



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IAGO DILLION LIMA CAVALCANTI

**ENCAPSULAÇÃO DA ONCOCALIXONA A EM NANOPARTÍCULAS DE POLI-
ISOBUTILCIANOACRILATO-FUCANA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA**

Recife

2020

IAGO DILLION LIMA CAVALCANTI

**ENCAPSULAÇÃO DA ONCOCALIXONA A EM NANOPARTÍCULAS DE POLI-
ISOBUTILCIANOACRILATO-FUCANA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

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

Coorientadora: Prof^a. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira

Recife

2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- C376e Cavalcanti, Iago Dillion Lima.
Encapsulação da oncofalexona A em nanopartículas de poli-isobutilcianoacrilato-fucana e avaliação da atividade antiproliferativa / Iago Dillion Lima Cavalcanti. – 2020.
84 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.
Inclui referências e anexos.
1. Nanopartículas. 2. Sobrevivência celular. 3. Polissacarídeos. 4. OncoA. 5. Poli-isobutilcianoacrilato. I. Magalhães, Nereide Stela Santos (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2020-095)

IAGO DILLION LIMA CAVALCANTI

**ENCAPSULAÇÃO DA ONCOCALIXONA A EM NANOPARTÍCULAS DE POLI-
ISOBUTILCIANOACRILATO-FUCANA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 20/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior (Examinador Externo)
Universidade Potiguar

Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar sempre e ter me preparado para enfrentar esta fase da minha vida.

Agradeço a minha orientadora, a professora Nereide Magalhães, que confiou no meu trabalho e na minha dedicação sem me conhecer, sem saber do meu perfil de trabalho, dividindo seu conhecimento e se preocupando com o meu crescimento profissional.

Agradeço ao professor Francisco Xavier Junior por me ajudar a ingressar no mestrado e por sempre acreditar no meu potencial, se preocupando no meu crescimento acadêmico, dividindo sempre seu conhecimento e me incluindo na prática laboratorial. Grande parte do profissional que sou hoje, devo a você professor!

Agradeço a professora Mariane Lira que apareceu como uma luz em um momento de escuridão, perdido, sem saber o que fazer, achando que não iria conseguir finalizar o mestrado. Mudou minha forma de pensar, deu confiança no meu trabalho e mais segurança para me virar sozinho, deixando as coisas mais fáceis e simples de se lidar. Aprendi que não há resultados ruins, todo resultado é bom dependendo do nosso ponto de vista. Nada é descartável, tudo é aproveitável.

Agradeço ao professor Rafael Ximenes que surgiu com uma proposta de trabalho que mudou meu rumo no mestrado, trazendo novos desafios a serem enfrentados e contribuindo de forma muito positiva a minha pesquisa.

Agradeço ao Grupo SLC, em especial Sarah Palácio, Rafaela Ferraz, Sandrelli Meridiana, Thaiane Siqueira, Jaqueline Siqueira, Daniel Charles e André Campos por fazer parte dessa jornada, contribuindo nas discussões e construção das ideias, facilitando a minha jornada e proporcionando um ambiente de trabalho mais alegre e divertido.

A minha família, que sempre acreditou no meu potencial me dando suporte e apoiando as minhas escolhas. Destaco a minha mãe Dilma Cavalcanti, por ser uma mulher forte e que me inspira a enfrentar os meus problemas sempre de cabeça erguida e da forma mais honesta e verdadeira possível. Também agradeço aos meus irmãos Iury Cavalcanti, Igor Cavalcanti,

Jhonnath Cavalcanti e Patrícia Santos que estavam presentes em todos os momentos dando apoio e me distraíndo com as palhaçadas de sempre. Como também aos meus sobrinhos Cauã Cavalcanti e Ryan Santos pelo momentos de descontração. Agradeço a minha madrinha Mirelly Pimentel e ao meu primo Fabricio Oliveira, como também as minhas primas Maria Clara e Maria Eduarda, por me acolherem nesses dois anos, dando suporte e acreditando no meu potencial.

Agradeço aos meus amigos, principalmente a Cleberson Soares, Diogo Timóteo, Andreza Aguiar e Natália Outtes, que mostraram que devemos trabalhar duro, mas ter ao menos um momento de diversão e conforto para não endoidarmos, e se por acaso endoidarmos que seja das resenhas e leseiras do dia a dia, pois a vida é uma festa e devemos aproveitar todos os dias. Obrigado por dividirem a carga comigo e deixar as coisas mais leves!

Agradeço a FACEPE pelo apoio e suporte financeiro durante esse percurso do mestrado.

Agradeço também a todos que contribuíram de forma direta ou indireta durante esses dois anos de mestrado. Muito obrigado!

RESUMO

A *Cordia oncocalyx* Allemão é uma planta pertencente à família Boraginaceae, cuja importância clínica é associada a presença de compostos com estrutura quinona, sendo a oncoalixona A (OncoA) o mais abundante, que apresenta atividades antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e hipoglicêmica. No entanto, estes compostos possuem limitações farmacêuticas devido a toxicidade renal, cardíaca e pulmonar. Neste contexto, o objetivo do estudo foi encapsular a OncoA em nanopartículas de poli-isobutilcianoacrilato revestidas com fucana (OncoA-NP-Fuc), caracterizar físicoquimicamente, avaliar a estabilidade e atividade antiproliferativa frente a células MDA-MB-231, a fim de produzir sistemas contendo características físico-químicas promissoras para aplicação na terapêutica do câncer. Os resultados obtidos nas análises de Infravermelho (FT-IR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TG) de OncoA-NP-Fuc comprovam o desenvolvimento de nanopartículas contendo a OncoA, com tamanho de partícula $305 \pm 6,49$ e taxa de encapsulação do fármaco de $101,5 \pm 1,4\%$. Além disso, as nanopartículas apresentam-se estáveis quanto ao tamanho e carga de superfície, quando armazenadas a 4°C durante 7 meses. Quando em contato com meio gástrico simulado o tamanho médio das nanopartículas (NP-Fuc) foi aumentado 245 nm para 287,9 nm em 30 minutos, permanecendo constante durante duas horas. Ao contrário, quando em contato com o fluido intestinal e sanguíneo simulados o tamanho médio das partículas diminuiu de 245 nm para 214,9 e 218,9 nm respectivamente, permanecendo constante durante duas horas. As nanopartículas são compatíveis com sangue humano, não induzindo a hemólise, mesmo em alta concentração ($330 \mu\text{M}$). A encapsulação da OncoA nas nanopartículas potencializou a atividade antiproliferativa (IC_{50} de $10,5 \pm 0,74 \mu\text{M}$) com relação a OncoA ($20,8 \pm 1,36 \mu\text{M}$). A captura celular das nanopartículas foi observada por microscopia de fluorescência tanto através da autofluorescência da OncoA nanoencapsulada quanto da marcação com rodamina. Além disso, inibiu a migração celular em 24 horas e promoveu atividade antiproliferativa das células MDA-MB-231 em até 72 horas, mesmo em concentrações abaixo da IC_{50} ($3,13 \mu\text{M}$). OncoA-NP-Fuc apresenta-se como um sistema promissor para potencializar o efeito antiproliferativo e inibidor de migração celular da OncoA.

Palavras-chave: Nanopartículas. Sobrevivência celular. Polissacarídeos. OncoA. Poli-isobutilcianoacrilato.

