



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA**

Sanielly Jonhara Torres Silva

**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-PEG VOLTADAS A
LIBERAÇÃO DO ÁCIDO CUMÁRICO COMO AGENTE
ANTINEOPLÁSICO**

Recife

2018

Sanielly Jonhara Torres Silva

**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-PEG VOLTADAS A
LIBERAÇÃO DO ÁCIDO CUMÁRICO COMO AGENTE
ANTINEOPLÁSICO**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Morfotecnologia do Centro de
Biociências da Universidade Federal
de Pernambuco como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Morfotecnologia.

Área de Concentração: Morfotecnologia.

Orientadora: **Prof.^a Dr.^a Rosa Valéria
da Silva Amorim**

Coorientador: **Prof. Dr. Severino Alves
Junior**

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Sanielly Jonhara Torres

Nanopartículas de quitosana-PEG voltadas a liberação do ácido cumárico como agente antineoplásico/ Sanielly Jonhara Torres Silva-2018.

82 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Rosa Valéria da Silva Amorim

Coorientador: Severino Alves Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Nanotecnologia 2. Quitosana 3. Câncer I. Amorim, Rosa Valéria da Silva (orient.) II. Alves Júnior, Severino (coorient.) III. Título

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-173

SANIELLY JONHARA TORRES SILVA

**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-PEG VOLTADAS A
LIBERAÇÃO DO ÁCIDO CUMÁRICO COMO AGENTE
ANTINEOPLÁSICO**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Morfotecnologia da Universidade
Federal de Pernambuco como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Morfotecnologia.

Aprovado em: 28/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Rosa Valéria da Silva Amorim (Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Eliete Cavalcante da Silva (Interna)

Dr.^a Marília de Assis Alcoforado Costa (Externa)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro, de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof.^a Dr.^a Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

DIRETOR

Prof.^a Dr.^a Maria Eduarda Larrazábal

VICE-DIRETOR

Prof.^a Dr.^a Oliane Maria Correia Magalhães

Recife

2018



pósMorfotec

Programa de Pós-Graduação
em Morfotecnologia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

COORDENADOR

Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite

VICE-COORDENADOR

Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza

CORPO DOCENTE

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Prof.^a Dr.^a Kenia Valenca Correia

Prof.^a Dr.^a Cláudia Sampaio de Andrade
Lima

Prof.^a Dr.^a Luciana Maria Silva de
Seixas Maia

Prof. Dr. Claudio Gabriel Rodrigues

Prof. Dr. Luiz Lucio Soares da Silva

Prof.^a Dr.^a Eliete Cavalcante da Silva

Prof.^a Dr.^a Paloma Lys de Medeiros

Prof. Dr. Gilberto Gonçalves Rodrigues

Prof. Dr. Ricardo Yara

Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza

Prof.^a Dr.^a Rosa Valeria da Silva

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Amorim

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso
Vieira

Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite

Prof.^a Dr.^a Juliana Pinto de Medeiros

Recife

2018

Porque dele, e por meio dele, e para ele são todas as coisas. A ele, pois, a glória eternamente. Amém!

Romanos 11.36

Aos meus pais Julio João e
Maria Salete e irmão Juliellyson
Torres.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o autor da minha vida, o meu socorro bem presente, e meu ajudador.

Aos meus pais Julio João e Maria Salete, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando em cada sonho e me ajudando a superar todos os obstáculos.

Ao meu irmão Juliéllyson Torres, pelas palavras de ânimo e de encorajamento nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

A minha Tia Maria Graciete e Minha avó Maria Pereira por suas orações constantes e palavras de amor.

Aos meus orientadores Rosa Valéria e Severino Alves, por transmitirem seus conhecimentos, e por terem me recebido de braços abertos em seus respectivos laboratórios, onde de fato um “projeto” tornou-se realidade.

A querida Prof^a. Dr^a. Jaciana Aguiar, por seu carinho e atenção.

A Maria Eduarda Farias, Yuri Albuquerque e Leandro Azevedo, pela paciência e disposição em ajudar, vocês foram peças fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos colegas de turma, em especial a Juliana Barbosa e Isabelly Barbosa pela oportunidade da convivência e demonstração de afeto e amizade.

Ao Msc Rafael Padilha, por sua disponibilidade em ouvir, ajudar e incentivar.

A minha grande amiga Gibbelly Cavalcante, por todos esses anos de amizade sadia e sincera, mas sobretudo por sua lealdade, minha sincera gratidão.

A Jéssica Andrade, que apesar do pouco tempo de convivência se tornou amiga, irmã, mãe, professora; as suas palavras de amor e sabedoria, ouvidos atentos e abraços sinceros fizeram toda a diferença na concretização e conclusão deste trabalho.

As minhas parceiras de vida, Mariah Alexandre, Camila Martina, Carolina Monteiro, que são as irmãs que escolhi para a vida, obrigada pelo incentivo e pela torcida de sempre.

A Adriano Moraes, por ter sido meu braço direito e ombro amigo nessa etapa final do trabalho, pelos conselhos e por todo apoio nas minhas decisões.

Aos demais professores do programa, familiares e amigos que diretamente ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Inúmeras estratégias vêm sendo desenvolvidas na terapia do câncer, como a encapsulação de agentes antitumorais através de nanopartículas (Np's) poliméricas. O presente trabalho propõe o desenvolvimento de Np's de Quitosana-Polietileno glicol (Np's QS/PEG), a fim de encapsular o Ácido Cumárico (*p*-CA) e avaliar o seu potencial citotóxico frente a linhagens celulares tumorais. As Np's QS/PEG foram desenvolvidas por gelificação iônica, analisadas quanto ao tamanho, morfologia e caracterizações físico-químicas, também foi realizada a eficiência de encapsulação do *p*-CA, sua liberação *in vitro* e a avaliação da citotoxicidade frente as linhagens de fibroblastos murino (3T3) e adenocarcinoma mamário murino (4T1). As Np's QS/PEG apresentaram um tamanho de 173,8 nm com índice de polidispersão de 0,03 e morfologia esférica. As caracterizações físico-químicas mostraram que houve interação entre os polímeros e o composto. A capacidade de encapsulação das Np's QS/PEG para o *p*-CA foi de 79,6%, e quando submetidas em pH 2,0 tiveram uma liberação em torno de 90%, enquanto que em pH de 5,6, 22%. O ensaio de viabilidade celular mostrou que o *p*-CA encapsulado nas Np's QS/PEG conseguiu uma maior inibição celular frente às linhagens estudadas em relação ao *p*-CA na sua forma livre. Assim, o encapsulamento do *p*-CA em QS facilitou a sua permeação para o interior da célula, demonstrando seu potencial como uma futura alternativa na terapia do câncer.

Palavras chaves: Nanopartículas. Câncer. Quitosana. Ácido Cumárico.

ABSTRACT

Numerous strategies have been developed in cancer therapy, as the encapsulation of antitumor agents through polymer nanoparticles (Np's). The present work proposes the development of chitosan-polyethylene glycol nanoparticles (Np's QS/PEG) to encapsulate Cumaric Acid (*p*-CA), and to evaluate its cytotoxic potential against tumor cell lines. The QS/PEG Np's were developed by ionic gelation, analyzed for size, morphology and physicochemical characterization, the efficiency of encapsulation of *p*-CA, its in vitro release and the evaluation of cytotoxicity against murine fibroblast strains (3T3) and murine mammary adenocarcinomic (4T1). The NPS QS/PEG had a size of 173,8 nm with polydispersity index of 0,03 and spherical morphology. The physicochemical characterizations showed that there was interaction between the polymers and the compound. The encapsulation capacity of the NP's QS/PEG for the *p*-CA was 79,6%, and when submitted at pH 2,0 they had a release of around 90%, while at pH of 5,6, 22%. The cell viability assay showed that *p*-CA encapsulated in QS/PEG Np's achieved greater cell inhibition against the strains studied with respect to *p*-CA in its free form. Thus, the encapsulation of *p*-CA in QS facilitated its permeation into the cell, demonstrating its potential as a future alternative in cancer therapy.

Keywords: Nanoparticles. Cancer. Chitosan. Cumaric Acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sistema de Liberação controlada X Sistema de Liberação Não Controlada (Convencional).....	25
Figura 2 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.....	27
Figura 3 – Representação das estruturas primárias da quitina e da quitosana.....	28
Figura 4 – Estruturas química dos ácidos cumáricos.....	35
Figura 5 – Sistema desenvolvido para Liberação controlada in vitro mimetizando o pH gástrico (pH= 2,0) e pH tumoral (pH= 5,6).....	44
Figura 6 – Sistema desenvolvido para Liberação controlada in vitro mimetizando o pH gástrico (pH= 2,0) e pH tumoral (pH= 5,6).....	44
Figura 7 – Fotomicrografia das Nanopartículas de Quitosana/PEG (1:1).....	46
Figura 8 – Fotomicrografia das Nanopartículas de Quitosana/PEG (1:2).....	47
Figura 9 – Fotomicrografia das Nanopartículas de Quitosana/PEG – ácido p-cumárico (QS/PEG – p-CA).....	47
Figura 10 – Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) quitosana (QS), polietileno glicol (PEG), Nanopartícula de Quitosana/PEG (Np's QS/PEG), ácido p-cumárico (p-CA) Nanonopartículas de Quitosana/PEG – ácido p-cumárico (Np's QS/PEG – p-CA).....	49
Figura 11 – Curva de TG/DTG da quitosana (QS).....	50
Figura 12 – Curva de TG/DTG das Np's quitosana/PEG (QS/PEG).....	51
Figura 13 – Curva de TG/DTG do ácido p-cumárico (p-CA).....	52

Figuro 14 – Curva de TG/DTG das Np's quitosana/PEG-ácido p-cumárico (QS/PEG – p-CA).....	53
Figura 15 – Difratoograma de Raio x DRX da QS, PEG, QS/PEG e QS/PEG – p-CA.....	54
Figura 16 – Curva de calibração do p-CA e Equação Linear da Reta.....	55
Figura 17 – Perfil de liberação in vitro das Nanopartículas de Quitosana/PEG – ácido p-cumárico (QS/PEG – p-CA) no pH 2,0 e pH 5,6 a 37°C.....	56
Figura 18 – Efeito do Ácido p-cumárico (p-CA), Cisplatina, nanopartículas de quitosana/PEG (QS/PEG) e nanopartículas de quitosana/PEG – ácido p-cumárico (QS/PEG – p-CA) sob a viabilidade celular da linhagem 3T3.....	57
Figura 19 – Efeito do Ácido p-cumárico (p-CA), Cisplatina, nanopartículas de quitosana/PEG (QS/PEG) e nanopartículas de quitosana/PEG-ácido p-cumárico (QS/PEG – p-CA) sob a viabilidade celular da linhagem 4T1.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vantagens das formas farmacêuticas de liberação controlada sobre as fórmulas farmacêuticas convencionais.....	26
Tabela 2 – Tipo de nanopartículas, tamanho e índice de polidispersão.....	48

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>p</i>	Posição química para
<i>o</i>	Posição química orto
<i>m</i>	Posição química meta
n ^o	Número
‘	Apóstrofo
/	Barra
-	Hífen
mg	Miligramas
Kg	Quilograma
μmol	Micromol
L	Litro
%	Por cento
mL	Mililitro
μm	Micrometro
M	Molar
p	Peso
v	Volume
s	Segundos
kV	Quilivolt
cm	Centímetro
min	Minutos
°	Graus

°C	Graus Celsius
nm	Nanometros
β	Letra grega beta
α	Letra grega alfa
mA	Miliampere
=	Sinal de igual
+	Sinal de mais
<	Menor que
2θ	Theta

LISTA DE ABREVIATURAS

3T3	Fibroblasto Murino
4T1	Adenocarcinoma Mamário Murino
A549	Adenocarcinoma de Pulmão
AIDS	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	Análise de Variância
ASTM	American Society for Testing and Materials Standards
BSTR	Laboratório de Terras Raras
CaCo-2	Adenocarcinoma de Colón
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CPAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DHE	Departamento de Histologia e Embriologia
DL50	Dose letal capaz de matar 50% dos indivíduos da população
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz
DMEM	Meio Dulbecco/Vogt modified Eagle's Minimal Essential Medium
DMSO	Sulfóxido de Dimetilo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
DQF	Departamento de Química Fundamental
DR-X	Difração de Raios
DTG	Análise Térmica Diferencial
FT-IR	Infravermelho com Transmissão de Fourier
HCC827	Adenocarcinoma de Pulmão
HCl	Ácido Clorídrico

HPLC	High Performace Liquid Cromatography – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPG2	Hepatocarcinoma Humano
HT29-D4	Adenocarcinoma de Colorretal
LQES	Laboratório de Química do Estado Sólido.
LWM	Low Weight Molecular - Baixo Peso Molecular
MCF7	Adenocarcinoma Mamário Humano
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
N ₂	Gás Nitrogênio
N2a	Neuroblastoma Murino
NaCl	Cloreto de Sódio
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCI-H299	Carcinoma Mucoepidermoide de Pulmão Humano
NP's	Nanopartículas
OD	Densidade Óptica
PBS	Tampão Fosfato
<i>m</i> -CA	Ácido meta-Cumárico
<i>o</i> -CA	Ácido orto-Cumárico
<i>p</i> -CA	Ácido para-Cumárico
PCS	Espectroscopia de Correlação de Fótons
PDI	Índice de Polidispersidade ou Polidispersão
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial de Hidrogênio
pKa	Constante de Acidez

QS	Quitosana
QS/PEG	Quitosana/Polietilenoglicol
Rpm	Rotações por Minuto
RPMI	Roswell ParK Memorial Institute Medium
SisNano	Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologia
TGA	Análise Termogravimétrica
TPP	Tripolifosfato Pentasódico Hexahidratado
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV-vis	Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA.....	24
2.2 NANOTECNOLOGIA VOLTADA A CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.....	24
2.2.1 Liberação Controlada de Fármacos.....	24
2.2.2 Nanopartículas.....	26
2.3 QUITINA E QUITOSANA.....	28
2.4 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	29
2.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	31
2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	31
2.5.2 Tamanho de Partícula e Índice de Polidispersidade.....	31
2.5.3 Espectroscopia do Infravermelho por Transmissão de Fourier (FT-IR).....	32
2.5.4 Análise Termogravimétrica (TGA).....	32
2.5.5 Avaliação da Cristalinidade – Difração de Raios-X (DR-X).....	32
2.6 CÂNCER.....	33
2.7 ÁCIDO CUMÁRICO.....	34
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4 METODOLOGIA.....	38
4.1 MATERIAIS.....	38
4.2 CÉLULAS.....	38
4.3 PURIFICAÇÃO E DESPOLIMERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	38
4.4 SÍNTESE DAS NANOPATÍCULAS.....	39
4.4.1 Síntese da Nanopartícula de Quitosana/PEG (Np's QS/PEG).....	39
4.4.2 Síntese da Nanopartícula de Quitosana/PEG-Ácido Cumárico (Np's QS/PEG – p-CA).....	40
4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	40
4.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	40

4.5.2	Análise de Tamanho de Partícula e Índice de Polidispersão.....	40
4.5.3	Espectro de Infravermelho com Transmissão de Fourier (FT-IR).....	41
4.5.4	Análise Termogravimétrica (TGA).....	41
4.5.5	Difratometria de raios-x (DR-X).....	41
4.5.6	Curva de calibração do Ácido p-Cumárico.....	42
4.5.7	Eficiência de Encapsulação.....	42
4.5.8	Estudo da Liberação in vitro do Ácido p-Cumárico a partir das Nanopartículas de Quitosana/PEG – p-CA.....	43
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	44
4.6.1	Ensaio de Viabilidade Celular.....	44
5	RESULTADOS.....	46
5.1	CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DAS NANOPARTÍCULAS.....	46
5.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	46
5.1.2	Análise de Tamanho de Partícula e Índice de Polidispersão.....	48
5.1.3	Espectro de Infravermelho com Transmissão de Fourier (FT-IR).....	48
5.1.4	Análise termogravimétrica (TGA).....	49
5.1.5	Difratometria de raios-x (DR-X).....	53
5.1.6	Eficiência de encapsulação.....	54
5.1.7	Liberação in vitro do Ácido p-Cumárico a partir das Nanopartículas de Quitosana/PEG.....	55
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	55
5.2.1	Ensaio de Viabilidade Celular.....	56
6	DISCUSSÃO.....	59
6.1	CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS.....	59
6.1.1	Análise da Morfologia das Np's por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	59
6.1.2	Análise de Tamanho de Partícula e Índice de Polidispersão.....	59
6.1.3	Espectro de Infravermelho com Transmissão de Fourier (FT-IR).....	60
6.1.4	Análise termogravimétrica (TGA).....	61
6.1.5	Difratometria de raios-x (DR-X).....	62
6.1.6	Eficiência de encapsulação.....	62
6.1.7	Liberação in vitro do Ácido p-Cumárico a partir das Nanopartículas de Quitosana/PEG.....	63

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	65
6.2.1 Ensaio da Viabilidade Celular.....	65
7 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde e vem ganhando grandes proporções, pois é uma das maiores causas de morte em todo mundo. Com diagnóstico tardio e tratamento de alto custo, muito agressivo e invasivo, gera vários efeitos colaterais com grandes repercussões econômicas e sociais. (FERLAY ET AL. 2015).

Atualmente, inúmeras estratégias vêm sendo desenvolvidas e utilizadas na terapia de câncer, estando a maioria destas comprometidas com a melhor forma de administração da droga. Os chamados sistemas de carreamento, direcionam o medicamento no local alvo, como é o caso dos nanocarreadores. Estes, além de trazer vários benefícios terapêuticos como tamanho reduzido, estabilidade física e biológica para proteção do fármaco, podem também superar casos de resistência a múltiplas drogas pelas células cancerosas. (JABIR et al., 2012).

Agentes dietéticos naturais têm chamado a atenção tanto em pesquisa como a própria população devido a sua capacidade de reduzir os riscos relacionados ao desenvolvimento do câncer. Esses agentes dietéticos naturais possuem uma grande variedade de compostos bioativos, incluindo os compostos fenólicos. (AMIN et al., 2009).

O ácido cumárico (*p*-CA) é um ácido fenólico presente em cogumelos, cereais e frutas, esta substância apresenta atividades biológicas como ação antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênico, antiplaquetária e anticancerígena que podem ser atraentes em tratamentos tumorais. Estudos recentes mostram que o *p*-CA apresenta capacidade elevada em eliminar espécies reativas de oxigênio em algumas linhagens tumorais. (PRAGASAM et al., 2013, EL-SEEDI ET AL., 2012).

A eficácia dos compostos fenólicos depende da garantia de sua estabilidade, bioatividade e biodisponibilidade dos ingredientes ativos, sendo este o grande obstáculo, já que são suscetíveis à degradação. Este problema pode ser contornado através da adsorção e ou encapsulação destes compostos em carreadores como nanopartículas de quitosana. (FANG, BHANDARI, 2010).

