



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

BÁRBARA LAÍS CARNEIRO SILVA

BIOCONJUGADOS A BASE DE QUITOSANA-DACARBAZINA: do design a sua
avaliação citotóxica em linhagens tumorais

Recife
2018

BÁRBARA LAÍS CARNEIRO SILVA

BIOCONJUGADOS A BASE DE QUITOSANA-DACARBAZINA: do design a sua
avaliação citotóxica em linhagens tumorais

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

Área de Concentração: Novas tecnologias aplicadas em Ciências Morfológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Valéria da Silva Amorim

Coorientador: Prof. Dr. Severino Alves Júnior

Recife
2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Bárbara Laís Carneiro

Bioconjugados a base de quitosana-dacarbazina: do design a sua avaliação citotóxica em linhagens tumorais / Bárbara Laís Carneiro Silva - 2018.

47 folhas: il., fig., tab.

Orientador: 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. Quitosana 2. Dacarbazina 3. Câncer

I. Amorim, Rosa Valéria da Silva (orient.) II. Alves Júnior, Severino (coorient.) III. Título

615.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-457

BÁRBARA LAÍS CARNEIRO SILVA

BIOCONJUGADOS A BASE DE QUITOSANA-DACARBAZINA: do design a sua
avaliação citotóxica em linhagens tumorais

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

Aprovado em: 31/08/2018

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dr.^a Luciana Maria Silva de Seixas Maia (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

A minha filha Helena Carneiro, aos meus pais Vera Barão e Reynaldo Carneiro e ao meu marido Plutarco Reis,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar condições físicas, emocionais, espirituais e estruturais para a realização deste trabalho.

A meus pais, Vera Barão e Reynaldo Carneiro, por todo amor, educação, ensinamentos, incentivos e por toda estrutura tanto financeira como emocional, não apenas durante todo curso, mas também em todos os dias de minha vida.

Aos meus familiares e amigos, pela amizade, estímulo e apoio.

Ao meu marido Plutarco Reis, pelo incentivo diário, apoio e cumplicidade que nos une.

Aos colegas de curso, pela agradável convivência e troca de experiências ao longo do curso.

Aos mestres, pelo incentivo e aprendizado.

Aos queridos professores da banca, pela colaboração e participação.

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela oportunidade.

Ao Dr. Emanuel Borges, pela amizade, incentivo e ajuda com as traduções durante as pesquisas.

Ao professor Leandro Aguiar, pela colaboração, paciência, e toda ajuda com a montagem dos gráficos.

A Rafael Padilha, Robson Coelho e Leandro Azevedo, pelo apoio e auxílio na realização de alguns procedimentos.

A Yago Rodrigues e Yuri Albuquerque, pela colaboração, dedicação e supervisão durante os testes de viabilidade celular e síntese do bioconjugado, sem vocês nada disso seria possível.

A Cecília Santos, pela amizade, auxílio e apoio com as análises térmicas.

Aos professores Drs. Ricardo Yara e Cláudia Sampaio, do laboratório de Biofísica Química da UFPE, pelo apoio e por ceder o laboratório para a realização das análises de FTIR e UV-vis.

A professora e Coordenadora, Dra. Sônia Leite, por todo apoio e assistência. A senhora foi de imensurável importância, sua dedicação foi fundamental para a conclusão desse trabalho.

A professora Dra. Jaciana Aguiar, pela amizade, paciência, colaboração com os testes citotóxicos e por todo apoio estrutural e emocional para a realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Ricardo Oliveira, por toda dedicação, assistência e disponibilidade, na realização do RMN e interpretação dos resultados.

Ao professor Dr. Severino Alves Junior, do Departamento de Química Fundamental da UFPE, por toda paciência, conselhos, compreensão, apoio e ensinamentos. Obrigada por ter me acolhido e me incentivado a concluir o curso e o trabalho.

E finalmente a professora e orientadora Dra. Rosa Valéria Amorim, pela oportunidade, orientação e compreensão, obrigada por ter acreditado em mim.

RESUMO

O câncer é uma das doenças que mais causa morte em todo mundo, seu tratamento é altamente agressivo e em muitos casos ineficaz. A Dacarbazina é um antitumoral da família dos alcaloides, é utilizada para o tratamento de melanoma e tumores sólidos, porém como toda droga antitumoral, causa inúmeros efeitos colaterais, e acometem tanto as células tumorais como as células saudáveis. No intuito de minimizar tais efeitos e potencializar sua ação frente às células tumorais, o presente estudo utilizou a quitosana, um biopolímero natural e promissor, muito aplicado na área biomédica, para sintetizar bioconjugados a base de quitosana e Dacarbazina para a aplicação farmacológica em linhagens de células tumorais. Os biogonjugados sintetizados foram caracterizados físico-quimicamente e testados em linhagens normais e tumorais para a avaliação da viabilidade celular. Todas as caracterizações físico-químicas realizadas exibiram resultados que comprovam interação entre o polímero e a droga. A microscopia de varredura demonstrou que os bioconjugados apresentaram superfícies levemente irregulares, sendo evidenciados os cristais da droga na superfície da quitosana. O Espectro Infravermelho com Transmissão de Fourier, a espectroscopia de absorção na região ultravioleta visível e a ressonância magnética nuclear comprovaram que houve troca química entre a quitosana e a Dacarbazina e que as cadeias polissacarídicas de quitosana estão ligadas através de ligações de hidrogênio a Dacarbazina. A análise termogravimétrica foi utilizada para a determinação da estabilidade térmica e/ou a taxa de composição dos materiais em estudo em função da temperatura, assim percebeu-se que a estabilidade térmica do bioconjugado, sofreu modificações significativas diante da conjugação entre a quitosana e a Dacarbazina. As análises citotóxicas indicaram que a Dacarbazina isolada utilizada nos experimentos apresentou atividade citotóxica considerável frente às linhagens celulares. O bioconjugado também demonstrou características tóxicas frente às linhagens tumorais de carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano, câncer de mama humano e carcinoma de cólon humano, porém notou-se que a atividade citotóxica do bioconjugado foi maior em comparação a citotoxicidade da Dacarbazina isolada. Assim pode-se concluir que houve interação molecular entre a quitosana e a Dacarbazina e que os bioconjugados foram sintetizados com êxito, possibilitando estudos mais aprofundados, uma vez que esses possam vir a ser alternativas promissoras para o tratamento do câncer.

Palavras-chaves: Quitosana. Dacarbazina. Bioconjugados. Câncer. Antitumorais.

ABSTRACT

Cancer is one of the most deadly diseases in the world, its treatment is highly aggressive and in many cases ineffective. Dacarbazine is an antitumor of the alkaloid family, it is used for the treatment of melanoma and solid tumors, but like all antitumor drug, causes numerous side effects, and affects both tumor cells and healthy cells. In order to minimize such effects and potentiate their action against tumor cells, the present study used chitosan, a natural and promising biopolymer, widely applied in the biomedical area, to synthesize chitosan-based bioconjugates and Dacarbazine for pharmacological application in strains of tumor cells. The synthesized bioglobes were physicochemically characterized and tested in normal and tumor cell lines for the evaluation of cell viability. All physicochemical characterizations performed showed results that demonstrate the interaction between the polymer and the drug. Scanning microscopy demonstrated that the conjugates had slightly irregular surfaces, and the crystals of the drug on the surface of the chitosan were evident. The Infrared Spectrum with Fourier Transmission, ultraviolet-visible absorption spectroscopy, and nuclear magnetic resonance proved that there was a chemical exchange between chitosan and Dacarbazine and that polysaccharide chains of chitosan are linked through hydrogen bonds to Dacarbazine. The thermogravimetric analysis was used to determine the thermal stability and/or composition rate of the materials under study as a function of temperature, so it was noticed that the thermal stability of the conjugate underwent significant modifications due to the conjugation between chitosan and Dacarbazine. Cytotoxic analyzes indicated that the isolated Dacarbazine used in the experiments presented considerable cytotoxic activity against the tumor lines. The conjugate also demonstrated toxicity to the human lung cancer mucoepidermoid carcinoma, human breast cancer, and human colon carcinoma tumor lines, but it was noted that the cytotoxic activity of the conjugate was higher in comparison to the isolated Dacarbazine cytotoxicity. Cytotoxic analyzes indicated that the isolated Dacarbazine used in the experiments showed considerable cytotoxic activity against the cell lines. Bioconjugate also demonstrated toxicity to the human lung, mucoepidermoid carcinoma, human breast cancer, and human colon carcinoma tumor cell lines, but it was noted that cytotoxic activity of the bioconjugate was higher in comparison to the isolated Dacarbazine cytotoxicity. Thus, it can be concluded that there was a molecular interaction between chitosan and Dacarbazine and that the bioconjugates were synthesized with success, allowing for more in-depth studies, since these could be promising alternatives for the treatment of cancer.

Keywords: Chitosan. Dacarbazine. Bioconjugates. Cancer. Antitumoral.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura molecular da Dacarbazina.....	18
Figura 2 –	Estrutura molecular da Quitosana.....	21
Figura 3 –	Eletromicrografia de varredura do polímero de QS (A-B), das partículas da droga DTIC (C-D) e do bioconjugado QS/DTIC 1:2 (E-F).....	29
Figura 4 –	Espectro de absorção na região do infravermelho da QS, DTIC e bioconjugado respectivamente.....	31
Figura 5 –	Espectro de absorção ultravioleta da QS, DTIC e bioconjugados em ácido acético.....	32
Figura 6 –	Análise termogravimétrica da QS, DTIC e bioconjugado respectivamente, em atmosfera de nitrogênio no intervalo de 10°/min.....	34
Figura 7 –	Espectro de RMN de H-1 do bioconjugado QS/DTIC, evidenciando os simpletos da DTIC na região 7.54 ppm e 8.32 ppm e da QS na região entre 4.0 ppm e 2.5 ppm.....	35
Figura 8 –	Espectro de RMN de H-1 do bioconjugado QS/DTIC, evidenciando os simpletos em δ 8.1 e 8.4 ppm com razão entre as áreas de integração de 2:1.....	36
Figura 9 –	Ensaio de viabilidade celular da Quitosana, Dacarbazina e bioconjugado nas linhagens celulares tumorais: MCF7, NCI-H292, HCT116 e em linhagem sadia: RAW264.7.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Atribuições vibracionais das bandas de absorção do espectro infravermelho da QS, DTIC e bioconjugado	30
Tabela 2 –	Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais MCF7, NCI-H292, HCT116 e em linhagem sadia: RAW264.7, testadas na dose única de 50 µg/ml.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSTr	Laboratório de Terras Raras
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dHE	Departamento de Histologia e Embriologia
dQF	Departamento de Química Fundamental
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTIC	Dacarbazina
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectro Infravermelho com Transmissão de Fourier
HCT116	Células de carcinoma de colón humano
IC50	Concentração Inibitória
INCA	Instituto Nacional Do Câncer
MCF-7	Células de câncer de Mama Humano
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCI-H292	Carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano
QS	Quitosana
RAW264.7	Células de macrófagos murino
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TGA	Análise Termogravimétrica
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV-vis	Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	Objetivo Geral.....	16
1.1.2	Objetivos Específicos.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	CÂNCER E SEU TRATAMENTO.....	17
2.2	DACARBAZINA.....	18
2.3	BIOPOLIMEROS.....	19
2.4	QUITOSANA.....	20
2.5	EFEITO ADJUVANTE DA QUITOSANA.....	22
2.6	BIOCONJUGADOS.....	22
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	MATERIAIS.....	24
3.2	PURIFICAÇÃO E DESPOLIMERIZAÇÃO DA QUITOSANA..	24
3.3	PREPARAÇÃO DO BIOCONJUGADO.....	25
3.4	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA	25
3.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	25
3.4.2	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho.....	25
3.4.3	Espectroscopia de Absorção na Região do UV-visível.....	26
3.4.4	Análise Termogravimétrica e Análise Térmica Diferencial.....	26
3.4.5	Espectroscopia de Ressonância Magnética.....	26
3.5	AVALIAÇÃO CITOTÓXICA.....	27
3.5.1	Viabilidade Celular.....	27
4	RESULTADOS.....	28
4.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	28
4.2	ANÁLISE DO ESPECTRO INFRAVERMELHO COM TRANSMISSÃO DE FOURIER (FTIR).....	30
4.3	ANÁLISE DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL).....	32
4.4	ANÁLISE DE PERDA DE MASSA E ANÁLISE TÉRMICA.....	33
4.5	ANÁLISE DO RMN).....	35