ABSTRACT

Cordia oncocalyx Allemão is a plant belonging to the Boraginaceae family, whose clinical importance is associated with the presence of compounds with quinone structure, with oncocalyxone A (OncoA) being the most abundant, which presents anti-tumor, anti-inflammatory, antioxidant and hypoglycemic activities. Therefore, the encapsulation of OncoA in polymeric nanoparticles presents itself as a viable alternative to improve the therapeutic effects and decrease the toxicity of this active molecule. Besides, the development of nanoparticles can allow the controlled release of the drug. In this context, this study aims to encapsulate the OncoA in poly (isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles coated with fucoidan (OncoA-NP-Fuc), to characterize physicochemically, to evaluate the stability and antiproliferative activity against MDA-MB-231 cells, in order to develop systems for application in cancer therapy. The results obtained by the Infrared (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermogravimetry (TG) analyzes of OncoA-NP-Fuc prove the development of nanoparticles containing OncoA. Particles presented a mean diameter size of 305 ± 6.49 and a drug encapsulation rate of $101.5 \pm 1.4\%$. Nanoparticles are stable in terms of particle size and surface charge when stored at 4°C for at least seven months. When in contact with simulated gastric media, the average size of the nanoparticles (NP-Fuc) was increased from 245 nm to 287,9 nm in 30 minutes, remaining constant for two hours. On the contrary, when in contact with the simulated intestinal and blood fluid, the average particle size decreased from 245 nm to 214.9 and 218.9 nm respectively, remaining constant for two hours. The nanoparticles are compatible with human blood, not inducing hemolysis, even in highest concentration (330 μ M). The encapsulation of OncoA in the nanoparticles potentiated antiproliferative activity (IC₅₀ of 10.5 ± 0.74 μ M) in comparison to free OncoA (20.8 ± 1.36 μ M). The cellular uptake of nanoparticles was observed by fluorescence microscopy both through the autofluorescence of the nanoencapsulated OncoA and through the labeling system using rhodamine. Also, it inhibited cell migration in 24 hours and promoted the antiproliferative activity of MDA-MB-231 cells within 72 hours, even at concentrations below the IC₅₀ (3.13 μ M). OncoA-NP-Fuc presents itself as a promising system to enhance the antiproliferative and cell migration inhibiting effect of OncoA.

Keywords: Nanoparticles. Cell survival. Polysaccharides. OncoA. Polyisobutylacacrylate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química das quinonas.....	20
Figura 2 -	Estrutura química da OncoA.....	23
Figura 3 -	Esquema representativo da liberação convencional e controlada de fármacos.....	27
Figura 4 -	Principais nanossistemas utilizados para o encapsulamento de fármacos.....	28
Figura 5 -	Representação estrutural de nanocápsulas e nanoesferas.....	29
Figura 6 -	Representação química da polimerização aniônica do alquilcianoacrilato....	31
Figura 7 -	Estrutura de nanoesferas e nanocápsulas obtidas de diferentes mecanismos de polimerização.....	32
Figura 8 -	Estrutura química parcial da fucana.....	35
Figura 9 -	Curva de padrão da OncoA. Curva 1 (-▲-), Curva 2 (-■-) e Curva 3 (-●-)....	47
Figura 10 -	Cromatograma da OncoA nas concentração de 0,5 µg/mL (A), 2 µg/mL (B), 5 µg/mL (C), 10 µg/mL (D), 15 µg/mL (E) e 20 µg/mL (F) diluída em acetonitrila:água acidificada 30:70 v/v.....	48
Figura 11 -	Cromatograma das nanopartículas NP-Fuc (A) e OncoA-NP-Fuc (B) em concentração de 10 µg/mL.....	48
Figura 12 -	Morfologia das nanopartículas NP-Fuc (A) e OncoA-NP-Fuc (B) observadas por microscópio eletrônico de varredura.....	50
Figura 13 -	Espectro de FT-IR da OncoA.....	51
Figura 14 -	Espectro de FT-IR das NP-Fuc.....	52
Figura 15 -	Espectro de FT-IR das OncoA-NP-Fuc.....	52
Figura 16 -	Espectro de FT-IR da mistura física entre a OncoA e NP-Fuc.....	53
Figura 17 -	Análise de EDX evidenciando a presença do enxofre nas amostras.....	54
Figura 18 -	Gráficos de análise termogravimétrica da OncoA (A), NP-Fuc (B), Mistura física (C) e OncoA-NP-Fuc (D).....	55
Figura 19 -	Gráficos de Calorimetria Diferencial de Varredura da OncoA (A), NP-Fuc (B), Mistura física (C) e OncoA-NP-Fuc (D).....	56
Figura 20 -	Estabilidade das nanopartículas em pH 1.2 (○), 6.8 (□) e 7.4 (●). Tamanho das nanopartículas através do tempo de contato em meios biológicos simulados.....	57
Figura 21 -	Estabilidade das nanopartículas em pH 1.2 (○), 6.8 (□) e 7.4 (●). Potencial	

	zeta das nanopartículas através do tempo de contato em meios biológicos simulados.....	58
Figura 22 -	Avaliação do tamanho das nanopartículas NP-Fuc (○) e OncoA-NP-Fuc (■) armazenadas a 4°C.....	59
Figura 23 -	Avaliação da carga de superfície das nanopartículas NP-Fuc (○) e OncoA-NP-Fuc (■) armazenadas a 4°C.....	59
Figura 24 -	Potencial hemolítico da NP-Fuc em amostra de sangue humano. (A) Taxa de hemólise; (B) Aspectos macroscópicos. **** p-valor (<0.0001).....	60
Figura 25 -	Viabilidade das células MDA-MB-231 expostas a OncoA-NP-Fuc (A), OncoA (B) e NP-Fuc (C) após 24 horas. * p-valor (<0.03) ** p-valor (<0.003) **** p-valor (<0.0001).....	61
Figura 26 -	Viabilidade das células MDA-MB-231 expostas a OncoA-NP-Fuc (A), OncoA (B) e NP-Fuc (C) após 48 horas. * p-valor (<0.03) ** p-valor (<0.003) **** p-valor (<0.0001).....	62
Figura 27 -	Viabilidade das células MDA-MB-231 expostas a OncoA-NP-Fuc (A), OncoA (B) e NP-Fuc (C) após 72 horas. *** p-valor (0.0001) **** p-valor (<0.0001).....	62
Figura 28 -	Fotografias das células MDA-MB-231, em microscópio óptico com objetiva 10x, expostas as amostras OncoA, NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc na concentração de 3,13 µM.....	64
Figura 29 -	Fotografias das células MDA-MB-231, em microscópio óptico com objetiva 10x, expostas as amostras OncoA, NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc na concentração de 25 µM.....	65
Figura 30 -	Perfil de fluorescência da OncoA.....	66
Figura 31 -	Perfil de fluorescência do DAPI.....	66
Figura 32 -	Captura celular da Rodamina-NP-Fuc a 37 °C. Coluna A: Alexa fluor; Coluna B: DAPI; Coluna C: Rodamina.....	68
Figura 33 -	Captura celular da OncoA-NP-Fuc a 37 °C. Coluna A: Alexa fluor; Coluna B: DAPI; Coluna C: Rodamina.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tamanho, potencial zeta e taxa de encapsulação das nanopartículas OncoA-NP-Fuc.....	46
--	----

