externalizada em células em processo de apoptose, serve tanto para o reconhecimento e remoção de corpos apoptóticos por fagócitos como também proporciona um local de ligação para a proteína anexina V (FADOK et al.,1992). A anexina V tem a capacidade de se ligar fortemente aos fosfolípides de membrana plasmática sendo essa ligação uma forte evidência da fase precoce da apoptose (MOCHIZUKI et al.,2003; MOSS & MORGAN, 2004).

A necrose é o tipo de morte celular desordenado e não programado iniciado por estímulos ambientais que resultam em rápida desregulação da homeostasia (BRAS et al.,2005).

Entre as características básicas desse processo inclui o aumento do volume celular, dilatação das mitocôndrias e do retículo plasmático, desagregação dos ribossomos, hidrólise do DNA e perda da integridade de membranas, inclusive dos lisossomos (KOMATSU, 1995;

KUMAR et al.,2005)(Figura 4). A alteração na permeabilidade da membrana, por diminuição nos níveis de ATP, compromete a bomba de Na^+/K^+ e de outros fenômenos que são ATP-dependentes (TRUMP et al.,1997). Com o rompimento das organelas e da membrana plasmática há a liberação de componentes intracelulares o que leva a uma reação inflamatória local (KERR et al.,1995; BOUJRAD et al.,2007).

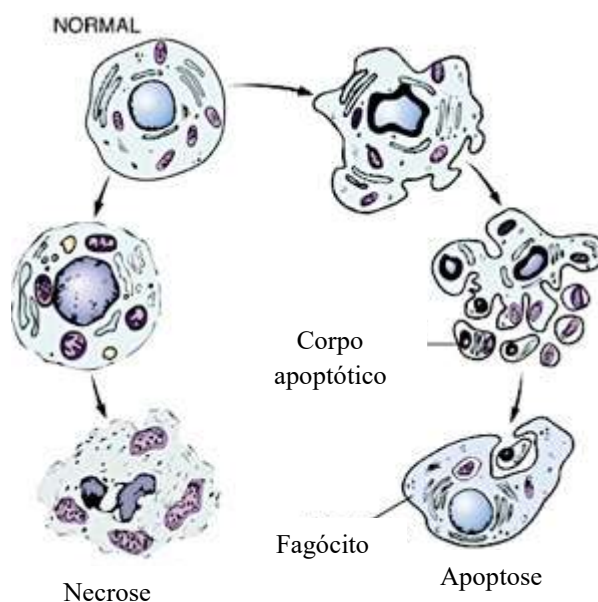
Ocorre a também digestão aleatória do DNA, a cromatina não se remodela, a membrana plasmática perde sua integridade e a célula entra em citólise imediata, sendo esse o estágio final da declínio celular e característica básica no processo de necrose (SARASTE & PULKKI, 2000; JEFFREY, 2000; MELLO et al.,2001; HAIL et al.,2006). A necrose é controlada pela interação de diferentes vias de sinalização (FESTJENS et al, 2006; GOLSTEIN & KROEMER, 2007). Dentre elas, através da proteína que interage com o receptor de morte (RIP), bem como o fator 2 associado ao receptor de TNF (HOLLER et al.,2000; LIN et al.,2004). Outra via está associada a ativação da poli-ADP-ribose polimerase que reduz a produção de ATP em células com DNA danificado (ZONG et al.,2004) (Tabela 1). Os estudos que investigam os mecanismos de morte celular são de extrema importância para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos.

Tabela 1: Características diferenciais entre células apoptóticas e células necróticas. Adaptado de ITO & OTSUKI, 1998.

	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS
APOPTOSE	Redução do volume citoplasmático	Processo regulado pela ativação das caspases	Geralmente induzida por estímulos fisiológicos
	Alteração na orientação dos fosfolípides na membrana plasmática	Digestão não aleatória do DNA	Fagocitose por células adjacentes ou macrófagos
	Formação de corpos apoptóticos	Dependente de ATP	Não induz resposta inflamatória
NECROSE	Aumento de tamanho celular	Regulado pela interação de diferentes vias de sinalização	Geralmente induzida por estímulo patológicos
	Perda da integridade da membrana	Digestão aleatória do DNA	Fagocitose por macrófagos

	Inchaço e lise celular	Não requer energia	Induz resposta inflamatória
--	------------------------	--------------------	-----------------------------

Figura 4: Morfologia das células apoptóticas e células necróticas.



Fonte: Adaptado de VIOLA, 2004.

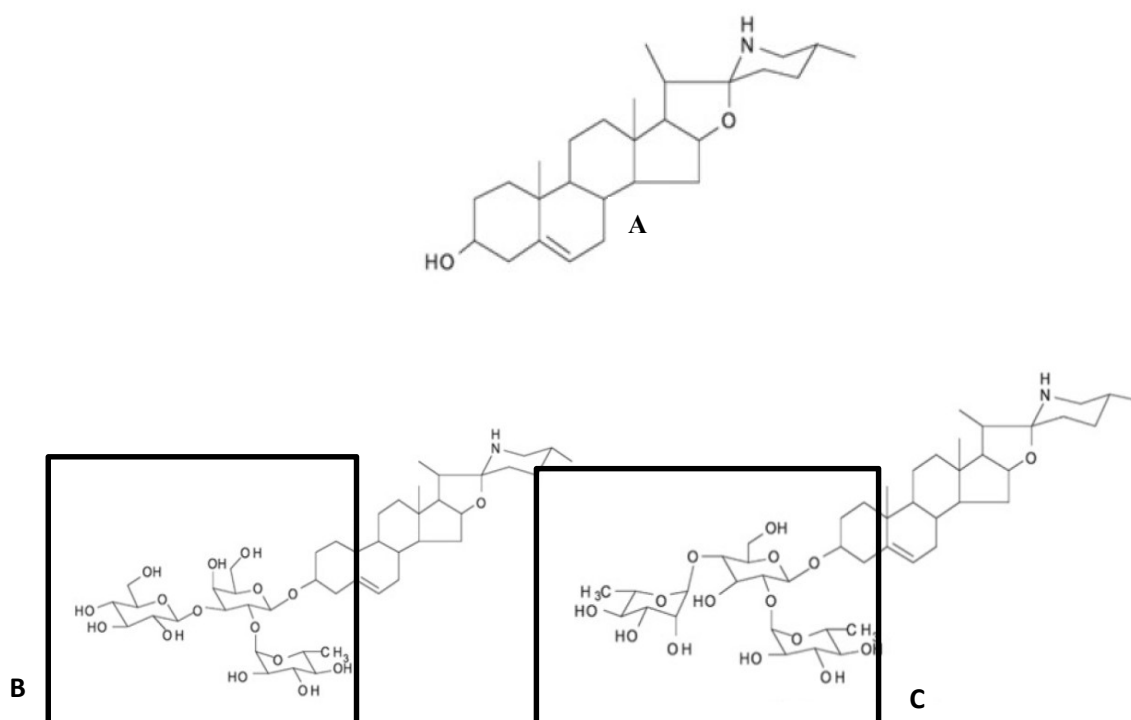
2.3 SOLASODINA

2.3.1 Propriedades físico-químicas da solasodina

A solasodina, (1S, 2S, 4S, 5'R, 6R, 7S, 8R, 9S, 12S, 13R, 16S) - 5',7,9,13-tetrametil-5-oxaspiro[ciclopentano[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]icosano-6,2'-piperidin]-18-en-16-ol, C₂₇H₄₃NO₂, peso molecular 413,6358 g.mol⁻¹, é um alcaloide esteroidal obtido principalmente de plantas do gênero *Solanum* pertencente à família *Solanaceae* que apresenta duas formas glicosiladas: a solamargina e a solasonina.

A solasonina apresenta uma molécula de galactose ligada a Ramnose e a glicose, enquanto a solamargina apresenta uma molécula de glicose ligada a outras duas de ramnose. (Figura 5).

Figura 5: Estrutura química da solasodina (a) e suas formas glicosiladas solasonina (b) e solamargina (c) (RIPPERGER, 1995).



Fonte: RIPPERGER, 1995.

A solasodina possui um coeficiente de partição de 4,6 o que explica a sua alta solubilidade em solventes orgânicos como benzeno, piridina e clorofórmio e sua baixa solubilidade em metanol, acetona e etanol. Seu caráter lipofílico pode ser evidenciado pela presença do núcleo esteroidal na sua estrutura. Entretanto, assim como algumas classes de alcaloides, em pH ácido o grupo amino é protonado formando um sal solúvel em água. A solasodina apresenta-se na forma cristalina com coloração branca (figura 6).

Figura 6: Aspecto macroscópico da solasodina em forma de pó com coloração branca.



2.3.2 Propriedades biológicas da solasodina

Os alcaloides esteroidais são amplamente conhecidos por suas atividades biológicas, uma vez que, provavelmente, atuam como mecanismo de defesa nos organismos que os produzem contra herbivoria e outras defesas interespecies. Assim, estudos científicos vêm sendo desenvolvidos a fim de avaliar o poder farmacológico dessas substâncias. Os alcaloides esteroidais e suas formas glicosiladas do gênero *Solanum* são relatados cientificamente por possuírem atividade antifúngica, moluluscida, teratogênicos e embriotóxica, além de atividade antioxidante (ESTEVES-SOUZA et al.,2012).

2.3.2.1 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica da solasodina foi demonstrada através da inibição dose-dependente do fungo *Phytophthora cactorum*, causador de várias doenças em plantas (NES, et al.,1982). A aglicona solasodina foi reportada como agente fungistático (SEGAL; SCHLOSSER, 1975; SINDEN et al.,1973). Em 1983, Rowan e colaboradores observaram inibição no crescimento de 35% de *Colletotrichum gloeosporioide*, considerado um dos maiores patógenos de plantas do mundo, causada pela solasodina na concentração de 25 µg/mL.

2.3.2.2 Atividade antiparasitária

Chataing e colaboradores (1998) testaram heterosídeos alcaloídicos extraídos de uma espécie do gênero *Solanum*, sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de duas diferentes

cepas de *Trypanosoma cruzi* e relataram que os glicoalcalóides possuem uma maior atividade inibitória quando comparados a aglicona solasodina. Também foi demonstrado que a solasonina requer uma maior concentração para induzir efeito inibitório de crescimento nas cepas em relação a solamargina. Udalova e colaboradores (1994) demonstraram a importância da porção de carboidrato ramnose na toxicidade contra nematoides fitoparasitas. A atividade leishmanicida foi reportada por Miranda e colaboradores em 2012, afirmando que a solasodina apresentou valores de CI_{50} muito altos para atividade avaliada e que os glicosídeos (solasonina e solamargina) demonstraram ser mais ativas contra a leishmania em relação ao controle positivo (cetoconazol). De acordo com Mcconville e Ferguson (1993), isso pode estar ligado a necessidade de algum tipo de açúcar para ocorrer atividade.

2.3.2.3 Atividade antiinflamatória

A atividade antiinflamatória foi investigada em um estudo realizado por Emmanuel e colaboradores em 2006. A solasodina mostrou atividade contra edemas induzidos em ratos por carragenina. A carragenina é um extrato solúvel em água utilizada em modelos animais de inflamação para testes de fármacos analgésicos, que quando injetada por via subcutânea provoca inchaço e dor. A solasodina reduziu em 13,9 a 44,7% o processo de reação inflamatória em função do tempo de tratamento.

2.3.2.4 Neurogênese

Lecanu e colaboradores (2011) estudaram a indução de neurogênese *in vivo* e *in vitro* em duas espécies de animais diferentes (ratos e camundongos). A solasodina exibiu propriedades neurogênicas, induzindo as células P19 (teratocarcinoma), NT2 (células precursoras) e PC12 (feocromocitoma) a se diferenciar em neurônios na concentração de 90 μ M. Além disso, induziu a formação de axônios nas células P19 e demonstrou *in vivo* propriedades proliferativas e diferenciação em progenitores neuronais.

2.3.2.5 Atividade citotóxica e antitumoral

Já tem sido demonstrado que é a mistura padrão das formas glicosiladas da solasodina (33% solasonina + 33% solamargina + 34% de di e monoglicosídeos) que apresentam atividade citotóxica significativa contra uma variedade de linhagens de células cancerosas, incluindo células leucêmicas humanas e células 1547 de osteosarcoma humano, através da indução de apoptose (VIJAYAN *et al.*,2002; TROUILLAS *et al.*,2004; ONO *et al.*,2006). A atividade antitumoral da solasodina foi comprovada também em camundongos utilizando modelos experimentais de tumores ascíticos: sarcoma 180 (S-180). Um aumento significativo da sobrevida dos animais e inibição do tumor foi observado (CHAM *et al.*,1987). Além disso, Cham e colaboradores também demonstraram, em 1991, que um creme formulado com altas concentrações da mistura padrão dos glicosídeos (10%) apresentou resultados efetivos no tratamento de tumores de pele benignos e malignos. Além disso, foi demonstrado que em baixas concentrações (0,005%), o tratamento foi eficiente para outros tipos de câncer de pele, sendo que a mistura glicosilada de solasodina não apresentou efeitos adversos sobre o fígado, rins ou sistema hematopoiético.