4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA).....	36
4.6.1	Análise da Viabilidade Celular).....	36
5	DISCUSSÃO.....	39
6	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

Estudos frequentes relatam que o câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, sendo seu tratamento de grande importância social e médica. A quimioterapia é uma das formas mais utilizadas no tratamento desta doença, entretanto, elevadas doses causam severa toxicidade às células normais, sendo necessário em alguns casos a suspensão do tratamento (PEREZ-HERRERO & ERNANDEZ-MEDARDE, 2015).

Por ser uma doença altamente heterogênea em que cada massa tumoral consiste em células cancerosas com diferentes origens genéticas, o câncer apresenta diferentes neoplasias malignas e capacidade diferenciadas de resposta as drogas. Portanto, a quimioterapia convencional com um único fármaco, embora seja efetiva imediatamente, muitas vezes se torna ineficaz em períodos prolongados de tratamentos (LIU, Y. et al., 2017).

É pertinente afirmar que uma das maiores causas da mortalidade por câncer se deve à qualidade do tratamento oferecido aos pacientes, isso está diretamente correlacionada com a biologia da doença. Hipertensão, doenças cardiovasculares e diabetes, por exemplo, têm efeitos importantes que podem acometer o tratamento do câncer. (KIMMICK et al., 2017)

Os sistemas convencionais de terapia proporcionam uma baixa eficácia na terapêutica de alguns medicamentos, devido a apresentarem dificuldades de absorção ou problemas de transporte relativo à via de administração, relacionado a parâmetros como estabilidade da droga, baixo controle dos níveis terapêuticos e necessidade de menor intervalo de administração, dentre estes medicamentos estão, os antibióticos e antitumorais, os quais muitas vezes acarretam risco à saúde dos pacientes (EROGÇLU et al., 2002).

A quitosana é um polímero natural, catiônico obtido da desacetilação da quitina, que por sua vez provem da carapaça de crustáceos e insetos, tem sido muito utilizada na produção de sistemas bioconjugados e nanopartículas devido suas propriedades físico-químicas. Além de ser biodegradável e biocompatível, esta biomolécula é mucoadesiva, o que facilita sua passagem e consequentemente do princípio ativo por ela carregado através das barreiras epiteliais podendo ser administrada por via oral, nasal e ocular (MEDEIROS 2011).

Polímeros sintéticos apresentam alguns problemas de biocompatibilidade e biodegradabilidade, o que coloca em dúvida sua aplicação em humanos. Esses tipos de problemas é pouco encontrado no uso de polímeros naturais, como por exemplo, a quitosana. Isso faz desse polímero natural uma excelente alternativa em diferentes sistemas de terapêutica. Além de sua biocompatibilidade a quitosana também apresenta atividades

farmacológicas favorecendo mais ainda seu uso em detrimentos dos materiais sintéticos (CASSETARI, et. al., 2012).

Nesse contexto, para diminuir os efeitos adversos sobre as células normais e potencializar as terapias contra o câncer moléculas isoladas de diferentes fontes naturais têm sido introduzidas nos diversos tipos de tratamentos (ORSOLIC et al., 2012).

Dessa forma faz-se necessário buscar novos meios, que atuem especificamente sobre as células cancerígenas, sem prejudicar ou até mesmo causando menos danos as células normais, ou seja, quem tenha baixa toxicidade, e que ainda previnam metástase, que ultrapasse os tecidos e permaneça mais tempo no organismo, reduzindo o número de dosagens, sendo estas características presentes em sistemas envolvendo os biconjugados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Sintetizar bioconjugados de QS/DTIC farmaceuticamente importante para o tratamento do câncer, melhorando a ação citotóxica da DTIC frente a linhagens tumorais e avaliando o efeito adjuvante da quitosana, abrindo assim uma nova perspectiva para a pesquisa de novas formas terapêuticas

1.1.2 Objetivos Específicos

Purificar e despolimerizar a QS usada para conjugação a DTIC;

Sintetizar bioconjugados de QS/DTIC;

Caracterizar físico-quimicamente e morfolologicamente os bioconjugados;

Avaliar a ação citotóxica da DTIC frente a linhagens tumorais;

Avaliar os efeitos adjuvantes da QS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER E SEU TRATAMENTO

A definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Existem quase 200 tipos de câncer que acometem os vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (ALMEIDA et al., 2005).

Dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) 2016, demonstram que os tipos de câncer mais incidentes no mundo são, pulmão com 1,8 milhões de casos, mama (1,7 milhões), intestino (1,4 milhões) e próstata (1,1 milhões). Nos homens, os tipos mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Já nas mulheres, as maiores incidências encontradas foram, mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%).

O câncer é ocasionado pela proliferação descontrolada de células e a consequência do acúmulo dessas é a formação de tumores, podendo levar a metástase e passar para tecidos adjacentes. Pode ser denominado de carcinoma quando tem início em tecidos epiteliais ou sarcoma quando tem início em tecidos conjuntivos (MEDEIROS, 2011).

Atualmente, existem inúmeras técnicas que são utilizadas para o tratamento do câncer. Porém cada técnica possui suas próprias limitações e efeitos adversos. O tratamento cirúrgico (excisão do tumor) geralmente é a primeira escolha de tratamento utilizada pelos médicos. No entanto, a excisão cirúrgica não é eficaz quando as células cancerosas se infiltraram nos órgãos vitais ou se espalharam pelo corpo (metástase) (SUBRAMANI et al., 2018).

Além do método cirúrgico, os tratamentos mais conhecidos utilizados no combate do câncer são: a radioterapia, quimioterapia e a hormônioterapia. A quimioterapia pode ser indicada antes ou após uma cirurgia ou até mesmo isoladamente, sem que haja indicação cirúrgica. Em certos caso é utilizada em conjunto a outros procedimentos, como a radioterapia, por exemplo. Porém a indicação do tratamento depende de vários fatores, como tipo do tumor, localização e estágio da doença (RAGAZ et al., 1997).

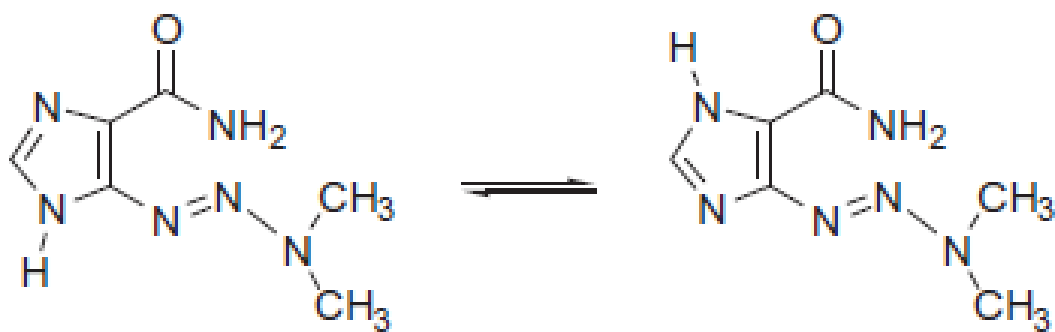
A maioria dos agentes quimioterápicos utilizados possui atividade antitumoral por meio de efeito citotóxico ou citostático. Apesar de serem agentes potentes contra as células tumorais, a baixa solubilidade, taxa de depuração rápida e graves efeitos adversos, são

problemas comuns encontrados na administração desses medicamentos. As formulações comercializadas destes fármacos anticancerígenos geralmente contêm alta concentração de surfactantes não iônicos como solubilizantes, tais como Tween 80 e cremophor EL, os quais podem causar efeitos colaterais graves como, hipersensibilidade, nefrotoxicidade, retenção de líquidos, neurotoxicidade e toxicidade musculoesquelética nos pacientes. Além disso, os fármacos quimioterapêuticos não diferenciam o tecido tumoral dos tecidos normais, tendo uma distribuição generalizada em todo o corpo, levando a efeitos adversos tanto aos tecidos normais como aos comprometidos. (LIU et al., 2013).

2.2 DACARBAZINA

A Dacarbazina (DTIC) é uma droga considerada um agente de alquilação, e além do melanoma tem sido aplicado na cura de outros diferentes tipos de câncer, tais como a doença de Hodgkin, tumores de tecidos moles, tumores de células nervosas e linfomas (QUITA, 2016).

Figura 1– Estrutura molecular da Dacarbazina. Fonte: AL-BADR & ALODHAIB 2016



Desde 1971 a DTIC é a droga utilizada como tratamento padrão de pacientes com metástases inoperáveis de melanoma sistêmico e maligno. Produz respostas satisfatórias em aproximadamente 15% dos pacientes, e em apenas 4% dos pacientes submetidos ao tratamento à doença desaparece (NIEWEG & GALLEGOS-HEZNÁNDEZ, 2015).

A DTIC é considerada o agente mais ativo em regimes de monoterapia para tratamento do melanoma com metástases, entretanto outros agentes também são utilizados em associação com esta droga, os principais são as temozolomidas, as nitrosoureas (Carmustina, Lomustina

e Fotemustina) e os análogos da platina (2ª linha, cisplatina e a carboplatina), taxanos, paclitaxel (GOMES, 2012).

Apesar de a DTIC ser utilizada em associação a outros medicamentos, estudos demonstraram que essas terapias de combinação não conseguem ter resultados melhores que a utilização da DTIC isolada (PATEL, et al., 2013).

Sua administração pode ser feita através de um esquema inicial com dosagens durante 5 dias, podendo ser substituído por outros regimes com o mesmo desempenho, utilizando dosagens equivalentes a 1000 mg/m² a cada 21 dias, obtendo assim melhores respostas na pele, linfonodos e metástases pulmonares (MARQUERTE et al., 2015).