A quitosana (QS) é um polissacarídeo obtido através da desacetilação da quitina, vem sendo amplamente utilizada na indústria farmacêutica, como um sistema de liberação de fármacos, na indústria alimentícia e engenharia de tecidos. A liberação de drogas a

partir de nanopartículas a base de quitosana depende do seu comportamento de entumescimento, ou seja, absorção da água, e também das interações droga-quitosana, que são influenciadas pelo pH do meio. (SOARES et al, 2016, YUAN et al., 2010).

O uso de polietilenoglicol (PEG), um surfactante hidrofílico não iônico, como copolímero na produção de nanopartículas em conjunto com a quitosana, torna o dispositivo desenvolvido mais biocompatível e mais estável em fluidos biológicos, pois diminui a tendência natural de agregação. (PREGO et al, 2006).

Deste modo, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de nanopartículas Quitosana-PEG (Np's QS/PEG), via gelificação iônica da quitosana, e encapsulamento do ácido cumárico (*p*-CA), caracterização destas partículas e avaliação do seu potencial citotóxico, visando obter um sistema associado como um potencial promissor para agente antitumoral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA

A nanociência pode ser definida como o estudo de fenômenos naturais que regem o comportamento dos átomos, moléculas, e estruturas em escala nanométrica. A nanotecnologia representa um conjunto de técnicas utilizadas na manipulação de átomos e moléculas para a criação de novos materiais em escala nanométrica. (DIMER et al., 2013. BRASIL, 2012b).

Grande atenção tem sido voltada a esses materiais por apresentarem propriedades físico-químicas diferentes dos materiais já conhecidos, o que oferece grandes possibilidades de aplicações, dentre as quais estão os nanomedicamentos, nanocarreadores terapêuticos, adjuvantes terapêuticos, diagnósticos e em diversos produtos para a saúde. (FALLEIROS et al., 2011).

Vários trabalhos científicos relatam os benefícios da nanotecnologia na terapia em que grande parte dos estudos visam o desenvolvimento de formulações nanotecnológicas dirigidas ao tratamento do câncer, de doenças inflamatórias, cardiovasculares, neurológicas e ao combate do vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS). (DIMER et al., 2013).

O incentivo a nanotecnologia no nosso país tem se mostrado progressivo. A portaria nº 245 de 5 de abril de 2012, do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação publicada em 09 de abril de 2012 no Diário Oficial, anunciou a criação do Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologia (SisNano), para o aumento do peso da atividade industrial no Produto Interno Bruto do país, cujo apelo é principalmente voltado à indústria farmacêutica e de cosméticos. (BRASIL, 2012a).

2.2 NANOTECNOLOGIA VOLTADA A CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

2.2.1 Liberação Controlada de Fármacos

O sucesso das pesquisas na área da nanotecnologia estimulou o desenvolvimento de transportadores em escala nanométrica para a liberação de fármacos de forma controlada a partir de 1980. (HOFFMAN, 2008).

Na liberação não controlada, isto é, no sistema de liberação convencional, a concentração sanguínea de fármacos oscila em picos máximos e mínimos de declínio, que pode causar toxicidade em altas concentrações ou a ineficiência do tratamento em baixas concentrações sanguíneas. (AULTON, 2008).

Os dispositivos com liberação modificada têm como propósito melhorar a disponibilidade de compostos bioativos. Neste âmbito, uma liberação controlada refere-se à produção de uma concentração estável no organismo dentro da faixa terapêutica e redução dos efeitos secundários (Figura 1). (SÁEZ, HERNÁEZ, LOPES, 2003).



Figura 1: Sistema de Liberação controlada X Sistema de Liberação Não Controlada (Convencional). Fonte: Laboratório de Química do Estado Sólido – LQES. Instituto de Química – UNICAMP (<http://lqes.iqm.unicamp.br>).

Vários estudos demonstram as vantagens das formas farmacêuticas de liberação controlada sobre as formas farmacêuticas de sistema de liberação convencional, dentre as quais podemos citar: redução da frequência de administração, maior adesão do paciente ao tratamento, redução dos efeitos colaterais e menor custo total do tratamento (Tabela 1). (ALLEN et al., 2013; AULTON, 2008; DAS, DAS, 2003; KREUTER, 2001).

Tabela 1. Vantagens das formas farmacêuticas de liberação controlada sobre as fórmulas farmacêuticas convencionais.

Vantagem	Explicação
Menores oscilações dos níveis plasmáticos do fármaco	A velocidade de liberação controlada elimina os picos e depressões das concentrações séricas do fármaco
Redução na frequência da dose	Os produtos com velocidade controlada liberam mais que uma única dose de medicamento, e assim são ingeridos com menor frequência. Com redução da administração menores são as chances de esquecimento de uma dose.
Maior Conveniência e Cooperação do paciente	
Redução dos efeitos Colaterais	Devido a redução das oscilações do fármaco, acima da faixa terapêutica e também em níveis tóxicos, o surgimento de efeitos colaterais são menos frequentes.
Redução na Frequência, gerando redução no custo do tratamento.	Embora o custo inicial do sistema de liberação controlado seja maior que o sistema convencional, com a redução da frequência das doses, o benefício terapêutico ampliado e os efeitos colaterais reduzidos, o tempo dispensado pelos profissionais de saúde no atendimento, a administração e monitoramento dos pacientes fica reduzido.

Fonte: ANSEL et al., 2007.

2.2.2 Nanopartículas

O termo nanopartículas (NP's) refere-se a dois tipos de estruturas: nanocápsulas e nanoesferas. Nanocápsulas são sistemas reservatórios, em que o fármaco pode estar dissolvido no núcleo e/ou adsorvido a membrana polimérica, isolando o núcleo do meio externo. (AULTON, 2008. SCHAFFAZICK et al., 2003.). Enquanto que as nanoesferas são sistemas em que o fármaco se encontra disperso de forma homogênea ou solubilizado na matriz polimérica ou cerosa, sem núcleo definido (Figura 2). (AZEVEDO, 2002).

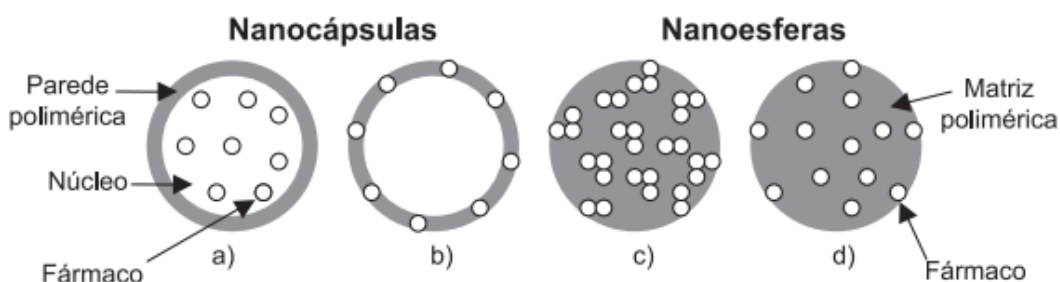


Figura 2: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas: a) Fármaco dissolvido no núcleo das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido na parede polimérica; c) fármaco retido na matriz polimérica da nanoesfera; d) fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica da nanoesfera. (Fonte: SCHAFFAZICK et al., 2003).

A utilização de Np's poliméricas como sistema de liberação de fármacos apresenta grandes vantagens tais como: proteção do fármaco, direcionamento a sítios específicos, estabilidade física e biológica suficiente para reter o fármaco e promover a liberação de forma controlada, simplicidade no processo de formulação e estabilidade de fármacos voláteis. (KAYSER et al., 2005). Além de possuírem tamanho pequeno suficiente para serem injetadas diretamente na circulação sanguínea, também possuem a capacidade de administração por outras vias, tais como a pulmonar e nasal através de medicamentos inalatórios e/ou aerossóis, pela via transcutânea para administração de medicamentos pela pele e absorvidos na circulação e pela via oral. (MOREIRA, 2014).

Polímeros são macromoléculas compostas por moléculas pequenas ligadas umas às outras, que formam estruturas lineares, ramificadas e /ou ligações cruzadas. (PEREIRA, 2006). Os polímeros podem ser naturais ou sintéticos, como polímeros naturais podemos citar celulose, colágeno e quitosana, como exemplos de polímeros sintéticos temos poli (etileno), poli (álcool vinílico), poli (acrilamida) e poli (etilenoglicol). (AZEVEDO, 2002). A quitosana (QS) é um dos polímeros que se destaca na formulação de nanopartículas poliméricas, pois tem solucionado problemas como solubilidade e hidrofobicidade de agentes terapêuticos. (SINHA et al., 2004. DENKBAS et al., 2003).

2.3 QUITINA E QUITOSANA

Em 1823, o pesquisador Odier, isolou uma substância insolúvel contida na carapaça dos insetos e a denominou de quitina, cujo nome é derivado da palavra grega *Chiton* que significa carapaça ou caixa protetora (KUMAR, 2000) e afirmou que se tratava da mesma substância encontrada nas plantas, a celulose, porém somente em 1843, Payen detectou a presença de nitrogênio na quitina a diferenciando da celulose. (ALMEIDA, 2009).

A quitina é um polissacarídeo nitrogenado, natural, branco, duro, e inelástico presente na carapaça dos crustáceos, nos exoesqueletos de insetos, em nematoides e nas paredes celulares de fungos e de leveduras. (MUZZARELLI, 1983). A QS é um polissacarídeo catiônico composto por unidades obtida a partir da desacetilação da quitina em meio alcalino, e através de alguns fungos (Figura 3). (DAMIAN et al., 2009; BAO et al., 2008; KUMAR et al., 2008; AMORIM et al., 2006, MUZZARELLI, 1983).

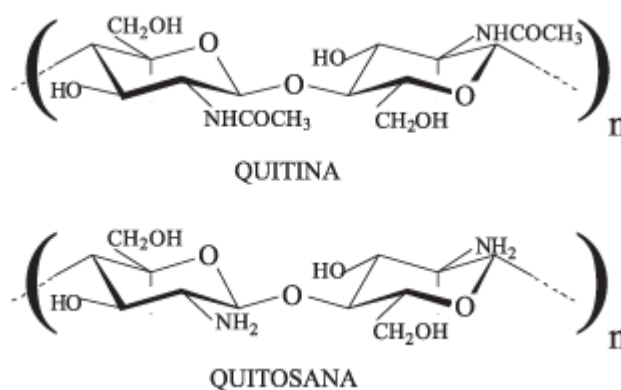


Figura 3: Representação das estruturas primárias da quitina e da quitosana. (Fonte: BATTISTI, CAMPANA-FILHO, 2008).

A QS e a quitina são constituídas por unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina em porção variáveis, o primeiro tipo destas unidades são mais predominantes na quitina, enquanto que a D-glicosamina se acentua na QS. (SILVA et al., 2006). Conforme o grau médio de acetilação, parâmetro utilizado para determinar o grau de unidades N-acetil-D-glicosamina na quitina e QS, pode-se obter diversos tipos de QS que irão demonstrar propriedades físico-químicas, como solubilidade, massa molar, viscosidade e grau de polimerização variáveis. (MILIOLI, 2011; SILVA et al., 2006).

A solubilidade da QS está ligada a quantidade de grupamentos aminos protonados na cadeia polimérica. Em soluções aquosas de ácidos diluídos, os grupamentos amino da QS adquirem maior número de carga positivas, quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior solvatação em água. (RINAUDO, 2006; SANTOS et al, 2003).

O grau de protonação pode ser determinado pela variação da concentração de QS. Para uma determinada concentração de ácido, o grau de protonação depende do pKa (constante de acidez) do ácido utilizado para solubilizar a QS. Esta protonação proporciona a qualidade de mucoadesão oferecendo maior vantagem quando comparada a outros polímeros naturais. (RINAUDO, 2006; AGNIHOTRI et al., 2004).

A QS é solúvel em soluções ácidas como de ácido clorídrico, ácido fórmico e ácido acético, sendo este o solvente mais empregado. A solubilidade depende da força iônica do meio, do pH, do grau de desacetilação da quitosana, e da massa molar sendo assim, todos esses fatores devem ser analisados para o uso da quitosana como biomaterial. (RINAUDO, 2006; BERGER et al., 2004).

A massa molar, pode ser muito variável e está diretamente ligada à sua origem e o processamento da quitina. Alguns fatores como: tempo, temperatura, concentração dos reagentes e condições atmosféricas empregadas na reação da desacetilação da quitina são influenciadoras da distribuição da massa molar que pode ser determinada por Cromatografia e Viscosimetria Capilar. (LARANJEIRA, FÁVERE, 2009; ROBERTS, 1992, CANELLA, GARCIA, 2001).

A importância da massa molar é evidenciada em vários estudos que objetivam a utilização da quitosana para fins farmacêuticos, onde se tem notado que o desenvolvimento de polímeros com baixa massa molecular tem demonstrado resultados mais interessantes (SATO et al., 2001) como por exemplo o tamanho nas sínteses de nanopartículas de quitosana (GAN et al., 2005; YIEN et al., 2012) e atividade antimicrobiana. (ZHENG, ZU, 2003).

2.4 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

Nanopartículas de quitosana apresentam vantagens sobre outras partículas por sua capacidade de controle na liberação de agentes, na solubilidade em soluções ácidas

aquosas e no uso de solventes que não oferecem grandes riscos à saúde para sua síntese (WILSON et al., 2010). Várias metodologias para síntese de Np's de QS são descritas na literatura como por exemplo: emulsão, spray-drying, micelar reverso. (AGNIHOTRI et al., 2004).

A gelificação iônica é uma das técnicas mais utilizadas no preparo de Np's, pois não necessita a utilização de agentes que reagem covalentemente com o polímero, evitando uma possível citotoxicidade ou efeitos indesejáveis por parte do agente reticulante. (CALVO et al., 1997). Com esse método, as Np's são obtidas devido a ligações inter e intramoleculares entre a fase ácida (pH 4-6) contendo quitosana e a fase alcalina (pH 7-9) contendo um contra-íon como o tripolifosfato de sódio (TPP) ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), que é um poliânion multivalente, com baixa toxicidade e baixo custo. (AJUN et al., 2009; AOUADA, 2009).

O polietileno glicol (PEG), é um polímero constituído por unidades repetidas de etileno glicol, e está disponível comercialmente com diferentes tamanhos e massa molecular média em faixas definidas, sendo amplamente utilizado na indústria biológica, química e farmacêutica, por não apresentar toxicidade, não-imunogênico e altamente flexível, na agregação de proteínas e outras biomoléculas melhorando o desempenho farmacológico, e na produção de surfactantes poliméricos principalmente no polímeros hidrofobicamente modificados. (PIGNATELO, et al., 2015).

O PEG é utilizado como copolímero na produção de Np's que em conjunto com a quitosana, torna o dispositivo desenvolvido mais biocompatível e mais estável em fluidos biológicos, pois diminui a tendência natural de agregação por sua propriedade de surfactante hidrofílico não iônico. (PREGO et al., 2006). Os surfactantes são moléculas anfifílicas formadas por uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica cuja parte apolar é composta em grande parte por uma cadeia hidrocarbonada e a porção polar é caracterizada por uma parte iônica, não iônica ou anfotérica. (NITSCHKE, PASTORE, 2002). A função dos surfactantes é basicamente distribuir nas interfaces entre as fases fluidas que apresentam diferenças nas polaridades, onde por meio desta distribuição podemos diminuir as tensões interfacial e superficial. (NITSCHKE, PASTORE, 2002).

2.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia de Np's podem ser observadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que fornece também informações sobre o diâmetro das partículas. (HALL et al., 2007; SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000). O MEV trouxe uma nova dimensão ao estudo da morfologia, por produzir imagens de alta resolução e ampliação, em até 300.000 vezes. (MANNHEIMER, 2002).

Sua utilização é comum em biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia e é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas, outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. (DEDAVID et al., 2007). Apesar dos estudos de MEV serem inadequados para confirmar a formação de complexos de inclusão, as alterações drásticas na forma das partículas, bem como no seu aspecto e tamanho podem ser retratados por meio desta análise. (ALVES, 2013).

2.5.2 Tamanho de Partícula e Índice de Polidispersidade

O tamanho das partículas e a sua distribuição são características importantes na determinação da via de administração. (SCHAFFAZICK et al, 2003). Uma das principais técnicas utilizadas é a chamada Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS), que realiza a medida do movimento browniano das partículas, determinando o diâmetro hidrodinâmico das mesmas na suspensão. (UNER, 2006; HEURTAULT et al, 2003.)

Deste modo, a intensidade da luz dispersa pode variar com o diâmetro das partículas e a velocidade dos movimentos brownianos, onde partículas menores apresentam movimentos mais rápidos do que as partículas maiores e conseqüentemente menos dispersão de luz. (FINSY, DE JAEGER, 1991).

O Índice de Polidispersidade ou Polidispersão (PDI) fornece informações quanto ao grau de homogeneidade de uma amostra. Quanto menor o seu valor, maior será a homogeneidade do diâmetro das partículas no sistema. (LIU, WU, 2010).

2.5.3 Espectroscopia do Infravermelho por Transmissão de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia do infravermelho é um método analítico utilizado para identificação de grupos funcionais em moléculas orgânicas no estado sólido, líquido e gasoso, onde cada grupo absorve uma frequência característica, que pode ser de estiramentos ou de deformação, correspondendo ao nível de energia da molécula. (SKOOG et al., 2002, PAVIA et al., 2008).

Para pesquisa na área farmacêutica esse método é utilizado para a identificação de fármacos, análise de pureza de amostras, investigação estrutural, cristalinidade, interações entre fármacos e excipientes, entre outras aplicações. (KALINKOVA, 1999).

2.5.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises térmicas demonstram grande relevância para a indústria farmacêutica, pois apresentam dados no que se refere à caracterização de fármacos e seus eventos térmicos definidos, estudo de pureza, estudos de polimorfismo e estudo de compatibilidade para fármacos. Tais dados são ferramentas importantes para a avaliação de pré-formulações, e definição da estabilidade de fármacos e da formulação farmacêutica. (OLIVEIRA et al., 2011).

A análise Termogravimétrica (TGA) é uma técnica de análise térmica em que a variação de massa da amostra é determinada como uma função de temperatura, ou tempo de aquecimento, utilizando um programa controlado de temperatura. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Para fins farmacêuticos, o uso do TGA é descrito na caracterização, determinação do grau de pureza e de umidade, identificação de pseudopolimorfismo, na avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos e em estudos de cinética de degradação. (OLIVEIRA et al., 2011).