LISTA DE ABREVIACÕES

OncoA	Oncocalixona A
IBCA	Isobutilcianoacrilato
PIBCA	Poli-isobutilcianoacrilato
DMSO	Dimetilsufóxido
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a Ultravioleta
DL₅₀	Dose letal média
IC₅₀	Concentração Inibitória Média
PLA	Polilactídeo
PLGA	Poli(lactídeo co-glicolídeos)
PGA	Poliglicólicos
PMMA	Poli(metil metacrilato)
PVP	Poli(<i>N</i> -vinil pirrolidona)
PVA	Poli(álcool vinílico)
PAM	Poliacrilamida
PEG	Polietilenoglicol
HCl	Ácido clorídrico
AEP	Polimerização por emulsão aniônica
NP-Fuc	Nanopartículas de Poli-isobutilcianoacrilato revestidas com Fucana
OncoA-NP-Fuc	Nanopartículas de Poli-isobutilcianoacrilato revestidas com Fucana contendo oncocalixona A
Rodamina-NP-Fuc	Nanopartículas de Poli-isobutilcianoacrilato revestidas com Fucana contendo Rodamina
PDI	Índice de polidispersão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
TG	Análise Termogravimétrica
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
PBS	Tampão Fosfato-Salino
SFB	Soro Fetal Bovino
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
EDX	Raio X por Energia Dispersiva

DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
RREP	Polimerização por Emulsão de Radicais Redox
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1	PRODUTOS NATURAIS COMO PRINCIPAL FONTE DE FÁRMACOS.....	19
3.2	ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS DERIVADOS QUINOIDES.....	19
3.3	<i>CORDIA ONCOCALYX</i> ALLEMÃO.....	21
3.4	ONCOCALIXONA A.....	22
3.4.1	Método de quantificação da OncoA.....	24
3.4.2	Atividade antiproliferativa.....	24
3.4.3	Toxicidade da OncoA.....	25
3.5	NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA.....	26
3.6	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	28
3.6.1	Mecanismos de polimerização.....	29
3.6.2	Nanopartículas obtidas por polimerização de alquilcianoacrilatos.....	31
3.6.3	Nanopartículas de Poli-isobutilcianoacrilato.....	32
3.6.4	Purificação das nanopartículas obtidas por polimerização.....	33
3.7	FUCANA.....	34
4	METODOLOGIA	38
4.1	MATERIAIS.....	38
4.2	PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PIBCA REVESTIDAS COM FUCANA CONTENDO OncoA.....	38
4.2.1	Purificação das nanopartículas.....	38
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	39
4.3.1	Tamanho e carga de superfície das nanopartículas.....	39
4.3.2	Taxa de encapsulação da OncoA.....	39
4.3.2.1	Curva padrão da OncoA.....	39
4.3.2.2	Quantificação da OncoA em nanopartículas.....	39
4.3.3	Análise morfológica.....	40

4.3.4	Análise espectroscópica.....	40
4.3.5	Análise de difração de raios X por energia dispersiva.....	41
4.3.6	Análise térmica.....	41
4.4	ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS.....	41
4.4.1	Estabilidade das nanopartículas em diferentes pH.....	41
4.5	ESTUDO DE COMPATIBILIDADE SANGUÍNEA: POTENCIAL HEMOLÍTICO.....	42
4.6	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DE OncoA-NP-Fuc.....	43
4.7	ESTUDO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	43
4.8	ESTUDO DE VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR DAS NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS MDA-MB-231.....	44
4.8.1	Espectroscopia de fluorescência da OncoA.....	44
4.8.2	Visualização microscópica de internalização celular.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1	NANOPARTÍCULAS DE PIBCA REVESTIDAS COM FUCANA CONTENDO OncoA.....	46
5.2	QUANTIFICAÇÃO DA OncoA EM NANOPARTÍCULAS.....	46
5.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	49
5.4	ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA.....	50
5.5	ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA.....	53
5.6	ANÁLISE TÉRMICA.....	54
5.7	ESTABILIDADE DAS NP-Fuc EM DIFERENTES pH.....	56
5.8	ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DAS NP-Fuc E OncoA-NP-Fuc.....	58
5.9	ESTUDO DE COMPATIBILIDADE SANGUÍNEA: POTENCIAL HEMOLÍTICO.....	59
5.10	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DE OncoA-NP-Fuc.....	60
5.11	ESTUDO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	63
5.12	ESTUDO DE VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR DAS NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS MDA-MB-231.....	65
5.12.1	Espectroscopia de fluorescência da OncoA.....	65

5.12.2	Visualização microscópica de internalização celular.....	67
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
6.1	PERSPECTIVAS.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	84

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são amplamente utilizados desde os primórdios da civilização na busca por alívio e cura de doenças. Com o avanço da tecnologia, formas de isolamento e análises de compostos ativos ampliou a utilização dos produtos naturais para tratamento de inúmeras doenças (VIEGAS-JUNIOR; BOLZANI, 2006; PLETSCBI, 2017). Dentre os produtos naturais, a planta do gênero *Cordia* pertencente à família Boraginaceae, presente em sua grande maioria no nordeste Brasileiro, especificamente no Ceará, é estudada por apresentar diversos metabólitos secundários com atividades biológicas, que incluem atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antiplaquetária, antitumoral, entre outras (FERREIRA et al., 2004). Dentre os metabólitos, a oncocalixona A (OncoA), vem recebendo atenção por ser o composto majoritário e apresentar diversas propriedades farmacológicas, como vem sendo evidenciados na literatura (FERREIRA et al., 2004; PESSOA et al., 2003).

A OncoA é uma quinona isolada principalmente do cerne do caule da *Cordia oncocalyx*. Os compostos quinoides apresentam em sua estrutura um sistema aromático que as confere atividades biológicas. Estudos demonstram que a OncoA apresenta atividades citotóxicas, antioxidantes, antiplaquetária, analgésica e anti-inflamatória (BAYEN et al., 2007; FERREIRA et al., 2004).

Apesar do amplo potencial terapêutico, muitos dos compostos obtidos de plantas, apresentam limitações biofarmacêuticas que impossibilitam a sua aplicação terapêutica. Alguns estudos evidenciam que a OncoA pode ser tóxica para os rins, pulmão e coração (PESSOA et al., 2003; COSTA, 2016), sendo tais toxicidades comuns em compostos pertencentes a classe das quinonas. Devido a estas limitações, novas abordagens terapêuticas têm surgido com o intuito de modificar os perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos de moléculas terapêuticas, promovendo uma vetorização de ativos para sítios alvos, reduzindo toxicidade e cessando o progresso de doenças (PIMENTEL et al., 2007). Neste sentido, o uso da nanotecnologia farmacêutica traz alternativas a partir da utilização de sistemas de liberação de fármacos tais como nanopartículas, lipossomas, emulsões, microemulsões e complexos de ciclodextrinas, que possibilitam o aumento da eficácia terapêutica de um fármaco através do aumento da sua solubilidade, proteção contra degradação enzimática, aumento do intervalo entre as doses e/ou diminuição de efeitos adversos (GOMES, 2010; PIMENTEL et al., 2007).