A alta atividade das formas glicosilada da solasodina está relacionada à expressão elevada da proteína ligadora da ramnose na membrana plasmática de células cancerígenas, em relação às células saudáveis. Após a internalização, a solasodina glicosilada induz a apoptose celular através da expressão de receptores externos, como o receptor do fator de necrose I, TNFR-1 (CHAM *et al.*,2011).

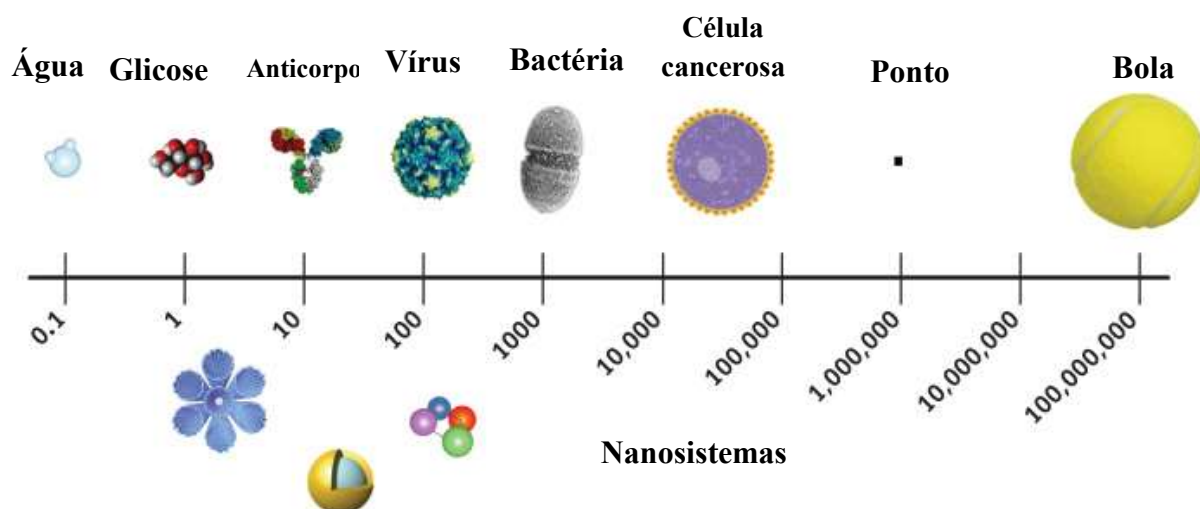
2.4 NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

A nanotecnologia pode ser definida como uma tecnologia que tem permitido controlar, manipular, estudar as estruturas em tamanho nanométricos 0,1 a 1000 nm (Figura 7). O amplo desenvolvimento de tecnologias em escala nanométrica está mudando o meio científico em termos de diagnóstico de doenças, tratamento e prevenção. Esta inovação tecnológica tem sido referida como nanomedicina pelo Instituto Nacional de Saúde e tem o potencial para transformar as descobertas moleculares decorrentes da genômica e proteômica em benefício para a saúde de pacientes (SINGH, 2009).

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica

ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos (SAKATA et al.,2007).

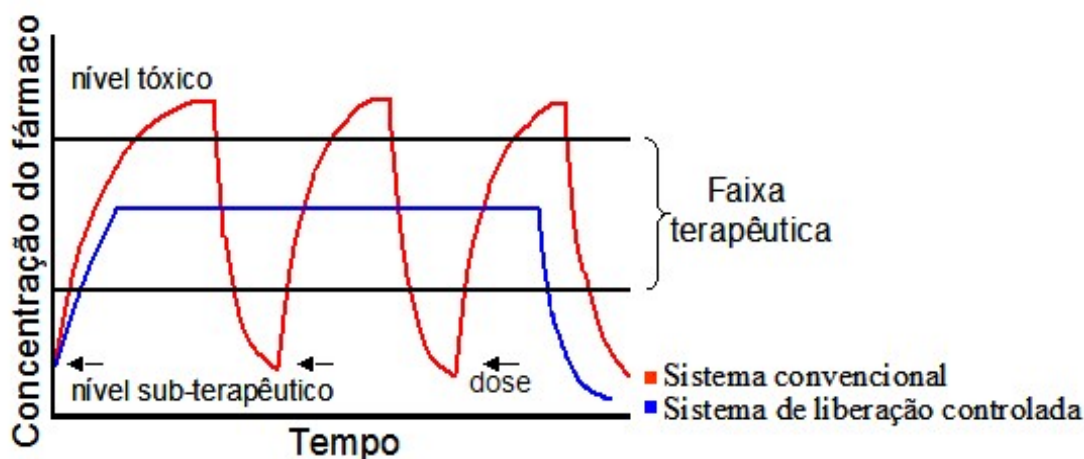
Figura 7: Nanoescala.



Fonte: Adaptado de NIH, 2007.

Sistemas de liberação controlada de medicamentos são desenvolvidos para se obter uma concentração plasmática ou níveis de concentração teciduais de fármacos de forma controlada, atingindo o efeito terapêutico desejado e evitando possíveis reações adversas inerentes ao composto. Estes sistemas podem controlar a liberação do princípio ativo, prolongar a sua liberação e/ou direcioná-lo a sítios específicos de ação (células, órgãos, microrganismos). Na terapia medicamentosa utilizando formas farmacêuticas convencionais como comprimidos, soluções, suspensões, cápsulas, etc. torna-se difícil manter as concentrações plasmáticas de fármacos em nível terapêutico por um longo período de tempo, devido à liberação imediata de todo o conteúdo de fármaco. Este fato gera, inicialmente, um pico máximo de concentração plasmática que pode atingir níveis tóxicos. Após esse pico máximo, a concentração plasmática torna-se insuficiente para ação farmacológica sendo uma dose subterapêutica, proporcionando flutuações aleatórias da biodisponibilidade do princípio ativo (LEE et al.,2004). O principal objetivo de uma forma farmacêutica de liberação controlada é, portanto, manter a concentração plasmática constante do fármaco no nível terapêutico, eliminando as variações que geralmente são observadas no decorrer do tratamento com dose subterapêuticas ou efeitos tóxicos da substância ativa (Figura 8).

Figura 8. Farmacocinética de sistemas farmacêuticos convencionais e sistemas de liberação controlada ou sustentada de fármacos.



Fonte: LIRA, 2007.

2.4.1 Sistemas Nanoparticulados

O controle de liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores, capazes de permitir a otimização da velocidade de liberação e do regime de dosagem das substâncias, tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos dez anos. Dentre os vetores, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas) (SCHAFFAZICK et al.,2003).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro que varia de 10nm a 1000nm. O termo nanopartícula inclui: as nanocápsulas, que são constituídas por um envoltório polimérico pouco espesso disposto ao redor de um núcleo oco ou de natureza oleosa e estabilizada por um filme interfacial de agentes tensoativos, e as nanoesferas que são sistemas matriciais em que o fármaco está fisicamente e uniformemente dispersa ou solubilizada na matriz polimérica, obtendo-se um sistema monolítico, não sendo possível identificar um núcleo diferenciado (SOPPIMATH et al.,2001; SINGH et al.,2009).

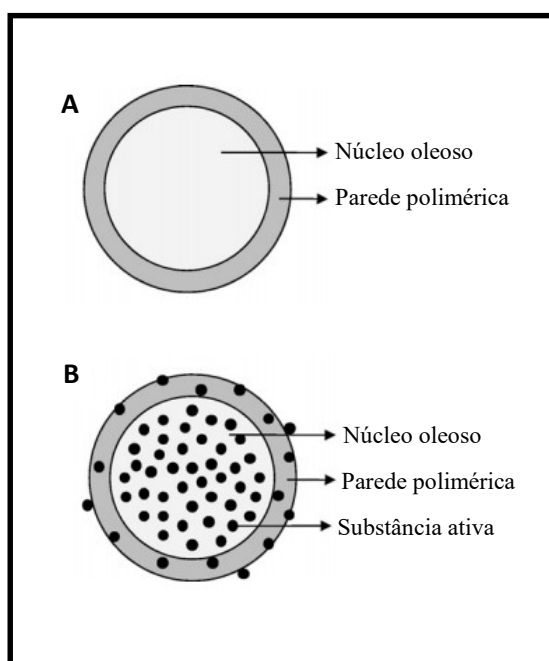
Esses sistemas, em geral, podem ser utilizados para melhorar o direcionamento de fármacos, e a biodisponibilidade, sustentar a liberação de fármacos ou solubilizá-los para administração sistêmica. Sendo assim, o agente terapêutico fica protegido da degradação enzimática (GE et al.,2002). A vantagem de usar nanopartículas para liberação de drogas está no fato destas possuírem um pequeno tamanho e serem constituída de polímeros

biodegradáveis. O seu tamanho nanométrico permite que elas passem através do endotélio, do epitélio, tumores ou ainda que elas penetrem microcapilares. E o uso de materiais biodegradáveis na preparação das nanopartículas, permite que ocorra uma liberação sustentada da droga (SINGH et al.,2009).

Os sistemas nanoparticulados apresentam várias vantagens em relação aos lipossomas, como a maior estabilidade em fluidos biológicos e durante o armazenamento, além do controle de liberação do fármaco e a possibilidade de serem administrado por via oral (SOPPIMATH et al.,2001; SCHAFFAZICK et al.,2003). Dentre os sistemas nanoparticulados, destacam-se as nanocápsulas como foco deste trabalho.

As nanocápsulas são sistemas nano-vesiculares que apresentam em sua estrutura uma membrana polimérica, com surfactantes lipofílicos e/ou hidrofílicos na interface, e um núcleo oleoso. O fármaco pode está dissolvidos na cavidade aquosa ou oleosa, e/ou adsorvidos à parede polimérica. A cavidade pode conter a substância ativa sob a forma líquida ou sólida ou como uma dispersão molecular (SCHAFFAZICK et al.,2003; MORA-HUERTAS et al.,2010)(Figura 9).

Figura 9: Diferentes estruturas das nanocápsulas: em A, núcleo oleoso envolto pela parede polimérica e em B, substância ativa dissolvida no núcleo oleoso e/ou adsorvida à parede polimérica das nanocápsulas.



Fonte: Adaptado de MORA-HUERTAS, 2010.

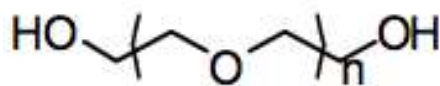
2.4.2 Nanocápsulas furtivas

Quando administrado intravenosamente, os carreadores de fármacos convencionais são rapidamente identificados na corrente sanguínea pelo Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM), principalmente pelas células de Kupffer no fígado e os macrófagos no baço. A remoção dos sistemas coloidais da circulação, geralmente ocorre porque, receptores específicos que estão nas células de Kupffer e nos macrófagos reconhecem proteínas do plasma que se ligam a superfície desses sistemas (processo de opsonização) (MOSQUEIRA et al.,2001 a; SOPPIMATH et al.,2001; RAO et al.,2004).

Para evitar estes inconvenientes, nos últimos 10 anos foram desenvolvidas técnicas, que visam controlar os processos de opsonização, principalmente pela modificação da superfície dos carreadores. Essa modificação têm-se dado principalmente pela adição de polímeros hidrofílicos a superfície dos sistemas coloidais (AVGOUSTAKIS et al.,2003). A eficiência da modificação da superfície pode ser estimada através da carga de superfície, densidade dos grupos funcionais ou pelo aumento da hidrofília da superfície. Outra técnica que pode ser utilizada é o potencial zeta. O Potencial zeta pode ser positivo ou negativo, dependendo da natureza do polímero ou do material utilizado para o revestimento (SOPPIMATH et al.,2001).