Como muitos medicamentos quimioterápicos, a DTIC também tem uma variedade de efeitos colaterais, tais como vômitos, dor de cabeça, fadiga, alopecia e imunossupressão. Além destes efeitos, por vezes a DTIC também provoca grave hepatotoxicidade acompanhada de necrose hepatocelular e trombose da veia hepática (HORIGUCHI et al., 2010). Considerada uma droga citostática, a DTIC possui potencial genotóxico e tem mostrado mutagênicidade em células procariotas e eucariotas in vitro, bem como clastogênicidade à medula óssea de rato in vivo (KUKUMANU et al., 2011).

No intuito de diminuir os diversos efeitos colaterais de certos fármacos, pesquisas têm sido realizadas objetivando explorar as potencialidades terapêuticas das suspensões coloidais para a administração de fármacos (RAFFIN et al., 2003).

2.3 BIOPOLIMEROS

Os biopolímeros são cadeias de polímeros sintetizados por organismos vivos e, portanto, são exemplos perfeitos para aplicação da biotecnologia devido a vários aspectos: 1) por serem biodegradáveis, reduzem a acumulação de resíduos industriais; 2) tendem a gerar menos poluentes durante a produção; 3) podem usar resíduos ou subprodutos como material de partida; 4) podem ser menos tóxicos, o que aumenta as possibilidades de aplicação em medicamentos e alimentos, por exemplo; e 5) eles tendem a biodegradar a formação de produtos inócuos (ou menos tóxicos) para o meio ambiente. Alguns exemplos de biopolímeros naturais são polissacarídeos, incluindo amido, quitina/quitosana, celulose, alginato e outros polímeros de carboidratos. Entre os polímeros formados a partir de proteínas animais estão a gelatina, lã, seda, colágeno e glúten (FASCIOTTI, 2017).

O desenvolvimento de sistemas inovadores de administração de fármacos tem sido sempre alvo de muitos pesquisadores e empresas farmacêuticas. Além do seu papel clássico como

sistemas de liberação, muitos demonstraram benefícios promissores para aumentar o efeito de agentes anticancerígenos, aumentarem a biodisponibilidade oral, melhorar a adesão do paciente, bem como superar a resistência a fármacos tumorais (KHDAIR et al., 2016).

Na área médica, polímeros biodegradáveis são alternativas promissoras e sustentáveis, uma vez que, por definição, são degradados através de ações enzimáticas que tendem a diminuir continuamente suas massas moleculares. O termo "biodegradável" é utilizado quando ocorre hidrólise ou degradação enzimática, ou quando os processos de clivagem da cadeia polimérica que ocorrem durante a degradação não são totalmente conhecidos.

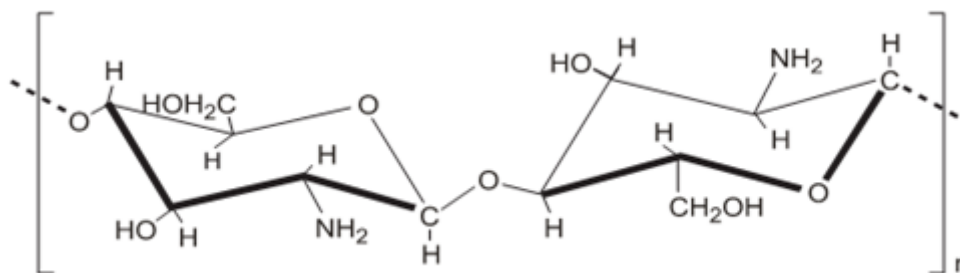
Os polímeros naturais, como os polissacarídeos, possuem estruturas diversas com diferentes funções fisiológicas e são utilizados para diversos fins em aplicações biomédicas, devido às suas propriedades distintivas, incluindo seu comportamento pseudoplástico, capacidade de gelificação, capacidade de ligação à água e biodegradabilidade. Dessa forma alguns polissacarídeos são usados para transportar produtos farmacêuticos efetivamente, formando em alguns casos redes poliméricas altamente hidrofílicas nas quais os fármacos podem ser incorporados fisicamente (KIM, et al., 2016). Eles podem formar uma matriz ou membrana que podem controlar a liberação de um medicamento durante um período prolongado de tempo. Entre os potenciais polímeros catiônicos naturais utilizados na indústria farmacêutica, a quitosana atraiu um grande interesse devido às suas propriedades químicas únicas (CHANPHAI, et al., 2017).

2.4 QUITOSANA

Pesquisadores descrevem a quitosana (QS) como sendo um polissacarídeo natural oriundo da forma N-desacetilada de quitina, encontrada principalmente no exoesqueleto de crustáceos, insetos e fungos. Foi reconhecido como um polímero favorável para a liberação de fármaco, por possuir uma alta densidade de carga positiva, atribuída à presença do grupo glucosamina em sua estrutura (JAIN et al., 2016).

Quitina e quitosana são copolímeros constituídos por unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina em proporções variáveis, sendo o primeiro tipo dessas unidades predominam no caso da quitina, enquanto quitosana é composta predominantemente, por unidades D-glicosamina. A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose (COSTA SILVA, et. al. 2006).

Figura 2 – Estrutura molecular da Quitosana. Fonte: AZEVEDO et al., 2007



A quitosana possui grupos amina e hidroxila reativos capazes de serem submetidos a modificações químicas. É solúvel em meios aquosos ácidos, de $\text{pH} < 6,2$, sendo os ácidos acético, fórmico e cítricos os mais usados na solubilização do biopolímero. Quando dissolvida possui carga positiva sobre os grupos $-\text{NH}_3^+$, o que facilita sua solvatação em água. Além disso, adere a superfícies carregadas negativamente, agregando-se com compostos polianiônicos e complexo íons metálicos. Desta forma, tanto a solubilidade em soluções ácidas, quanto à agregação com poliânions atribuem propriedades excelentes à quitosana (GONSALVES et al., 2011).

Possuem propriedades bem definidas, incluindo biocompatibilidade, baixo custo, elevada tolerância pelo organismo, ampla resposta imune e capacidade de estimular respostas Th1. Além disso, demonstra mucoadesividade, prolongando o tempo do antígeno nos locais da mucosa. A versatilidade da quitosana permite uma diversidade de formulações, tais como, micro/nanopartículas, hidrogéis e micro agulhas para satisfazer as diversas necessidades dos novos métodos de vacinação. Pesquisas recentes têm várias formulações à base de quitosana que são altamente adequadas como adjuvantes com excelentes perfis de segurança (XIA et al., 2015).

Devido a suas inúmeras propriedades, a QS vem sendo utilizada como materiais de liberação sustentada, veículos de drogas, adesivos biológicos e fibras biodegradáveis. Sua bioadesividade na superfície do tumor pode ser adquirida através de forte interação eletrostática entre carga positiva de QS e carga negativa da membrana celular. Também, a liberação de fármaco sensível ao pH em tecidos tumorais ou microambiente celular é conseguida pelo polímero da QS (AGRAWAL et al., 2017).

2.5 EFEITO ADJUVANTE DA QUITOSANA

Os adjuvantes são considerados substâncias que podem potencializar a ação de fármacos melhorando a terapia de várias doenças. Três classes de adjuvantes têm tido destaque nas utilizações clínicas, são eles: os inibidores antissépticos, os agentes naturais derivados de planta ou polímeros, e bacteriófagos (BROOKS & BROOKS, 2014).

Estudos demonstram que os esforços destinados a melhorar a qualidade do tratamento dos pacientes concentraram-se em métodos alternativos para melhorar a eficácia de fármacos quimioterápicos e minimizar a toxicidade sistêmica. Entre estas abordagens inovadoras, a conjugação de agentes citotóxicos com polímeros ou produtos de fontes naturais começou a ganhar impulso entre a comunidade científica (CHAUBEY & MISHRA, 2014).

Dessa forma, a quitosana que possui propriedades biológicas e peculiares, explicadas muitas vezes, pelo grupamento amínico livre e suscetível de protonação das unidades desacetiladas do polímero, abrange uma variedade considerável de aplicações, que vão desde simples veículo até a exploração farmacológica de suas atividades antimicrobiana, coagulante, hipocolesterolêmica, regeneradora em osteoartrite, dentre outras (SILVA et al., 2006).

2.6 BIOCONJUGADOS

Historicamente, o emprego da maioria dos fármacos tem sido limitado por vários fatores farmacocinéticos. Entre eles a impossibilidade de aumentar a sua concentração no sangue, a quantidade de tempo que o agente terapêutico permanece na circulação, a baixa solubilidade e, especialmente, os efeitos colaterais indesejáveis inerentes ao tratamento de altas doses. Esses fatores dificultam a obtenção da concentração necessária do fármaco para o sucesso farmacológico e terapêutico (TORCHILIN, 2005)

Pesquisas extensas demonstraram que os materiais poliméricos representam veículos promissores para agentes anticancerígenos devido à boa solubilidade em água e estrutura quimicamente flexível. Assim, como um dos sistemas de distribuição poliméricos, os bioconjugados de polímero-fármaco, especialmente aqueles com propriedade de automontagem, chamaram a atenção para o efeito de permeabilidade e retenção em tecidos tumorais e comportamentos de liberação controlada de drogas. Assim vários polímeros são utilizados para preparar bioconjugados de polímero-fármaco para melhorar a eficiência da quimioterapia contra o câncer (HE & YIN, 2017).

Nos últimos anos, os bioconjugados de polímero-fármaco, em que os fármacos anticancerígenos são bioconjugados com vários polímeros hidrofílicos e biocompatíveis através de ligantes biodegradáveis, estão emergindo como plataforma inovadora e potencial para a administração de fármacos anticancerígenos. Estudos recentes demonstram que vários bioconjugados de polímero-fármaco são excelentes e promissoras apostas para o tratamento do câncer, incluindo ácido poli (ácido 1-glutâmico) -paclitaxel (PGA-PTX), -poli [(N-carboxibutil) -l aspartamida] - camptotecina (PGA-CPT), HPMA-DOX, PEG-docetaxel (PEG-DTX) e ciclodextrina-CPT que já avançaram para ensaios clínicos (LIU, et al., 2013).

Os polímeros e os sistemas de administração de fármacos baseados em polímeros sofreram uma enorme expansão na última década, com o desenvolvimento clínico e pré-clínico de nanomedicinas e outras aplicações biomédicas. A característica principal de um bioconjugado de polímero-fármaco é que em vez de conter um fármaco que é encapsulado não covalentemente dentro de uma estrutura polimérica, o fármaco é fisicamente bioconjugado com o transportador polimérico. Assim, os problemas associados à liberação de fármaco como "explosão" e/ou descontrolada podem ser amplamente superados, pois o fármaco pode ser ligado ao polímero através de ligações que são especificamente projetadas para liberar drogas em certas estruturas (MARASINI, et al., 2017).