As nanopartículas poliméricas são partículas coloidais sólidas com um tamanho na faixa de 10 a 1000 nm e são formadas por polímeros, naturais ou sintéticos, biodegradáveis e biocompatíveis, sendo classificados em nanocápsulas e nanoesferas (FDA, 2014; YADAV et

al., 2019). As nanopartículas possibilitam a encapsulação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, o que permitem a sua aplicação terapêutica por via oral, tópica, injetável, parenteral, oftálmica, implantes e sistemas bioadesivos (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Além disso, é possível acoplar às nanopartículas proteínas, polissacarídeos, anticorpos, vírus, dentre outros compostos, o que proporciona o direcionamento ativo destes sistemas a sítios-alvo, potencializando o efeito do fármaco e reduzindo sua toxicidade (KUMAR, 2010; ALEXANDER et al., 2016).

Atualmente, vários polímeros são utilizados no desenvolvimento de nanopartículas. O poli-isobutilcianoacrilato (PIBCA) é um polímero biodegradável derivado do alquilcianoacrilato, utilizado no preparo de nanopartículas apresentando grande potencial como nanossistemas na liberação de fármacos. Além disso, o desenvolvimento de nanopartículas de PIBCA requerem a utilização de um polissacarídeo (OOWAKI et al., 2000; REECE; MAXEY; KRON, 2001). A fucana é um polissacarídeo obtido de algas marrons e invertebrados marinhos que está sendo bastante utilizado no desenvolvimento de nanopartículas por apresentar atividades biológicas como anti-inflamatória, antioxidante, anticoagulante e antitumoral, além de ter uma baixa toxicidade (FITTON; STRINGER; KARPINIEC, 2015).

Atualmente, o desenvolvimento de sistemas de direcionamento de fármacos a sítios alvo, vem ganhando destaque por aumentar a eficácia do medicamento, além de reduzir sua toxicidade, com isso promovendo maior segurança ao paciente. Portanto, no presente estudo, foram formuladas nanopartículas de PIBCA revestidas com fucana contendo OncoA encapsulada e avaliado a atividade antiproliferativa, frente a linhagem de células de câncer de mama.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver nanopartículas de poli-isobutilcianoacrilato revestidas com fucana contendo OncoA encapsulada e avaliar atividade antiproliferativa.

2.2 ESPECÍFICOS

- Obter nanopartículas contendo OncoA;
- Caracterizar as nanopartículas quanto ao tamanho, carga de superfície, taxa de encapsulação da Onco A, aspectos morfológicos, espectroscópicos e análise térmica;
- Avaliar a estabilidade das nanopartículas ao armazenamento e em contato com fluidos simulados: gástrico, intestinal e sanguíneo;
- Verificar a compatibilidade sanguínea das nanopartículas;
- Comparar a atividade antiproliferativa da OncoA livre e encapsulada em nanopartículas;
- Verificar a captura celular das nanopartículas em células MDA-MB-231;
- Avaliar a migração celular da linhagem MDA-MB-231 quando expostas a OncoA livre e encapsulada em nanopartículas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PRODUTOS NATURAIS COMO PRINCIPAL FONTE DE FÁRMACOS

O Brasil com sua biodiversidade, detentor da maior floresta equatorial e tropical do planeta, apresenta uma diversidade de plantas ricas em metabólitos secundários com grande interesse biológico. Grande parte das substâncias orgânicas conhecidas são originárias de produtos naturais, sendo as plantas o maior fornecedor de metabólitos secundários, onde muitos são de grande valor agregado devido suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al., 2002).

Grupos de pesquisa, institutos e indústrias estudam avidamente a busca de novas substâncias com potentes propriedades terapêuticas e a compreensão dos seus mecanismos de ação para melhor atender as necessidades da população (MATIAS et al., 2015). Muitos dos metabólitos secundários derivados de plantas apresentam atividades terapêuticas importantes na prática clínica incluindo atividades anticancerígenas, antibacterianas, anti-inflamatórias, analgésicas, entre outras (SARKER; LATIF; GRAY, 2005; DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015).

O ácido acetilsalicílico (aspirina) foi uma das principais descobertas, sendo um derivado da salicina, encontrado na casca do salgueiro *Salix Alba L.* (DER MARDEROSIAN; BEUTLER, 2002). Outro fármaco descoberto a partir de plantas medicinais é a morfina, principal metabólito ativo da espécie *Papaverum somniferum*, tendo a partir desta substância a possibilidade de produção de outras moléculas, como é o caso da codeína (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Muitos desses metabólitos também são amplamente utilizados como modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos, como por exemplo a procaína, cloroquina, tropicamida ou no isolamento de fármacos imprescindíveis como a vimblastina, vincristina, podofilotoxina e os análogos etoposídeo e teniposídeo, paclitaxel e a camptotecina (PINTO et al., 2002).

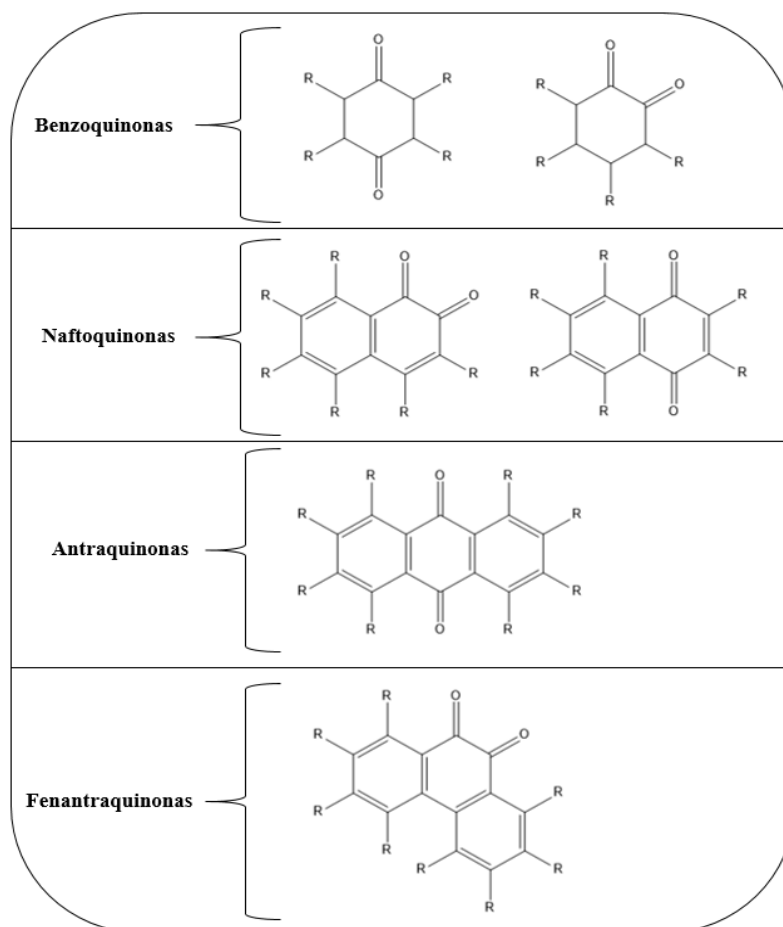
3.2 ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS DERIVADOS QUINOIDES

Tendo como fonte principal os vegetais, as quinonas são substâncias orgânicas considerada uma classe importante dos produtos naturais. Apresenta uma variada família de

metabólitos secundários importantes no transporte de elétrons e na fotossíntese (COSTA, 2016; SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016).