Muitos polímeros são capazes de reduzir drasticamente a interação do colóide com as proteínas presente no plasma, destes o PEG (polietilenoglicol) tem sido amplamente estudado (Figura 10). Ele é um polímero neutro, hidrofílico e não-imunogênico que pode ser adsorvido ou ligado covalentemente à superfície de colóides hidrofóbicos. A presença desse polímero reduz à identificação pelo SFM, aumento sua circulação na corrente sanguínea. Além de evitar o reconhecimento pelos anticorpos do organismo, a presença do PEG na superfície das nanopartículas aumenta o tempo de resistência destas na circulação sistêmica (MOSQUEIRA et al.,2001a; HANS & LOWMAN, 2002). Os carreadores de fármacos que possuem esse mecanismo de “driblar” o SFM são chamados de furtivos (MOSQUEIRA et al.,2001b). O mecanismo pelo qual o PEG obtém esses resultados ocorre através da proteção estérica que confere aos sistemas coloidais. As cadeias de PEG na superfície das nanopartículas são flexíveis, organizando-se em conformação de nuvem, que evita a interação de outros polímeros com a superfície das partículas. Isso evita a opsonização, pois diminui a adsorção de proteínas (opsoninas) a superfície das nanopartículas e conseqüentemente o processo de fagocitose da mesma (SOPPIMATH et al.,2001).

Figura 10: Estrutura química do PEG.



Fonte: SEITZ; MEHTA; YEAGER, 2000.

Ademais, a formulação de sistemas nanoparticulados com PLGA-PEG, possibilita a funcionalização das cadeias de PEG com ligantes os quais podem aumentar a seletividade celular no sítio-alvo, aumento sua internalização pelos receptores mediadores de endocitose. Esta aplicação é bastante promissora na área de desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento do câncer (BETANCOURT et al., 2009; WANG et al., 2010).

Peracchia e colaboradores (1999), em seus estudos observaram que nanocápsulas furtivas tiveram um tempo maior na circulação sanguínea, depois de administrada intravenosamente em camundongos, do que as que não continham PEG.

Mosqueira e colaboradores (2001), avaliaram a relação entre as características físico-químicas de nanocápsulas de PLA revestidas com PEG e ativação do sistema complemento avaliado em função da clivagem do componente do sistema complemento C3, além da captação dos sistemas coloidais por macrófagos (células da linhagem J774A1). Os resultados revelaram que a presença de PEG diminui a ativação do sistema complemento e o consequente *clearance* plasmático por parte das células do Sistema do Retículo Endotelial. Esses resultados são proporcionais ao tamanho da cadeia de PEG e a sua densidade na formulação.

2.4.3 Métodos de preparação de nanocápsulas

Há vários métodos de preparação de nanopartículas poliméricas:

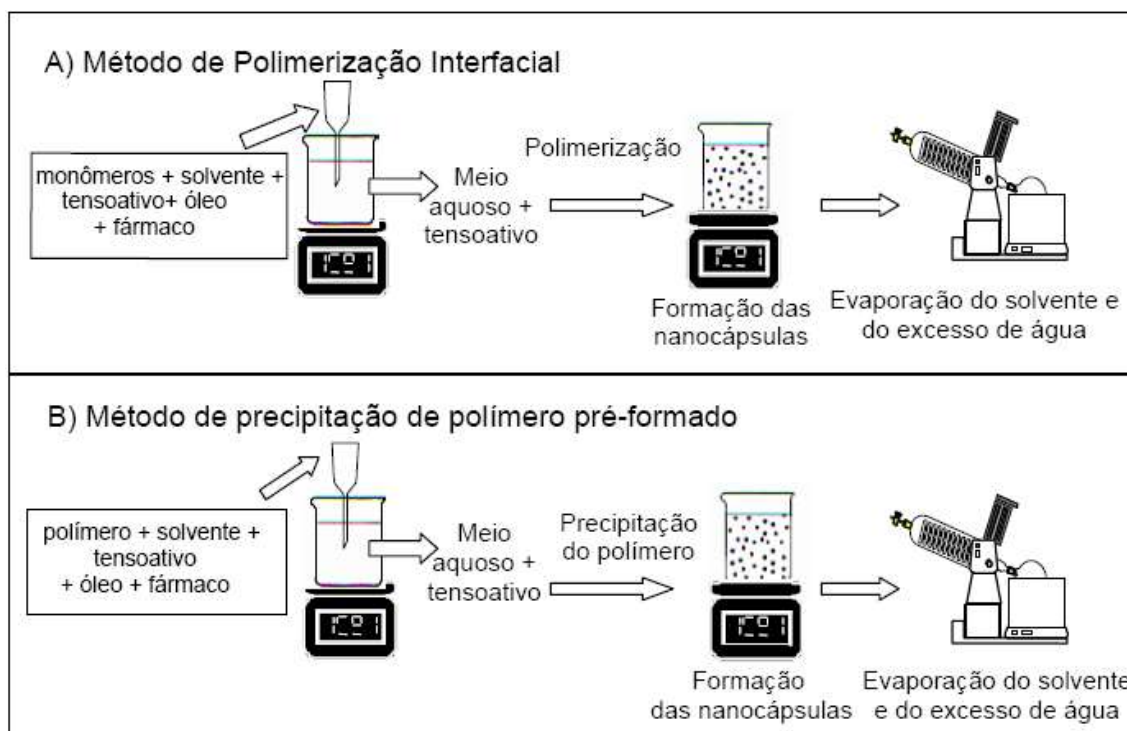
a) Polimerização interfacial – consiste em verter, lentamente e sob agitação, uma fase orgânica composta, do monômero, de etanol e de um óleo, completamente solubilizada, sobre uma fase aquosa, composta de água e de um tensoativo não-iônico. A formação das nanocápsulas se dá de forma espontânea no meio (Figura 11a). As vantagens desse método consistem em ser de preparação simples, rápida e de fácil transposição industrial. Além disso,

as suspensões são estáveis à temperatura ambiente, podendo ser esterilizadas por autoclaves, e ainda possuem elevadas taxas de encapsulação para fármacos lipofílicos (FALLOUH et al.,1986). Por outro lado, devido a reatividade dos monômeros utilizados, reações químicas entre estes e o fármaco e outros constituintes da preparação podem acontecer, antes ou durante o processo de polimerização (COUVREUR et al.,2002).

b) Deposição interfacial de polímeros pré-formados – este método foi proposto por Fessi e colaboradores em 1988, sendo um protocolo simples de preparação de suspensões de nanopartículas. Esse método é constituído por duas fases: a fase orgânica e a fase aquosa. A fase orgânica contém o fármaco a ser encapsulado, o óleo, o tenso-ativo de baixo EHL (Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo) e o polímero, solubilizado em solvente miscível em água. A fase aquosa é formada pela água e por um tensoativo hidrofílico (Figura 11b). A formação das nanocápsulas é formada instantaneamente no momento em que a fase apolar é vertida, através de um funil, sobre fase aquosa (Figura 5B). Este método apresenta como vantagem o menor diâmetro das nanopartículas obtidas (aproximadamente 200nm), a monodispersão e ausência de monômeros residuais (FESSI et al.,2010, COUVREUR et al.,2002).

c) Emulsificação-difusão – em 1988, Quitanar-Guerreiro e colaboradores propuseram um método, também baseado na utilização de polímeros pré-formados, chamado de emulsificação-difusão. Neste, um solvente parcialmente solúvel em água é previamente saturado com água para garantir um equilíbrio termodinâmico inicial. O polímero, o óleo e o fármaco são solubilizados no solvente saturado em água e então mistura é emulsificada, sob agitação vigorosa, com a fase aquosa, que contém um tensoativo não-iônico. A adição de água subsequente ao sistema causa difusão do solvente para a face externa, resultando na formação das nanocápsulas. As vantagens desse método em relação aos anteriormente citados são a menor quantidade de solventes orgânicos utilizados e a possibilidade de preparação das nanocápsulas com núcleo aquoso (FESSI et al.,2010, COUVREUR et al.,2002).

Figura11: Métodos empregados na preparação das nanocápsulas poliméricas. Em A, Método de Polimerização Interfacial; B, Método de precipitação de Polímeros Pré-formados (SCHAFFAZICK et al.,2003).



Fonte: SCHAFFAZICK et al., 2003.

2.4.4 Polímeros utilizados na preparação das nanocápsulas

A seleção de matérias-primas para a preparação de nanopartículas é um passo importante na elaboração do produto farmacêutico. São inúmeros os fatores que devem ser considerados como a toxicidade das matérias-primas, a via de administração, a biocompatibilidade e a biodegradabilidade dos polímeros.

Devido ao potencial oferecido pela química de polímeros hoje, um número limitado de polímeros podem ser utilizado para a preparação das nanopartículas para liberação *in vivo*. Para essa finalidade, o polímero deve possuir algumas propriedades adequadas. Ele deve ser biodegradável, a fim de ser eliminado totalmente do corpo em período curto de tempo, permitindo a repetição da administração sem, que ocorra risco de acumulação. Ele também deve ser atóxico e não imunogênico. Além disso, a escolha do polímero deve ser feita visando propriedades adequadas para a liberação da droga, para as quais as nanopartículas são desenvolvidas (OKADA, 2002; NAIR AND LAURENCIN, 2007 PRÉAT et al.,2012).

O polímero pode ser sintético, semi-sintético ou natural, tendo como exemplos: goma arábica, gelatina (natural), etilcelulose, ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, ciclodextrinas semi-sintéticas e, como polímeros sintéticos, PCL, poli (alquilcianoacrilato) e poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico) e copolímeros (poli (ácido láctico-co-glicólico- PLGA) (COUVREUR et al.,2002; HANS & LOWMAN, 2002).

A tabela 2 apresenta uma lista de polímeros mundialmente usados na composição de nanocarreadores.

Tabela 2. Polímeros mundialmente usados na constituição das nanopartículas.

Material	Nome completo	Abreviaturas ou nomes comerciais
Homopolímero Sintético	Poly(lactide)	PLA
	Poly(lactide-co-glycolide)	PLGA
	Poly(epsilon-caprolactone)	PCL
	Poly(isobutylcyanoacrylate)	PICBA
	Poly(isohexylcyanoacrylate)	PIHCA
	Poly(n-butylcyanoacrylate)	PBCA
	Poly(acrylate) and poly(methacrylate)	Eudragit*
Polímeros natural	Chitosan	
	Alginate	
	Gelatin	
	Albumin	
Copolímeros	Poly(lactide)-poly(ethylene glycol)	PLA-PEG
	Poly(lactide-co-glycolide)-poly(ethylene glycol)	PLGA-PEG
	Poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol)	PCL-PEG
	Poly(hexadecylcyanoacrylate-co-poly(ethylene glycol) cyanoacrylate)	Poly(HDCA-PEGCA)
Coloídes Estabilizantes	Dextran	F68
	Pluronic F68	PVA
	Poly(vinyl alcohol)	
	Copolymers (see above)	
	Tween® 20 or Tween® 80	

Fonte: VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009.

Pesquisas demonstraram que a liberação da droga nesses sistemas poliméricos pode ocorrer através de dois mecanismos: difusão ou degradação ou mesmo pela associação desses dois processos. (SOPPIMATH et al.,2001).

Na difusão, a droga encapsulada pela membrana polimérica ou suspensa na matriz polimérica dissolve e difunde para fora do polímero. A difusão do fármaco através da matriz polimérica, esta condicionada a outras propriedades específicas da molécula do fármaco como solubilidade, tamanho da molécula, distribuição do fármaco na matriz polimérica e interações específicas com o polímero (FAISANT et al.,2002).

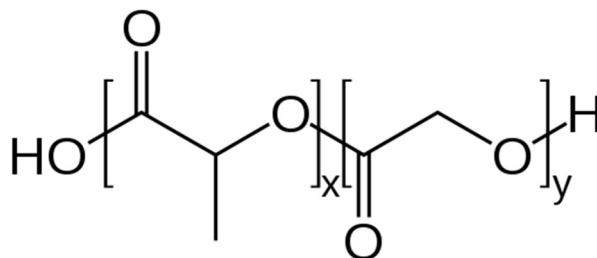
Na degradação, o polímero é degradado naturalmente pela hidrólise das ligações ésteres, liberando o fármaco ou pode sofrer degradação enzimática ou por ambos os processos (FAROKHZAD & LANGER, 2006). Desta forma há uma liberação contínua da droga, o qual conduz a um perfil farmacocinético de liberação controlada. A degradação dos polímeros

depende principalmente de três propriedades: da composição química, pois a taxa de degradação depende do tipo de ligações químicas, da cristalinidade, quanto maior sua cristalinidade mais lenta é sua degradação e da hidrofobicidade, visto que um número elevado de grupamentos hidrofóbicos retarda a degradação.

Segundo Fessi e colaboradores (2010), a liberação *in vitro* das substâncias encapsuladas também sofre influência de outros fatores, como a concentração e características físico-químicas da substância encapsulada, principalmente sua solubilidade e coeficiente de partição, a natureza do óleo, tamanho de partícula e método de preparação empregado.

Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), figura 12, é um polímero que apresenta grande potencial de uso para tecnologias de liberação controlada e engenharia de tecidos, uma vez que sua hidrólise origina dois compostos endógenos e facilmente metabolizados no sistema biológico via ciclo de Krebs, sendo considerado, portanto, biodegradável. Além disso, PLGA apresenta baixíssima toxicidade e já vem sendo utilizado em experiências clínicas, por isso o PLGA é aprovado pelo FDA e pela Agência Europeia de Medicina (EMA) (FESSI et al.,2010; SIEGEL et al.,2011).

Figura 12: Estrutura molecular do PLGA. Em x, a quantidade de subunidade de ácido láctico e em y, a quantidade de subunidades de ácido glicólico.



Fonte: KALAIIVANI, 2008.

O PLGA é solúvel em um vasto número de solventes, como compostos clorados, tetrahidrofurano, acetona e acetato de etila, e apresenta peso molecular que varia desde 5000 a 20000 Da, além disso, suas características físico-químicas dependem, majoritariamente, da proporção de ácido glicólico e láctico presente em sua composição. A taxa de decomposição, por exemplo, sofre influencia desta proporção: PLGAs com alta proporção de ácido glicólico apresenta degradação mais lenta que aqueles que contem mais baixas proporções de ácido láctico. Tal fato é explicado uma vez que o ácido láctico apresenta um grupo radical metila que, em altas proporções, dificulta estericamente o ataque nucleófilo da água que ocorre na hidrólise

do éster (WANG et al.,2001; SIEGE et al.,2011).

O PLGA também é bastante utilizado em combinação com outros polímeros, resultando em características interessantes aos sistemas nanoparticulados produzidos. Mudanças na superfície de nanopartículas, por exemplo, são técnicas utilizadas para bloquear as interações eletrostáticas e hidrofóbicas que atuam na ligação entre proteínas opsonizadoras e as nanopartículas, que acarretam na eliminação dessas partículas da circulação sanguínea pelo sistema retículo endotelial, este processo é um das mais importantes barreiras biológicas para nanopartículas baseadas em sistemas de liberação controlada. (FESSI et al.,2010; KUMARI et al.,2010). A mais comum mudança de superfície utilizada é a ligação entre o PLGA e o polietilenoglicol (PEG) como já foi descrito acima.

Vários compostos terapêuticos vem sendo encapsulados com sucesso em nanopartículas contendo PLGA para o sistema de liberação controlada (tabela 3).

Tabela 3: Fármacos encapsulados em nanopartículas de PLGA e nível de estudo.

Fármaco	Nível de estudo	Referência
Paclitaxel	Pré-clínico (ratos)	DANHIER et al.,2009
Diclofenaco	<i>In vivo</i>	AGNIHOTRI et al.,2009
Flurbiprofeno	Pré-clínico (Coelhos)	ARAUJO et al.,2009
Rolipram	Pré-clínico	LAMPRECHT et al.,2001
Tacrolimus	Pré-clínico	LAMPRECHT et al.,2005
Betametasona	Pré-clínico (Coelhos)	HIGAKI et al.,2005
Urocortina	Pré-clínico (Ratos)	HU et al.,2011
Loperamida	Pré-clínico	TOSI et al.,2007
Ácido siálico	Pré-clínico	COSTANTINO et al.,2005
Insulina	Pré-clínico	CUI et al.,2006

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antiproliferativa da solasodina encapsulada em nanocápsulas furtivas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e caracterizar a nanocápsulas furtivas contendo solasodina;
- Avaliar a citotoxicidade da solasodina encapsulada frente a diferentes linhagens celulares;
- Avaliar a capacidade de fragmentação de DNA das células frente à solasodina nanoencapsulada;
- Determinar o tipo de morte celular frente ao tratamento com solasodina nanoencapsulada;
- Avaliar o potencial de membrana mitocondrial das células frente à solasodina nanoencapsulada.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido ao Jornal “Biomaterials”

An evaluation of the antiproliferative activity of solasodine-loaded nanocapsules

Ana Lygia dos Santos Câmara¹, Jaqueline Rodrigues da Silva², Ricardo Bentes de Azevedo²,
Noemia Pereira dos Santos³, Nereide Stela Santos Magalhães^{1*}

¹Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
(LIKA)

²Universidade de Brasília (UnB), Laboratório de Nanobiotecnologia

³Centro Acadêmico de Vitória, UFPE, Departamento de Biologia

* Corresponding author:

Prof. Nereide Stela Santos Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco

Grupo de Sistemas de Liberação Controlada de Medicamentos

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil

Tel: +55 81 21268484; fax: +55 81 21268485

E-mail: [**nssm@ufpe.br**](mailto:nssm@ufpe.br)

ABSTRACT

In this work, we report the development and characterization of stealth nanocapsules containing solasodine and their *in vitro* antiproliferative activity. Nanocapsules were obtained by the method of interfacial deposition of a pre-formed polymer with 178.5 ± 1.58 nm of mean size diameter. The treatment of 4T1 and MCF-7 cells with concentrations of solasodine-loaded nanocapsules ranging from 3.125 to 25 $\mu\text{g/mL}$ for 48 h induced significant reduction of their viability. On the contrary, the normal NIH 3T3 cells did not show significant loss of viability. A significant DNA fragmentation, an increase in propidium iodide+ cell number and a mitochondrial membrane potential reduction were detected. These cytotoxic results demonstrate that solasodine-loaded nanocapsules induced necrosis cell death associated with severe cell morphological alterations. This study shows that encapsulation of solasodine present antiproliferative effects and identifies the nanocapsules system as a promising drug cancer therapy.

Keywords: Solasodine, nanocapsules, antiproliferative activity, flow citometry.

1. Introduction

Breast cancer is one of the most frequent types of cancers, both in developing countries as in developed countries and is responsible for the highest mortality rate among women. The therapies applied in the treatment of this malignancies ranging from local to systemic procedures [1,2]. Due to the limitations of the treatments currently the scientific community has been engaged in discovering molecules potentially effective in cancer therapy and which do not induce severe side effects.

Plants have been used historically by humans as a source of precursor chemicals for development of new chemotherapeutic agents [3]. About 60% of the anticancer drugs used as therapeutic agents in the past decades have been developed from natural products, among them stands out vinblastine (Velban®), vincristine (Oncovin®) and paclitaxel (Taxol®) [4]. Plants of the family *Solanaceae* are rich sources of secondary metabolites with pharmacological properties, such as glycoalkaloids and steroidal alkaloids [5,6,7,8]. The solasodine is a steroidal alkaloid which is present particularly in the genus *Solanum* and can be used as a nitrogen analogue of diosgenin, for commercial synthesis of various steroidal drugs. Cham (1990) reported that the glycoside moiety enables the recognition of membrane receptors and induces the cellular internalization allowing the biological activity [9]. The extraction yield of solasodine glycosides is limited, but the extraction of aglycone occurs in higher yield. Thus, the encapsulation is an alternative to enhance the biological activity of solasodine tendo em vista que irá melhorar a acessibilidade da droga a célula.

Nanotechnology aims to create systems with controlled drug released, with greater permanence in the systemic circulation thereby increasing therapeutic efficacy with lower doses and low toxicity [10,11]. Among these systems, nanoparticles stand out because of great therapeutic potential, stability in biological fluids and during storage. Thus, the objective of this study was to encapsulate aglycone solasodine in stealth nanocapsules and assess the cytotoxic activity in vitro using different cell lines.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Diblock copolymer of PLGA and polyethylene glycol covalently attached (PLGA-PEG, Resomer® RGP d50105; 50/50 PLGA 45kDa, containing approximately 10% PEG 5kDa) were provided by Boehringer Ingelheim (Germany); soya phosphatidylcholine (Epikuron® 200),

was obtained from Lucas Meyer (Germany); Poloxamer 188, was generously supplied by ICI (France); Purified soybean oil were all purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA); analytical grade solvents and reagents were obtained from Merck (Darmstadt, Germany); Solasodine was generously supplied by the Laboratório de Tecnologia farmacêutica (Universidade Federal da Paraíba, Brazil).

2.2. Formulation of stealth solasodine-loaded nanocapsules(SSD-NCs)

PLGA-PEG nanocapsules containing solasodine were obtained by interfacial deposition of a preformed polymer on the surface of nanoemulsion droplets [12]. The organic phase (polymer, soybean oil, soya phospholipid and solasodine) were dissolved in 14 mL acetone. The aqueous phase (poloxamer) was dissolved in 55 mL of a pH 7.4 phosphate buffer solution at 0.2 M (Table 1). After the dissolution of all constituents, separately, the organic phase was poured into the aqueous phase by dripping under magnetic stirring at 150 rpm for 30 min. Organic solvents were removed by evaporation in reduced pressure at 40°C (Eyela NAJ-160, Tokyo Rikakikai, Japan) until the colloidal suspension was concentrated to a 10 mL final volume. The suspension of nanocapsules was conditioned in sealed vials and stored at 4°C, until the use.

Table 1: Ratio components.

Constituents	Ratio (mg)
Polymer	150
Soybean oil	100
Soya phospholipid	150
Poloxamer	150

2.3. Physicochemical characterization of solasodine-loaded nanocapsules

The physicochemical analysis of nanocapsules was carried out immediately after preparation. Parameters such as the macroscopic and morphological aspect, particle mean diameter, zeta potential and pH changes were analyzed. The particle mean diameter and polydispersity index were measured by photon correlation spectroscopy (PCS) (Beckman

Coulter Delsa™ Nano S Particle analyzer). The surface charge potential of SSD-NCs was determined using a Zetasizer (Nano-ZS90, Malvern, United Kingdom) through an electrophoresis technique.

2.4. Stability assessment of solasodine-loaded nanocapsules

The SSD-NCs stability was performed by measure particle size, polydispersity index (PDI), macroscopic appearance and pH variation after preparation and during storage of nanocapsules formulations at predetermined time intervals. Briefly, after preparation samples of nanocapsules suspension were submitted to centrifugation (3.165g for 1h at 4°C) and horizontal mechanical stirring (180 strokes/min for 48h at 37°C); for long-term stability evaluation.

2.5. Morphological study

The morphology of SSD-NC was evaluated by scanning electronic microscopy (SEM) (JOEL JSM-7001F). The samples were diluted 500x in distilled water and coated with colloidal gold and photomicrograph in scanning electron microscopy.

2.6. Cell culture

Mouse mammary carcinoma cells (4T1), human breast adenocarcinoma cells (MCF-7) and fibroblasts cells (NIH 3T3) were purchased from American Type Cell Collection. These cells were maintained as monolayers in Dulbecco's MEM with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, USA) in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C. For experiments, the cells were grown in plastic tissue culture flasks and used when in the exponential growth phase.

2.7. Cell viability

The effects on cell growth were determined by MTT assay as described previously [13]. Briefly, cells were seeded in 96-well plates at the following density: NIH 3T3 cells (4×10^6 cells / mL) and 4T1 and MCF-7 (2.5×10^6 cells / mL). After reaching the stage of confluence, cells were treated with SSD-NCs (0.7812 to 25 µg/ml) and then incubated for 48 hours in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C. After this incubation period, the supernatant was removed and added 15ul of MTT solution (5 mg/mL in PBS) and 135 µl of complete medium in each well incubated for 3 hours at 37 °C in 5% CO₂. After this period, the supernatant was removed and added to 100 mL of DMSO immediately thereafter, the plates were read on a spectrophotometer conjugated to a microplate reader at an absorbance of 595

nm (Bio-rad, Hercules, CA). The viability was determined using no treated cells with nanocapsules as a control.

2.8. Mitochondrial membrane potential (MMP)

In order to evaluate the MMP cells treated with SSD-NCs (3.125 and 6.25 $\mu\text{g/mL}$) flow cytometry was used. For this it was used rhodamine 123 (5 mg/mL diluted in ethanol – Sigma, USA) a cationic fluorochrome permeable to membrane which is rapidly captured by mitochondria. Changes in mitochondrial membrane potential are detected due to the efflux of rhodamine 123 from the mitochondria, emitting a lower fluorescence. Rhodamine 123 fluoresces in the range of 515-530 nm [14]. In this experiment, after 48h of cells treatment, detached with trypsin/EDTA and washed with PBS; the cells were resuspended in 100 μL of binding buffer and stained with 5 μL of Rhodamine 123 (5 mg/mL diluted in ethanol), incubated at 37° and 5% CO₂. Then, samples were evaluated using a flow cytometer (CyFlow®, Partec, Münster, Germany) at FL1-H channel and analyzed by the CyFlow software. Analyzes were made from the acquisition of 10.000 events and results expressed according to percentage the total number of events.