Dessa forma é evidente que os bioconjugados à base de quitosano tornaram-se uma nova categoria de biomateriais que mantém potenciais promissores para várias aplicações em áreas multidisciplinares (HU & LUO 2016)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

A Quitosana de baixo peso molecular (50 a 190 Da; 75-85% desatilada) foi adquirida da Sigma-Aldrich Co. A droga antitumoral Dacarbazina (com de pureza $\geq 99\%$), também foi adquirida da Sigma-Aldrich Co. Os demais reagentes de grau analítico, foram do acervo do Laboratório de Tecnologia Biopolímero, Departamento de Histologia e Embriologia (dHE) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e do laboratório de Terras Raras (BSTr) do Departamento de Química Fundamental (dQF) da UFPE.

3.2 PURIFICAÇÃO E DESPOLIMERIZAÇÃO DA QUITOSANA

Para eliminar qualquer impureza presente, a quitosana de baixo peso molecular foi solubilizada em ácido acético a 1% sob agitação magnética, durante 12 horas, e após total solubilização a solução foi filtrada em filtro de Milipore de 3,0 μm e colocada novamente sob agitação para a adição do hidróxido de sódio (NaOH) a 40%, que foi gotejado aos poucos, até alcançar pH 8 e assim promover a precipitação da quitosana, então a solução foi centrifugada a 15.000rpm durante 20 minutos, seguida por 3 lavagens com água destilada e 1 lavagem com etanol absoluto. O precipitado obtido permaneceu em temperatura ambiente para secagem.

Para a despolimerização, a quitosana já purificada foi solubilizada novamente em ácido acético á 1%. Após total solubilização, nitrito de sódio (NaNO_2) a 0,1M foi adicionado a solução que permaneceu sob agitação magnética durante 3 horas. Passado esse tempo a solução foi filtrada em filtro de Milipore de 0,8 μm e então foi adicionado o hidróxido de sódio (NaOH) a 40% que foi gotejado aos poucos, para precipitação da quitosana. Após esses processos a solução foi centrifugada a 15.000rpm durante 20 minutos seguida por 3 lavagens com água destilada e 1 lavagem com etanol absoluto. O precipitado obtido foi liofilizado. (JANES; ALONSO, 2003)

3.3 PREPARAÇÃO DO BIOCONJUGADO

Para a síntese dos bioconjugados, a quitosana foi solubilizada em ácido acético a 0,5% sob agitação mecânica durante 10 minutos. A Dacarbazina foi solubilizada em água Milli-Q, não havendo a necessidade de agitação mecânica. Após total solubilização das duas soluções, a solução de DTIC foi vertida na solução de QS que estava sob agitação mecânica, temperatura de aproximadamente 20°C, permanecendo assim durante 16 horas protegida do contato com a luz. Após esse tempo, a solução foi congelada a -80°C e liofilizada.

3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA

3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia, da QS, da Dacarbazina e do bioconjugado foi identificada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) realizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM). Para isso as amostras foram montadas em bases de alumínio com fita de carbono e revestidas de ouro por um equipamento de crepitação durante 240s, posteriormente foram observadas no MEV, modelo JSM-5600L V (JEOL, Japão) a uma voltagem de aceleração de 15kV.

3.4.2 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

A caracterização das interações químicas entre a quitosana e a Dacarbazina foram realizadas através do método de espectroscopia de infravermelho por transmissão de Fourier (FTIR) no Laboratório de Biofísica Química da UFPE.

Os espectros da quitosana, Dacarbazina e do bioconjugado foram registrados através do aparelho Agilent Technologies Cary 360 FTIR com comprimento de onda entre 4000 e 750 cm^{-1} . As amostras liofilizadas foram prensadas contra o cristal de diamante do aparelho para que houvesse leitura dos picos característico de cada substancia.

3.4.3 Espectroscopia de Absorção na Região do UV-visível

Os espectros de absorção na região do UV-Vis da quitosana, Dacarbazina e bioconjugado foram realizados no Laboratório de Biofísica Química da UFPE e avaliados através do espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 1800, com uma faixa de comprimento de onda de 700 a 200nm a temperatura ambiente. Para a realização das análises as amostras foram solubilizadas em ácido acético a 0,25%.

3.4.4 Análise Termogravimétrica e Análise Térmica Diferencial

A perda de massa e estabilidade térmica da QS, da DTIC e do bioconjugado foi determinada através da análise termogravimétrica (TGA) e da análise térmica diferencial (DTA), onde aproximadamente 7mg das amostras foram adicionadas em um cadinho aberto de platina, o equipamento utilizado foi o Shimadzu modelo DTG-60H usando uma rampa de aquecimento de 10 °C/min a 900 °C numa atmosfera de N₂.

As análises foram realizadas no Laboratório de Terras Raras (BSTR) do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

3.4.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética

A determinação estrutural do bioconjugado foi analisada através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

Foram utilizadas 7mg das amostras liofilizadas de quitosana, Dacarbazina e bioconjugado, que foram solubilizados em 700µl de água deuterada com pH 7. Após total solubilização de todas as amostras, as soluções foram analisadas na Central Analítica do Departamento de Química fundamental da UFPE, através do aparelho Agilent 300 – vnmrs 300.

3.5 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA

3.5.1 Viabilidade Celular

A atividade citotóxica da quitosana, Dacarbazina e bioconjugado foi realizada através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983) para verificar a citotoxicidade *in vitro* do bioconjugado, quitosana e Dacarbazina em 3 linhagens de células tumorais e 1 linhagem de célula normal.

O ensaio do MTT é uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

As linhagens tumorais utilizadas, MCF7 (carcinoma de mama - humano) e a linhagem normal Raw 264.7 (macrófagos de murino) foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI1640 e DMEM, respectivamente.

As linhagens tumorais utilizadas foram, NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano) e HCT116 (carcinoma de colón humano) foram obtidas do banco de células do laboratório de Antibióticos da UFPE e mantidas em meio de cultura DMEM e RPMI1640 respectivamente.

Os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos e as células foram mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram diluídas em PBS (Phosphate-Buffered Saline) estéril e testadas na concentração de 50 µg/ml.

As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/ml. As amostras previamente dissolvidas em PBS foram diluídas em série nos meios RPMI e DMEM para obtenção das concentrações finais e adicionadas em placa de 96 poços (100µL/ poço). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram adicionados 20 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h, após isso a absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

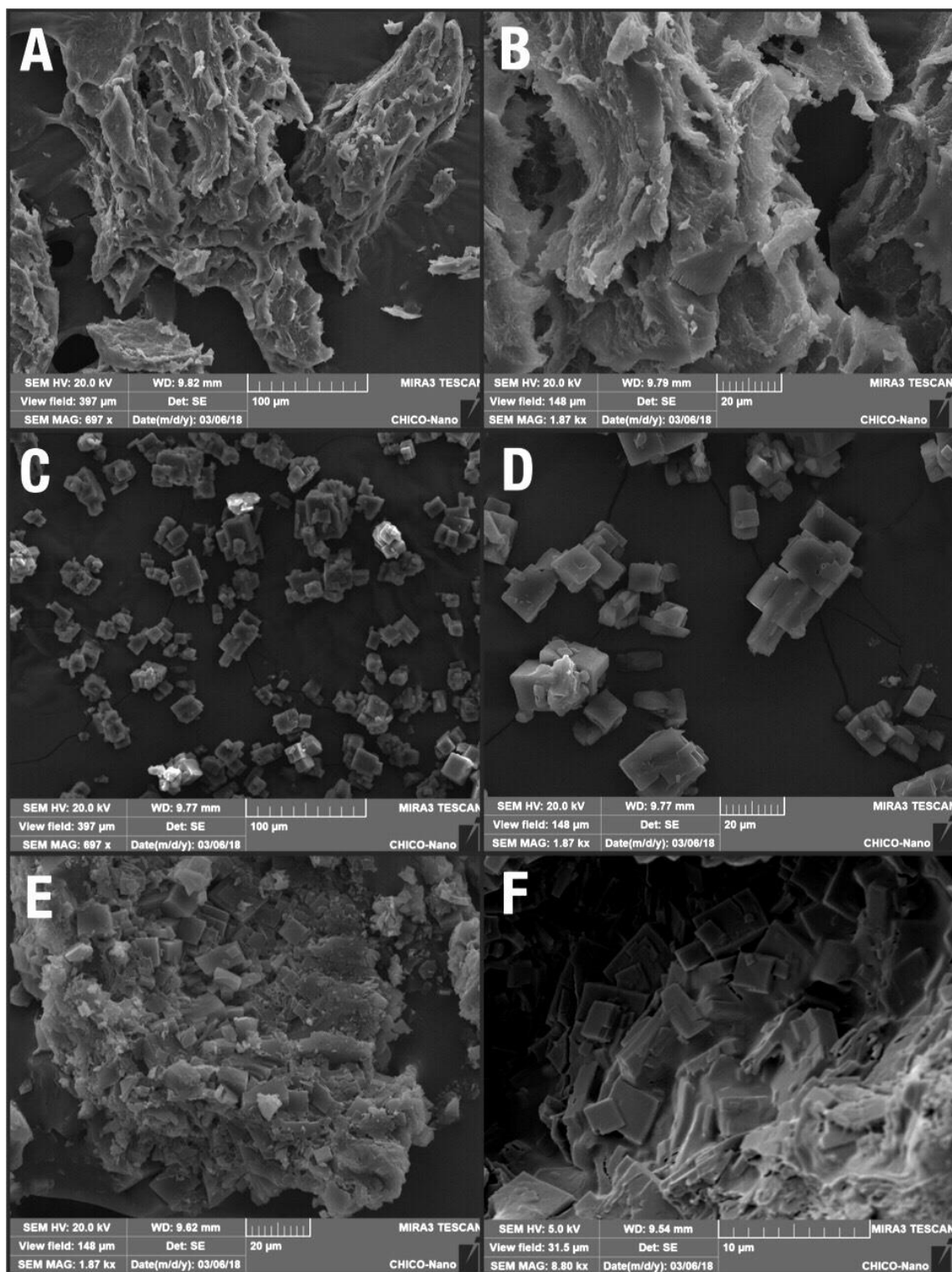
4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram analisadas a morfologia das superfícies da quitosana, da Dacarbazina e do bioconjugado sintetizado.

As imagens capturadas em diferentes aumentos (figura 3) revelam que a quitosana apresentou uma superfície irregular e porosa, características que são específicas desse biopolímero (figura 3 – A e B). A Dacarbazina apresentou estruturas bem definidas e delimitadas em forma de cristais poligonais, com tamanho variando de 8 a 18 μm (figura 3 – C e D). Já a eletromicrografia do bioconjugado evidenciou claramente esses cristais da Dacarbazina aderidos à superfície no polímero de quitosana (figura 3 – E e F).

Figura 3 - Eletromicrografia de varredura do polímero de QS (A-B), da droga DTIC (C-D) e do bioconjugado QS/DTIC (E-F)



4.2 ANÁLISE DO ESPECTRO INFRAVERMELHO COM TRANSMISSÃO DE FOURIER (FTIR)

A fim de investigar as possíveis interações químicas entre a QS e a DTIC foram realizada análise de FTIR do bioconjugado sintetizado e de seus componentes individuais (quitosana e Dacarbazina). Quando comparado os espectros do bioconjugado com os espectros da QS e da DTIC observa-se semelhança entre picos importantes, representados na tabela 1.