2.5.5 Avaliação da Cristalinidade – Difração de Raios-X (DR-X)

Essa técnica permite diferenciar compostos cristalinos e amorfos (ÜNER, 2006), e é válida para fornecer informações que podem ser importantes em relação as partículas produzidas e as matérias primas utilizadas. (BUNJES, UNRUH, 2007). O método de difração consiste em um método simples e direto que permite a identificação do fármaco sem necessidade de tratamento prévio. (PHADNIS et al., 1997).

No princípio da difração de raios-X muitas funções nas análises farmacêuticas são assumidas, sendo esta uma poderosa ferramenta que permite alta precisão nos resultados quantitativos e qualitativos de misturas sólidas, também combina especificidade com um alto nível de exatidão para a caracterização dos fármacos sólidos. É especialmente útil para descrição do possível comportamento polimórfico de fármacos, além de permitir a identificação simultânea de ingredientes ativos múltiplos em formulações farmacêuticas diferentes. (JUNIOR, 2004).

2.6 CÂNCER

O câncer é uma das maiores ameaças da saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, cujo quadro tende a não se modificar por algumas décadas já que as causas que levam ao surgimento do câncer são inúmeras, que vão desde o envelhecimento da população mundial aos maus hábitos alimentares, e alguns mecanismos multifatoriais que causam o seu surgimento ainda não estão totalmente elucidados. Nesse panorama, a estimativa para o biênio de 2016-2017 foi de 600 mil casos de câncer. (INCA, 2015).

Essa patologia se dá pelo crescimento celular desordenado, onde a característica principal que o define é a multiplicação rápida de células anormais que podem crescer além de seus limites habituais, e em alguns casos migrar para tecidos adjacentes e se espalhar para outros órgãos. Este processo é referido como metástase, e é a principal causadora de morte. (RANG, 2001).

Muitos tipos de cânceres podem ser prevenidos, evitando a exposição a fatores de risco comuns. (LIANG et al., 2010). A prevenção baseia-se na redução ou eliminação desses fatores que podem ser internos ou externos, onde os internos estão ligados a predisposição genética e o estresse oxidativo, enquanto que os externos estão associados ao meio ambiente, hábitos ou costumes próprios de um meio sociocultural. O tratamento consiste na escolha da terapia mais eficiente que pode ser cirurgia, quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia, e uso de radiofármacos sendo estabelecidos de acordo com o tipo de tumor e estágio da doença (GARCIA et al., 2007, MOREIRA, 2014).

Muito embora o tratamento do câncer tenha apresentado evoluções, grande parte de suas modalidades terapêuticas, em especial, a quimioterapia e a radioterapia causam

efeitos colaterais nas células normais, fato este, que determina a busca de ações terapêuticas que sejam menos agressivas ao paciente, e de forma mais eficiente que atinja apenas as células tumorais, causando assim menores danos à saúde do mesmo (DOS SANTOS et al., 2002).

Uma atenção crescente tem sido dedicada ao papel da dieta na saúde humana. Vários estudos epidemiológicos indicaram que a alta ingestão de produtos naturais (vegetais e frutas) está associada com uma redução no risco de uma variedade de doenças crônicas como aterosclerose e câncer. Estes efeitos têm sido particularmente atribuídos aos compostos que possuem atividade antioxidante. Os principais antioxidantes são as vitaminas C e E, os carotenóides e os compostos fenólicos (PODSEDEK, 2007, LUNET et al., 2005, RIBOLI, NORAT, 2003, ANNEMA et al., 2011, ANDRADE et al., 2012)

O estresse oxidativo, causado pelo desbalanço entre os sistemas antioxidantes e a produção de compostos oxidativos (radicais livres) aparentemente está associado com diversas doenças de cunho multifatorial, especialmente os vários tipos de desordens inflamatórias, doenças cardiovasculares e câncer. Os mecanismos pelos quais essas patologias se desenvolvem, geralmente envolvem alterações oxidativas de moléculas consideradas críticas, o que inclui proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos além das substâncias envolvidas na modulação da expressão gênica e em respostas inflamatórias (LAGUERRE et al., 2007).

2.7 ÁCIDO CUMÁRICO

O ácido cumárico é um ácido fenólico pertencente à família dos ácidos hidroxicinâmicos. Existem três isômeros deste composto que são chamadas de orto-cumárico, meta-cumárico e para-cumárico, que recebem essa classificação de acordo com a localização do grupo hidroxila dentro da estrutura (Figura 4). (KOC et al., 2016).

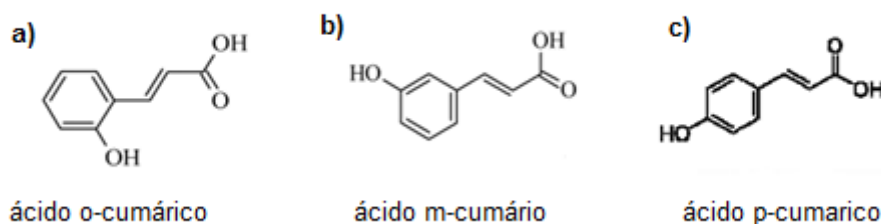


Figura 4: Estruturas química dos ácidos cumáricos: a) orto-cumárico, b) meta-cumárico, c) para-cumárico. (Fonte: GOPALAN et al., 2015. Figura adaptada).

Os compostos fenólicos constituem o maior grupo de antioxidantes naturais, e estão amplamente distribuídos na alimentação, especificamente o ácido p-cumárico (*p*-CA) pode ser encontrado em frutas como: maçã, uvas, laranja, peras; vegetais como: feijão, batata, cebola; e cereais como: aveia, milho e trigo. Vários estudos têm demonstrado a importância dos compostos fenólicos, principalmente o *p*-CA, desempenham atividades importantes dentre as quais se destacam a atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória, atividade antimutagênica, atividade anticancerígena, além de atenuar a aterosclerose, o dano cardíaco oxidativo, ansiedade, gota e diabetes. (PRAGASAM, et al., 2013).

Quando comparado a outros ácidos como o ácido cafeico, ácido ferúlico, e ácido clorogênico o *p*-CA possui maior biodisponibilidade e pode ser absorvido em todas as porções do trato gastrointestinal dos ratos, com maior taxa de absorção no jejuno, e com excreção mais lenta quando comparada ao ácido ferúlico na urina dos ratos. (ZHAO, MOGHADASIAN, 2010).

Também possui baixa toxicidade (DL50 = 2850mg/Kg em camundongos), servindo assim como precursor de outros compostos fenólicos, podendo existir na sua forma livre ou conjugada, possuindo baixa solubilidade ou nenhuma solubilidade em água na sua forma conjugada (PEIN et al., 2016).

No estudo de Mathew e colaboradores (2015) foram avaliadas a atividade antioxidante do *p*-CA e outros compostos fenólicos frente a algumas espécies de oxigênio reativas. De acordo com os estudos o *p*-CA apresentou atividade reduzida do que o ácido cafeico e ácido ferúlico, contudo em outros estudos quando o ácido cumárico é exposto

em culturas de células o *p*-CA teve atividade similar ao ácido caféico e ácido felúrico, e em concentrações de 50-200 µmol/L a capacidade de eliminação de radicais livres foi superior a outros ácidos nas linhagens de célula A549 (adenocarcinoma de pulmão) e HT29-D4 (adenocarcinoma de colón). Sendo assim foi possível concluir que o *p*-CA pode executar formas diferentes de ação quando executado no sistema de uma forma isolada para sistemas mais elaborados como cultura de células e a própria alimentação. (ESPINOSA et al, 2015, OU et al., 2009, BOUZAIENE et al.,2015).

Em outros estudos, o *p*-CA apresenta uma atividade antimutagênica e antitumorigênica bastante interessante, de acordo com as pesquisas, este composto promove proteção a cadeia do ácido desoxirribonucleico (DNA) evitando os danos que são causados ao longo da cadeia devido ao estresse oxidativo, além de possuir efeito citotóxico em algumas linhagens tumorais como neuroblastoma (N2a), adenocarcinoma de colón (CaCo-2), linhagem celulares de câncer de pulmão (NCI-H299, A549, HCC827), câncer de fígado (HPG2), e câncer de mama (MCF7). (KAI, et al., 2014; LOO. G, 2003).

Com distribuição na alimentação, o ácido cumárico possui atividades biológicas comprovadas, contudo a sua absorção, metabolização e biodisponibilidade (via de metabolismo, metabólitos formados, biomarcadores, local de ação) continuam em grande parte desconhecidas, sendo necessário maiores investigações para a total elucidação. (PEIN, 2016). Dessa forma a encapsulação destes compostos seria uma alternativa para proteção, melhor biodisponibilidade e consequentemente aumento potencial de expansão das atividades biológicas deste composto.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanopartículas de quitosana/polietilenoglicol via gelificação iônica, a fim de encapsular o ácido cumárico, caracteriza-las físico-química e morfologicamente e avaliar seu potencial citotóxico, frente as linhagens de células de fibroblasto murino (3T3) e células de adenocarcinoma mamário murino (4T1).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar e despolimerizar a QS;
- Sintetizar nanopartículas de QS/PEG, utilizando diferente proporções entre os polímeros;
- Caracterizar o tamanho e o índice de polidispersão destas Np's;
- Encapsular o *p*-CA nas Np's de Quitosana/PEG;
- Analisar a Morfologia das Np's de QS/PEG e Np's QS/PEG – *p*-CA encapsulado por Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Avaliar as características espectroscópicas dos polímeros, do *p*-CA e formulações através de Espectroscopia de Infravermelho;
- Determinar a variação da massa da QS, *p*-CA e das Np's formuladas em relação ao tempo e a temperatura por Análise Termogravimétrica;
- Diferenciar a cristalinidade e amorfização das amostras por Difração de Raio-X;
- Quantificar a eficiência de encapsulação do *p*-CA e mimetizar a liberação das Np's QS/PEG – *p*-CA simulando o pH gástrico e pH tumoral;
- Analisar a citotoxicidade *in vitro* das Np's frente as células de fibroblasto murino (3T3) e células de adenocarcinoma mamário murino (4T1).

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

A QS de baixo peso molecular (LWM) foi adquirida Sigma-Aldricg pelo Laboratório de Biopolímeros do Departamento de Histologia e Embriologia (DHE) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O Tripolifosfato Pentasódico Hexahidratado (TPP), o Polietileno glicol 8000 (PEG) e ácido p-Cumárico (p-CA) foram adquiridos da Sigma-Aldricg e gentilmente cedidos pelo Laboratório de Terras Raras (BSTR) do Departamento de Química Fundamental (DQF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Hidróxido de sódio (NaOH), Nitrito de sódio (NaNO₂), Ácido Acético Glacial, Etanol absoluto e Metanol utilizados nas fases subsequentes deste trabalho são de grau analítico e do acervo próprio dos Laboratórios de Biopolímeros da (DHE – UFPE) e do Laboratório de Terras Raras (DQF – UFPE).

4.2 CÉLULAS

As linhagens de células de fibroblasto murino (3T3) células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) foram obtidas do Banco de Células do estado do Rio de Janeiro, e foram mantidas em estufa com atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ a 37 °C no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

4.3. PURIFICAÇÃO E DESPOLIMERIZAÇÃO DA QUITOSANA

No processo de purificação utilizamos o protocolo de Signini e Campana Filho (2001) com algumas adaptações, onde foi utilizado 2 gramas de QS LWM solubilizado em 200 mL de ácido acético a 1%, a solução foi colocada em um balão volumétrico de fundo redondo e mantida sob agitação magnética por 16 horas a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a filtração da solução através de membrana de Millipore de acetato de celulose no tamanho de 3µm. Posteriormente, foi preparado uma solução de NaOH à 40% (100 mL) e gotejado na solução de QS a fim de ajustar o pH para 8,0. A solução resultante foi centrifugada a 15.000 rpm por 20 minutos sendo realizada três lavagens com água e uma lavagem com etanol absoluto e colocada para secar em temperatura ambiente.

O processo de despolimerização foi realizado de acordo com a descrição de Janes e Alonso (2003) com algumas modificações, na qual a QS purificada foi adicionada à 200 mL de ácido acético a 1% em um balão volumétrico de fundo redondo sob agitação magnética em temperatura ambiente, após a total solubilização foi incluído 10 mL de nitrito de sódio (NaNO_2) a 0,1M para que a concentração final da solução fosse de 10 mg/mL e mantida por agitação magnética a temperatura ambiente por 4 horas. Em seguida, a solução foi filtrada em filtro Millipore de acetato de celulose de 0,8 μm . Para o ajuste do pH para 8,0 foi novamente gotejado o NaOH a 40% e subsequentemente realizada a centrifugação a 15.000 rpm durante 20 minutos, sendo realizada três lavagens com água e uma lavagem com etanol absoluto. Após a centrifugação, a quitosana foi congelada e liofilizada.

4.4. SÍNTESE DAS NANOPATÍCULAS

4.4.1 Síntese da Nanopartícula de Quitosana/PEG (Np's QS/PEG)

As Np's de QS/PEG foram sintetizadas através da adaptação do método de gelificação iônica descritos na literatura por CALVO et al. (1997) e por JAIN et al. (2016). Deste modo, foram realizadas duas sínteses com diferentes proporções de QS/PEG (1:1 e 1:2 respectivamente 30mg de QS: 31mg de PEG, e 30mg de QS: 62 mg de PEG). Em um Becker de 50 mL foi adicionada a solução de ácido acético a 1% (15mL) e o PEG como agente surfactante sob agitação magnética com chapa aquecedora. Em seguida, foi adicionada a QS (30mg), a temperatura foi de 60 °C e o pH ajustado para 5,0 através do gotejamento de NaOH a 20%. O TPP (22,5 mg), agente reticulante, foi dissolvido em 3mL de água destilada, atingindo uma concentração final de 0,75% (p/v) e subsequentemente gotejado lentamente na solução. A solução permaneceu sob agitação magnética por 1 hora, e em seguida centrifugada a 6000 rpm por 1 hora e posteriormente foi realizada 3 lavagens com água destilada e 3 centrifugações a 6000 rpm por 30 minutos para retirar o excesso do PEG. Após centrifugação a amostra foi sonicada por 30 minutos, congelada a -80°C e liofilizada.

4.4.2 Síntese da Nanopartícula de Quitosana/PEG-Ácido Cumárico (Np's QS/PEG – p-CA)

As Np's QS/PEG – *p*-CA foram formuladas na proporção de QS/PEG de 1:2, seguindo a mesma metodologia anteriormente descrita.

Foi adicionado 62mg de PEG a uma solução de 15ml de ácido acético a 1% em um Becker de 50ml sob agitação magnética com chapa aquecida. Em seguida foi adicionada a QS, de modo que a temperatura, pH, concentrações/peso, da quitosana e da solução de ácido acético foram semelhantes a metodologia descrita anteriormente. 18mg de *p*-CA, foi solubilizado em 3ml de metanol (0,6% (p/v) isoladamente, mantido sob agitação magnética e gotejado na solução de QS/PEG. Em seguida 22,5mg do TPP foram solubilizados em 3ml de água destilada e gotejado na solução onde permaneceu sob agitação magnética em chapa aquecida a uma temperatura de 60°C por 1 hora, e em seguida centrifugada a 6000 rpm por 1 hora. Subsequentemente foram realizadas 3 lavagens com água destilada e 3 centrifugações a 6000 rpm por 30 minutos para retirar o excesso do PEG na solução o *p*-CA. Após a centrifugação a amostra foi sonicada por 30 minutos, congelada a -80°C e liofilizadas.

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As características morfológicas das nanopartículas foram examinadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM). As amostras foram montadas em base de alumínio com fita de carbono e metalizadas com ouro pelo equipamento de crepitação por 240s, e posteriormente foram observadas usando o MEV JSM-5600L V (JEOL, Japão) a uma tensão de aceleração de 15kV.

4.5.2 Análise de Tamanho de Partícula e Índice de Polidispersão

O tamanho das nanopartículas foi medido através do método de Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) também chamada de Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS) realizados no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). O tamanho foi medido através do equipamento Microtrac Zetatrac Legacy-Zetatrac com

versão do software Microtrac Flex 10.6.2. As amostras foram suspensas em água destilada, sonicada por 1 hora e encaminhadas para a análise.

4.5.3 Espectro de Infravermelho com Transmissão de Fourier (FT-IR)

A caracterização das interações químicas entre QS, PEG e *p*-CA foram realizadas através do método de Espectrometria de infravermelho com transmissão de Fourier (FTIR) realizado no Laboratório de Biofísica Química do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O perfil espectrofotométrico das nanopartículas foi obtido a partir da técnica do espectrômetro Agilent 630 com comprimento de onda entre 4000 e 750 cm^{-1} . As amostras em estado sólido foram prensadas contra um cristal de diamante usando uma braçadeira de pressão anexada ao aparelho seguida de leitura e registro. Os espectros de FTIR foram adquiridos em menos de 30 segundos e foram comparadas as amostras de referências em sua biblioteca.

4.5.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

A avaliação da estabilidade térmica e dinâmica de decomposição das amostras foi realizada via análise termogravimétrica e análise térmica diferencial. O equipamento utilizado na análise termogravimétrica foi o Shimadzu, modelo DTG- 60H – Simultaneous DTA-TG Apparatus, do Laboratório de Terras Raras do Departamento de Química Fundamental da UFPE. Para se obter as curvas da Análise Termogravimétrica (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTG) foi utilizado um fluxo de 50 mL/min de N_2 com taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 800 $^{\circ}\text{C}$, utilizando cadinho de alumina contendo massa de amostra em torno de 3,0 mg. A calibração do instrumento foi verificada antes dos ensaios empregando-se um padrão de oxalato de cálcio monohidratado, conforme norma ASTM (American Society for Testing and Materials Standards).

4.5.5 Difratometria de raios-x (DR-X)

A análise por difração de raios-X de pó foi utilizada para a identificação das fases cristalográficas presentes nas amostras. O equipamento utilizado para a realização das análises foi o difratômetro de raios-x da Rigaku modelo 2400 DMAX, usando um raio $\text{K}\alpha$ de radiação do cobre (0,15 nm), operando com tubo alvo de cobre a 40 kV com 40 mA, do Departamento de física da UFPE. Os difratogramas foram obtidos na faixa de 20

de 10 a 80 graus e passo 0,01°, o tempo de aquisição foi de 1 segundo à temperatura de 25°C.

4.5.6 Curva de calibração do Ácido *p*-Cumárico

A curva de calibração foi determinada através de soluções preparadas em triplicata de *p*-CA solubilizadas em metanol cujas concentrações foram de 0,1 mg/mL a 0,005 mg/mL e medidas por análise cromatográfica. A coluna utilizada na detecção foi a Ascentis Express C18 de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e fase estacionária de 5 µm. A absorbância foi monitorada à 305 nm com um fluxo de fase móvel de 0,7 mL/min. A injeção das amostras foi de 30 µL e realizada em triplicata. A fase móvel utilizada foi constituída por 77% de água e 23% de acetonitrila e adicionado ácido fórmico na concentração de 0,12 g/L para atingir o pH de 3,5, seguindo a metodologia descrita por Salameh et al. (2008). Os dados da análise cromatográfica foram obtidos com ajuda do software Excel 2016 e compilados através do programa OriginPro 8.