2.9. Detection of Annexin V and propidium iodide

Phosphatidylserine is externalized during apoptosis, being an indicative for the cells to be removed by the mononuclear phagocyte system. Annexin V is a protein with high affinity and specificity for this phospholipid. Cells stained with FITC-annexin exhibit high fluorescence at wavelength 515-530 nm [15]. For this experiment the cells were treated for 48 h with SSD-NCs in two concentrations (3.125 and 6.25 $\mu\text{g/mL}$), values that represents the IC₅₀ in 4T1 and MCF-7; to detect annexin-V and propidium iodide was used the Vybrant Apoptosis Assay Kit #3 (Molecular Probes, Eugene, OR). After incubation cells were washed with PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4), resuspended in 100 μL annexin-binding buffer, and then incubated with 10 μL of annexin-V and 2 μL of propidium iodide at room temperature for 15 minutes. Then, samples were evaluated using a flow cytometer (CyFlow®, Partec, Münster, Germany) at FL1-H and FL2-H channels and analyzed by the CyFlow software. Analyzes were made from the acquisition of 10.000 events and results expressed according to percentage the total number of events.

2.10. Determination of DNA fragmentation

To determine the DNA fragmentation using propidium iodide, the cells were treated with 3.125 and 6.25 $\mu\text{g/mL}$ of SSD-NCs for 48 hours as describe in viability experiments. After

incubation the cells were detached with trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich/St Louis, USA), washed with PBS and resuspended in 100 µl of RNase (Invitrogen, USA) incubated for 30 minutes at room temperature. After that, 5 microliters of propidium iodide (Molecular Probes-Eugene, OR) was added and incubated for 15 minutes, protect from light. The cells were resuspended in PBS, pH 7.4 and then assessed by flow cytometry (CyFlow®, Partec, Münster, Germany) using the channel FLH-2 (responsive to detections in the range of 560 to 580 nm). Analyzes were made from the acquisition of 10.000 events and results expressed according to percentage the total number of events.

2.11. Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the Student's t test ($p \leq 0.05$). The experimental results were expressed in the form of mean $\pm$ SD format.

3. Results and discussions

3.1 Preparation of solasodine-loaded nanocapsules

In the preformulation study, nanocapsules were obtained ranging only the concentration of solasodine (1, 1.5, 2 mg/mL) and analyzes by particle size, polydispersity index (PDI), pH and macroscopic aspects (Table 1). Unstable nanocapsules formulation presented crystals of solasodine, phase separation, lower pH or high particle size and distribution. Generally, nanocapsules obtained by interfacial deposition of a preformed polymer present the mean size of 100-300 nm. Among the main factors that affect the mean particle diameter stands out the nature and concentration of the polymer in the organic phase, solvent polarities, the nature and ratio of internal/external phases and the nature and concentration of surfactants [16, 17].

Table 1: Characteristics of formulations NC1, NC2, and NC3.

Parameters	Formulations		
	NC1	NC2	NC3
Solasodine (mg)	10	15	20
Drug:polymer	1:8	1:12	1:16
Size	178.5 $\pm$ 1.9	182.9 $\pm$ 9.6	204.8 $\pm$ 4.6

PDI	0.272±0.01	0.327±0.05	0.453±0.07
pH	7.33	7.27	7.15
Phase separation	Absent	Present	Present
Crystals	Absent	Present	Present

3.2. Characterization and stability of solasodine-loaded nanocapsules

The most stable formulation, though, of SSD-NCs was formulated using 1mg/mL of solasodine. The particle size analysis revealed that NC1 were on the nanoscale, presenting particle size and PDI of 178.5 ± 1.58 and 0.272 ± 0.21 , respectively, and Zeta potential of -0.18 ± 0.219 . Moreover, the suspension dosage form presented pH of 7.33, optimal macro and microscopic features as seen in the SEM images (Fig. 1). Figure 1 shows a typical SEM picture of spherical NCs with smooth surfaces and undetectable free drug crystals. The SSD-NCs size as estimated by SEM correlated well with the size measured by PCS showing particles in a nanometric size range. Thus, this formulation was selected for the *in vitro* tests.

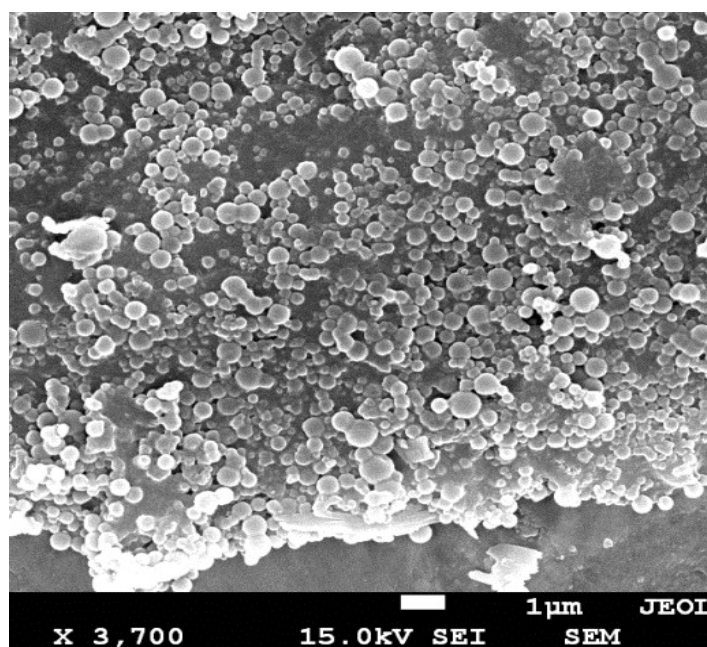


Fig. 1: Scanning electron micrograph of solasodine-loaded nanocapsules.

The nanocapsule size is an important parameter to be evaluated for controlled release systems, should be less than 100 nm when the aim is to cross the blood brain barrier, the

branching pulmonary or skin and higher than 100 nm when the goal is to penetrate tumors, which have pores ranging from 100 to 1000 nm [18]. Polydispersity index of less than 0.3 indicate the presence of a monodisperse particle population or exhibits a narrow distribution of particle size [19].

As regards to accelerate stability, the nanocapsules formulated, after being submitted to mechanical agitation and centrifugation, preserved their particle size, 182.1 ± 2.45 nm and 176.1 ± 3.81 nm, respectively, and the polydispersity index had a slight increase, 0.280 ± 0.015 and 0.291 ± 0.015 (Table 2). In concern to long-term stability, NC1 stored at 4°C , in the dosage form, maintained their physicochemical properties for 90 days, without phase separation or agglutination (Fig.2).

Table 2: Physicochemical characteristics and accelerated stability of formulation NC1.

Characteristics		
Physicochemical assay	NC1	
Macroscopic aspects	Fluid milky white, bluish opalescent	
Microscopic aspects	Spherical particle, Brownian motion	
Mechanical agitation	Diameter mean size (nm) / PDI	$182.1 \pm 2.45 / 0.280 \pm 0.015$
	pH	7.28 ± 0.011
Centrifugation	Diameter mean size (nm) / PDI	$176.1 \pm 3.81 / 0.291 \pm 0.015$
	pH	7.26 ± 0.013

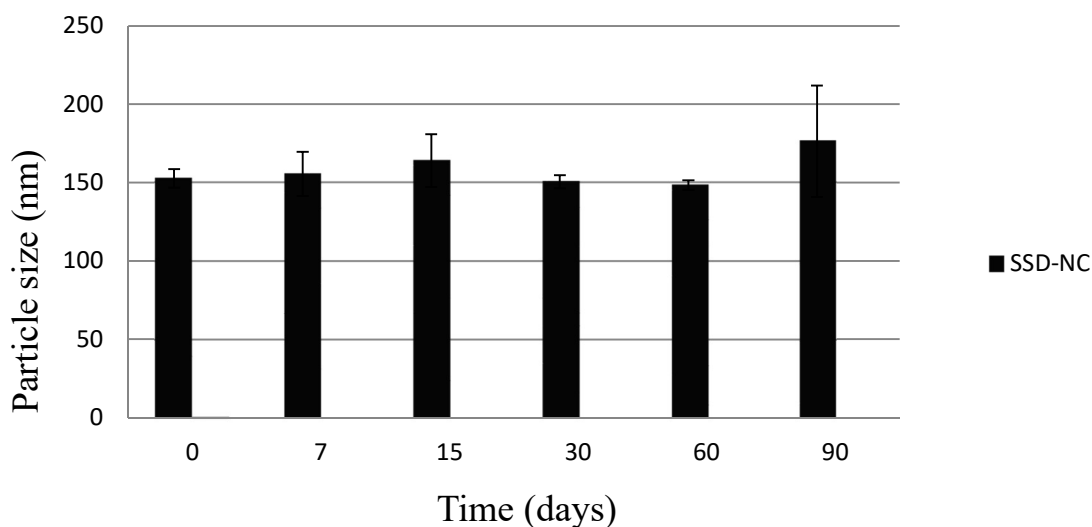


Fig. 2: Long-term stability of NC1 in 90 days.

3.3. Cell viability

The 4T1 and MCF-7 cells exhibit a significant dose-dependent reduction in their viability after treatment with solasodine-loaded nanocapsules. The IC_{50} values of SSD-NCs on 4T1 and MCF-7 cells were found to be 5.31 and 4.14 $\mu\text{g/mL}$, respectively. On the other hand, the fibroblast cells NIH 3T3 were not affected by the solasodine-loaded nanocapsules treatment in the concentrations which represents 4T1 and MCF-7 IC_{50} (3.125 and 6.25 $\mu\text{g/mL}$)(Fig. 3). The responses of different cell lines to the same treatment are influenced by several factors such as cell morphology and proliferation time. The MCF-7 cells were more susceptible to the treatment, probably because this cell line proliferates quicker than the 4T1. In relation to the drug, has been described that the glycoalkaloids present in plants of the genus *Solanum* have anticancer properties in animals [20]. However, in studies using lines of colon cancer aglycone solasodine showed low cytotoxicity in concentration of 37.23 $\mu\text{g/mL}$ [21]. The mechanism which the internalization of solasodine occurs in the cell appears to be associated to the sugar moiety. It has been reported that the glycosidic moiety binds to lecithins present in the membrane promoting its internalization. After endocytosis, the sugar molecule is broken and the aglycon promotes breakage and leakage of the content of lysosomes, culminating in cell death [22]. Due to the necessity of the sugar moiety to the internalization, the solasodine encapsulation is an alternative to enhance the biological activity.

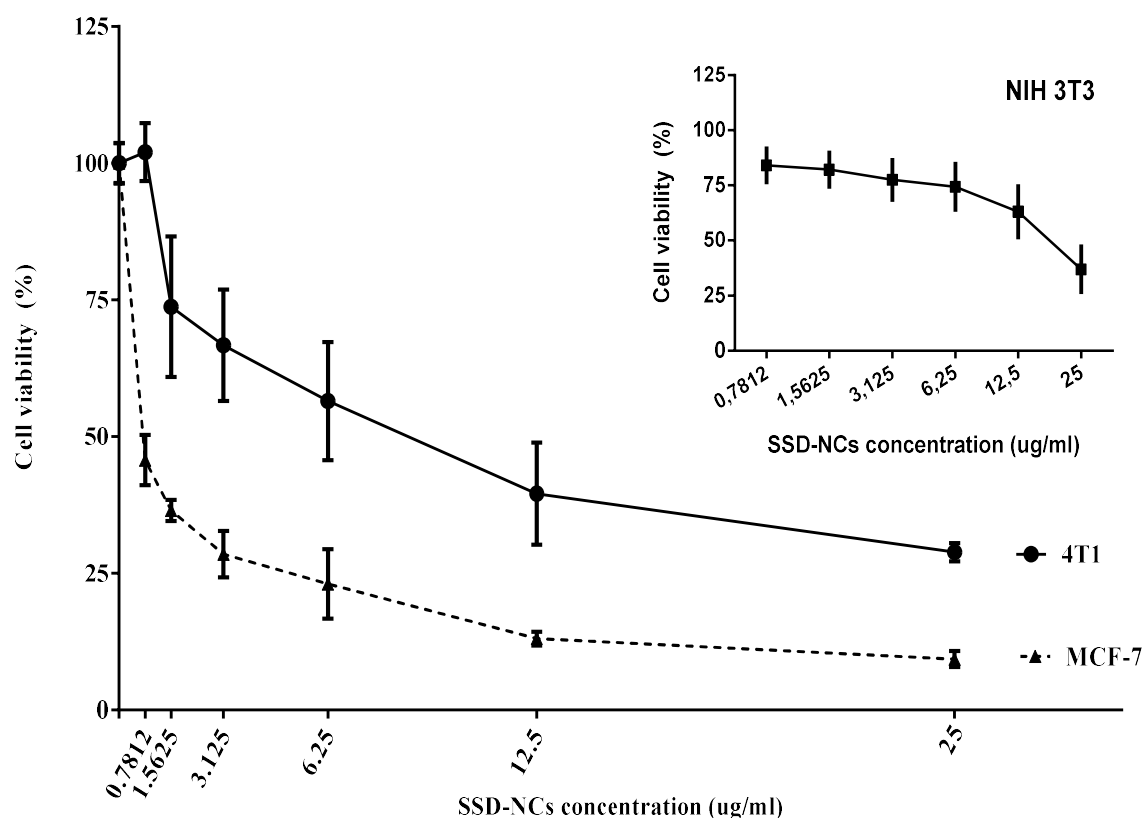


Fig. 3: Dose-response curve of MCF-7, 4T1 and NIH 3T3 cells after 48 hours incubation with different concentrations of solasodine-loaded nanocapsules (3.125 and 6.25 $\mu\text{g/mL}$).