Tabela 1 – Atribuições vibracionais das bandas de absorção do espectro infravermelho da QS, DTIC e bioconjugado

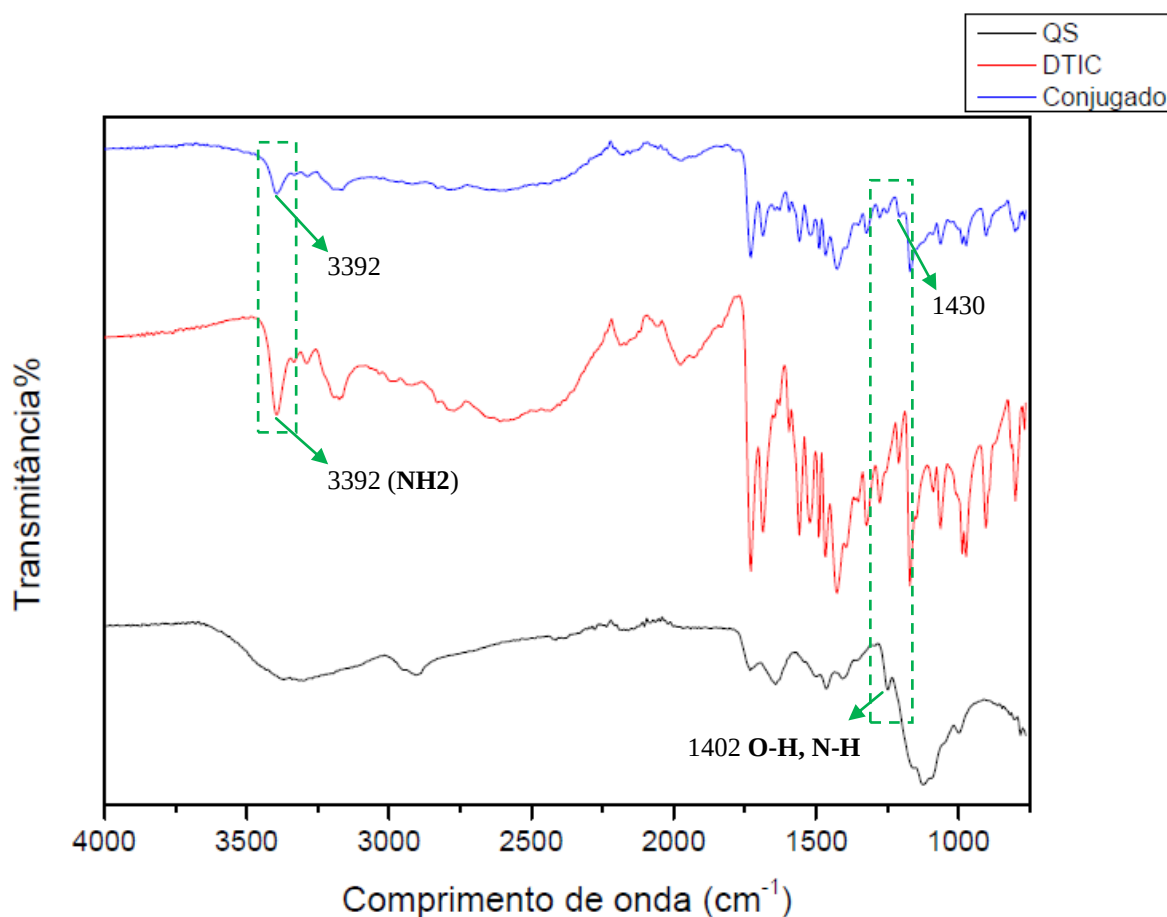
	Comprimento de Onda (cm ⁻¹)	Atribuições
Quitosana	3369, 3310	O-H, N-H
	2903	C-H
	1646, 1501	N-H
	1460	C-H
	1402	O-H, C-H
Dacarbazina	3392, 3287, 3170	NH ₂
	2780, 2606	C-H
	1728	C=O
	1687	C=C
	1465	C-H
Bioconjugado	1646	N-H
	3392, 3287, 3170	NH ₂

O espectro da QS despolimerizada pode ser observado na figura 4, onde apresentou picos de absorção característicos, tais como 3310 e 2903 cm⁻¹, que correspondem a grupos OH e CH₂ e os picos a 1646, 1501 e 1402 cm⁻¹ correspondem a vibrações de flexão do grupo NH₂ e de vibrações do OH do grupo alcoólico primário. As bandas de absorção que aparecem a 3369 e 1728 cm⁻¹ representam grupos NH₂ e C=O que esticam vibrações, respectivamente (ANANDHAKUMAR et al., 2016; MACEA et al., 2015).

A DTIC apresentou picos de 3392, 3287 e 3170 característicos das bandas NH₂, 1728 e 1687, correspondentes a C=O e C=C respectivamente, confirmando a composição química do fármaco (Tabela 1).

Na análise do espectro do FTIR do bioconjugado, observam-se alguns picos sobrepostos devido à semelhança estrutural dos compostos, porém os principais picos característicos tanto da QS como da DTIC são observados no bioconjugado, tais picos apresentam-se deslocados indicando que houve uma possível interação química entre o polímero da quitosana com a Dacarbazina após a conjugação, (figura 4).

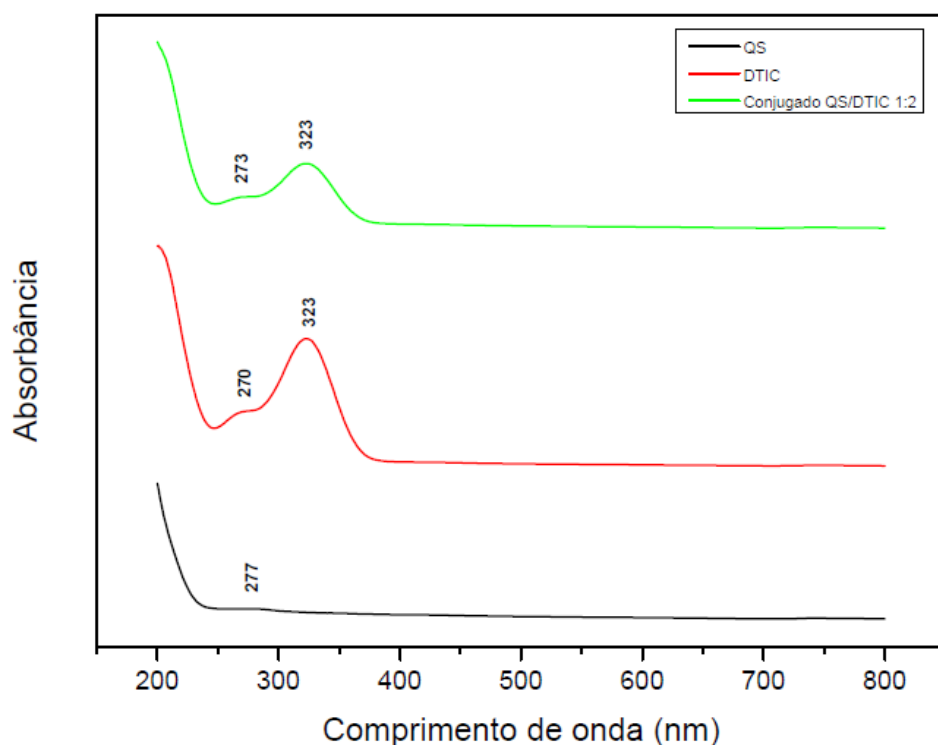
Figura 4 - Espectro de absorção na região do infravermelho da QS, DTIC e bioconjugado respectivamente



4.3 ANÁLISE DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL

A espectroscopia na região do UV-Vis foi utilizada para monitorar a formação da conjugação entre a QS e a DTIC. Os espectros de UV-Vis do bioconjugado, da QS e da DTIC são apresentados na figura 5.

Figura 5 – Espectro de absorção ultravioleta da QS, DTIC e bioconjugados em ácido acético



O espectro da DTIC exibiu pico máximo de absorção de 323nm, outro pico característico foi registrado a 270nm. O pico de absorção da QS foi exibido a 277nm.

A conjugação entre a QS e a DTIC resultaram na formação de um espectro que contém os mesmos picos da DTIC, porém o pico da região 273nm (figura 5) encontra-se levemente deslocados, sugerindo assim que houve interação molecular.

4.4 ANÁLISE DE PERDA DE MASSA E ANÁLISE TÉRMICA

A análise termogravimétrica (TGA) foi utilizada para a determinação da estabilidade térmica e/ou a taxa de composição dos materiais em estudo em função da temperatura. As curvas de TGA foram obtidas na faixa de 25 – 900°C, sob atmosfera de N₂ (100 mL.min⁻¹), com a razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹.

O termograma da quitosana (figura 6) revela a presença de duas etapas de perda de massa, sendo que a primeira ocorre até 150 °C, com diminuição de cerca de 11,2% e está relacionado à perda de água adsorvida no polímero. A segunda etapa teve início em 230 °C até a temperatura de 900°C, com uma perda de aproximadamente 72%, atribuído à degradação térmica do polímero a partir de 230 °C, ou seja, o polímero de quitosana apresentou resistência até essa temperatura.

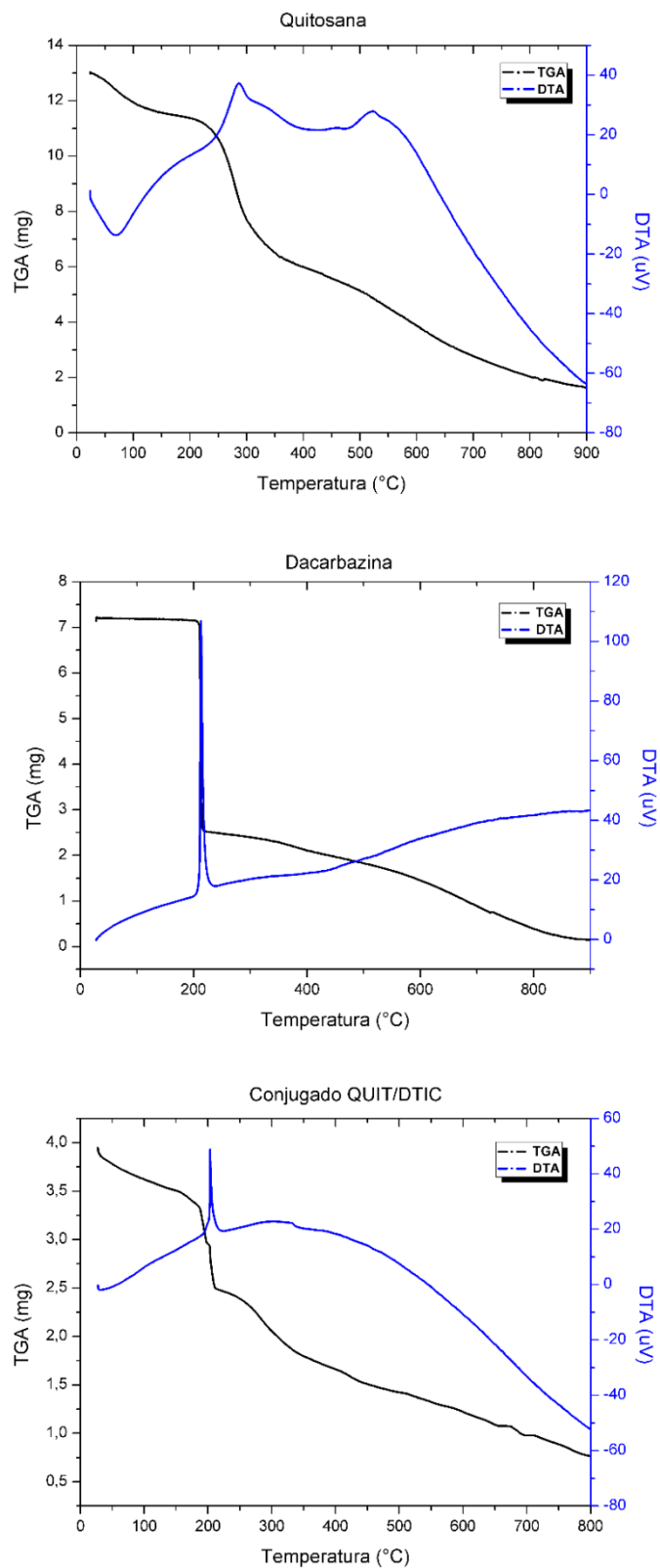
A curva DTA da quitosana (figura 6) assinalou um pico endotérmico que se relaciona à perda de água que ocorreu no polímero, ficando próximo a 70 °C. Pôde-se também visualizar a presença de um pico exotérmico próximo a 290°C, correspondente à degradação da quitosana.