4.5.7 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação do *p*-CA nas Np's de QS/PEG foi determinada utilizando Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) da marca *Shimadzu* operando com um sistema de bombeamento binário de solventes do tipo LC-20AD, amostrador automático SIL-20A, detector UV-vis SPD-20A, forno para coluna CTO-20A, o módulo de comunicação entre o HPLC e o computador é do tipo CBM-20A, contendo degaseificador DGU-20A.

Np's QS/PEG – *p*-CA (5mg) foram adicionadas a 50 mL de ácido acético a 1% sob agitação magnética por 30 minutos, a solução foi centrifugada a 6.000 rpm durante 30 minutos. Uma alíquota de 5 mL do sobrenadante foi retirada e diluída em 100 mL de água, o pellet foi suspenso em 50 mL de metanol e submetido a uma nova agitação e posterior centrifugação como descrito anteriormente. As alíquotas foram retiradas em triplicata para serem analisadas através de cromatografia.

Os dados obtidos foram interpretados utilizando o método de regressão linear pela equação da reta $y = ax + b$, da curva de calibração do *p*-CA, sendo: y = resposta medida; x = concentração; a = inclinação da curva de calibração (sensibilidade); b = interseção com o eixo y .

4.5.8 Estudo da Liberação *in vitro* do Ácido *p*-Cumárico a partir das Nanopartículas de Quitosana/PEG – *p*-CA

Após o desenvolvimento da formulação farmacêutica, é necessário avaliar o perfil de liberação *in vitro* que irá determinar a quantidade de fármaco liberado por unidade de tempo.

A avaliação do perfil de liberação *in vitro* do *p*-CA nas Np's de QS/PEG – *p*-CA foi realizada mimetizando o pH gástrico e o pH tumoral conforme a metodologia preconizada pela USP 29 (2006).

Uma solução contendo 500 mg de cloreto de sódio (NaCl), 2 mL de ácido clorídrico (HCl) e 250 mL de água (pH 2,0), 100 mL desta solução foi transferida para um Becker contendo 10 mg de nanopartículas de QS/PEG – *p*-CA. Esse sistema ficou mantido sob temperatura de 37 °C através de um banho-maria, e com auxílio de uma haste de vidro mantida sob agitação mecânica de 100 rpm durante 2 horas (Figura 5 e 6). Na primeira hora foram retiradas alíquotas de 2 mL (a cada 10 minutos) e outra alíquota de 2 mL na segunda hora, todas as alíquotas foram retiradas em triplicata, analisadas quanto a presença do fármaco através do equipamento HPLC.

Para avaliação da cinética de liberação em pH de 5,6, 10 mg das nanopartículas de QS/PEG – *p*-CA foi adicionada à 100 mL de uma solução de tampão fosfato (PBS 0,1M). O sistema se manteve sob agitação mecânica durante 24 horas, as condições de temperatura, rotações por minuto e alíquotas na primeira hora se mantiveram iguais ao sistema anteriormente citados. E posteriormente nas 2, 4, 6, 12, 24 horas após o início da liberação do fármaco. Essas alíquotas também foram quantificadas pelo equipamento HPLC, quanto a presença do fármaco. Os dados obtidos foram analisados com ajuda do software Excel 2016 e plotados através do programa OriginPro 8.



Figura 5



Figura 6

Figura 5 e 6: Sistema desenvolvido para Liberação controlada in vitro mimetizando o pH gástrico (pH= 2,0) e pH tumoral (pH= 5,6). (Fonte: autor).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.6.1 Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado através do método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMMANN, 1983). As linhagens celulares tumorais utilizadas foram de adenocarcinoma mamário murino (4T1) que foram cultivadas em meio Roswell ParK Memorial Institute Medium (RPMI), e as células de fibroblastos embrionário murino (3T3) cultivadas em meio Dulbecco/Vogt modified Eagle's Minimal Essential Medium (DMEM), ambas suplementadas com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina (2mM) e gentamicina (40 µg/mL) e mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂.

As células foram semeadas em uma placa de 96 poços (7 x 10³ células / poço) e tratadas com concentrações diferentes (9, 27 e 81 µg / mL) do *p*-CA, das Np's QS/PEG e Np's QS/PEG – *p*-CA dissolvidas previamente em solução de PBS acidificada, transferidas para uma solução de sulfóxido de dimetilo (DMSO) (1%) e incubadas durante 72 horas. Como droga antitumoral controle foi utilizada a cisplatina, nas mesmas concentrações citadas acima.

Após a incubação com o tratamento, 22,5 µL de MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich - EUA) (5 mg /mL em PBS) foi adicionado a cada

poço e reencubado por 4 horas. Então, o sobrenadante foi descartado e 150 µL de DMSO foram adicionados a cada poço para solubilizar os cristais de formazano. A absorbância de cada poço foi registrada através de espectrofotômetro e a densidade óptica (OD) foi medida em um comprimento de onda de 540 nm.

A porcentagem de células viáveis foi calculada através desta fórmula: $(\text{Células tratadas OD} / \text{células OD não tratadas}) \times 100$. Os dados dos percentuais foram analisados através de análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste Newman-Keuls. Os resultados com $p < 0,001$ foram considerados significantes. O software utilizado foi ASSISTAT versão 7.7.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DAS NANOPARTÍCULAS

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As Np's QS/PEG nas proporções de 1:1 e 1:2, QS/PEG – *p*-CA apresentaram morfologia esférica (Figuras 7, 8, 9). Quanto ao diâmetro, as Np's QS/PEG na proporção 1:2 e QS/PEG – *p*-CA exibiram um diâmetro inferior a 200 nm.

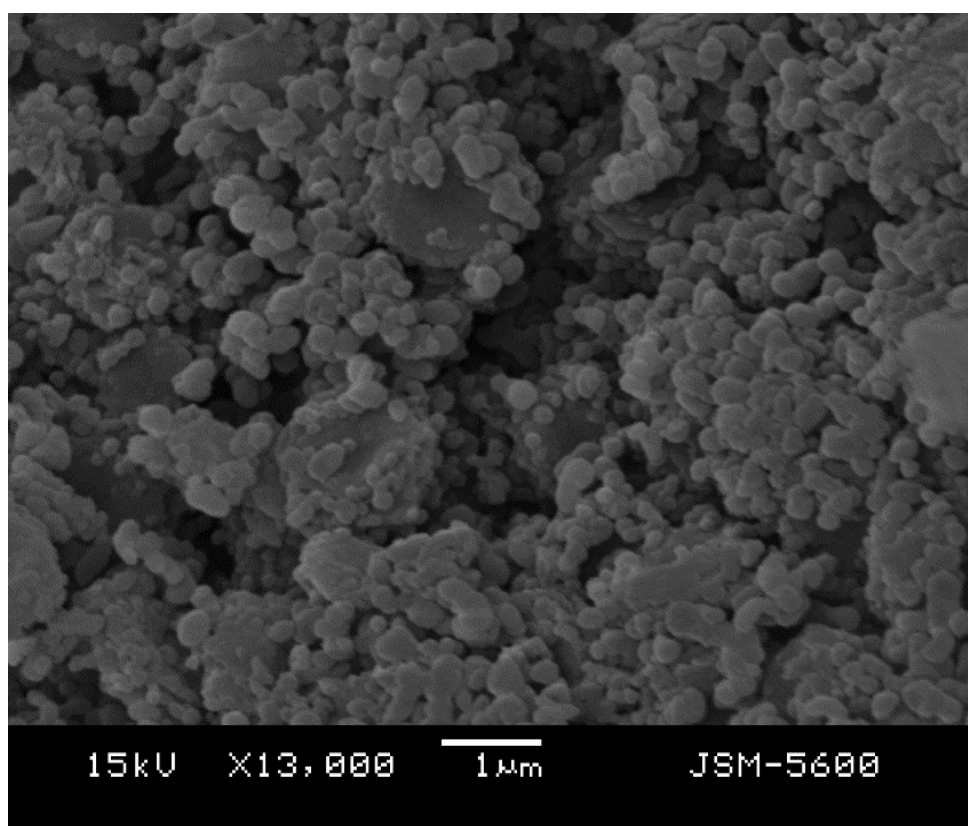


Figura 7: Fotomicrografia das Nanopartículas de Quitosana/PEG (QS/PEG) (1:1). (Fonte: autor).

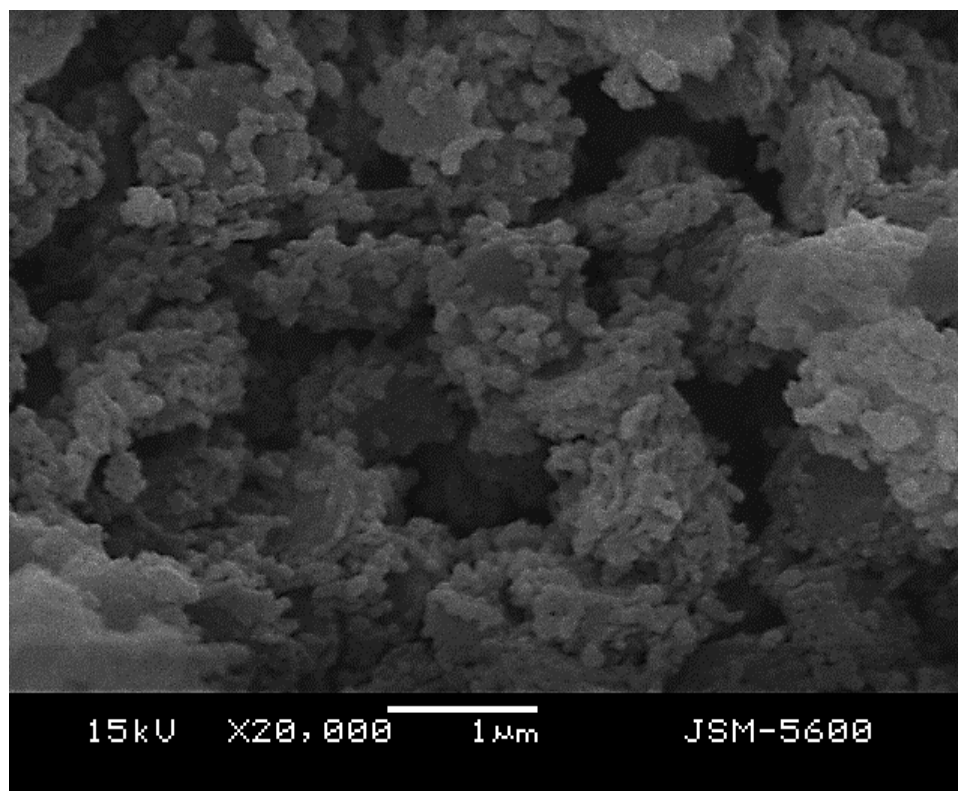


Figura 8: Fotomicrografia das Nanopartículas de Quitosana/PEG QS/PEG) (1:2). (Fonte: autor).

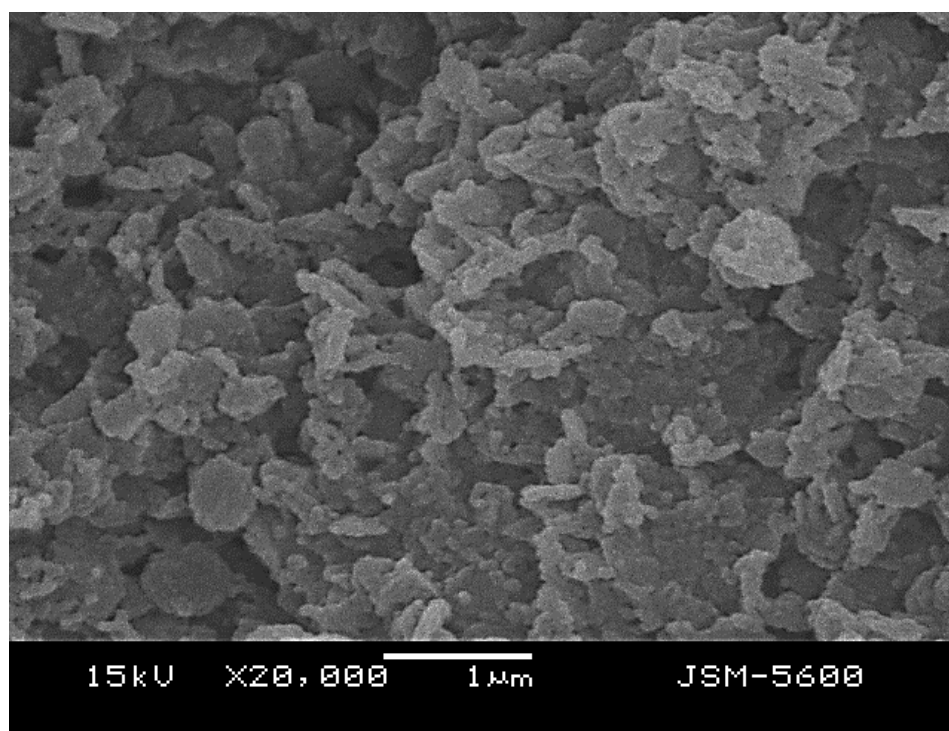


Figura 9: Fotomicrografia das Nanopartículas de Quitosana/PEG – ácido p-Cumárico (QS/PEG – *p*-CA). (Fonte: autor).

5.1.2 Análise de Tamanho de Partícula e Índice de Polidispersão

O tamanho médio das Np's formuladas bem como seus respectivos índices de polidispersão estão descritos na Tabela 2. O tamanho médio das Np's QS/PEG nas suas diferentes proporções variou em torno de 80%. Estes resultados determinaram a escolha das Np's QS/PEG na proporção 1:2 para o encapsulamento do *p*-CA e para as etapas subsequentes. As Np's QS/PEG – *p*-CA mostraram um valor médio de 54 nm com PDI de 0,45.

Tabela 2. Tipo de nanopartículas, tamanho e índice de polidispersão. (Fonte: autor).

Tipo de Nanopartícula	Tamanho Médio	Índice de Polidispersão (PDI)
QS/PEG 1:1	761 nm	0,26
QS/PEG 1:2	173,8 nm	0,03
QS/PEG (1:2) – <i>p</i> -CA	54 nm	0,45

5.1.3 Espectro de Infravermelho com Transmissão de Fourier (FT-IR)

Na figura 10 estão os espectros para as amostras de QS, PEG, Np's QS/PEG, *p*-CA e Np's QS/PEG – *p*-CA.

A QS apresentou as principais bandas nas regiões 3343 cm⁻¹, 1683 cm⁻¹, 1649 cm⁻¹ e 1466 cm⁻¹. A amostra do PEG expressou suas principais bandas na região 2916 cm⁻¹, 1425 cm⁻¹, 1188 cm⁻¹ e 1057 cm⁻¹.

O espectro de infravermelho do *p*-CA apresentou banda na região 3366 cm⁻¹, 1732 cm⁻¹ e 1300 cm⁻¹ e em 925 cm⁻¹ à medida que as Np's QS/PEG – *p*-CA em 1624 cm⁻¹ e 1465 cm⁻¹.

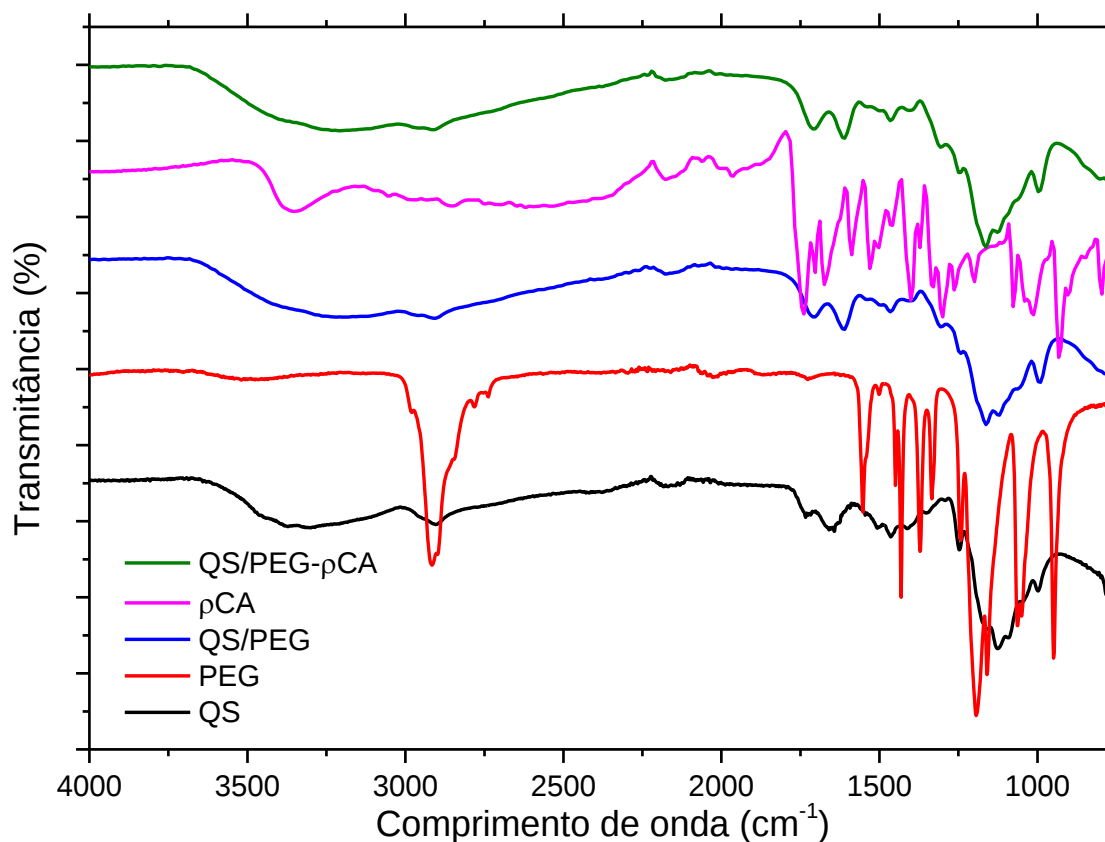


Figura 10: Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) quitosana (QS), polietilenoglicol (PEG), Nanopartícula de Quitosana/PEG (Np's QS/PEG), ácido p-cumárico (*p*-CA) Nanopartículas de Quitosana/PEG – ácido p-cumárico (Np's QS/PEG – *p*-CA).