De acordo com a sua estrutura, as quinonas podem ser classificadas em benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e fenantraquinonas (Figura 1) (COSTA, 2016; SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016). As quinonas apresentam dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado com seis átomos de carbono, são espécies químicas neutras com duas propriedades químicas importantes, oxidantes e eletrofílicas, possibilitando com que esses componentes participem de reações do tipo redox e reações de Michael, no qual o potencial redox sofre forte influência do pH do meio e também devido a presença de substituintes. As quinonas quando protonadas são oxidantes mais fortes do que quando não estão protonadas e a presença de substituintes aceitadores de elétrons também aumenta o poder oxidante das quinonas, enquanto que a presença de doadores de elétrons reduz a sua capacidade oxidante (MONKS et al., 1992; LITTLE et al., 1995).

Figura 1 – Estrutura química das quinonas



Fonte: Adaptado de SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016

A estrutura química do núcleo quinoide pode influenciar na atividade biológica dos derivados quinonas, devido a presença de cadeias hidrofóbicas esses compostos podem se ligar a membranas celulares e proteínas, além disso muitos estudos evidenciam as mais diversas atividades biológicas das quinonas, como atividades antitumoral (MULLER et al., 1985; COSTA-LOTUFO et al., 2002; ASCHE, 2005), anti-inflamatória (FERRÁNDIZ et al., 1994), antibiótica (HARTLEY; RESZKA; LOWN, 1988; COZZOLINO et al., 1990; KOYAMA, 2006;), antimalária (LIN et al., 1991; SILVA et al., 2009), antiviral (SARIN et al., 1987), anticoagulante (DOWD; ZHENG, 1995; BELISARIO et al., 1996), entre outras.

3.3 *CORDIA ONCOCALYX* ALLEMÃO

Representando 10% do território nacional, a caatinga é considerada o bioma mais rico do mundo em biodiversidade e o único bioma exclusivamente brasileiro. Das 932 espécies registradas na região, cerca de 380 são endêmicas, destacando-se a *Cordia oncocalyx* Allemão (pau branco) que anteriormente era conhecida cientificamente por *Auxemma oncocalyx* (Allemão) Baill (GUIMARÃES; COELHO; AZEVEDO, 2013). Por apresentar uma diversidade de propriedades químicas, biológicas e farmacológicas as espécies do gênero *Cordia* (*Cordia oncocalyx* e *Cordia glazioviana*) são especialmente incluídas em estudos de produtos naturais (MATIAS et al., 2015).

A *Cordia oncocalyx* é popularmente conhecida como louro-branco, pau branco, pau branco-preto e pau branco-do-sertão (GUIMARÃES; COELHO; AZEVEDO, 2013), sendo descrita pelo médico e botânico Francisco Freire Allemão como uma árvore de pequeno porte, produtora de madeira pesada e de boa qualidade, resistente ao ataque de fungos e cupins, muito utilizada na construção civil, marcenaria e carpintaria, sendo empregada no paisagismo, na ornamentação de praças e avenidas, devido à beleza de suas flores (COSTA et al., 2005; GUIMARÃES; COELHO; AZEVEDO, 2013).

A *Cordia oncocalyx* é uma espécie arbórea, que pode atingir uma altura de aproximadamente 12 m e 45 cm de diâmetro, quando adulta. Seus múltiplos troncos são ramificados com altura do solo de 20 a 30 cm, sendo dicotômica e muito ramificada, com casca externa esbranquiçada e diâmetro de 1 mm a 3 mm e casca interna com coloração bege-clara. As folhas são elípticas, íntegras e serradas do meio até o ápice, oblongas ou oblongo-ovadas, apresentando glândulas salientes em sua face adaxial e esparsas (GOTTSCHING; MILLER, 2006; GUIMARÃES; COELHO; AZEVEDO, 2013).

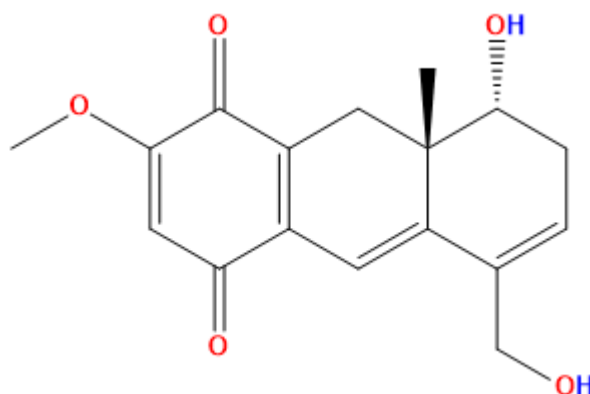
Muitas pesquisas evidenciam as propriedades terapêuticas da *Cordia oncocalyx*, o que atrai bastante interesse no estudo desta planta amplamente utilizada no nordeste brasileiro. Estudos mostraram que o extrato hidroalcoólico do caule da *Cordia oncocalyx* apresentam atividades antitumoral, analgésica, anti-inflamatória e antiplaquetária, sendo esta atividade antiplaquetária confirmada também no extrato metanólico do cerne da planta, apresentando também atividade antioxidante (FERREIRA et al., 1999; REVILLA, 2016). Além disso, uma fração solúvel em água do extrato etanólico obtido do cerne da *Cordia oncocalyx* apresentou-se como um inibidor da agregação plaquetária induzida por colágeno, trombina, ácido araquidônico e adrenalina em plasma rico em plaquetas (FERREIRA et al., 1999), também apresentando propriedade antioxidantes, analgésicas e anti-inflamatórias *in vivo* (FERREIRA et al., 2003; FERREIRA et al., 2004).

Das cascas da *Cordia oncocalyx* pode-se extrair a alantoína que é uma substância com propriedades cicatrizantes, anti-inflamatória e regeneradora de tecidos necrosados (GUIMARÃES; COELHO; AZEVEDO, 2013). Outros metabólitos também já foram isolados do extrato hidroalcoólico da *Cordia oncocalyx*, incluindo o β -sitosterol, quinonas monoterpenoides e hidroquinonas, sendo que o principal composto isolado a OncoA (PESSOA et al., 1995; BARRETO et al., 2013; LOBERMANN; WEISHEIT; TRAUNER, 2013). A OncoA é o principal composto produzido pela *Cordia oncocalyx*, representando 0,13% do extrato bruto, além disso apresenta diversas propriedades terapêuticas, como antiagregantes plaquetários, anti-inflamatória, antitumoral e antioxidante, tornando-a um composto adequado para o desenvolvimento de fármacos (LEYVA et al., 2000; FERREIRA et al., 2003; PESSOA et al., 2004; BARRETO et al., 2013).

3.4 ONCOCALIXONA A

A oncoA [(5r,10as)-5-hydroxy-8-(hydroxymethyl)-3-methoxy-10a-methyl-5,6,10,10a-tetrahydroanthracene-1,4-dione] (Figura 2) é um metabólito secundário, extraído do cerne do caule da planta *Cordia oncocalyx*, (PESSOA et al., 2003; FERREIRA et al., 2004). A OncoA se destaca dentre outros metabólitos da *Cordia oncocalyx* por ser facilmente extraída e devido aos seus mais variados efeitos terapêuticos evidenciados na literatura (PESSOA et al., 2003; FERREIRA et al., 2004; FERREIRA et al, 2008; ILAYARAJA; PRABAKARAN; MANIVANNAN, 2014; MELO et al, 2015; MATOS et al, 2017).