3.4. Mitochondrial membrane potencial (MMP)

Analysis of mitochondrial membrane potential by flow cytometry showed that the treatment with 3.125 and 6.25 $\mu\text{g/mL}$ SSD-NCs induced changes in the membrane of the organelle, which reflects metabolic activity and integrity of mitochondria membrane. Cells which had unmodified membrane potential captured rhodamine and emitted high fluorescence when hit by laser. Changes in membrane potential leads to efflux of rhodamine and generates events with low fluorescence (Fig. 4). The increase in mitochondrial membrane permeability, which may be due to several factors, is considered an indicator of mitochondrial damage and is generally defined as an early stage of apoptosis [23]. Intracellular events which lead to apoptosis and necrosis can occur sequentially, and may occur collapse of the mitochondrial membrane potential and further, the breaking of the plasma membrane leading to necrosis process [24]. These results suggest that de solasodine abolish the normal electrochemical gradient, depolarizing the membrane, and thereby deenergize the mitochondria.

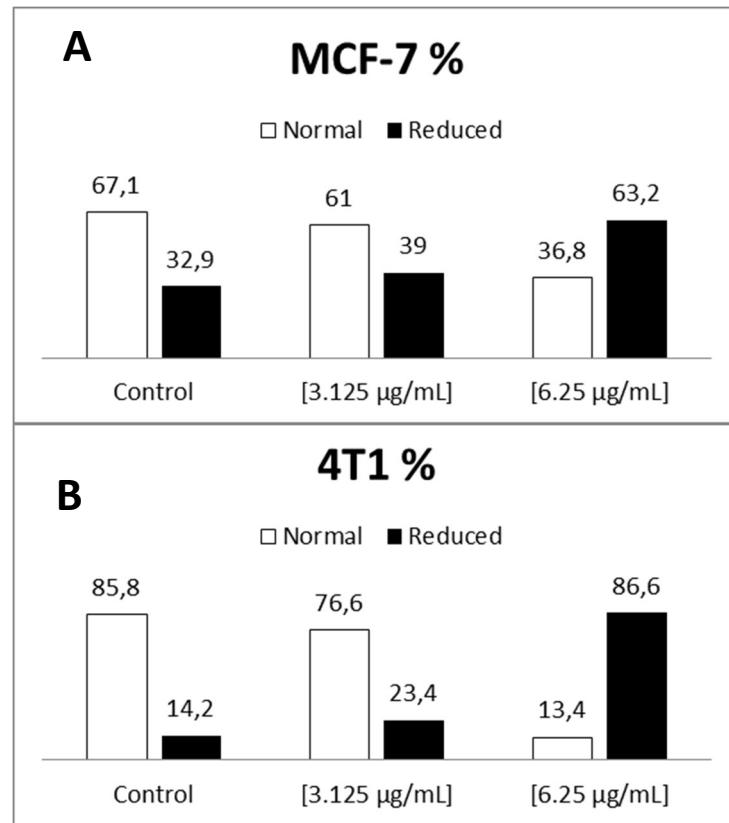


Fig. 4: Alterations of SDS-NCs on 4T1 and MCF-7 mitochondrial.

3.5. Detection of Annexin V and propidium iodide

4T1 and MCF-7 cells were treated with 3.125 and 6.25 µg/mL of SSD-NCs to detect annexin and propidium iodide. It was observed that most of the cells, were only stained with propidium iodide (Fig. 5a), demonstrating loss of membrane permeability and suggesting necrosis. There was an increase in the percentage of cells stained both for annexin V and propidium iodide; 2.21, 0.44 and 4.40% in [3.125 µg/ml] and 6.26, 0.52 and 8.23% in [6.25 µg/ml] for NIH 3T3, 4T1 and MCF-7, respectively, showing the process of late apoptosis (Fig. 5b). The detection of annexin V / propidium iodide was analyzed to measure the externalization of phosphatidylserine A [25]. Annexin V has the ability to bind strongly to the plasma membrane phospholipids [26]. The staining with propidium iodide allows measuring cells with fragmented cell membrane and may indicate a late stage apoptosis or necrosis. The double emission of annexin V and propidium iodide suggests late apoptosis, the AV can pass the membrane permeabilized while PI enters the cytosol [27].

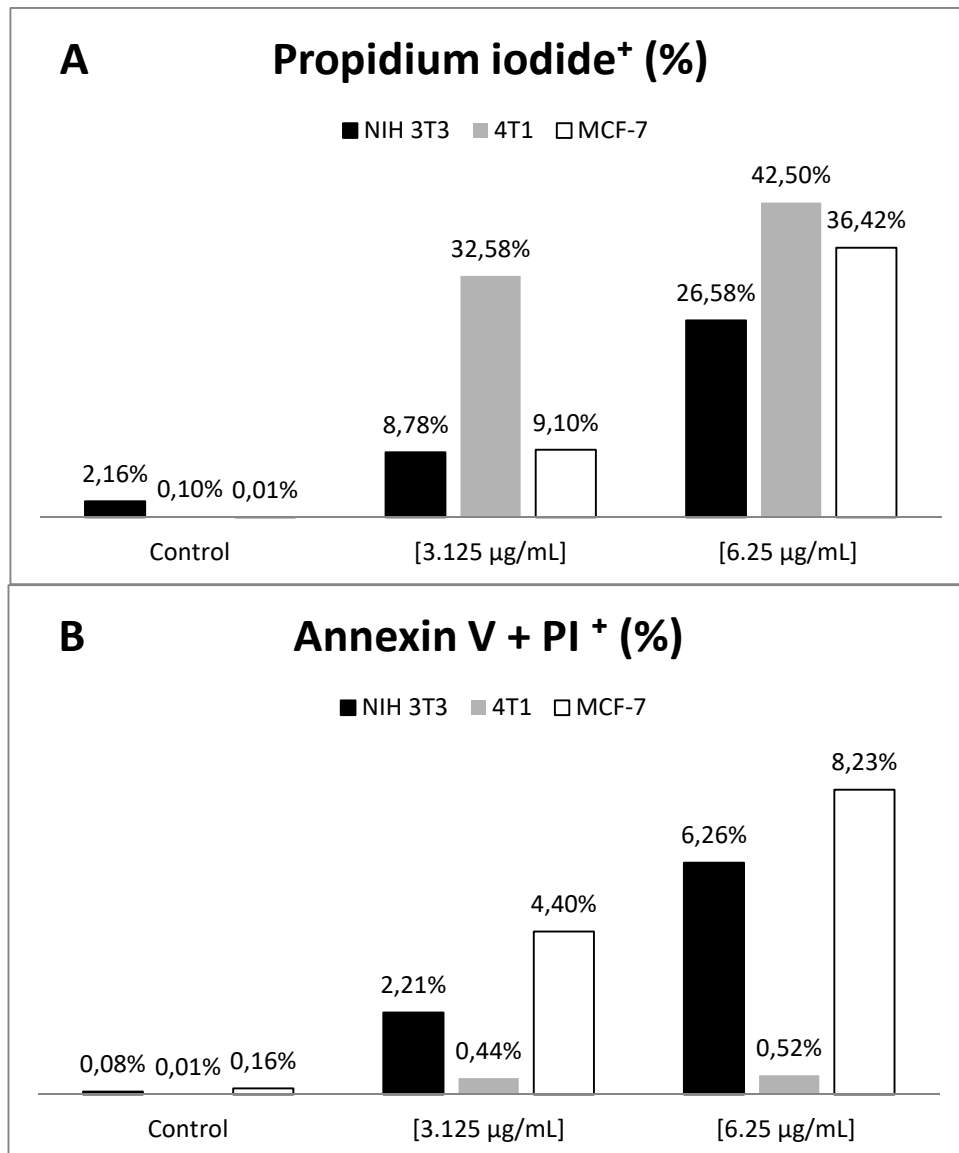


Fig. 5: Analysis of detection of propidium iodide and annexin V in NIH 3T3, 4T1 and MCF-7 cells treated with SSD-NCs using flow cytometry. In A, cell PI⁺ and in B, cell with double emission AV⁺ and PI⁺.

3.6. DNA fragmentation

The test DNA fragmentation was performed on the cell lines 4T1 and MCF-7 using concentrations 3,125 and 6.25 µg/mL. There was an increase in DNA fragmentation compared to control (untreated group) with increasing concentrations of SSD-NCs (Fig. 6). Fragmentation is a remarkable characteristic of apoptosis triggered after activation of capases [28]. In order that there was no intense DNA fragmentation, this test can be a confirmation of cell death by necrosis process.

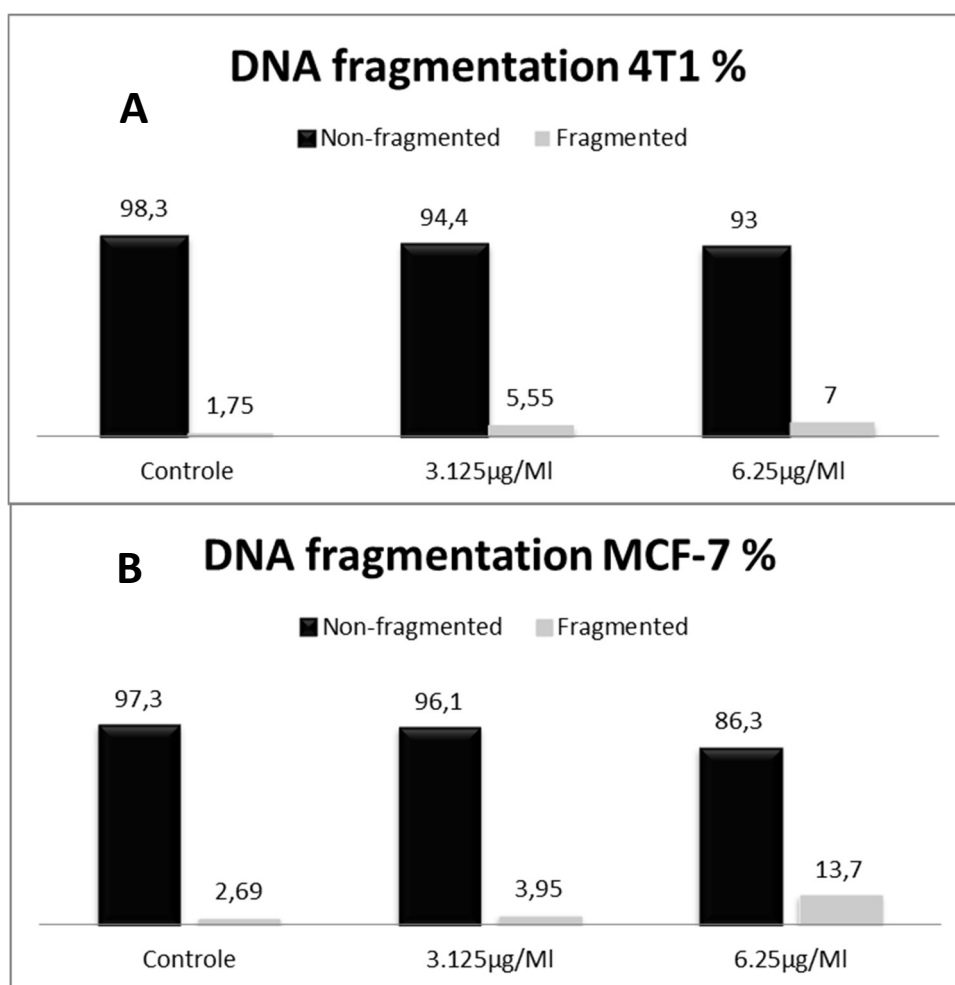


Fig. 6: Effects of solasodine-loaded nanocapsules (3.125 and 6.25 µg/mL) on DNA fragmentation of 4T1 and MCF-7 cells.