A curva de TGA do fármaco dacarbazina (figura 6) apresenta um evento significativo, entre 200 e 236 °C, correspondendo a um percentual aproximado de 65,1% de perda de massa, sugerindo a decomposição do fármaco nesta faixa. Notou-se uma contínua perda de massa a partir de 236 °C até 900 °C, na qual praticamente toda massa é perdida. A curva de DTA apresentou um pico exotérmico intenso em torno de 215 °C, atribuído à decomposição do fármaco.

Já na curva de TGA do bioconjugado QS/DTIC (figura 6) observou-se um comportamento próximo ao da quitosana isolada, com a presença de dois estágios de perda de massa. O primeiro evento, relativa à desidratação da amostra na faixa de 25 e 182 °C, com perda de 13,4% e um segundo evento, entre 186 e 900 °C, com perda de massa de aproximadamente 59%, correspondendo provavelmente à degradação do fármaco e da quitosana.

Contudo, em relação à curva DTA do bioconjugado, observou-se apenas um evento exotérmico próximo à temperatura de 203 °C, devido ao início da degradação do material. Apesar desta temperatura de degradação ter sido menor em relação à dacarbazina isolada, o fato de ter havido uma perda de massa menor, pode inferir numa maior estabilidade térmica do material bioconjugado. Isto pode ser explicado devido à presença da ligação entre a quitosana e a dacarbazina, onde é necessária uma maior temperatura para a quebra de todas as ligações.

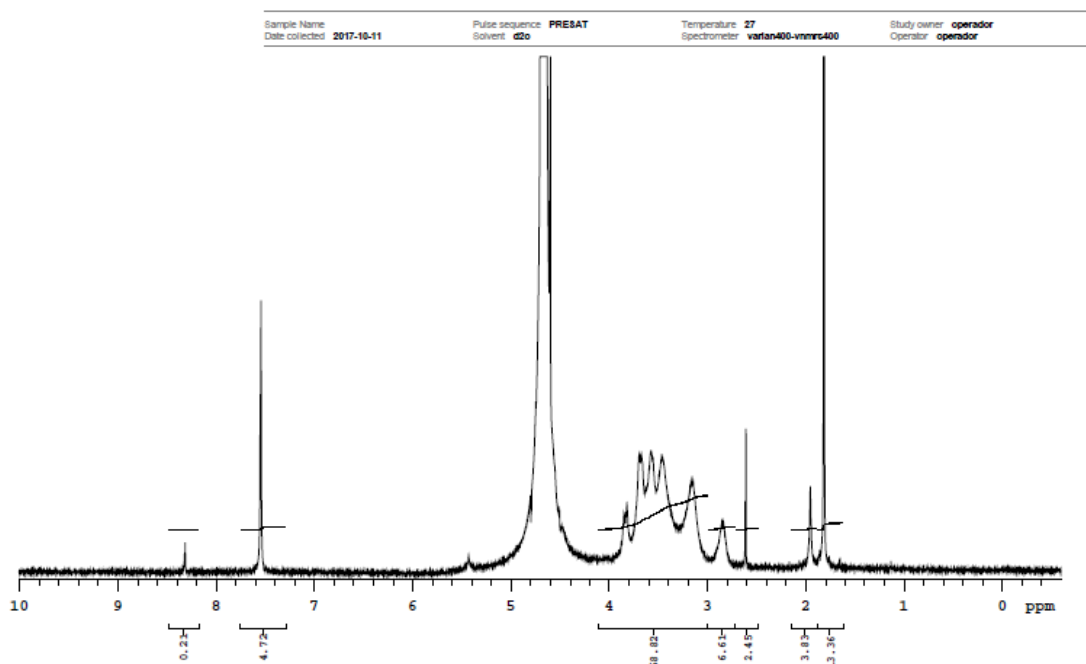
Figura 6 - Termograma da QS, DTIC, e do bioconjugado QS/DTIC respectivamente, em atmosfera de nitrogênio no intervalo de 10°/min.



4.5 ANÁLISE DO RMN

No espectro do RMN de H-1 do bioconjugado (figura 7) são observados tanto os sinais da quitosana, como os da dacarbazina. Isso sugere significativamente que houve uma mudança na estrutura, que permitiu a dissolução da amostra em água deuterada e obtenção dos espectros, pois são observados dois sinais na região de aromáticos, em 7.54 ppm (majoritário) e 8.32 ppm (minoritário). O majoritário é da dacarbazina. O outro também pode ser da dacarbazina, porém com alguma alteração. Na região entre 4.0 ppm e 2.5 ppm, observam-se os sinais do anel glicosílico da quitosana, enquanto em torno de 2.0 ppm observa-se um sinal (simpleto) minoritário que pode ser atribuído à metila do grupo acetil, indicando um certo grau de acetilação da quitosana; e um simpleto mais intenso, que é atribuído as metilas da dacarbazina.

Figura 7 – Espectro de RMN de H-1 do bioconjugado QS/DTIC, evidenciando os simpletos da DTIC na região 7.54 ppm e 8.32 ppm e da QS na região entre 4.0 ppm e 2.5 ppm



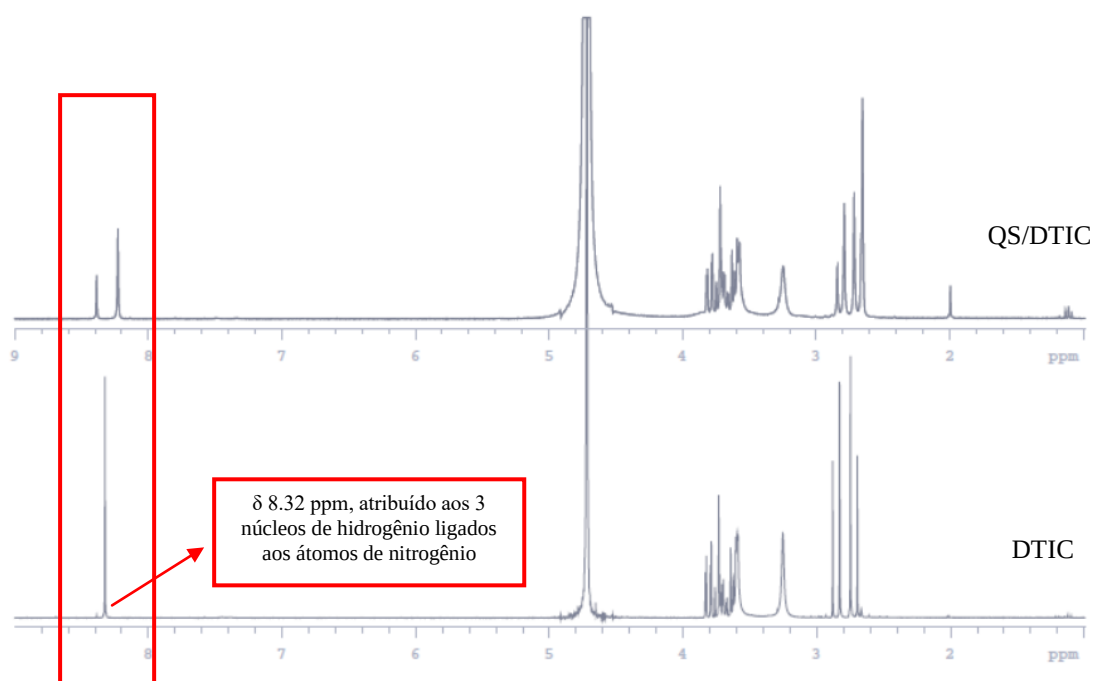
O espectro da DTIC que apresenta um simpleto em δ 8.32 ppm, é atribuído aos três núcleos de hidrogênio ligados aos átomos de nitrogênio. Isso é uma evidencia que há troca química entre esses átomos.

Na presença da QS, observa-se no espectro a presença de dois simpletos (figura 8), em δ 8.1 e 8.4 ppm com razão entre as áreas de integração de 2:1. assim, a troca química observada

no espectro da DTIC, não é mais evidenciada no bioconjugado. Isso indica claramente que há uma interação química entre a droga e o polímero, competindo com a troca química.

Portanto, tais dados sugerem que há interação entre fármaco e quitosana, resultando em melhora significativa na solubilidade do fármaco em água.

Figura 8 – Espectro de RMN de H-1 do bioconjugado QS/DTIC, evidenciando os simpletos em δ 8.1 e 8.4 ppm com razão entre as áreas de integração de 2:1



4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

4.6.1 Análise da Viabilidade Celular

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos desvios padrões no programa GraphPad Prism 5.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%) (RODRIGUES et al., 2014).

As amostras testados na concentração de 50 µg/ml estão apresentaram na tabela 2.

Tabela 2 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais MCF7, NCI-H292, HCT116 e em linhagem normal: RAW264.7, testadas na dose única de 50 µg/ml.