Figura 2 – Estrutura química da oncoA



Fonte: PUBCHEM, 2019

A OncoA apresenta-se como um pó vermelho escuro, cuja massa molar é de 302.326 g/mol, com fórmula molecular $C_{17}H_{18}O_5$. Apresenta restrita solubilidade em água (33,30 mg/dL), com valor de log p de 0,9848, sendo solúvel em solventes orgânicos como metanol, clorofórmio e dimetilsulfóxido (DMSO) (COSTA et al., 2004; ROCHA, 2015; JOSHI et al., 2013; PKCSM, 2019; PUBCHEM, 2019a). De acordo com o estudo eletroquímico da OncoA realizado por Costa e colaboradores (2012), este metabólico apresenta dois grupos carbonil α,β -insaturado, grupos hidroxila nos carbonos C-8 e C-11, demonstrando também ser um agente aceitador de Michael, sendo estes resultados importantes para avaliar possíveis interações da OncoA com o DNA.

Por tratar-se de uma quinona, muito se acredita sobre os efeitos terapêuticos da OncoA. A presença de um sistema aromático nos compostos quinoides os confere atividades terapêuticas incluindo atividade antioxidante (BELISARIO et al., 1992; HOUGHTON et al., 1995), antiagregante plaquetário (TENG et al., 1993; CHUNG et al., 1994), analgésica (ABDEL-FATTAH; MATSUMO; WATANABE, 2000), anti-inflamatória (VAZQUEZ et al., 1996; ODUKOYA; HOUGHTON; RAMAN, 1999) e antitumoral (MORELLO et al., 1995; ITOIGAWA et al., 2000). Segundos estudos *in vitro* e *in vivo*, a OncoA demonstra apresentar atividades antibacteriana (ILAYARAJA; PRABAKARAN; MANIVANNAN, 2014), antifúngica (ILAYARAJA; PRABAKARAN; MANIVANNAN, 2014), antitumoral (PESSOA et al., 2000; LEYVA et al., 2000; PESSOA et al., 2004; SBARDELOTTO, 2013), analgésica (FERREIRA et al., 2004; ILAYARAJA; PRABAKARAN; MANIVANNAN, 2014), anti-inflamatória (FERREIRA et al., 2004; ILAYARAJA; PRABAKARAN; MANIVANNAN, 2014), antiplaquetária (FERREIRA et al., 1999; FERREIRA et al., 2008), antioxidante (FERREIRA et al., 2003), hipoglicemiante (SIVAGNANAM; KALAIVANAN;

RAJAMANICKAM, 2013), anti-glicação (MELO et al., 2015), neurogênica (MATOS et al., 2017) e leishmanicida (VIANA et al., 2015).

3.4.1 Métodos de quantificação da OncoA

COSTA e colaboradores (2004) conseguiram identificar e quantificar a OncoA por técnica validada para a quantificação de frações quinonas presentes no extrato etanólico da planta *Auxemma glazioviana*, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplado a ultravioleta (UV). Os parâmetros utilizados por COSTA e colaboradores (2004) foram os seguintes: coluna C18, eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min e fase móvel acetonitrila/água (1:1) com absorbância de 280 nm.

Por se tratar de um método inespecífico para quantificação da OncoA, TAVARES e colaboradores (2019) validaram um novo método para quantificação através da técnica de HPLC-UV, buscando obter um método simples, rápido, específico, sensível e robusto para a quantificação da OncoA em formulações farmacêuticas.

De acordo com o estudo de TAVARES e colaboradores (2019) os melhores parâmetros para quantificação da OncoA por HPLC-UV são coluna C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm), fluxo de 0,7 mL/min⁻¹, eluição isocrática com fase móvel acetonitrila/água acidificada (ácido trifluoroacético 0,05%, pH= 3) com proporção 30:70 (v/v), temperatura à 25°C e absorbância de 283 nm.

3.4.2 Atividade antiproliferativa

Por apresentar um complexo de anel aromático planar, policíclico e grupos hidroxilas, sendo estas características essenciais dos agentes intercalantes de DNA, acredita-se que a OncoA apresenta atividade de inibição do crescimento celular por ligar-se ao DNA através de ligações de pontes de hidrogênio (COSTA et al., 2012; JOSHI et al., 2013). Com isso, muitos estudos investigam a atividade antiproliferativa da OncoA (SBARDELOTTO, 2013).

Buscando avaliar a atividade antiproliferativa da OncoA em células de linhagem leucêmicas (HL-60), SBARDELOTTO (2013) observou atividade citotóxica da OncoA nas células leucêmicas que induz alterações bioquímicas levando a células ao processo de apoptose. O estudo também identificou redução na viabilidade celular de maneira dose-dependente, induzindo mudanças morfológicas das células leucêmicas quando há concentrações elevadas do fármaco, com isso induzindo a célula a apoptose. Quanto a

integridade celular, o autor comparou os resultados da OncoA com a doxorubicina, que é um quimioterápico amplamente utilizado para o tratamento de diversos cânceres, observando que nas concentrações de 8, 16,5 e 33 μM a OncoA reduziu a integridade da membrana plasmática em 86,3%, 64,1% e 10,6% respectivamente, enquanto a doxorubicina reduziu 34,95%.

A OncoA parece apresentar uma seletividade pelas células na fase S do ciclo celular e induz redução de células presentes na fase G_2/M do ciclo celular em concentrações de 16,5 $\mu\text{g/mL}$ e 33 $\mu\text{g/mL}$, resultados diferentes dos apresentados pela doxorubicina que reduziu o número de células em G_0/G_1 e em G_2/M (SBARDELOTTO, 2013).

PESSOA e colaboradores (2004) avaliaram também a atividade da OncoA frente as células leucêmicas (linhagem CEM), como também em células de pulmão (linhagem SW1573). Os resultados mostraram alta atividade da OncoA sobre as células leucêmicas em comparação com seus derivados (6-Cloro-oncocalixona A, 8-O-Acetil-oncocalixona A e 8,11-O-Diacetil-oncocalixona A), com IC_{50} de $1,4 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$. Já em relação as células de câncer de pulmão, verificou-se atividade citotóxica com um valor de IC_{50} de $4,9 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$, podendo esse efeito estar relacionado a possíveis danos no DNA.

3.4.3 Toxicidade da OncoA

Os estudos de dose letal média (DL_{50}) permitem determinar a concentração de uma substância capaz de produzir a morte de 50% dos animais tratados de um grupo experimental (HAYES, 2007). O estudo de toxicidade oral aguda realizado por COSTA (2016), em camundongos Swiss fêmeas mostraram que a OncoA pode induzir dano glomerular e tubular, como também induz a produção de infiltrado inflamatório em análise histológica do tecido renal de ratos, podendo estar relacionado ao estresse oxidativo induzido pela OncoA.