5.1.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A QS exibiu três eventos de perda de massa durante o processo, onde a primeira perda foi de 14,2 % entre as temperaturas 26,5 °C a 153 °C, a segunda ocorreu entre 153 a 415 °C e foi de 43,7% e a última perda foi de 45,2% tendo seu início em 415 °C finalizando em 733°C. Para a curva TG/DTG da quitosana, foi registrados três picos do DTG em 54, 265 e 613 °C nas quais as áreas corresponderam a 10%, 30,3% e 30,4% de perda de massa respectivamente, corroborando com o resultado do TG (Figura 11).

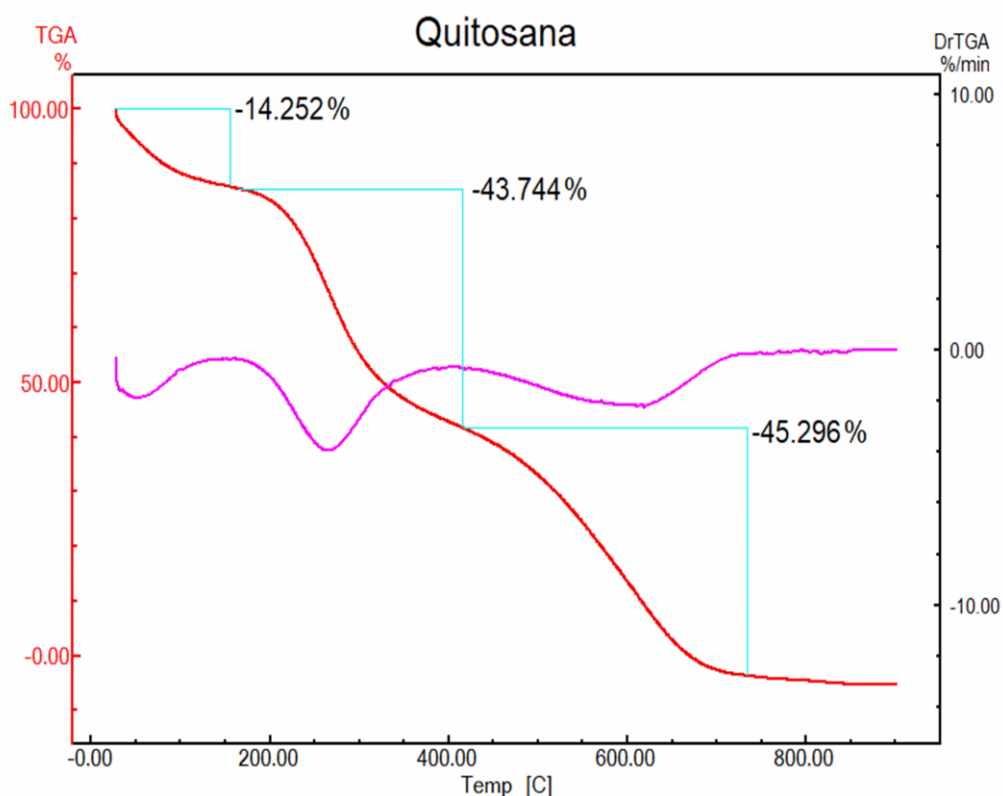


Figura 11: Curva de TG/DTG da quitosana obtida em atmosfera de nitrogênio N_2 no intervalo de 30-600°C na razão de 10°C/min. (Fonte: autor).

A Np QS/PEG demonstrou três eventos de perda de massa, onde a primeira etapa ocorreu entre 33 a 126°C resultando numa diminuição de massa de 15,1%, a segunda perda foi de 29,8% entre as temperaturas 126 a 310 °C, e a terceira entre 310 a 600°C gerando uma redução de 21,7% de massa. Analisando a curva TG/DTG da Np QS/PEG, foram registrados dois picos do DTG em 64 e 255 °C nas quais as áreas corresponderam a 11,3% e 20,2% de perda de massa respectivamente, confirmando os dados analisados no TG (Figura 12).

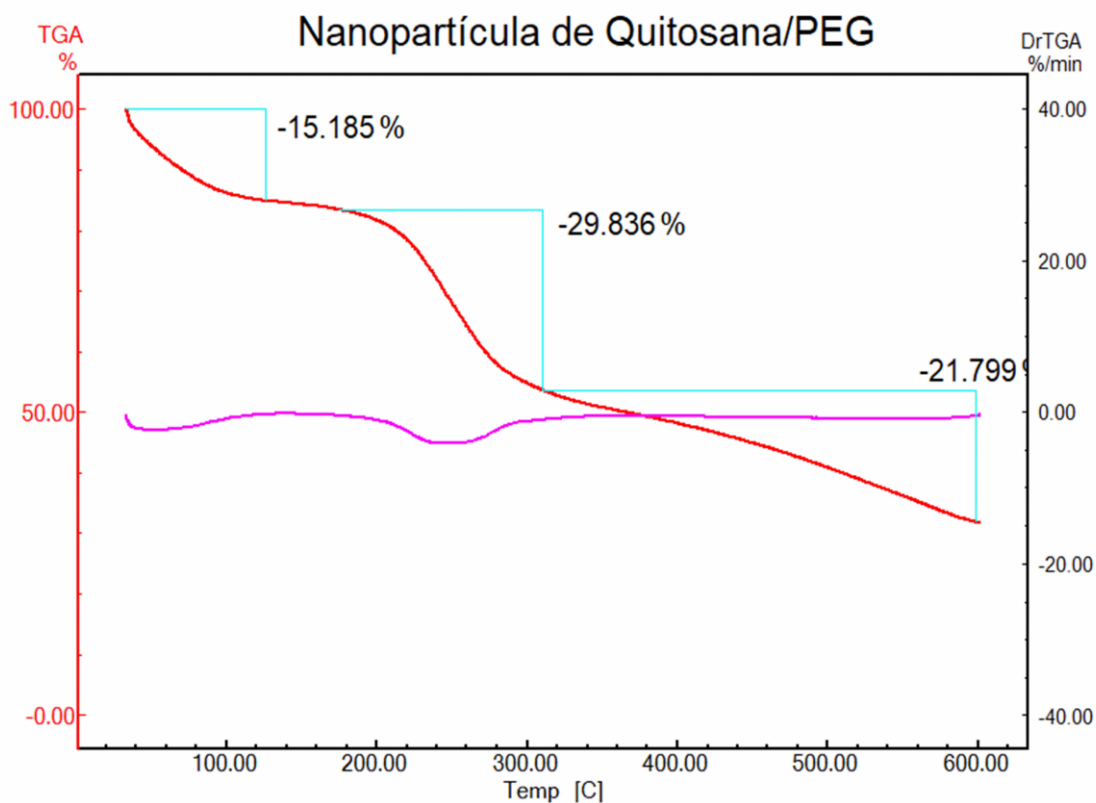


Figura 12: Curva de TG/DTG das Np's quitosana/PEG obtida em atmosfera de nitrogênio N₂ no intervalo de 30-600°C na razão de 10°C/min. (Fonte: autor).

Analisando os eventos no TG do *p*-CA, observam-se duas etapas de perda de massa, a primeira entre 28 a 265°C com perda de 73,3% e o segundo evento ocorre entre 265 °C a 600 °C com perda de massa de 25,2 %. A curva TG/DTG do ácido cumárico mostrou um pico do DTG em 218 °C em que a sua área correspondeu 64,5% de perda de massa, estando em concordância com o analisado no TG (Figura13).

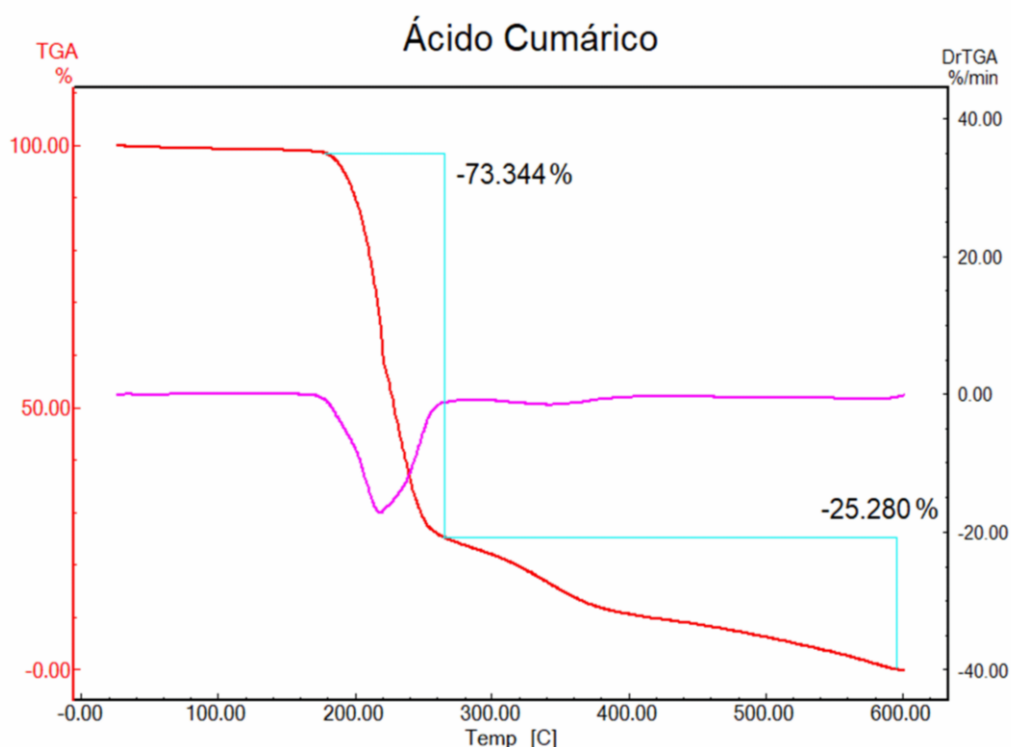


Figura 13: Curva de TG/DTG do ácido cumárico obtido em atmosfera de nitrogênio N₂ no intervalo de 30-600°C na razão de 10°C/min. (Fonte: autor).

A NP QS/PEG – *p*-CA apresentou três eventos de perda de massa, onde a primeira mostrou uma redução de massa de 19,9% entre 26 a 140°C, a segunda perda foi de 29,7% entre as temperaturas 140 a 298 °C, e a terceira entre 298 a 600°C gerando uma perda de 37,3%. A curva TG/DTG da Np QS/PEG – *p*-CA, exibiu dois picos do DTG em 52 e 240 °C nas quais as áreas corresponderam a 18,2% e 20% de perda de massa respectivamente, concordando com os dados analisados no TG (Figura 14).

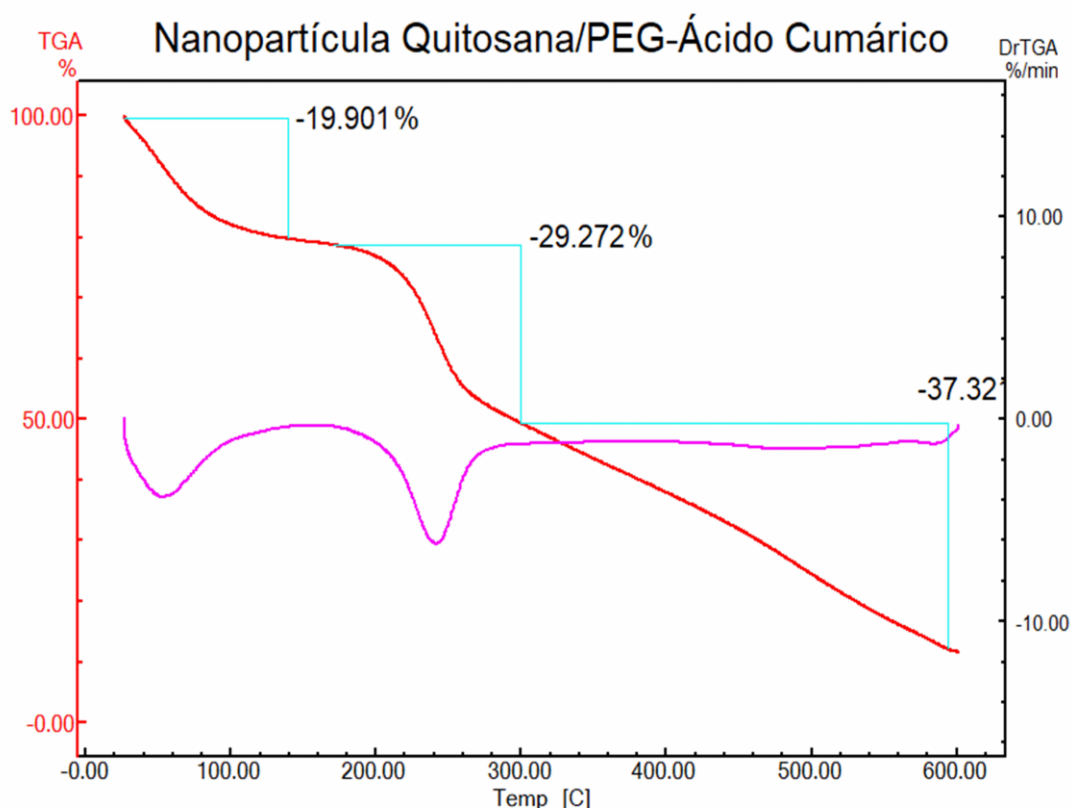


Figura 14: Curva de TG/DTG das Np's quitosana/PEG-ácido cumárico obtida em atmosfera de nitrogênio N₂ no intervalo de 30-600°C na razão de 10°C/min. (Fonte: autor).

5.1.5 Difractometria de raios-x (DR-X)

O difratograma para as amostras analisadas está ilustrado na figura a seguir (Figura 15). O composto *p*-CA exibiu características cristalinas com um pico intenso na região de 2θ em 25 ° além dos picos de menor intensidade. A QS exibiu característica praticamente amorfa, porém com picos na região de 2θ em 20° e 22,3°, o PEG também apresentou perfil cristalinos em que foi possível observar dois picos intensos nas regiões de 2θ em 19 e 23,12 ° além de outros picos de menor intensidade. Já as Np's QS/PEG e Np's QS/PEG – *p*-CA apresentaram características totalmente amorfas.

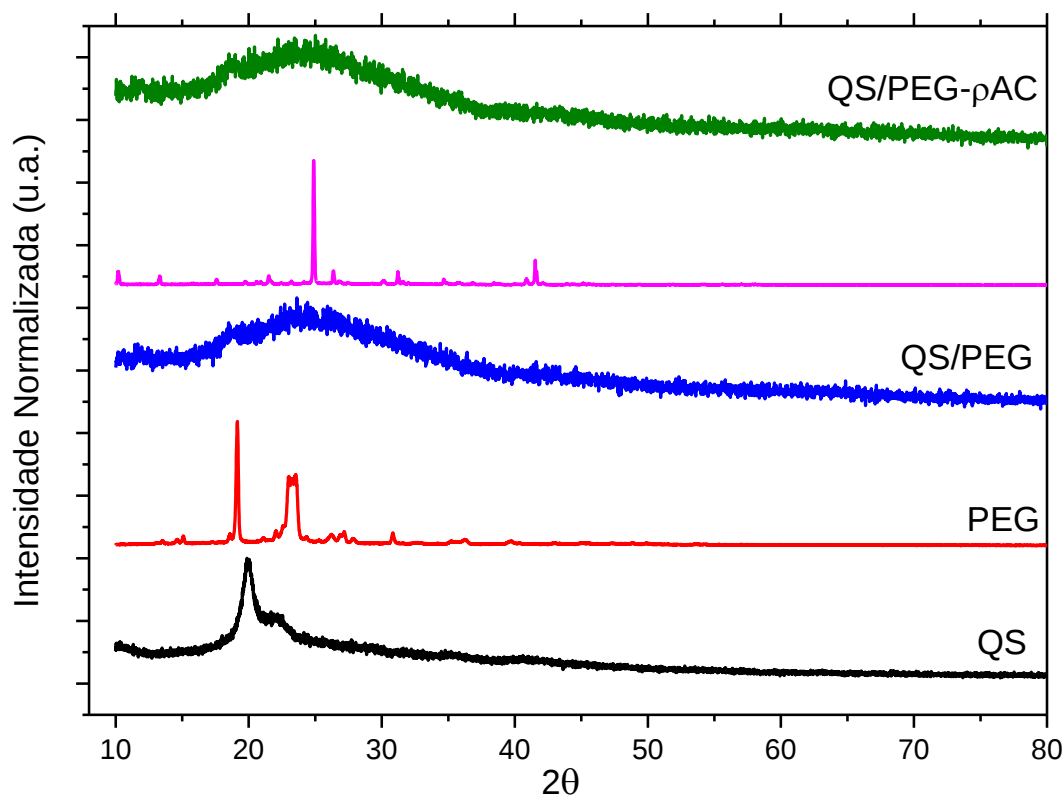


Figura 15: Difratoograma de Raios -X (DRX) com o passo de 0,01°/s no intervalo de 10 a 80° 2θ do QS, PEG, QS/PEG e QS/PEG – *p*-CA. (Fonte: autor).

5.1.6 Eficiência de encapsulação

As Np's QS/PEG – *p*-CA apresentaram uma eficiência de encapsulação de 79,6%, considerando os dados obtidos e analisados através da equação da reta da curva de calibração do *p*-CA (Figura 16).

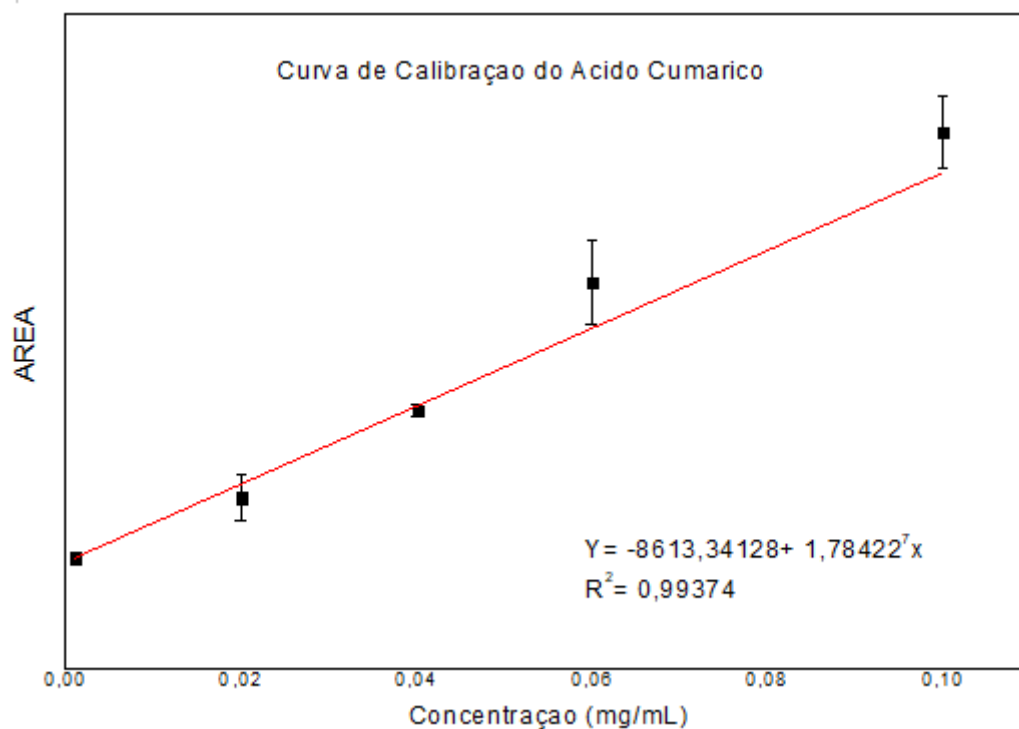


Figura 16: Curva de calibração do Ácido Cumárico e Equação Linear da Reta, onde R^2 é o coeficiente de determinação. (Fonte: autor).