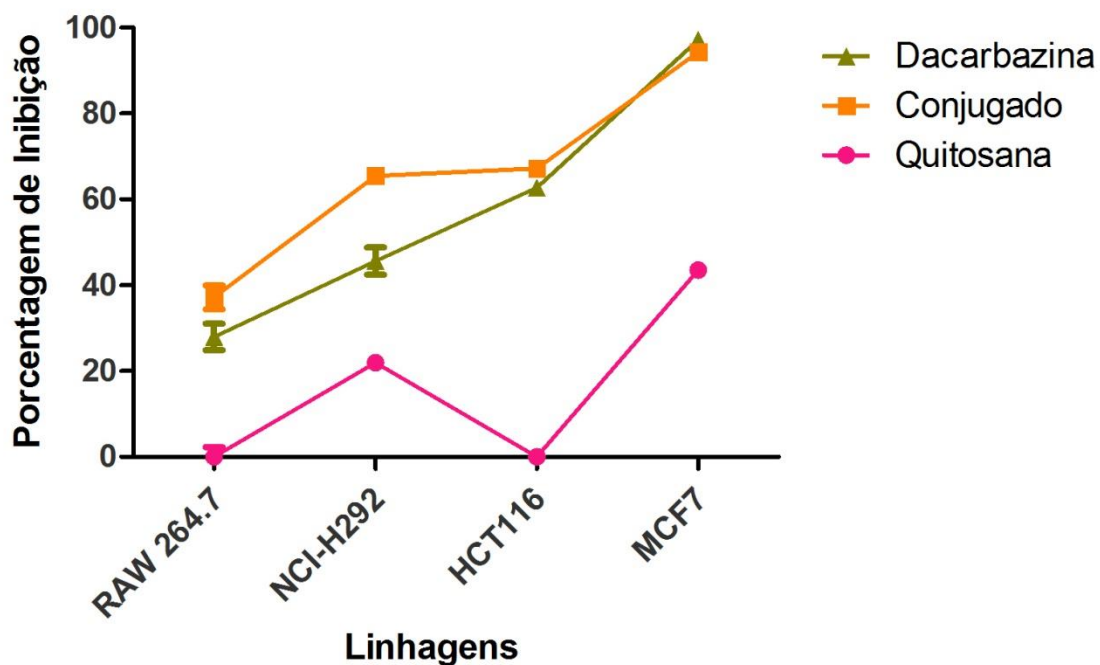
% de Inibição nas Linhagens Celulares Testadas				
	MCF7	NCI-H292	HCT116	RAW264.7
Bioconjugado	94,27 ± 1,15	65,42 ± 1,14	67,22 ± 0,74	37,17 ± 2,81
Quitossana	43,57 ± 0,82	21,92 ± 0,44	0,00 ± 0,00	0,00 ± 2,33
Dacarbazina	97,09 ± 0,21	45,63 ± 3,15	62,74 ± 0,14	27,97 ± 3,08

*Cada valor foi estimado como média de triplicatas.

Os resultados do bioconjugado estão apresentados na tabela 3 e demonstram que o mesmo apresentou uma citotoxicidade maior que a Dacarbazina isolada, frente às células tumorais NCI-H292 e HCT116 e frente à linhagem normal RAW264.7.

A figura 9 chama atenção para o resultado da viabilidade celular do bioconjugado diante da linhagem NCI-H292, o qual teve um aumento significativo na atividade citotóxica em comparação a Dacarbazina isolada.

Figura 9 – Ensaio de viabilidade celular da Quitosana, Dacarbazina e bioconjugado nas linhagens celulares tumorais RAW264.7, NCI-H292, HCT116 e em linhagem sadia de MCF7



Os resultados das análises citotóxicas exibem que a Dacarbazina isolada apresentou atividade tóxica frente às linhagens testadas e apesar de ser utilizada para o tratamento de melanoma, apresenta também atividade efetiva em outras linhagens de células tumorais.

5 DISCUSSÃO

O crescimento desordenado de células é denominado câncer, sendo esta doença responsável por elevadas taxas de mortalidade em todo mundo (HOSKIN & RAMAOTHY, 2008). O câncer é comumente tratado pelos métodos convencionais como: cirurgia, radioterapia e quimioterapia, porém essas alternativas de tratamento ocasionam diversos efeitos colaterais que diminuem a qualidade de vida do paciente, assim tem-se buscado novas formas de tratamento que sejam eficientes sem causar tantos danos (NIH, 2005).

As aplicações dadas aos biomateriais obtidos a partir da quitosana têm evoluído muito nos últimos tempos, e vão desde o simples uso como excipiente para indústria farmacêutica, ou métodos de “*drug-delivery*”, até avançadas aplicações na área de engenharia tecidual, podendo ser permeados por células, atuando como moldes para formação de estruturas biológicas complexas. No que se refere a aplicações biomédicas, a quitosana conjuga as propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, com propriedades de absorção, permitindo que seja utilizada até mesmo em terapias genéticas, no tratamento de reação imunológica ou alérgica (SPIN-NETO et al. 2008).

A quitosana utilizada neste trabalho foi adquirida comercialmente, e como os resultados obtidos com relação à conjugação com a Dacarbazina seriam inéditos, seria crucial ter-se a certeza que houve interação química entre o polímero e o fármaco. Para isso os dados obtidos a partir do FTIR, UV-Vis, TGA/DTA e RMN foram minuciosamente analisados para confirmarem tais interações moleculares.

Dessa forma quando as moléculas de quitosana foram submetidas a análises de FTIR e RMN, os dados aqui expostos levaram a comprovação que as cadeias polissacarídicas de quitosana estão ligadas através de ligações de hidrogênio a Dacarbazina.

Estudos demonstram que a técnica de espectroscopia de infravermelho é excelente para a caracterização de polímeros como a quitosana, bem como bioconjugados formados a partir desse polímero, pois possui algumas vantagens, tais como, ser uma análise não destrutiva, necessita de pequenas quantidades de amostra e ser um método de análise rápido. Assim foram observados no FTIR que os sinais característicos da quitosana continuaram identificáveis e algumas pequenas modificações foram identificadas, corroborando com os resultados encontrados no trabalho de LIU, et. al., 2013 onde surge um fraco sinal por volta da região 1728 cm^{-1} , correspondente a o estiramento da ligação C – O de ésteres, indicando a ligação éster do grupo hidroxila da quitosana com a Dacarbazina. O FTIR é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas

de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas. O grupamento NH₂, presente no espectro FTIR da quitosana, tem atraído atenção crescente em aplicações farmacêuticas e biomédicas por ter sido citado como responsável pela atividade antimicrobiana da quitosana (MANIVASAGAN; OH, 2016). Essas propriedades da quitosana são particularmente adequadas para o desenvolvimento do bioconjugado polímero-fármaco devido à sua disponibilidade para acoplamento com os grupos amino primários e grupos hidroxila de cada subunidade polimérica e a natureza catiônica que permite a reticulação iônica com a droga.

As análises térmicas, em especial as análise térmica diferencial (DTA) e análise termogravimétrica (TGA), também são excelentes técnicas complementares que podem fornecer boas informações sobre a natureza de uma mistura polimérica (SEMSARILAR et al., 2012). Assim como encontrado na literatura, o presente estudo demonstrou que o primeiro estágio onde houve perda de massa correspondeu ao desprendimento de água adsorvida no polímero. A água ligou-se principalmente aos grupos hidroxila e amina da quitosana, sendo que a interação ocorreu mais fortemente com os grupos hidroxila. Esta ligação da água sucedeu-se principalmente por pontes de hidrogênio (SILVA 2012).

A segunda etapa tem início aproximadamente a 208 °C e é a decomposição principal da QS. A perda de massa de 45% nesta fase está ligada à ruptura de cadeias de polissacarídeos (incluindo desidratação, desaminação, desacetilação, quebra de ligações glicosídicas e abertura do anel de piranose), vaporização e eliminação de produtos de degradação. Acima de 400 °C observa-se uma diminuição ainda mais lenta da perda de massa até 800 °C esses dados foram semelhantes aos encontrados por ZIEGLER-BOROWSKA et al 2015, que verificou também que a primeira fase exibe um processo endotérmico (com um mínimo de DTA a 423 °C), que pode ser explicado pela ruptura de ligações de hidrogênio seguido de evaporação da água. Esse efeito também foi observado na DTIC e no bioconjugado.

Com isso percebeu-se que a estabilidade térmica do bioconjugado, sofreu modificações significativas diante da conjugação entre a QS e a DTIC, em comparação as moléculas de quitosana e Dacarbazina isoladas.

Todos esses testes foram utilizados no presente estudo e os resultados das análises demonstraram interações e trocas químicas importantes entre a quitosana e a Dacarbazina, corroborando com os dados encontrados na literatura que relatam a quitosana como sendo um importante polímero, com apostas promissoras para as pesquisas nas indústrias farmacêuticas.

O presente estudo confirmou a Dacarbazina como um agente antitumoral *in vitro* muito potente, uma vez que a droga apresentou uma atividade citotóxica em todas as linhagens

testadas. Os resultados citotóxicos do bioconjugado demonstraram que a quitosana potencializou a atividade da Dacarbazina frente às linhagens NCI-H292, HCT116 e RAW264.7, visto que o mesmo apresentou uma toxicidade maior nessas linhagens celulares em comparação a Dacarbazina isolada.

Tais resultados tem importante significância, tendo em vista que para a realização dos testes, foram utilizados 50µg/ml tanto do bioconjugado como da Dacarbazina isolada, ou seja o bioconjugado possui uma quantidade menor de Dacarbazina em comparação da quantidade de Dacarbazina isolada que foi utilizada nos experimentos, e ainda sim o bioconjugado teve uma atividade citotóxica maior, comprovando que a quitosana potencializou a ação toxica da droga, necessitando assim de uma menor quantidade sem diminuir seu efeito terapêutico, pelo contrario, aumentou sua efetividade.

Já na linhagem normal a quitosana não conseguiu diminuir a toxidade da Dacarbazina, afetando uma quantidade de células maior que o esperado, quando comparada a ação da Dacarbazina isolada nas mesmas células, esse resultado diferem do esperado, tendo em vista que dados encontrados em estudos de toxicidade realizados com quitosana, verificou-se que a quitosana diminuía a toxicidade de vários compostos tóxicos (BEREZIN; SKORIK, 2015).

De fato, o presente estudo demonstrou que apesar da Dacarbazina isolada apresentar alta toxicidade diante de todas as linhagens de células testadas, a junção com a quitosana foi de suma importância para aumentar sua potencialidade.

O bioconjugado apesar de possuir em sua composição uma quantidade menor de droga exibiu uma atividade citotóxica bastante significativa contra todas as linhagens celulares testadas, tendo um destaque maior diante da linhagem NCI-H292, onde essa citotoxicidade foi aumentada, salientando o valor positivo entre a conjugação da quitosana e a Dacarbazina, fato inédito ainda não descrito na literatura.

Os dados aqui discutidos demonstram que o presente estudo sintetizou com êxito bioconjugados de quitosana e Dacarbazina. Os resultados das análises realizadas apontaram que houve interação entre o polímero e a droga, oferecendo assim um escopo imenso para a exploração futura da quitosana em conjugação com a Dacarbazina para o desenvolvimento de um novo sistema de distribuição de fármaco bioconjugado, como alternativa para o tratamento do câncer.