Buscando avaliar também a toxicidade pulmonar, COSTA (2016) identificou, a partir da histologia de tecido pulmonar de camundongos Swiss fêmeas, que a OncoA pode induzir a hemorragia alveolar, infiltrado inflamatório, hiperplasia do BALT e atelectasia alveolar, sendo essa toxicidade comum a compostos pertencentes a classe das quinonas. Outra toxicidade importante, muito comum em antraquinonas, como por exemplo doxorubicina, daunorubicina e epirubicina, estão relacionados a produção de espécies reativas de oxigênio devido a reações redox, como também na formação de complexos com proteínas envolvidas no metabolismo de ferro (SIMUNEK et al., 2009; ICHIKAWA et al., 2014). Além disso, os derivados quinonas podem induzir a cardiomiopatia e isquemia ou alterações na pressão

arterial (ADÃO et al., 2013). Quanto aos estudos de cardiotoxicidade da OncoA, COSTA (2016) observou a presença de áreas de necrose, infiltrado inflamatório, edema e congestão vascular no tecido cardíaco de camundongos Swiss fêmeas, além da OncoA induzir a redução na pressão arterial média de ratos Wistar machos, normotensos, anestesiados.

Quanto a genotoxicidade, PESSOA e colaboradores (2003) demonstraram citotoxicidade da OncoA nas fases G₁, G₁/S e S do ciclo celular, mas não identificando efeito genotóxico em nenhuma das fases do ciclo celular na dosagem administrada (0,5 µg/mL).

Os efeitos tóxicos da OncoA são importantes e limitam a sua utilização na clínica, sendo necessário a inserção de tecnologias que permitem a redução da toxicidade. A tecnologia farmacêutica apresenta várias formas farmacêuticas, incluindo nanossistemas como lipossomos, nanoemulsões, nanopartículas de polímeros, micelas, entre outras que permitem uma liberação controlada do medicamento, além de direcionar seu mecanismo a sítios-alvo com consequente redução de sua toxicidade (SIEPMANN et al., 2019).

3.5 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

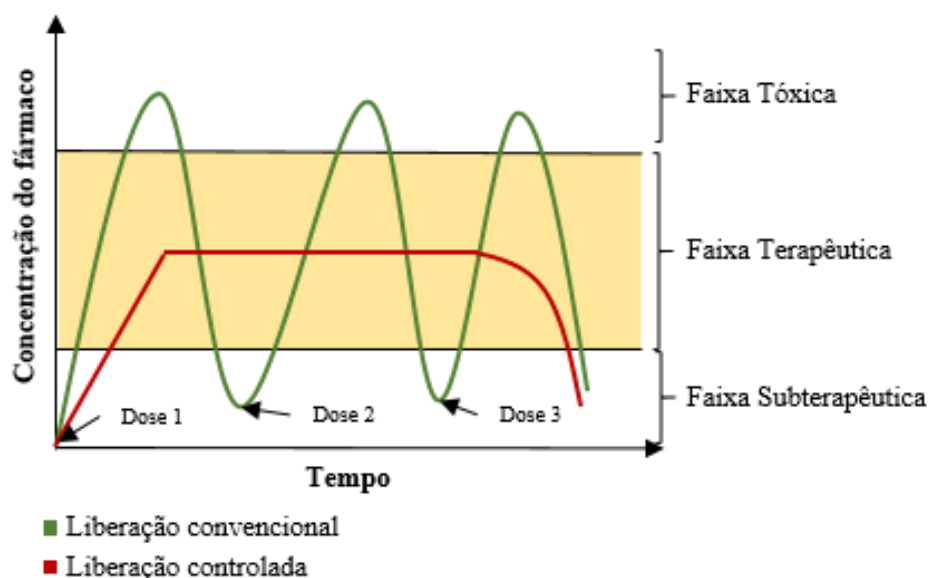
Considerada uma das técnicas mais inovadoras do século XXI, a nanotecnologia permite analisar as propriedades físico-químicas de materiais em escala nanométrica. Com ampla exploração em setores industriais e de produção, a nanotecnologia pode fornecer soluções importantes para a área farmacêutica na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças, proporcionando mais segurança para o profissional de saúde e para os pacientes (LESO; FONTANA; LAVICOLI, 2019).

A nanotecnologia farmacêutica é uma área das ciências farmacêuticas envolvidas no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas de entrega e liberação controlada de fármacos, em que o encapsulamento pode permitir a liberação do fármaco de acordo com alguns estímulos como pH e temperatura. Além disso pode-se acoplar proteínas, polissacarídeos, anticorpos, dentre outros componentes presentes nos organismos que permitem o direcionamento desses sistemas a sítios-alvo, potencialização do efeito do fármaco e uma redução em sua toxicidade, também permitindo o aprimoramento de propriedades do fármaco como aumentar a sua solubilidade e biodisponibilidade (KUMAR, 2010; ALEXANDER et al., 2016).

A liberação controlada do fármaco faz com que a concentração plasmática dele se mantenha dentro da faixa terapêutica, evitando que sejam atingidas concentrações subterapêuticas e por possibilitar um menor acúmulo de fármaco evita que também sejam

alcançadas as doses consideradas tóxicas (Figura 3). Com a liberação controlada de fármacos torna-se possível a diminuição do número de doses do medicamento, além disso reduz seus efeitos adversos e melhora a eficácia terapêutica (TORCHILIN, 2007).

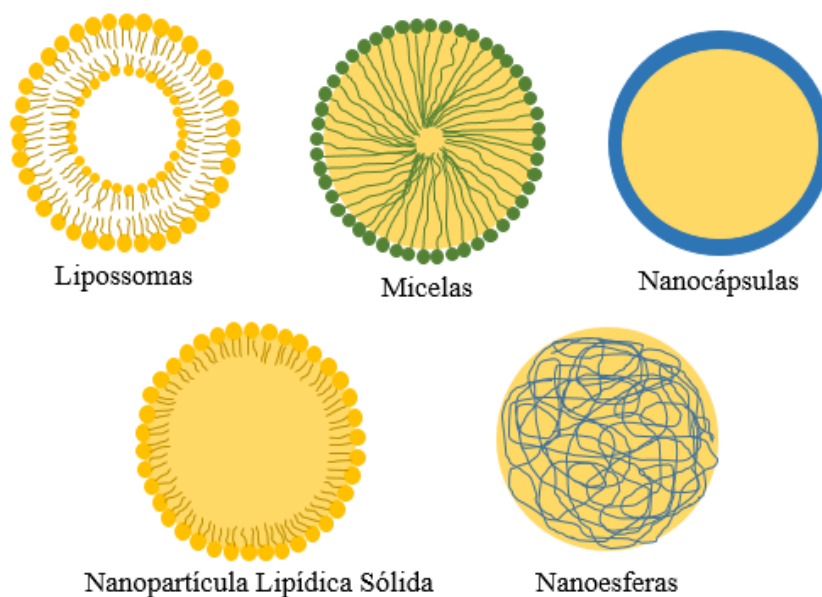
Figura 3 – Esquema representativo da liberação convencional e controlada de fármacos



Fonte: Criado por CAVALCANTI, 2020

São várias as formas de apresentação dos nanossistemas (Figura 4) que podem ser desenvolvidas como lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, micelas, nanopartículas de polímeros biodegradáveis, dentre outras, permitindo o encapsulamento de fármacos com características hidrofílicas e hidrofóbicas. Os lipídios e polímeros utilizados para obtenção desses sistemas de liberação devem apresentar afinidade entre o fármaco que se quer encapsular, além de ser biodegradáveis e biocompatíveis (MEI et al., 2013; ALEXANDER et al., 2016).