5.1.7 Liberação *in vitro* do Ácido p-Cumárico a partir das Nanopartículas de Quitosana/PEG

O perfil de liberação *in vitro* do *p*-CA a partir das Np's QS/PEG nos meios mimetizados estão representados na figura 17, onde observamos que no pH de 2,0 houve liberação de 90% da amostra na primeira hora enquanto que no pH de 5,6 houve uma liberação reduzida, em torno de 22%, durante o período do experimento

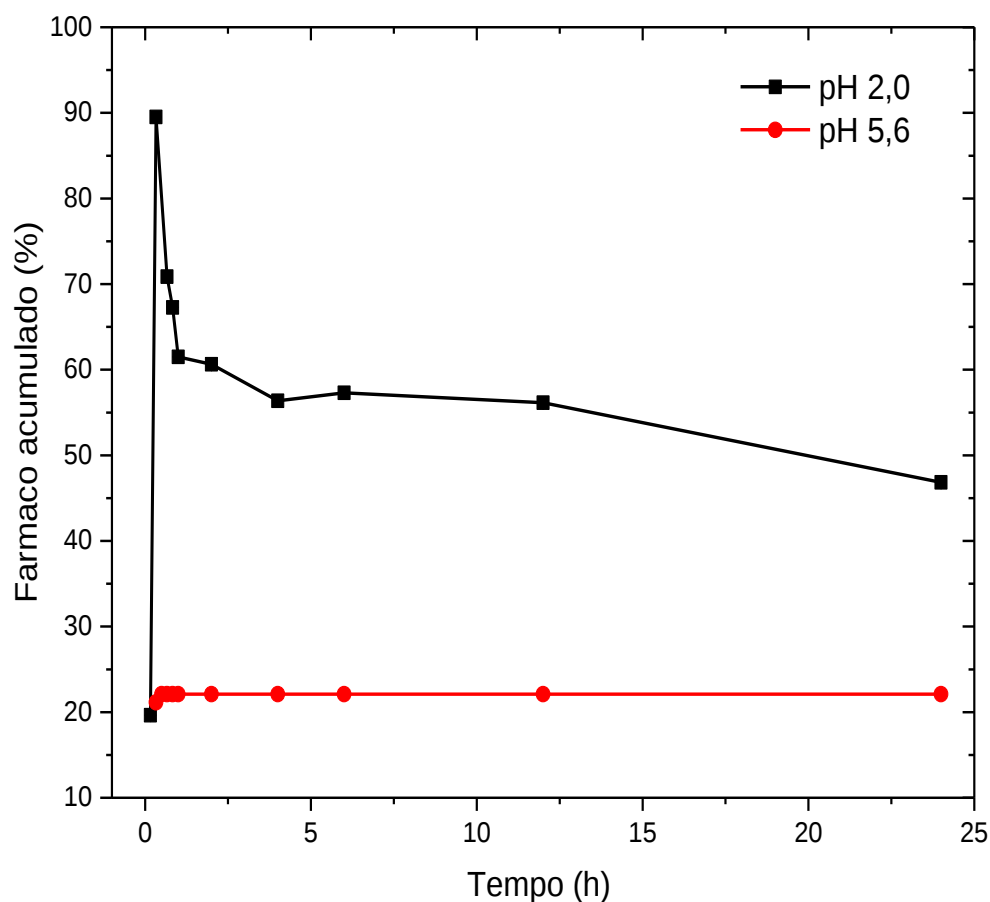


Figura 17: Perfil de liberação in vitro das Nanopartículas de Quitosana/PEG-Ácido Cumárico no pH 2,0 e pH 5,6 a 37°C. (Fonte: autor).

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.2.1 Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio de citotoxicidade demonstrou uma viabilidade da linhagem de células de fibroblasto murino superior a 90% quando tratadas com *p*-CA em todas as concentrações analisadas. As Np's QS/PEG bem como as Np's QS/PEG – *p*-CA apresentaram uma viabilidade celular igual ou superior a 100% em todas as concentrações analisadas, enquanto que a cisplatina (droga-controle) demonstrou uma citotoxicidade reduzindo as células viáveis em torno de 50% na concentração de 9 µg/mL, e de aproximadamente 30% nas concentrações de 27 µg/mL e 81 µg/mL (Figura 18).

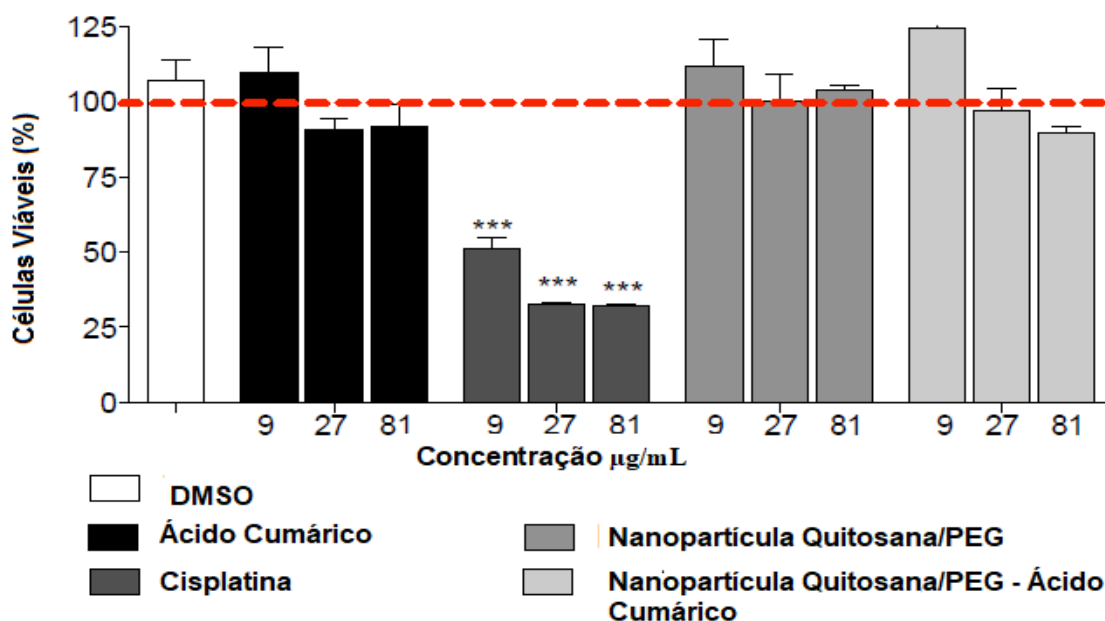


Figura 18: Efeito do Ácido cumárico, Cisplatina, nanopartículas de quitosana/PEG e nanopartículas de quitosana/PEG-ácido cumárico sob a viabilidade celular da linhagem 3T3. A linha tracejada representa o grupo de controle (tratado com RPMI), e as barras representam o erro padrão das amostras. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls, *** $p < 0,001$ (Controle vs Células tratadas). (Fonte: autor).

Na linhagem de adenocarcinoma mamário murino (4T1), o *p*-CA na forma isolada demonstrou uma viabilidade celular entre 90 e 80% nas concentrações de 9 µg/mL e 81 µg/mL. As Np's QS/PEG mostram atividade significativa nas concentrações de 27 e 81 µg/mL em torno de 70% e 20%. As Np's QS/PEG – *p*-CA mostraram uma viabilidade em torno de 40% na concentração de 27 µg/mL e aproximadamente 10% na concentração de 81 µg/mL (Figura 19).

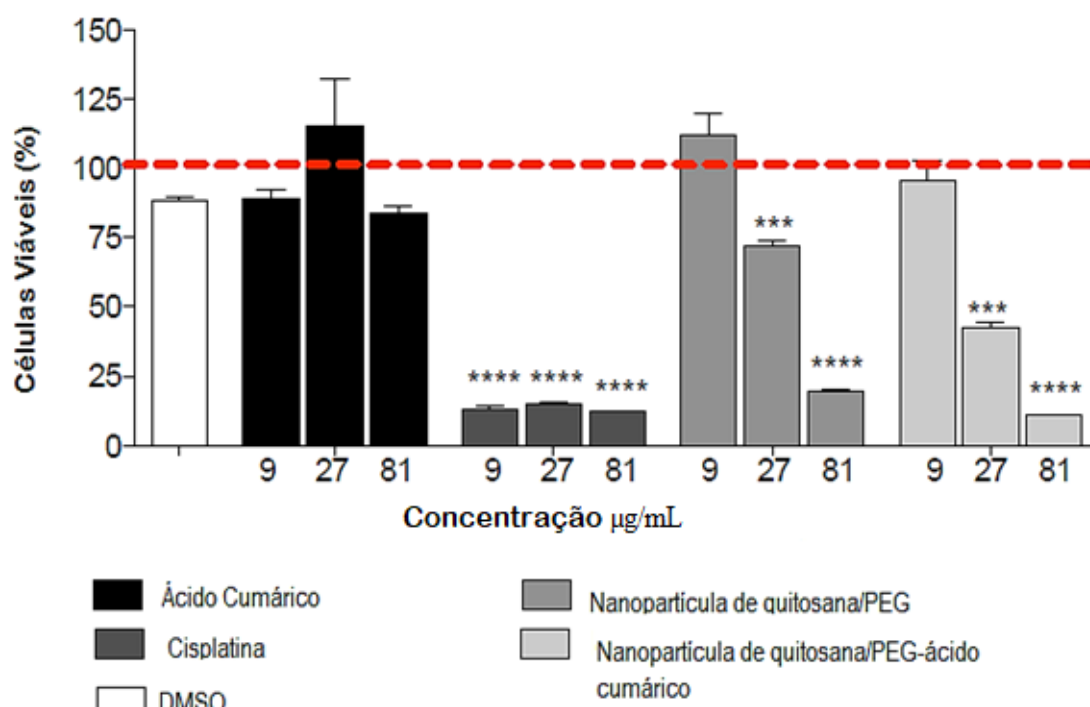


Figura 19: Efeito do Ácido cumárico, Cisplatina, nanopartículas de quitosana/PEG e nanopartículas de quitosana/PEG-ácido cumárico sob a viabilidade celular da linhagem 4T1. A linha tracejada representa o grupo de controle (tratado com RPMI), e as barras representam o erro padrão das amostras. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls, *** $p < 0,001$ (Controle vs Células tratadas). (Fonte: autor).

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS

6.1.1 Análise da Morfologia das Np's por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As Np's QS/PEG nas proporções de 1:1 e 1:2 (Figuras 7 e 8), apresentaram morfologia esférica, tamanhos e diâmetros uniformes, confirmando a tendência de homogeneidade apontada pelos valores de índices de polidispersão em torno de 0,2. Essa característica uniforme mostrou-se diferente dos resultados apresentados pelas nanopartículas de QS referidas na literatura. (VITALI et al., 2008, BLANCO, 2011).

A uniformidade pode ser devido ao revestimento das Np's com PEG, surfactante hidrofílico não iônico, que em conjunto com a QS, promove a compactação e consequentemente redução do tamanho das nanopartículas, tornando o dispositivo desenvolvido mais biocompatível e mais estável em fluidos biológicos, pois diminui a tendência natural de agregação. (PREGO et al., 2006).

As Np's QS/PEG – *p*-CA (Figura 9) apresentaram características morfológicas semelhantes a Np's QS/PEG, mostrando que a encapsulação do *p*-CA não provocou alterações morfológicas, resultado este compatível ao da literatura (HARRIS et al, 2011) que na formação de nanopartículas e microesferas de compostos fenólicos extraídos da erva mate em matriz de quitosana através do método de gelificação iônica, obteve a formação de microesferas de forma esférica com agregação ao longo da amostra analisada, corroborando com nossos resultados.

6.1.2 Análise de Tamanho de Partícula e Índice de Polidispersão

Os valores médios do tamanho das Np's QS/PEG (1:1) e QS/PEG (1:2) expostos na tabela 2, apresentaram uma distribuição de tamanho de 761nm e 173,8 nm respectivamente. O tamanho das Np's QS/PEG (1:2) foi bastante promissor uando comparado aos tamanhos das Np's QS desenvolvidas nos estudos de Janes e Alonso (2003) e Gulati et al. (2014), com 254 nm e 303 nm de tamanho, respectivamente. Essa redução de tamanho pode estar associada ao PEG, que como agente surfactante, promove a redução da energia livre interfacial do sistema, diminuindo o diâmetro médio da partícula. (SCHAFFAZICK et al., 2003, NAG et al., 2016).

A diferença de tamanho entre as Np's QS/PEG e QS/PEG – *p*-CA, medidas por DLS, pode ser atribuída a um inchaço das Np's na solução durante a medição de tamanho, indicando que possivelmente com a presença do *p*-CA as Np's conseguiram se manter menores. (NAJAFABADI et al., 2014).

O tamanho de partícula é uma característica importante em sistemas nanométricos, quanto menor for a partícula maior será a biodisponibilidade e consequentemente um aumento na taxa de dissolução em diferentes áreas do organismo, como por exemplo a captação de partículas em células não fagocíticas é maior quando as Np's se apresentam entre 20 a 50 nm. (FRÖHLICH, 2012, NAJAFABADI et al., 2014).

Os valores de índice de polidispersão nas Np's QS/PEG, em ambas proporções, foi inferior a 0,2 que estas partículas apresentam uma boa homogeneidade. Valores índice de polidispersão acima de 0,3 indicam uma heterogeneidade do diâmetro das partículas na suspensão, e pode ser atribuída a agregação de partículas. (SILVA et al., 2010, SOUZA, P. M. S et al., 2012).

6.1.3 Espectro de Infravermelho com Transmissão de Fourier (FT-IR)

A banda na região 3343 cm^{-1} apresentada no espectro de infravermelho da QS corresponde ao estiramento axial do grupo O-H; em 1683 cm^{-1} , demonstra deformação axial do grupamento C=O da amida. A banda 1649 cm^{-1} está relacionada a deformação angular da amina e a região de 1466 cm^{-1} representa deformação angular de CH_2 . (SOUZA, K. V.D et al., 2010).

O PEG exibiu os principais picos de absorções em 2916 cm^{-1} , referente ao grupamento C-H alifático, assim como foi possível observar a absorção do grupamento C-O-C em 1188 cm^{-1} (LONG et al., 2013, EL MAGHRABY, ELSERGANY, 2014) (Figura 10).

As Np's QS/PEG apresentaram comportamento semelhante ao espectro da quitosana, exceto pelo deslocamento da banda em 1649 cm^{-1} para 1608 cm^{-1} associada ao grupamento N-H da amina da quitosana. A presença do PEG nas amostras contribuiu para esse deslocamento, pois as moléculas de PEG formam ligações de hidrogênio com os grupos amina da QS. (DE MELO FIORI et al., 2014).

O espectro de infravermelho *p*-CA apresentou banda na região 3366 cm^{-1} referente ao grupamento O-H, em 1732 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} espectro demonstrou pico do grupamento

C=O e C-O respectivamente característico do ácido carboxílico, bem como pico em 925 cm^{-1} referente ao grupamento OH na posição “para” do anel” aromático do ácido. (KOC et al., 2016).

O perfil do espectro das Np's QS/PEG – *p*-CA foi similar ao perfil do espectro das Np's QS/PEG, apresentando leve deslocamento na região do grupamento N-H e CH₂, cuja banda nas Np QS/PEG foi evidenciada em 1609 cm^{-1} enquanto que nas Np's QS/PEG – *p*-CA foi em 1624 cm^{-1} , estas relacionadas ao grupamento N-H, já para o grupamento CH₂ foi de 1463 cm^{-1} para 1465 cm^{-1} respectivamente. Os deslocamentos evidenciados podem sugerir uma possível interação química entre QS e o *p*-CA (Figura 10).

6.1.4 Análise termogravimétrica (TGA)

O perfil do TGA da QS mostrou três etapas de perda de massa, sendo a primeira relacionada a desidratação da QS, na região entre 27 a $153\text{ }^{\circ}\text{C}$, a partir desta temperatura ocorre a decomposição da amostra em duas etapas nas regiões entre 153 a $415\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 415 a $733\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 11), este perfil está de acordo com os estudos de Santos et al. (2003) e Rao, Johns (2008). A perda de água, justifica-se pela afinidade dos polissacarídeos com a água resultando assim em macromoléculas com estruturas desordenadas observadas em todas as amostras, e o segundo estágio ocorre devido a desidratação dos anéis de sacarídeos o início da decomposição do esqueleto da quitosana. (DUDHANI; KOSARAJU, 2010, GAUTAM et al., 2014).

Segundo Matos et al. (2009), a curva termogravimétrica derivada (DTG) é um dado relevante obtido através da curva de TG, que expressa a derivada primeira da variação de massa (m) em relação ao tempo (dm/dt), sendo registrada em função do tempo ou da temperatura. Na curva de DTG são obtidos picos cujas áreas são proporcionais a variação de massa da amostra, apresentando informações mais facilmente visualizadas, como eventos sobrepostos, que em uma curva de TG. No nosso estudo observamos que as curvas de DTG confirmam os resultados obtidos pelas curvas de TG.

O perfil termogravimétrico do *p*-CA, foi decorrente as degradações do composto, em que de acordo com a figura 13 houve uma maior perda de massa (73,34%) em $265\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguida da degradação da amostra finalizando em $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 13), confirmando os resultados achados por Alevizou e Voutsas (2013).

As Np's QS/PEG e Np's QS/PEG – *p*-CA apresentaram um perfil de TGA com três perdas de massa onde a primeira perda está relacionada a desidratação da amostra e nas duas subseqüente a decomposição da amostra (Figuras 12 e 14). Também podemos observar que as nanopartículas sintetizadas apresentaram uma maior estabilidade quando se diz respeito a redução de perda de massa, contudo ainda que as perdas de massa ocorreram em menor quantidade, se deram a temperaturas inferiores quando comparadas a quitosana e o ácido cumárico isoladamente, corroborando com os dados encontrados no estudo de Laus e colaboradores. (LAUS et al., 2010).