6 CONCLUSÃO

- ✓ Foi sintetizado com êxito bioconjugado de quitosana e Dacarbazina.
- ✓ As caracterizações físico-químicas do bioconjugado QS/DTIC 1:2, confirmaram que houve interação química satisfatória entre a quitosana e a Dacarbazina.
- ✓ A análise dos resultados de citotoxicidade demonstrou que a conjugação da quitosana associada à Dacarbazina aumentou o potencial citotóxico do fármaco frente às linhagens celulares tumorais principalmente nas linhagens de carcinoma de pulmão (NCI-H292).
- ✓ O bioconjugado QS/DTIC apresentou um importante potencial para o desenvolvimento de um novo sistema de distribuição de fármaco.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL P.; SINGH R. P.; KUMARI S. L.; SHARMA G.; KOCH B.; RAJESH C. V.; MEHATA A. K.; SINGH S.; PANDEY B. L.; MUTHU M. S. TPGS-chitosan cross-linked targeted nanoparticles for effective brain cancer therapy. **Materials Science & Engineering C**, 10.1016/j.msec.2017.02.008 February 2017.
- AL-BADR A. A.; ALODHAIB M. M. Dacarbazine. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Methodology**, volume 41 ISSN 1871-5125, 2016.
- ALLEY, M. C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p. 589- 601, 1988.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específico e ciclo-celular não específico que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quim. Nova**, vol. 28, nº 1, p. 118-129, 2005.
- AL-SAIDI H. M. Biosorption using chitosan thiourea polymer as an extraction and preconcentration technique for copper prior to its determination in environmental and food samples by flame atomic absorption spectrometry: Synthesis, characterization and analytical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 390-401, 2016.
- ANANDHAKUMAR S.; KRISHNAMOORTHY G.; RAMKUMAR K. M.; RAICHUR A. M. Preparation of collagen peptide functionalized chitosan nanoparticles by ionic gelation method: An effective carrier system for encapsulation and release of doxorubicin for cancer drug delivery. **Materials Science & Engineering C**, 2016.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27–34, 2007.
- BEREZIN, A. S.; SKORIK, Y. A. Chitosan-isoniazid conjugates: Synthesis, evaluation of tuberculostatic activity, biodegradability and toxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 309–315, 2015.
- BROOKS, B. D.; BROOKS, A. E. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 78, p. 14–27, 2014.
- CASSETARI, L., VLLASALIU, D., LAM, J. K. W., SOLIMAN, M., ILLUM, L. Biomedical applications of amino acid-modified chitosan: A review. **Biomaterials**, 33, 30, p7565-7583, 2012.
- CHANPHAI, P.; TAJMIR-RIahi, H. A. Encapsulation of testosterone by chitosan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 535–541, 2017.

CHAUBEY, P.; MISHRA, B. Mannose-conjugated chitosan nanoparticles loaded with rifampicin for the treatment of visceral leishmaniasis. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1101–1108, jan. 2014.

COSTA SILVA H.; SANTOS K.; FERREIRA E. Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, Aplicações Farmacêuticas e Avanços. **Quim. Nova**, vol. 29, No. 4, 776-785, 2006.

EROGÇLU, M.; IRMAK, S.; ACAR, A.; DENKBAS, E. B. Design and evaluation of a mucoadhesive therapeutic agent delivery system for postoperative chemotherapy in superficial bladder cancer. **International Journal of Pharmaceutics** v. 235, p. 51–59, 2002.

FASCIOTTI, M. Perspectives for the use of biotechnology in green chemistry applied to biopolymers, fuels and organic synthesis: from concepts to a critical point of view. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6 p. 82-89, 2017.

GONSALVES, A. A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

GOMES F. Tratamento de Melanoma Maligno Cutâneo. **Centro hospitalar do Porto, dissertação/artigo de revisão bibliográfica** 2011/2012.

HE, R.; YIN, C. Trimethyl chitosan based conjugates for oral and intravenous delivery of paclitaxel. **Acta Biomaterialia**, S1742-7061(17)30120-4, february 2017.

HOSKIN, D. W. & RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v 1778, p. 357-375, 2008.

HORIGUCHI M; KIM J; MATSUNAGA N; KAJI H; EGAWA T; MAKINO K; KOYANAGI S; OHDO S. Glucocorticoid-Dependent Expression of O6 – Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene Modulates Dacarbazine-Induced Hepatotoxicity in Mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, JPET 333:787, 2010.

HU, Q.; LUO, Y. Polyphenol-Chitosan Conjugates: Synthesis, Characterization, and Applications. **Carbohydrate Polymers**, S0144-8617(16)30653-1, 2016.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde. Estimativa | 2016 Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, RJ 2015 INCA.

JAIN A.; THAKUR K.; SHARMA.; KUSH P.; JAIN U. Fabrication, Characterization and Cytotoxicity Studies of Ionically Cross-linked Docetaxel Loaded Chitosan Nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 65-74, 2016.

JANES, K. A.; ALONSO, M. J. Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: Preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 88, n. 12, p. 2769–2776, jun. 2003.

KIM, J.; HWANG, J.; SEO, Y.; JO, Y.; SON, J.; CHOI J. Engineered chitosan-xanthan gum biopolymers effectively adhere to cells and readily release incorporated antiseptic

molecules in a sustained manner. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2016.10.017>, 2016.

KIMMICK, G. G.; LI, X.; FLEMING, F. T.; SABATINO, S. A.; WILSON, J. F.; LIPSCOMB, J.; CRESS, R.; BERGOM, C.; ANDERSON, R. T.; WU, X. Risk of cancer death by comorbidity severity and use of adjuvant chemotherapy among women with locoregional breast cancer. **Journal of Geriatric Oncology**, JGO-00484; No. 7; 4C, november 2017.

KUKUMANU S; TAGNE J B; WILSON T A; NICOLOSI R J. A nanoemulsion formulation of dacarbazine reduces tumor size in a xenograft mouse epidermoid carcinoma model compared to dacarbazine suspension. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 7, p. 277-283, 2011.

KHDAIR A.; HAMAD I.; ALKHATIB H.; BUSTANJI Y.; MOHAMMAD M.; TAYEM R.; AL-FWARIS K. Modified-Chitosan Nanoparticles: Novel Drug Delivery Systems Improve Oral Bioavailability of Doxorubicin. **Pharmaceutical Sciences**, 10.1016/j.ejps.2016.07.012 July 2016.

LIU, F.; FENG, L.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; ZHANG, N. Synthesis, characterization and antitumor evaluation of CMCS-DTX conjugates as novel delivery platform for docetaxel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 451, p. 41-49, 2013.

LIU, Y.; QIAO, L.; ZHANG, S.; WAN, G.; CHEN, B.; ZHOU, P.; ZHANG, N.; WANG, Y. Dual pH-responsive multifunctional nanoparticles for targeted treatment of breast cancer by combining immunotherapy and chemotherapy. **Acta Biomaterialia**, S1742-7061(17)30696-7, november 2017.

MACEA R. B.; FLÓREZ DE HOYOS C.; MONTES Y. G.; FUENTES E. M.; RUIZ J. I. R. Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. **Polímeros**, v. 25(1), p. 58-69, 2015.

MANIVASAGAN, P.; OH, J. Marine polysaccharide-based nanomaterials as a novel source of nanobiotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 315–327, jan. 2016.

MARASINI, N.; HAQUE, S.; KAMINSKAS, L. M. Polymer-drug conjugates as inhalable drug delivery systems: A review. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 31, p. 18-19, 20017.

MARQUERTE C. G.; MONESTIER S.; GROB J. J. MELANOMA. **EMC Dermatología**, volume 49, nº2, junho 2015.

MEDEIROS K. A.; Desenvolvimento e testes *in vitro* de nanopartículas de quitosana para liberação controlada de peptídeos antitumorais. Dissertação de mestrado submetida a Universidade de Brasília. 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

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

NIEWEG O E; GALLEGOS-HEZNÁNDEZ J F. La cirugía em melanoma cutáneo maligno y las nuevas drogas. *Cirugía y Cirujanos*, 2015; 83(2):175-180.

ORSOLIC, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 31, p. 173-194, 2012.

PATEL B.; PARIKH R.; ABOTI P. Development of Oral Sustained Release Rifampicin Loaded Chitosan Nanoparticles by Desing of Experiment. **Journal of Drug Delivery**, article ID 370938, 10 pages, 2013.

PEREZ-HERRERO, E.; ERNANDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **Jornal Europeu de Farmacêuticos e Biofarmacêuticos**, v. 93, p. 52-79, 2015.

RAFFIN R.; OBACH E.; MEZZALIRA G.; POHLMANN A.; GUTERRES S. Nanocápsulas Polimérica Secas Contendo Indometacina: Estudo de Formulação e de Tolerância Gastrintestinal em Ratos. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 22 (2), p. 163-72, 2003.

QUITA S M. The protective effect of propolis (bee glue) against histopathological changes induced by dacarbazine in mice kindey. **Life Science Journal**, 13(3), 2016.

RAGAZ, J.; STEWART, M. J.; NHU LE, PLENDERLLEITH, I. H.; SPINELLI, J. J.; BASCO, V. E.; WILSON, K. S.; KNOWLING, M. A.; COPPIN, C. L.; PARADIS, M.; COLDMAN, A. J.; OLIVOTTO, I. A.; Adjuvant radiotherapy in node-positive premenopausal women with breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.337, n. 14, p. 956-962, 1997.

RODRIGUES, F. A. R.; BOMFIM, I. S.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; GONÇALVES, R. S. B.; WARDELL, J. L.; WARDELL, S. M. S. V.; SOUZA, M. V. N. Mefloquine-oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. **Chem Biol Drug Des** , v. 83, p. 126-131, 2014.

SEMSARILAR M.; TOM J.; LADMIRAL V.; PERRIER S. Supramolecular hybrids of cellulose and synthetic polymers. **Polymer Chemistry**, DOI: 10.1039/c2py20385e August 2012.

SILVA, H. S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, Nº 4, p. 776-785, 2006.

SILVA R. L. Sistema de Liberação Controlada de Quitosana Contendo Antígeno Capsular Vi de Salmonella Typhi, programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal. Dissertação 2012.

SUBRAMANI, K.; AHMED, W. Nanoparticulate drug-delivery systems for oral cancer treatment. **Emerging Nanotechnologies in Dentistry**. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812291-4.00017-0>, Elsevier Inc. All rights reserved, 2018.

SUTARIYA P. G.; PANDYA A.; LODHA A.; MENON S. K. A Simple and rapid creatinine sensing via DLS selectivity, using calix[4]arene thiol functionalized gold nanoparticles. **Talanta, The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.029> october 2015.

SPIN-NETO R.; PAVONE C.; FREITAS R. M.; MARCANTONIO A. C.; MARCANTONIO-JÚNIOR E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de otontologia da UNESP**, v. 37(2), p 155-161, 2008.

TORCHILIN, V.P Recents Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 4 (2), p. 145-60 Feb, 2005.

TORRES A.; CAMACHO L. H. Aplicaciones de la Bioquimioterapia en Pacientes com Melanoma Metastásico. **Revista Med**, v. 16(2), p. 161-169, 2008.

XIA Y.; FAN Q.; HAO D.; WU J.; MA G.; SU Z. Chitosan-based Mucosal Adjuvants: Sunrise on the Ocean. **Vaccine, JVAC**167631–14, 2015.

ZIEGLER-BOROWSKA M.; CHELMINIAK D.; KACZMAREK H. Thermal stability of magnetic nanoparticles coated by blends of modified chitosan and poly(quaternary ammonium) salt. **J. Therm Anal Calorim**, v. 119, p. 499-506, 2015.