4. Conclusions

Stealth nanocapsules containing solasodine were obtained with size mean diameter of 178.5 ± 1.58 , PDI of 0.272 and zeta potential of -0.18 ± 0.219 mV. This formulation in the suspension form was stable over storage at 4°C for 90 days. The treatment of cancer cells with solasodine-loaded nanocapsules at concentrations of 0.7812 to 25 µg/mL for 48 hours induced cytotoxic effects. IC₅₀ values of 5.31 and 4.14 µg/mL for solasodine nanoencapsulated in 4T1 and MCF-7 cells were found, respectively. However, the treatment with solasodine nanoencapsulated did not induce significant loss in the viability of normal NIH 3T3 cells. Regarding the mechanism of cell death, tumor cells were stained mostly by propidium iodide, suggesting a necrosis process. Treatment with the nanocapsules containing solasodine induced DNA fragmentation of tumor cells and alterations in mitochondrial membrane potential. In

assessing the antiproliferative activity it was demonstrated the solasodine encapsulated presents a potential anticancer properties.

Acknowledgments

Authors thank the Research Foundation of the State of Pernambuco (FACEPE) for the partial financial support (grant#0676-4.03/10) and the fellowship of the first author, and the Brazilian Council for Scientific and technological Development (CNPq) for a research grant (#484574/2011-6).

References

- [1] INCA (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). Ministério da Saúde. Tratamento do câncer. 2006.
- [2] NIH (National Institutes of Health. National Cancer Institute). What do you need to know about breast cancer. NIH Publication, n. 05-1556, 2005.
- [3] Tempone AG, Melhem MSC, Prado FO, Motoie G, Hiramoto RH, Antoniazzi MM, Haddad CFB, Jared C. Amphibian secretins for drug discovery studies: a search for a new antiparasitic and antifungal compounds. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2007b; 4:67-73.
- [4] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 2007; 70:461– 477.
- [5] Friedman M. Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stamonium*) seeds. *Journal of Chromatography*, 2004; 1054:143– 155.
- [6] Usubillaga A, Aziz I, Tettamanzi MC, Waibel R, Achenbach H. Steroidal alkaloids from *Solanum sycophanta*. *Phytochemistry*, 1997; 44:537–543.
- [7] Ripperger H, Porzel A. Steroidal Alkaloid Glycosides from *Solanum suaveolens*. *Phytochemistry*, 1997; 46(7):1279–1282.
- [8] Weissenberg M. Isolation of solasodine and other steroidal alkaloids and sapogenins by direct hydrolysis-extraction of *Solanum* plants or glycosides therefrom. *Phytochemistry*, 2001; 58:501–508.

- [9] Daunter B, Cham BE. Solasodine glycosides. In vitro preferential cytotoxicity for human cancer cells. *Cancer Letters*, 1990; 55:209-220.
- [10] Oktar N. Nanobiotechnology: A new world of nanomaterials. *Journal of Neurological Sciences*, 2003; 20:205-206.
- [11] Paris A, Pessey V. The future of nanomaterials and nanobiotechnology. *LabPlus Internacional*, 2003; 17:14-18.
- [12] Santos NP, Nascimento SC, Silva JF, Pereira ECG, Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhães NS. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *Journal Drug Delivery Science Technology*, 2005; 15:355-361.
- [13] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunol. Methods*, 1983; 65:55–63.
- [14] Chen LB, Summerhayes IC, Johnson LV, Walsh ML, Bernal SD, Lampidis TJ. Probing mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1982; 46:141-155.
- [15] Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differentiation*, 1999; 6: 644–651.
- [16] Santos-Magalhães NS, Pontes A, Pereira VMW, Caetano MNP. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *Int. J. Pharm*, 2000; 208: 71–80.
- [17] Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010; 385:113-142.
- [18] Hughes GA. Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine: NBM*, 2005;1:22-30.
- [19] Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. *Química Nova*, 2003; 26:726-737.
- [20] Daunter B, Cham BE. Solasodine glycosides. In vitro preferential cytotoxicity for human cancer cells. *Cancer Letters*, 1990; 55:209-220.

- [21] Bhutani KK, Paul AT, Fayad W, Linder S. Apoptosis inducing activity of steroidal constituents from *Solanum xanthocarpum* and *Asparagus racemosus*. *Phytomedicine* 2010; 17: 789-779.
- [22] Cham BE. Solasodine rhamnosyl glycosides specifically bind cancer cell receptors and induce apoptosis and necrosis. Treatment for skin cancer and hope for internal cancers. *Reasearch Journal of Biological Sciences*, 2007; 2:503-514.
- [23] Smaili SS, Hsu YT, Carvalho ACP, Rosenstock TR, Sharpe JC, Youle RJ. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signalling. *Braz. J. Med. Biol. Res*, 2003; 36:183–190.
- [24] Roy MK, Takenaka M, Kobori M, Nakahara K, Isobe S, Tsushida T. Apoptosis, necrosis and cell proliferation-inhibition by cyclosporine A in U937 cells (a human monocytic cell line). *Pharmacol. Res.*, 2006; 53:293–302.
- [25] Mochizuki T, Ruge Y, Zhao S, Tsukamoto E, Hosokawa M, Strauss HW, Blankenberg FG, Tait JF, Tamaki N. Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with ^{99m}Tc - annexin v. *J. Nucl. Med.*, 2003; 44:1.
- [26] Moss SE, Morgan RO. The annexins. *Genome Biol.*, 2004; 5:219.
- [27] Pec, MK, Aguirre A, Moser-Their K, Fernandez JJ, Souto, ML, Dorta J, Diaz-Gonzalez F, Villar J. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 65:1451–1461.
- [28] Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Reviews*, 2011; 26:51–63.

5 CONCLUSÕES

- ✚ Foram obtidas nanocapsules furtivas contendo a solasodina estáveis, sem variações significativas de pH, tamanho de partículas e índice de polidispersão ao longo de 90 dias;
- ✚ Os tratamentos das células tumorais com as nanocápsulas contendo solasodina por 48 horas induziram efeitos citotóxicos;
- ✚ Os efeitos citotóxicos sugerem de necrose;
- ✚ O tratamento não reduziu de forma significativa a viabilidade da célula normal NIH 3T3 nas concentrações de interesse;
- ✚ As nanocápsulas furtivas contendo solasodina induziram a fragmentação do DNA e alteração da membrana mitocondrial das células tumorais;
- ✚ As células foram marcadas em sua maioria positivamente para iodeto de propídio sugerindo necrose;
- ✚ Considerando os dados acima, foi demonstrado nesse trabalho que a solasodina encapsulada é um potencial agente anticarcinogênico viabilizando futuros estudo *in vivo* da ação antitumoral.

REFERÊNCIAS

AGNIHOTRI, S.M.; VAVIA, P.R. Diclofe

nac-loaded biopolymeric nanosuspensions for ophthalmic application, **Nanomedicine**, v.5, p.90–95, 2009.

ANTON, N.; BENOIT, J.P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. **Journal Controlled Release**. v. 128, p. 185–199, 2008.

ARAUJO J.; VEGA, E.; LOPES, C.; EGEA, M.A.; GARCIA, M.L.; SOUTO, E.B. Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres, **Colloids Surface B: Biointerfaces**, v.72, p.48–56, 2009.

BAYLY, A.C.; ROBERTS, R.A.; DIVE, C. Mechanisms of apoptosis. In **Advances in Molecular and Cell Biology**, v.20, p.183–229, 1997.

BETANCOURT, T.; BYRNE, J.D.; SUNARYO, N.; CROWDER, S.W.; KADAPAKKAM, M.; PATEL, S.; CASCIATO, S.; BRANNON-PEPPAS, L. PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles, **Journal of Biomedical Materials**, v.91A, p.263–276, 2009.

BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle**, v. 6, n.21, p. 2612-2619, 2007.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Moscow)**, v.70, n.2, p.231-239, 2005.

BUDIHardjo, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual Review of Cell and Development Biology**, v.15, p.269-90, 1999.

CAUCHETIER, E.; DENIAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A.; PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature-of the polymer on their in vitro characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v.250, p.273-281, 2003.

CHAM, BE. Topical Solasodine Rhamnosyl Glycosides Derived from the Eggplant Treats Large Skin Cancers: Two Case Reports. **International Journal Clinical Medicine**, v. 2, n. 4, p. 473-477, 2011.

CHAM, BE., DAUNTER, B.; EVANS, R. Topical Treatment of Malignant and Premalignant Skin Cancers by Very Low Concentration of a standard mixture of Solaso-dine Glycosides. **Cancer Letters**, v. 59, n. 3, p. 183-192, 1991.

CHAM, BE., MEARES, HM. Glycoalkaloids from *Solanum sodomaeum* L. Are Effective in the Treatment of Skin Cancers in Man. **Cancer Letters**, V.36, n. 2, p. 111-118, 1987.

COSTANTINO, L.; GANDOLFI, F.; TOSI, G.; RIVASI, F.; VANDELLI, M.A.; FORNI F. Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood–brain barrier, **Journal of Controlled Release**, v.108, p.84–96, 2005.

COTRAN, R. S.; VINAY KUMAR, M. V.; COLLINS, T. Patologia celular I: lesão e morte da célula. **Patologia estrutural da célula e funcional**, 6.ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-26, 2000.

VIOLA, J.P.B.; TEIXEIRA, L.K.; WERNECK, M.B.F. Imunologia tumoral. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, p. 105-112, 2004.

CUI, F.; SHI, K.; ZHANG, L.; TAO, A.; KAWASHIMA, Y. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. **Journal of Controlled Release**, v.114, p.242–250, 2006.

DANHIER, F.; LECOUTURIER, N.; VROMAN, B.; JEROME, C.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; FERON, O.; PREAT, V. Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Controlled Release**, v.133, p.11–17, 2009.

EMMANUEL, S., IGNACIMUTHU, S., PERUMALSAMY, R. & AMALRAJ,T. Antiinflammatory activity of *Solanum Trilobatum*. **Fitoterapia**, v.77, p. 611 – 612, 2006.

ESTEVE-SOUZA, A., SILVA, T.M.S., ALVES, C.C.F., CARVALHO, M.G., BRAZ-FILHO, R. & ECHEVARRIA, A. Cytotoxic activities against Ehrlich Carcinoma and Human K562 Leukaemia of alkaloids and flavonoid from two Solanum species. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.13(6), p. 838 – 842, 2002.

FADOK, V. A.; VOELKER, D. R.; CAMPBELL, P. A.; COHEN, J. J.; BRATTON, D. L. ; HENSON, P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **The journal of Immunology**, v.148, n.7, p. 2207-2216, 1992.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nature Reviews: Cancer**, v. 5, p. 876-885, 2005.

FESTJENS, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, n. 9-10, p. 1371-1387, 2006.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144-149, 2008.

FURTADO, V.C.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRATT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**. v. 22, p. 2967–2979, 2001.

GHOBRIL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEL, A. A Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, p. 178-194, 2005.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Science**, v. 32, n. 1, p. 37-43, 2007.

HAIL J. R, N.; CARTER B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11 p. 889–904, 2006.

HIGAKI M.; ISHIHARA T.; IZUMO N.; TAKATSU M.; MIZUSHIMA, Y. Treatment of experimental arthritis with poly(D,L-lactic/glycolic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone sodium phosphate. **Annals of Rheumatic Diseases**, v.64, p.1132–1136, 2005.

HOLLER, N.; ZARU, R.; MICHEAU, O.; THOME, M.; ATTINGER, A.; VALITUTTI, S.; BODMER, J. L.; SCHNEIDER, P.; SEED, B. ; TSCHOPP, J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. **Nature Immunology**, v. 1, n. 6, p. 489-495, 2000.

HU, K.; SHI, Y.; JIANG, W.; HAN, J.; HUANG, S.; JIANG, X. Lactoferrin conjugated PEGPLGA nanoparticles for brain delivery: preparation, characterization and efficacy in Parkinson's disease, **International Journal of Pharmaceutics**, v.415, p.273–283, 2011.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews: Cancer**, v. 2, p. 277-288, 2002.

INCA (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). Ministério da Saúde. **Tratamento do câncer**. 2006. Disponível em http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoos_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/tratamento, acessado em 16 de janeiro de 2013.

INCA (Instituto Nacional de Câncer do Brasil).. ESTIMATIVA 2012: **Incidência do câncer no Brasil**. 2012. 1-122 p.

ITO, Y.; OTSUKI, Y. Localization of apoptotic cells in the human epidermis by an in situ DNA nick end-labeling method using confococal reflectant laser microscopy. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.46, p.783-786, 1998.

JEFFREY, B. K. A célula. In: JEFFREY, B. K. **Atlas de histologia funcional**. São Paulo: Artes Médicas, p. 1-25. 2000

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, p. 139-163, 2005.