6.1.5 Difratometria de raios-x (DR-X)

As análises de raios-X das amostras foram realizadas no intuito de verificar qualitativamente a fase cristalográfica das amostras e verificar alterações estruturais nas nanopartículas sintetizadas.

A QS analisada apresentou um pico em 2θ 20,06° que caracteriza seu caráter semicristalino devido a fortes interações intermoleculares caracterizadas pelas pontes de hidrogênio formadas entre os grupos amina, álcool, amida e outros grupos funcionais presentes na molécula de quitosana. Essas fortes interações fornecem certa organização à estrutura cristalina da QS (AKMAZ et al., 2013, GAUTAM et al., 2014), semelhantemente o PEG apresenta um pico em 2θ 19°, revelando sua semi-cristalinidade (VRANDEČIĆ et al., 2010).

O *p*-CA apresentou dois picos intensos em 2θ 24,8° e 41,7°, corroborando com suas características cristalinas (CUNHA et al., 2012). As Np's QS/PEG e Np's QS/PEG – *p*-CA não apresentaram picos no difratograma, indicando que o processo de reticulação da quitosana através do gotejamento do TPP produz mudanças na propriedade física da cadeia de QS (SHARMA et al., 2003, CRUZ et al., 2016).

No difratograma das Np's QS/PEG – *p*-CA não foi possível observar os picos de difração do *p*-CA, sugerindo que o composto está totalmente disperso na nanopartícula.

6.1.6 Eficiência de encapsulação

A eficiência da encapsulação define a quantidade de substância retida no interior dos sistemas e depende, entre outros fatores, da afinidade entre o material que reveste a substância encapsulada. (ALMEIDA, 2013).

As Np's QS/PEG – *p*-CA demonstraram uma eficiência de encapsulação de 79,4%, mostrando uma capacidade de encapsulação superior ao descrito por Konecsni et al. (2012) que obteve 57,6% de rutina, outro composto fenólico do tipo bioflavonóide, encapsulada em nanopartículas de quitosana utilizando o método de gelificação iônica.

Nori et al. (2011), propuseram a encapsulação por coacervação complexa do extrato de própolis, rico em compostos fenólicos, com proteína isolada de soja e pectina como agente encapsulante. Esses autores encontraram uma eficiência de encapsulação de 66,12 a 72,01%, sendo o processo de encapsulação efetivo para preservar compostos fenólicos e flavonoides durante 6 meses de armazenamento, preservando também a atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato.

Extrato fenólico de blackberry (ácido gálico, epicatequina, ácido *p*-hidroxibenzóico) foi microencapsulado em matrizes de β -ciclodextrina, quitosana, xantana e hidrogéis de xantana e quitosana sendo os valores da eficiência de encapsulação de 52,4%, 75,5%, 46,5% e 66% para o ácido gálico, 51,5%, 24,5%, 48,5%, 41% para epicatequina, 14,5%, 0%, 0%, 0% para o ácido *p*-hidroxibenzóico respectivamente, indicando que a eficiência de encapsulação foi diretamente dependente do revestimento utilizado. A matriz de quitosana obteve maior encapsulação quando se tratou do ácido gálico (DA ROSA et al., 2014), assim como se mostrou um efetivo agente encapsulante para o composto utilizado em nosso estudo.

6.1.7 Liberação in vitro do Ácido *p*-Cumárico a partir das Nanopartículas de Quitosana/PEG

A liberação do *p*-CA a partir Np's QS/PEG na figura 17, quando expostas ao pH 2,0 (simulando o pH gástrico) apresentou um pico de liberação de 90% em 20 minutos, resultado este que difere do achado por Konecsni e colaboradores (2012) que ao expor suas nanopartículas de quitosana com rutina, ao pH de 1,4, não houve liberação durante as duas horas do experimento, sugerindo interações fortes entre a quitosana-rutina, o que não foi observado em nossos resultados. Resultado semelhante ao nosso foi obtido por Rutz (2013), onde as microcápsulas de quitosana liberaram em torno de 80% dos compostos fenólicos obtidos pelo suco da pitanga quando foram expostas ao pH 2,0 nas primeiras duas horas do ensaio, demonstrando que o perfil de liberação de uma droga está diretamente relacionado a distribuição desta droga na matriz polimérica, sendo assim,

depende das características físico-químicas da droga e dos componentes da matriz polimérica. (SPAGNOL et al., 2018).

Outro fato importante a ser considerado é que a QS é altamente solúvel em meios ácidos, dessa forma quando as Np's QS/PEG – *p*-CA entram em contato com o meio de pH 2,0 (simulando o pH gástrico) sofrem um aumento brusco levando a sua ruptura causado pela forte repulsão dos grupamentos aminos carregados positivamente. (GAMBOA, LEONG, 2013). Uma alternativa para contornar essa condição seria o revestimento das nanopartículas de quitosana com alginato, que é um polieletrólito aniônico bastante utilizado na formulação de nanopartículas de quitosana, onde esse complexo formado seria biodegradável e biocompatível e mecanicamente mais resiste em baixos valores de pH baixos onde a quitosana é solúvel. (HAMMAN, 2010).

O estudo de liberação do *p*-CA em PBS pH de 5,6 (simulando o pH tumoral), foi realizado visto que os tumores convertem ativamente glicose em ácido lático, e devido a uma produção acima do normal, juntamente com o ácido carbônico tem um pH extracelular baixo. (DANQUAH et al., 2011). No nosso estudo verificamos que nessas condições ocorre liberação máxima de 22% em 40 minutos de liberação em um período de 24 horas o qual foi monitorado. Estes resultados sugerem que a liberação controlada de compostos fenólicos como o *p*-CA além de dependerem da distribuição destes compostos na matriz polimérica sofrem influência através do solvente e pH do meio. (DA ROSA et al., 2014).

Um estudo de liberação de compostos fenólicos em diferentes matrizes poliméricas mostrou que em pH de 4,5 houve uma liberação superior em relação ao pH 7,4, demonstrando que quanto menor o pH maior a facilidade de rompimento de partículas poliméricas, devido a maior facilidade de solubilização do material na parede. (DA ROSA et al., 2014).

Esta diminuição de pH no meio, pode constituir uma vantagem no ponto de vista terapêutico, isto porque, há uma maior facilidade de acumulação de fármacos pouco ácidos nas células tumorais, e ainda, na liberação de fármacos que são transportados em nanopartículas, estáveis a pH neutro, mas sensíveis ao pH ácido, destabilizando-as e libertando o seu conteúdo. (DANQUAH et al., 2011).

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

6.2.1 Ensaio da Viabilidade Celular

O ensaio para avaliar a capacidade de redução do MTT apresentou grande importância para avaliar o comportamento do *p*-CA frente as linhagens celulares de fibroblastos murino (3T3) e adenocarcinoma mamário murino (4T1).

As células 3T3 e 4T1 apresentaram uma viabilidade superior a 80% quando tratadas com o *p*-CA não encapsulado, em todas as concentrações testadas.

A linhagem tumoral 4T1 possui várias características que tornam semelhantes ao câncer de mama humano. (PULASKI, OSTRAND-ROSENBERG, 2001). Estudos *in vivo* mostraram que animais com tumores do tipo 4T1 quando tratados pela ingestão de suco de uva, houve uma redução na massa tumoral, atribuído a presença de grande quantidade de compostos fenólicos existentes no suco, incluindo o *p*-CA. (SINGLETERY et al., 2003).

As Np's QS/PEG e as Np's QS/PEG – *p*-CA (figuras 18 e 19) demonstraram uma citotoxicidade dose-dependente na linhagem 4T1, além disso, as Np's QS/PEG – *p*-CA demonstraram maior capacidade de redução na viabilidade celular nas concentrações de 27 e 81 µg/mL. No estudo de Arulmozhi e colaboradores (2013), onde foi encapsulado o ácido elágico em Np's de QS obtidas através do método de gelificação iônica com o uso de TPP, a citotoxicidade em células de carcinoma oral (KB) foi superior quando o ácido elágico estava encapsulado do que na forma isolada, este fato poder ser explicado pela possibilidade de maior absorção intracelular das Np's, uma vez que a superfície das partículas possuem carga positiva enquanto que a membrana celular uma carga negativa, e através de uma interação não específica facilitaria a difusão dessas partículas para o interior da célula. (VENKATESAN et al., 2011).

As Np's QS/PEG também mostraram uma considerável redução na viabilidade celular, concordando com os achados na literatura que demonstram que Np's de QS possuem efeitos anticancerígenos. (LI et al., 2009, ARULMOZHI et al., 2013).

A cisplatina foi utilizada, no nosso estudo, como droga antitumoral controle, por ser um fármaco antineoplásico do tipo alquilante com eficácia em tumores de mama, pulmão, cabeça, pescoço, ovário e testículos. (DASARI, TCHOUNWOU, 2014). Apesar da sua notável capacidade antitumoral, a cisplatina possui limitações no seu uso devido a

alta toxicidade provocada, além de provocar uma resistência adquirida a droga após determinado tempo de administração. (NEVES, VARGAS, 2011). Tanto nas células 3T3 como nas células 4T1 a cisplatina mostrou alta toxicidade em todas as concentrações testadas.

Apesar da avaliação da cinética de liberação controlada no pH de 5,6, apresentar uma liberação baixa a avaliação citotóxica mostrou resultado satisfatório na capacidade de redução da viabilidade celular. Estudos na literatura demonstraram que quando foi analisado apenas a capacidade de redução de radicais livres, o *p*-CA demonstrou capacidade inferior quando comparado ao ácido cafeico e felúrico (MATHEW et al., 2015) porém quando analisaram a mesma atividade frente a linhagens de adenocarcinoma de pulmão (A549) e adenocarcinoma de colón (HT29-D4) mostrou atividade igual ou superior que o ácido felurico e cafeico. (BOUZAIENE et al., 2015). Estes dados indicam que o *p*-CA pode agir de diferentes formas de acordo com as condições e o tipo de sistema analisado, como no caso em sistema de cultura celular, corroborando com nossos estudos.

7 CONCLUSÃO

- As Np's QS/PEG na proporção de 1:2, selecionadas no nosso estudo, apresentaram um tamanho de partícula de 173,8 nm com PDI de 0,03 e morfologia esférica, que demonstrou tamanho e morfologia adequados para a encapsulação do ácido cumárico;
- O espectro de infravermelho por transmissão de Fourier (FTIR) das Np's QS/PEG e QS/PEG – *p*-CA mostrou alguns deslocamentos nas principais bandas, sugerindo interação entre os polímeros e o *p*-CA;
- Através da análise térmica (TGA e DTG) as Np's apresentaram uma redução na perda de massa, demonstrando que as Np's ofereceram uma condição de estabilidade maior relacionada à redução de massa,
- A difratometria de raios x (DR-X) mostrou uma amorfização nas amostras das Np's em relação a QS que apresenta um caráter semi-cristalino e o *p*-CA cristalino isso indica que as nanopartículas podem apresentar maior solubilidade e dissolução favorecendo a sua absorção celular em formulações farmacêuticas;
- A capacidade de encapsulação do *p*-CA pelas Np's QS/PEG foi de 79,6%, e quando submetidas em pH 2,0 tiveram uma liberação em torno de 90% , enquanto que em pH de 5,6 houve uma liberação de 22%; o que demonstra que a liberação sofre influência do pH do meio, que é uma condição importante para as vias de administração dessa formulação.
- O ensaio de viabilidade celular mostrou que quando encapsulado nas Np's, o *p*-CA, conseguiu uma maior inibição celular frente a linhagem 4T1 em relação ao *p*-CA na sua forma livre sugerindo que através do encapsulamento nessas Np's facilitou a permeação do *p*-CA no interior celular, potencializando sua atividade antitumoral.

REFERÊNCIAS

1. AGNIHOTRI, S. A., MALLIKARJUNA, N. N., AMINABHAVI, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of controlled release*, 100(1), 5-28.
2. AJUN, W., YAN, S., LI, G., HUILI, L. (2009). Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, 75(4), 566-574.
3. AKMAZ, S., DILAVER ADIGÜZEL, E., YASAR, M., ERGUVEN, O. (2013). The effect of Ag content of the chitosan-silver nanoparticle composite material on the structure and antibacterial activity. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2013.
4. ALEVIZOU, E. I., & VOUTSAS, E. C. (2013). Solubilities of p-coumaric and caffeic acid in ionic liquids and organic solvents. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 62, 69-78.
5. ALLEN JR, L. V., POPOVICH, N. G., & ANSEL, H. C. (2013). *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos-9*. Artmed Editora.
6. ALMEIDA, JACQUELINE DE FLORIO. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E Microencapsulação de Extrato Etanólico de Tomilho (*Thymus vulgaris* L.). Trabalho de Conclusão de Curso Bacharelado em Química da UTFPR – Campus Pato Branco. Pato Branco, 2013.
7. ALMEIDA, T. L. Desenvolvimento de membrana composta de PVAI e quitosana compatível com o sistema dermo-epidérmico. Dissertação (Mestrado em Ciências em Tecnologia Nuclear) - Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo - SP, 2009.
8. ALVES, I. B. V. Metal-Organic Frameworks (MOFs): alternativa inteligente para carreamento de fármacos anti-inflamatório e antineoplásico. 2013. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

9. AMIN, A. R., KUCUK, O., KHURI, F. R., SHIN, D. M. (2009). Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *Journal of Clinical Oncology*, 27(16), 2712-2725.
10. AMORIM, R. V. S., LEDINGHAM, W. M., KENNEDY, J. F., CAMPOS-TAKAKI, G. M. (2006). Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* using sugar cane substrates as inexpensive carbon sources. *Food Biotechnology*, 20(1), 43-53.
11. ANDRADE, F. O., NAGAMINE, M. K., CONTI, A. D., CHAIBLE, L. M., FONTELLES, C. C., JORDÃO JUNIOR, A. A., ONG, T. P. (2012). Efficacy of the dietary histone deacetylase inhibitor butyrate alone or in combination with vitamin A against proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(9), 841-850.
12. ANNEMA, N., HEYWORTH, J. S., MCNAUGHTON, S. A., IACOPETTA, B., FRITSCHI, L. (2011). Fruit and vegetable consumption and the risk of proximal colon, distal colon, and rectal cancers in a case-control study in Western Australia. *Journal of the American dietetic association*, 111(10), 1479-1490.
13. ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., & ALLEN, L. V. (2007). Formas farmacêuticas com velocidade controlada e sistemas de liberação de fármacos. *Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberacao de fármacos*, 283-300.
14. AOUADA, M. R. M. Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2009.
15. ARULMOZHI, V., PANDIAN, K., MIRUNALINI, S. (2013). Ellagic acid encapsulated chitosan nanoparticles for drug delivery system in human oral cancer cell line (KB). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110, 313-320.
16. AULTON, M. E. (2008). *Delineamento de formas farmacêuticas*. Artmed.
17. AZEVEDO, M. D. (2002). Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. In *WORKSHOP DO CURSO: TÓPICOS ESPECIAIS EM QUÍMICA*

INORGÂNICA IVINTRODUÇÃO À NANOTECNOLOGIA: UM ENFOQUE QUÍMICO (Vol. 1).

18. BAO, H., LI, L., ZHANG, H. (2008). Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosan–TPP nanoparticles in aqueous solutions. *Journal of colloid and interface science*, 328(2), 270-277.
19. BATTISTI, M. V., CAMPANA-FILHO, S. P. (2008). Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. *Química Nova*, 31(8), 2014-2019.
20. BERGER, J., REIST, M., MAYER, J. M., FELT, O., PEPPAS, N. A., GURNY, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 19-34.
21. BLANCO, M. A. (2011). *Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico AH PLUS* (Doctoral dissertation, Dissertação (Mestrado)–Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro).
22. BOUZAIENE, N. N., JAZIRI, S. K., KOVACIC, H., CHEKIR-GHEDIRA, L., GHEDIRA, K., LUIS, J. (2015). The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *European journal of pharmacology*, 766, 99-105.
23. BOUZAIENE, N. N., JAZIRI, S. K., KOVACIC, H., CHEKIR-GHEDIRA, L., GHEDIRA, K., LUIS, J. (2015). The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *European journal of pharmacology*, 766, 99-105.
24. BRASIL, Portaria nº 245, de 05 de abril de 2012. Dispõe da criação do Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias – SisNANO. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2012b.

25. BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-americana de saúde. Nanotecnologia: A interação célula e nanopartículas. Brasília, p. 89-102, 2011a.
26. BUNJES, H., UNRUH, T. (2007). Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Advanced drug delivery reviews*, 59(6), 379-402.
27. CALVO, P., REMUNAN-LOPEZ, C., VILA-JATO, J. L., & ALONSO, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125-132.
28. CANELLA, K. M. N., GARCIA, R. B. (2001). Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel–influência do método de preparação e do solvente. *Quim. Nova*, 24(1), 13-17.
29. CRUZ, J. B. D., CATÃO, C. D. D. S., BARBOSA, R. C., FOOK, M. V. L. (2016). Synthesis and characterization of chitosan scaffolds with antineoplastic agent. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 21(1), 129-140.
30. CUNHA, V. R., CONSTANTINO, V. R., ANDO, R. A. (2012). Raman spectroscopy and DFT calculations of para-coumaric acid and its deprotonated species. *Vibrational Spectroscopy*, 58, 139-145.
31. DA ROSA, C. G., BORGES, C. D., ZAMBIAZI, R. C., RUTZ, J. K., DA LUZ, S. R., KRUMREICH, F. D., NUNES, M. R. (2014). Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 527-533.
32. DAMIAN, C., BEIRÃO, L. H., FRANCISCO, A. D., ESPIRITO SANTO, M. L. P., TEIXEIRA, E. (2009). Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alimentos e Nutrição (Araraquara)*, 16(2), 195-205.
33. DANQUAH, M. K., ZHANG, X. A., MAHATO, R. I. (2011). *Advanced drug delivery reviews*, 63(8), 623-639.
34. DAS, N. G., DAS, S. K. (2003). Controlled release of oral dosage forms. *Pharmaceutical technology*, 15, 10-17.

35. DASARI, S., & TCHOUNWOU, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, 740, 364-378.
36. DE MELO FIORI, A. P. S., GABIRABA, V. P., PRAXEDES, A. P. P., DA SILVA NUNES, M. R., BALLIANO, T. L., DA SILVA, R. C., RIBEIRO, A. S. (2014). Preparação e caracterização de nanocompósitos poliméricos baseados em quitosana e argilo minerais. *Polímeros*, 24(5), 628-635.
37. DEDAVID, B. A., GOMES, C. I., MACHADO, G. (2007). *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. EdIPUCRS.
38. DENKBAŞ, E. B., KILIÇAY, E., BIRLIKSEVEN, C., ÖZTÜRK, E. (2002). Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization. *Reactive and Functional Polymers*, 50(3), 225-232.
39. DIMER, F. A., FRIEDRICH, R. B., BECK, R. C. R., GUTERRES, S. S., & POHLMANN, A. R. (2013). Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. *Química nova*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-. Vol. 36, n. 10,(2013), p. 1520-1526.
40. DOS SANTOS, R. V., DE LIMA, P. M., NITSCHKE, A., HARTH, F. M., DE MELO, F. Y., AKAMATSU, H. T., LIMA, H. C. (2002). Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais. *Rev. bras. alerg. imunopatol*, 77.
41. DUDHANI, A. R., KOSARAJU, S. L. (2010). Bioadhesive chitosan nanoparticles: preparation and characterization. *Carbohydrate polymers*, 81(2), 243-251.
42. EL MAGHRABY, G. M., ELSERGANY, R. N. (2014). Fast disintegrating tablets of nisoldipine for intra-oral administration. *Pharmaceutical development and technology*, 19(6), 641-650.
43. EL-SEEDI, H. R., EL-SAID, A. M., KHALIFA, S. A., GÖRANSSON, U., BOHLIN, L., BORG-KARLSON, A. K., VERPOORTE, R. (2012). Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(44), 10877-10895.

44. ESPINOSA, R. R., INCHINGOLO, R., ALENCAR, S. M., RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T., CASTRO, I. A. (2015). Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. *Food chemistry*, 182, 95-104.
45. FALLEIROS, J. P. B.; BRANDL, A. L.; DA FONSECA, A. R. A. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. *Nucleus*, v. 8, n. 1, 2011.
46. FANG, Z., BHANDARI, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.
47. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, ANVISA. 5 ed. Brasília: [s.n]. 2010. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm. Acesso em 03/10/2017.
48. FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., BRAY, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5).
49. FINSY, R., DE JAEGER, N. (1991). Particle sizing by photon correlation spectroscopy. Part II: Average values. *Particle & particle systems characterization*, 8(1-4), 187-193.
50. FRÖHLICH, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 7, 5577.
51. GAMBOA, J. M., LEONG, K. W. (2013). In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 65(6), 800-810.
52. GAN, Q., WANG, T., COCHRANE, C., MCCARRON, P. (2005). Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44(2), 65-73.
53. GARCIA, M., JEMAL, A. W. E. C. M. H. Y. S. R. T. M. J., WARD, E. M., CENTER, M. M., HAO, Y., SIEGEL, R. L., & THUN, M. J. (2007). Global cancer facts & figures 2007. Atlanta, GA: *American cancer society*, 1(3), 52.

54. GAUTAM, S., CHOU, C. F., DINDA, A. K., POTDAR, P. D., & MISHRA, N. C. (2014). Fabrication and characterization of PCL/gelatin/chitosan ternary nanofibrous composite scaffold for tissue engineering applications. *Journal of materials science*, 49(3), 1076-1089.
55. GOPALAN, N., RODRÍGUEZ-DURAN, L. V., SAUCEDO-CASTANEDA, G., & NAMPOOTHIRI, K. M. (2015). Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: a versatile enzyme for biorefining of biomass. *Bioresource technology*, 193, 534-544.
56. GULATI, N., NAGAICH, U., SARAF, S. (2014). Fabrication and in vitro characterization of polymeric nanoparticles for Parkinson's therapy: a novel approach. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(4), 869-876.
57. HALL, S. S., MITRAGOTRI, S., DAUGHERTY, P. S. Identification of peptide ligands facilitating nanoparticle attachment to erythrocytes. *Biotechnol. Prog.*, v.23, n.3, p.749-754, 2007.
58. HAMMAN, J. H. (2010). Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Marine drugs*, 8(4), 1305-1322.
59. HARRIS, R., LECUMBERRI, E., MATEOS-APARICIO, I., MENGÍBAR, M., & HERAS, A. (2011). Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 803-806.
60. HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. Physicalchemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, v. 24, p. 4283 – 43000, 2003
61. HOFFMAN, A. S. (2008). The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 132(3), 153-163.
62. INCA, Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: **INCA**, 2015. Disponível:<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf> Acesso em, 19 de outubro de 2017.

63. JABIR, N. R., TABREZ, S., ASHRAF, G. M., SHAKIL, S., DAMANHOURI, G. A., KAMAL, M. A. (2012). Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *International journal of nanomedicine*, 7, 4391.
64. JAIN, A., THAKUR, K., SHARMA, G., KUSH, P., & JAIN, U. K. (2016). Fabrication, characterization and cytotoxicity studies of ionically cross-linked docetaxel loaded chitosan nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 137, 65-74.
65. JANES, K. A., ALONSO, M. J. (2003). Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: preparation and characterization. *Journal of applied polymer science*, 88(12), 2769-2776.
66. JUNIOR, S. V. C. (2004). Técnicas de caracterização de polímeros. São Paulo: *Artliber Editora*.
67. KAI, H., OBUCHI, M., YOSHIDA, H., WATANABE, W., TSUTSUMI, S., PARK, Y. K., KUROKAWA, M. (2014). In vitro and in vivo anti-influenza virus activities of flavonoids and related compounds as components of Brazilian propolis (AF-08). *Journal of Functional Foods*, 8, 214-223.
68. KALINKOVA, G. N. (1999). Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. *International journal of pharmaceutics*, 187(1), 1-15.
69. KAYSER, O., LEMKE, A., HERNANDEZ-TREJO, N. (2005). The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. *Current pharmaceutical biotechnology*, 6(1), 3-5.
70. KOC, S., KOSE, D. A., AVCI, E., KOSE, K. (2016). Synthesis and Thermal Characterization of p-Coumaric Acid Complexes of CoII, NiII, CuII and ZnII Metal Cations and Biological Applications. *Hittite Journal of Science & Engineering*, 3(1).
71. KONECSNI, K., LOW, N. H., NICKERSON, M. T. (2012). Chitosan–tripolyphosphate submicron particles as the carrier of entrapped rutin. *Food chemistry*, 134(4), 1775-1779.
72. KREUTER, J. (2001). Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced drug delivery reviews*, 47(1), 65-81.
73. KUMAR, M. N. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46(1), 1-27.

74. KUMAR, S. R., AHMED, V. I., PARAMESWARAN, V., SUDHAKARAN, R., BABU, V. S., HAMEED, A. S. (2008). Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lateolabrax niloticus*) to protect from *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*. ***Fish & Shellfish Immunology***, 25(1), 47-56.
75. LAGUERRE, M., LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. ***Progress in lipid research***, 46(5), 244-282.
76. LARANJEIRA, M. C., FÁVERE, V. D. (2009). Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. ***Química Nova***, 32(3), 672-678.
77. LAUS, R., COSTA, T. G., SZPOGANICZ, B., FÁVERE, V. T. (2010). Adsorption and desorption of Cu (II), Cd (II) and Pb (II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent. ***Journal of Hazardous Materials***, 183(1), 233-241.
78. LI, F., LI, J., WEN, X., ZHOU, S., TONG, X., SU, P., SHI, D. (2009). Anti-tumor activity of paclitaxel-loaded chitosan nanoparticles: An in vitro study. ***Materials Science and Engineering: C***, 29(8), 2392-2397.
79. LIANG, X. J.; CHEN, C.; ZHAO, Y.; WANG, P. Circumventing Tumor Resistance to Chemotherapy by Nanotechnology. In: ZHOU, J. (Ed.). ***Multi-Drug Resistance in Cancer: Humana Press***, v.596, 2010. cap. 21, p. 467-488. (***Methods in Molecular Biology***). ISBN 978-1-60761-415-9.
80. LIU, C. H., WU, C. T. (2010). Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. ***Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects***, 353(2), 149-156.
81. LONG, G., YANG, X. L., ZHANG, Y., PU, J., LIU, L., LIU, H. B., LIAO, F. (2013). Facile one-step coating approach to magnetic submicron particles with poly (ethylene glycol) coats and abundant accessible carboxyl groups. ***International journal of nanomedicine***, 8, 791.
82. LOO, G. (2003). Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. ***The Journal of nutritional biochemistry***, 14(2), 64-73.

83. LUNET, N., LACERDA-VIEIRA, A., BARROS, H. (2005). Fruit and vegetables consumption and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Nutrition and cancer*, 53(1), 1-10.
84. MANNHEIMER, W. A. (2002). *Microscopia dos materiais: uma introdução*. Editora E-papers.
85. MATHEW, S., ABRAHAM, T. E., ZAKARIA, Z. A. (2015). Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *Journal of food science and technology*, 52(9), 5790-5798.
86. MATHEW, S., ABRAHAM, T. E., ZAKARIA, Z. A. (2015). Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *Journal of food science and technology*, 52(9), 5790-5798.
87. MATOS, J. D. R., MERCURI, L. P., ARAÚJO, G. L. B., STORPIRTIS, S., GONÇALVES, J., CHIANN, C., GAI, M. (2009). Aspectos gerais relativos ao desenvolvimento farmacotécnico de medicamento: análise térmica aplicada a fármacos e medicamentos. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 32-65.
88. MILIOLI, C. C. (2011). Avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana em pó dopada com prata. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2011.
89. MOREIRA, J. R. L. A nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no tratamento do câncer de mama. Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico na faculdade de Ceilândia. Brasília, (2014) Disponível em: http://bdm.unb.br/bitstream/10483/7034/1/2013_JoseRanclenissonLopesMoreira.pdf. Acessado em: 24 de novembro de 2017.
90. MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
91. MUZZARELLI, R. A. (1983). Chitin and its derivatives: new trends of applied research. *Carbohydrate Polymers*, 3(1), 53-75.
92. NAG, M., GAJBHIYE, V., KESHARWANI, P., JAIN, N. K. (2016). Transferrin functionalized chitosan-PEG nanoparticles for targeted delivery of

- paclitaxel to cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148, 363-370.
93. NAJAFABADI, A. H., ABDOUSS, M., FAGHIHI, S. (2014). Synthesis and evaluation of PEG-O-chitosan nanoparticles for delivery of poor water soluble drugs: Ibuprofen. *Materials Science and Engineering: C*, 41, 91-99.
 94. NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de platina(II) na terapia do câncer. *Revista virtual de Química*, v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011
 95. NITSCHKE, M., & PASTORE, G. M. (2002). Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*.
 96. NORI, M. P., FAVARO-TRINDADE, C. S., DE ALENCAR, S. M., THOMAZINI, M., DE CAMARGO BALIEIRO, J. C., CASTILLO, C. J. C. (2011). Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), 429-435.
 97. OLIVEIRA, M. A., YOSHIDA, M. I., GOMES, E. C. D. L., MUSSEL, W., SOARES, C., PIANETTI, G. (2011). Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. *Quim Nova*, 34(7), 1224-30.
 98. OU, S. Y., LUO, Y. L., HUANG, C. H., JACKSON, M. (2009). Production of coumaric acid from sugarcane bagasse. *Innovative food science & emerging technologies*, 10(2), 253-259.
 99. PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. A. (2008). *Introduction to spectroscopy*. Cengage Learning.
 100. PEIN, K., OU, J., HUANG, J., OU, S. (2016). p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 2952-2962
 101. PEREIRA, Maria Alves. Nanocápsulas: Preparação, caracterização e marcação com ^{99m}TcHMPAO para estudos de biodistribuição em modelo experimental de inflamação. 2006. 103p. Dissertação (Pós-graduação) – Ciência Farmacêutica – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
 102. PHADNIS, N. V., CAVATUR, R. K., SURYANARAYANAN, R. (1997). Identification of drugs in pharmaceutical dosage forms by X-ray powder

- diffractometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 15(7), 929-943.
103. PIGNATELLO, R., IMPALLOMENI, G., PISTARÀ, V., CUPRI, S., GRAZIANO, A. C., CARDILE, V., & BALLISTRERI, A. (2015). New amphiphilic derivatives of poly (ethylene glycol)(PEG) as surface modifiers of colloidal drug carriers. III. Lipoamino acid conjugates with carboxy-and amino-PEG 5000 polymers. *Materials Science and Engineering: C*, 46, 470-481.
 104. PODSEDEK, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 1-11.
 105. PRAGASAM, S. J., VENKATESAN, V., & RASOOL, M. (2013). Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation*, 36(1), 169-176.
 106. PREGO, C., TORRES, D., FERNANDEZ-MEGIA, E., NOVOA-CARBALLAL, R., QUIÑOÁ, E., ALONSO, M. J. (2006). Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: effect of chitosan pegylation degree. *Journal of Controlled Release*, 111(3), 299-308.
 107. PULASKI, B. A., OSTRAND-ROSENBERG, S. (2001). Mouse 4T1 breast tumor model. *Current protocols in immunology*, 20-2.
 108. RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., MOORE, P. K. (2001). Farmacologia. ed. *Elsevier Churchill Livingstone*. 5ª Ed. Capítulo, 42, 713-736.
 109. RAO, V., JOHNS, J. (2008). Thermal behavior of chitosan/natural rubber latex blends TG and DSC analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 92(3), 801-806.
 110. RIBOLI, E., NORAT, T. (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *The American journal of clinical nutrition*, 78(3), 559S-569S.
 111. RINAUDO, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 31(7), 603-632.

112. ROBERTS, G. A. (1992). Structure of chitin and chitosan. In ***Chitin Chemistry*** (pp. 1-53). Macmillan Education UK.
113. RUTZ, J. K. (2013). Caracterização e microencapsulação de suco de pitanga roxa (*Eugenia uniflora* L.). ***Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos*** Universidade Federal de Pelotas.
114. SÁEZ, V., HERNÁEZ, E., LÓPEZ, L. (2003). Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas. ***Revista Iberoamericana de Polímeros***, 4(2), 111-122.
115. SALAMEH, D., BRANDAM, C., MEDAWAR, W., LTEIF, R., & STREHAIANO, P. (2008). Highlight on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations. ***Food chemistry***, 107(4), 1661-1667.
116. SANTOS, J. E. D., SOARES, J. D. P., DOCKAL, E. R., FILHO CAMPANA, S. P., CAVALHEIRO, É. T. (2003). Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. ***Polímeros: ciência e tecnologia***, 13(4).
117. SANTOS, J. E. D., SOARES, J. D. P., DOCKAL, E. R., FILHO CAMPANA, S. P., CAVALHEIRO, É. T. (2003). Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. ***Polímeros: ciência e tecnologia***, 13(4).
118. SANTOS-MAGALHÃES, N.S., PONTES, A., PEREIRA, V.M.W., CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. ***International Journal of Pharmaceutics***, v.208, p.71-80, 2000.
119. SATO, T., ISHII, T., OKAHATA, Y. (2001). In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. ***Biomaterials***, 22(15), 2075-2080.
120. SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. L. D. L., POHLMANN, A. R. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. ***Química nova***. São Paulo. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737.
121. SHARMA, A., MONDAL, K., GUPTA, M. N. (2003). Some studies on characterization of three phase partitioned chitosan. ***Carbohydrate polymers***, 52(4), 433-438.

122. SIGNINI, R., CAMPANA FILHO, S. P. (2001). Characteristics and properties of purified chitosan in the neutral, acetate and hydrochloride forms. *Polímeros*, 11(2), 58-64.
123. SILVA, H. S. R. C., DOS SANTOS, K. S. C. R., FERREIRA, E. I. (2006). Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, 29(4), 776.
124. SILVA, M. D. S., COCENZA, D. S., MELO, N. F. S. D., GRILLO, R., ROSA, A. H., & FRACETO, L. F. (2010). Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. *Química Nova*, 1868-1873.
125. SINGLETARY, K. W., STANSBURY, M. J., GIUSTI, M., VAN BREEMEN, R. B., WALLIG, M., RIMANDO, A. (2003). Inhibition of rat mammary tumorigenesis by concord grape juice constituents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25), 7280-7286.
126. SINHA, V. R., SINGLA, A. K., WADHAWAN, S., KAUSHIK, R., KUMRIA, R., BANSAL, K., DHAWAN, S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International journal of pharmaceutics*, 274(1), 1-33.
127. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: *Editora Bookman*, 836 p., 2002.
128. SOARES, P. I., SOUSA, A. I., SILVA, J. C., FERREIRA, I. M., NOVO, C. M., BORGES, J. P. (2016). Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems for doxorubicin: Optimization and modelling. *Carbohydrate polymers*, 147, 304-312.
129. SOUZA, K. V. D., ZAMORA, P. G., ZAWADZKI, S. F. (2010). Esferas de quitosana/Fe na degradação do corante azul QR-19 por processos foto-Fenton utilizando luz artificial ou solar. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 20(3).
130. SOUZA, P. M. S., LOBO, F. A., ROSA, A. H., FRACETO, L. F. (2012). Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo o herbicida atrazina. *Química Nova*, 132-137.
131. SPAGNOL, C. M., ZAERA, A. M., ISAAC, V. L. B., CORRÊA, M. A., SALGADO, H. R. N. (2018). Release and permeation profiles of spray-dried

chitosan microparticles containing caffeic acid. *Saudi Pharmaceutical Journal*.

132. UNER, M. (2006). Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61(5), 375-386.
133. USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA, 29th ed. Rockville: *United State Pharmacopeial Convention*, 2006, p. 2671-2, 3046-7, 3092.
134. VENKATESAN, P., PUVVADA, N., DASH, R., KUMAR, B. P., SARKAR, D., AZAB, B., MANDAL, M. (2011). The potential of celecoxib-loaded hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the treatment of colon cancer. *Biomaterials*, 32(15), 3794-3806.
135. VITALI, L., LARANJEIRA, M. C., GONÇALVES, N. S., FÁVERE, V. T. (2008). Spray-dried chitosan microspheres containing 8-hydroxyquinoline-5 sulphonic acid as a new adsorbent for Cd (II) and Zn (II) ions. *International journal of biological macromolecules*, 42(2), 152-157.
136. VRANDEČIĆ, N. S., ERCEG, M., JAKIĆ, M., KLARIĆ, I. (2010). Kinetic analysis of thermal degradation of poly (ethylene glycol) and poly (ethylene oxide) s of different molecular weight. *Thermochimica acta*, 498(1), 71-80.
137. WILSON, B., SAMANTA, M. K., SANTHI, K., KUMAR, K. S., RAMASAMY, M., SURESH, B. (2010). Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 144-152.
138. YIEN, L., ZIN, N. M., SARWAR, A., KATAS, H. (2012). Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials*, 2012.
139. YUAN, Q., SHAH, J., HEIN, S. R. D. K., MISRA, R. D. K. (2010). Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier. *Acta biomaterialia*, 6(3), 1140-1148.
140. ZHAO, Z., MOGHADASIAN, M. H. (2010). Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 133-145.

141. ZHENG, L. Y., ZHU, J. F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate polymers*, 54(4), 527-530.