KERR, J. F.R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Methods Cell Biology**, v. 46, p. 1–27, 1995.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KOMATSU, M.; WAGURI, S.; UENO, T.; IWATA, J.; MURATA, S.; TANIDA, I.; EZAKI, J.; MIZUSHIMA, N.; OHSUMI, Y.; UCHIYAMA, Y.; KOMINAM, EI; TANAKA, K.; CHIBA, T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. **Journal of Cell Biology**, v.169, p. 425-434, 2005.

KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL. H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 1, p. 193-212, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Adaptação, dano e morte celular. In: **Bases patológicas das doenças**, 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Cap. 1, p. 3-48, 2005.

KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v.75, p.1–18, 2010

KUWANA, T.; NEWMAYER, D.D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. **Current Opinion Cell Biology**, v. 15, p. 691–699, 2003.

LAMPRECHT A.; UBRICH, N.; YAMAMOTO, H.; SCHAFER, U.; TAKEUCHI, H.; MAINCENT P.; KAWASHIMA Y.; LEHR C.M. Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.299, p.775–781, 2001.

LAMPRECHT, A.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Nanoparticles enhance therapeutic efficiency by selectively increased local drug dose in experimental colitis in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.315, p.196–202, 2005.

LAVIN, M.R. Neuroleptic-induced extrapyramidal side effects. **American Journal of Psychiatry**, v.150, p. 1752-3, 1993.

LECANU, L. ; HASHIM, A.I. ; MCCOURTY, A. ; GISCOS-DOURIEZ, I. ; DINCA, I.; YAO, W. ; VICINI, S. ; SZABO, G. ; ERDÉLYI, F. ; GREESON, J. ; PAPADOPOULOS, V. The

naturally occurring steroid solasodine induces neurogenesis in vitro and in vivo. **Neuroscience**, v.183, p. 251-264, 2011.

LIAO X.; TANG, S.; THRASHER, J. B.; GRIEBLING, T. L.; LI, B. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 4, p. 505-515, 2005.

LIN, Y.; CHOKSI, S.; SHEN, H. M.; YANG, Q. F.; HUR, G. M.; KIM, Y. S.; TRAN, J. H.; NEDOSPASOV, S. A. ; LIU, Z. G. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 11, p. 10822-10828, 2004.

LOWE, M.; LANE, J.D.; LUCOCQ, J.; PRYDE, J.; BARR, F.A.; WOODMAN, F.G.; ALLAN, V.J. Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. **Journal of Cell Biology**, v. 156, n. 3, p.495-509, 2002.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American Journal of Pathology**, v. 146, p. 3-15, 1995.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C.; MARIA, S. S. Morte celular. IN: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**, São Paulo: Manole, cap. 23, p. 275-281, 2001

MESTER, J.; REDEUILH, G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.8, p.872-885, 2008.

MOCHIZUKI, T.; RUGE, Y.; ZHAO, S.; TSUKAMOTO, E.; HOSOKAWA, M.; STRAUSS, H. W.; BLANKENBERG, F. G.; TAIT, J.F.; TAMAKI, N. Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with ^{99m}Tc- annexin v. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 1, 2003.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 385, p. 113-142, 2010.

MOSS, S. E.; MORGAN, R. O. The annexins. **Genome Biology**, v. 5, n. 4, p. 219, 2004

NES, W.D.; HANNERS, P.K.; BEAN, G.A.; PATTERSON, G.W. Inhibition of growth and sitosterol-induced sexual reproduction in *Phytophthora cactorum* by steroidal alkaloids. **Phytopathology**, v.72, p.447–450, 1982.

NEWMAN D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461 – 477, 2007.

NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Science**, v.22, p.299-306, 1997.

NIH (National Institutes of Health. National CancerInstitute). **What do you need to know about breast cancer**. NIH Publication, n. 05-1556, 2005.

ONO, M.; NISHIMURA, K; SUZUKI, K.; FUKUSHIMA, T.; IGOSHI, K.; YOSHIMITSU, H.; IKEDA, T.; NOHARA, T. Steroidal Glycosides from the underground Parts of *Solanum Sodomaeum*, **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.54, n. 2, p. 230-233, 2006.

OWENS, D.E.; PEPPAS, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.307, p.93–102, 2006.

PINTO, C.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: NBM**. v.2, p. 8–21, 2006.

POLLOCK, R. E. Manual de Oncologia Clínica. 8ªed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, p.10, 2006.

ROBBINS, T.; COTRAN,R.S.; KUMAR,V. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251 p.

ROBERT, E.G.; CATEZ, F.; SMITH, C.L; YOULE, R.J. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. **Dev. Cell**, v.1, pp. 515–525, 2001.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular**, v.45, p.528-37, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SEGAL, R., SCHLOSSER, E. Role of glicosidades in the membranolytic, antifungal action of saponins. **Microbiology**. V. 104: p.147-150

SEITZ, J.A.; MEHTA. S.P.; YEAGER, J.L. Revestimento de Comprimidos. In: LACHMAN L.; LIEBERMAN H.A.; KANIG J.L. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. vol.2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 599 – 643, 2000.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal Controlled Release**. v. 70, p. 1-20, 2001.

TOSI, G.; COSTANTINO, L.; RIVASI, F.; RUOZI, B.; LEO, E.; VERGONI, A.V.; TACCHI, R.; BERTOLINI, A.; VANDELLI, M.A.; FORNI, F. Targeting the central nervous system: in vivo experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with Loperamide and Rhodamine-123. **Journal of Controlled Release**, v.122, p. 1-9, 2007.

TRUMP; The Pathways of Cell Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis Benjamin E Trump Toxicol Pathol January vol. 25no. 1 82-88,1997

VIJAYAN P, KUMAR VS, DHANARAJ SA, BADAMI S, SURESH B. In vitro Cytotoxicity and Anti-tumor properties of the total Alkaloid fraction of unripe fruits of Solanum pseudocapsicum. **Pharma Biol**, v.40, p.456-60, 2002

WANG, M.; THANOU, M. Targeting nanoparticles to cancer. **Pharmacological**, v.62, p.90–99, 2010.

YASUHARA, S.; ZHU, Y.; MATSUI, T.; TIPIRNENI, N.; YASUHARA, Y.; KANEKI, M.; ROSENZWEIG, A.; MARTYN, J. A. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51, p. 873-885, 2003.

ZONG, W. X.; DITSWORTH, D.; BAUER, D. E.; WANG, Z. Q. ; THOMPSON, C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. **Genes and Development**, v. 18, n. 11, p. 1272-1282, 2004.

ANEXO A – Guide for authors da Biomaterials



Guide for Authors

The peer review submission system for *Biomaterials* is located here: <http://ees.elsevier.com/biomat/>

The Elsevier Editorial System (EES) is a web-based submission and review system. Authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process.

Please register at: <http://ees.elsevier.com/biomat/>

Referees, whose names are not normally disclosed to the authors, will study all contributions which the Editor-in-Chief deems to be of sufficient significance and interest to be sent for peer review. The criteria by which this initial assessment is made include relevance to the scope of the journal, the originality of the work and its significance to the broad development of the field of biomaterials.

Before You Begin

All authors, especially those submitting to the journal for the first time, are encouraged to read the following document authored by the Editor in Chief, which gives an overview of the journal as well as the writing and selection process of academic publishing as it relates to *Biomaterials*: [Writing Papers for Biomaterials](#).

Ethics in Publishing: For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/authorethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by

the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Mandatory Author Declaration: In addition to uploading manuscripts and figures, it is required that the corresponding author of each manuscript uploads a separate Author Declaration. All authors must sign this declaration; the corresponding author may not sign on behalf of other authors.

This Declaration covers a number of logistic and ethical issues. Please use the template given above for this Declaration. Authors may save this template, obtain the required signatures and then upload it as an integral part of their submission. The editorial process will not begin until and unless all authors have signed the declaration.

N.B.: The Author Declaration is independent of, and in addition to, the "Journal Publishing Agreement" agreement which is issued on acceptance.

Amendments to Manuscripts

In order to maintain the integrity of the scientific record, the version that is published in an issue on ScienceDirect and in print MUST be identical. One set of page proofs will be sent to the corresponding author. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return, but corrections are restricted to typesetting errors only. Proofs are NOT to be considered as drafts. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the responsibility of the corresponding author.

Copyright

All authors must sign the "Journal Publishing Agreement" before the article can be published. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with an agreement form or a link to the online version of this agreement. This transfer agreement enables Elsevier Ltd to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the author's proprietary rights. As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Role of the Funding Source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in

the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding Bodies Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Manuscript Preparation

General: Manuscripts must be word processed (preferably in Word format), double-spaced with wide margins and a font size of 12 or 10 pt. Files prepared in LaTeX are not supported. Figure captions should be in Arial font 9pt. Please check the current style of the journal, particularly the reference style (Vancouver), and avoid excessive layout styling as most formatting codes will be removed or replaced during the processing of your article. In addition, do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). However do use bold face, italic, subscripts, superscripts etc. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. The preferred style is: Surname, Initials, Department, Institution, City/State, Postal Code, Country. Authors should retain copies of all versions of their manuscript submitted to the journal. Authors are especially requested to be vigilant over the submission of the correct version of the manuscript at the various stages of the editorial process.

English Language: Manuscripts should be proof-read and have English language errors corrected before submission as we may have to return papers due to poor language usage. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> for more information.

Paper Length: Authors are urged to write as concisely as possible.

Abstracts: All manuscripts are to be supplied with an Abstract of about 100-200 words in length.

Keywords: Authors must provide 4-6 keywords for indexing purposes. A keyword list can be found at the end of these instructions. [click here](#)).

Text: Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Appendix (where necessary), Figures, Figure Captions and Tables, Supplementary Data. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. An abbreviated title for use as a running headline should also be supplied. Authors are requested to acknowledge funding sources for the work.

Units: The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in

Europe) is ambiguous and must not be used. If a large number of symbols are used it is helpful if authors submit a list of these symbols and their meanings.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to references by a number in square brackets on the line (e.g. Since Peterson[1]), and the full reference should be formatted according to the permutation of the Vancouver reference system with numbers in the text. It is suggested that authors refer to the following link for a comprehensive overview of the Vancouver reference styles: [Vancouver Reference Styles](#)

Examples of formatting follow:

1. Driessens FCM, Boltong MG, Bermudez O, Planell JA. Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study. *J Mater Sci: Mater Med* 1993;4:503-508.
2. Nancollas H. In vitro studies of calcium phosphate crystallisation. In: Mann S, Webb J, Williams RJP, editors. *Biomaterialization. Chemical and biochemical perspectives*. New York: VCH, 1989. p. 157-182.
3. Brown W, Chow LC. Combinations of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and paste as mineralizers and cements. US Patent No. 4612053, 1986.

N.B.: "Et al" must be used after the first 6 authors have been named. *Biomaterials* does not use the publication month or day.

Online Sources: References to online sources, including articles in press, should contain at a minimum the full URL and year the source was accessed. Furthermore, if known, the following information should be given: author names, dates, reference to a source publication.

Examples of formatting follow:

1. UK House of Commons Science and Technology Committee. Scientific Publications: Free for All? Tenth Report of Session 2003-4 Volume 1. London: The Stationary Office Ltd. Online. 2004 July. Available from URL: <http://www.publications.parliament.uk/pa/cm200304/cmselect/cmsctech/399/39902.htm>
2. Wellcome Trust. Economic Analysis of Scientific Research Publishing. Histon, UK: Wellcome Trust. Online. 2003. Available from URL: http://www.wellcome.ac.uk/doc_wtd003181.html
3. Keeney M, Lai JH, Yang F. Recent progress in cartilage tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2011. Available from URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21531126> (DOI: 10.1016/j.copbio.2011.04.003).

Artwork

Electronic artwork

General

points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
 EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".
 TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
 TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
 TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Video Data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 30 MB and running time of 5 minutes. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be

embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content. Files can be stored on diskette, ZIP-disk or CD (either MS-DOS or Macintosh).

After Acceptance

Proofs: One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author and should be returned within 48 hours of receipt. The average amount of time between acceptance and receipt of typeset proof is 6 working days. Papers are published in print within another 8 weeks upon receipt of author corrections. Corrections should be restricted to typesetting errors. Any queries should be answered in full. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return.

Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader® version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Track a Paper: Authors can track their paper status online after the paper has been accepted and forwarded to the Publisher. Enter your Elsevier reference number (JBMT xxx) and the Corresponding author's family name at the following web page: <http://www.elsevier.com/trackarticle>. Corresponding authors will receive an acknowledgement email from Elsevier with the reference number and the family name on it. Authors can also go to the 'track a paper' page by clicking onto the 'track a paper' button on the left hand side of the journal home page. .

Offprints: The corresponding author will be provided with a PDF of the article via email. The PDF is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Author Enquiries: For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.