Figura 4 – Principais nanossistemas utilizados para o encapsulamento de fármacos



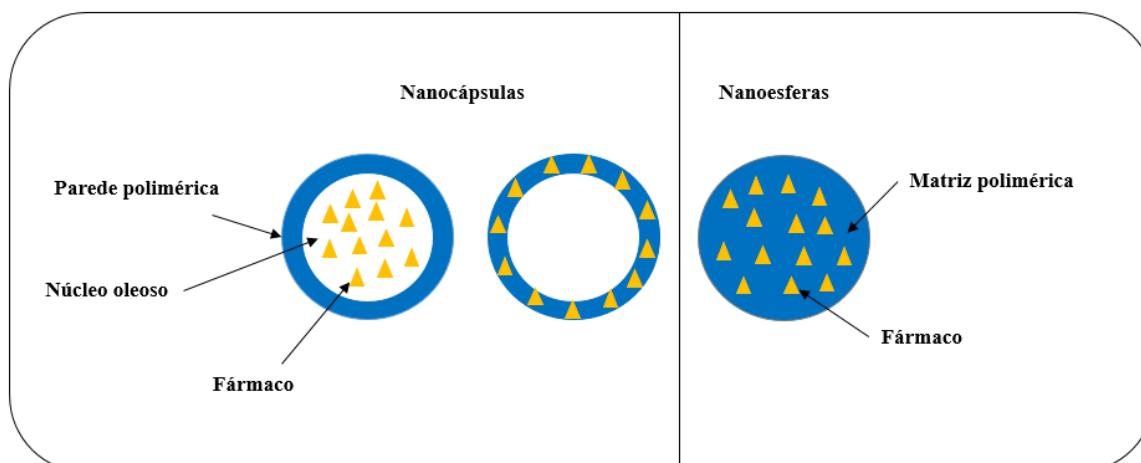
Fonte: Criado por CAVALCANTI, 2020.

Os nanossistemas podem apresentar maior eficiência de encapsulação e liberação controlada quando comparados com os sistemas convencionais, também são de fácil administração por possuírem tamanho nanométrico, podendo serem aplicadas diretamente no sistema circulatório, como também por via oral, nasal, pulmonar e transcutânea (PIMENTEL et al., 2007; ALVEZ; MARTINS; SANTANA, 2008).

3.6 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas poliméricas são nanossistemas constituídos de polímeros biodegradáveis que apresentam tamanho inferior a 1 micrometro, podendo ser classificadas em nanocápsulas e nanoesferas (Figura 5). As nanocápsulas são constituídas por um núcleo oleoso revestindo uma parede polimérica, no qual o fármaco pode se apresentar dissolvido no núcleo e/ou adsorvido na parede polimérica, enquanto que as nanoesferas não apresentam óleo em sua formulação, sendo formadas por uma matriz polimérica em que o fármaco pode encontra-se retido e/ou adsorvido a matriz polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

Figura 5 – Representação estrutural de nanocápsulas e nanoesferas



Fonte: Criado por CAVALCANTI, 2020.

A liberação do fármaco a partir das nanopartículas poliméricas é alcançada pela regulação das taxas de biodegradação do polímero e difusão do fármaco fora da matriz polimérica. Por isso os principais componentes utilizados para a formulação das nanopartículas poliméricas são os polímeros, que podem ser de origem natural ou sintéticos, ao qual dependem fortemente da sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Os polímeros naturais mais utilizados são o alginato de sódio, albumina, quitosana e gelatina, enquanto que os polímeros sintéticos mais comuns são polilactídeos (PLA), poli(lactídeo co-glicolídeos) (PLGA), poliglicólicos (PGA), poli (metil metacrilato) (PMMA), poli (*N*-vinil pirrolidona) (PVP), poli (álcool vinílico) (PVA), poliacrilamida (PAM), polietilenoglicol (PEG), policianoacrilatos, entre outros (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

Estas nanopartículas permitem aplicações terapêuticas como veículos de fármacos, proteínas e antígenos para administração oral, tópica, injetável, parenteral, oftálmica, implantes e sistemas bioadesivos. Vários métodos podem ser empregados para a formulação das nanopartículas poliméricas sendo os principais a polimerização em emulsão, polimerização interfacial e a precipitação de polímero pré-formado. Independentemente do método de preparação empregado serão obtidas suspensões coloidais aquosas (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; CRUCHO; BARROS, 2017).

3.6.1 Mecanismos de polimerização

FLORY (1953) classificou os mecanismos de polimerização em dois grupos: polimerização em etapa e polimerização em cadeia. Caracterizada por sucessivas reações

entre grupos funcionais reativos presentes em monômeros, a polimerização em etapas necessita de um longo período de tempo para se realizar, não necessitando de iniciadores promovedores da reação. Já a polimerização em cadeia precisa de um agente iniciador com o objetivo de formar um centro ativo que inicia e propaga a polimerização rapidamente, geralmente por aquecimento (MANO; MENDES, 2004; ODIAN, 2004).

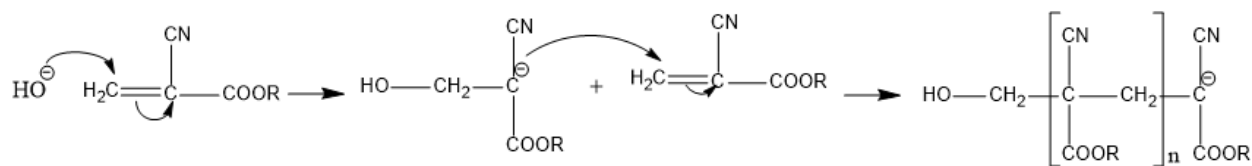
Para promover a polimerização em cadeia o método mais empregado é a polimerização via radicais livres, que se baseia na adição de agente iniciadores que irão promover a formação de radicais livres a partir da sua decomposição. Os sistemas radicalares podem ser sistemas homogêneos, polimerização em massa e em solução, ou sistemas heterogêneos, polimerização em suspensão e em emulsão (MANO; MENDES, 2004; ODIAN, 2004).

A polimerização em massa é um método simples que utiliza um monômero e iniciador de radicais livres sem adição de solvente, em que a reação é iniciada com aquecimento não ocorrendo a formação de um subproduto. A reação é verificada pelo aumento da viscosidade do meio, sendo este um dos principais problemas desse método, pois com o aumento da viscosidade há uma redução da movimentação das moléculas no meio e com isso afetando o processo de polimerização. A polimerização em solução utiliza solvente, o que permite controlar as condições da reação. O solvente deve ser miscível nos outros reagentes (monômero e iniciador), contudo a adição do solvente pode causar perda de produtividade e maior custo para purificação, além de serem tóxicos e ambientalmente incorretos (MORAES, 2013; CUNHA, 2018).

Compreendendo os sistemas heterogêneos, a polimerização em suspensões apresenta duas fases imiscíveis, objetivando manter as propriedades do polímero e facilitar o controle da reação. O monômero e o iniciador são inseridos na fase orgânica e dispersos em fase aquosa na presença de um agente de suspensão que tem o objetivo de estabilizar a dispersão. A agitação do sistema é um fator importante para a formação e dispersão de pequenas gotas do monômero (CUNHA, 2018).

Semelhante ao método de polimerização em suspensão, a polimerização em emulsão (Figura 6) difere pelo fato do iniciador ser miscível na fase aquosa, ao invés de ser solubilizado no monômero, além de promover a transferência de massa resultante da adição de um agente emulsificante na fase aquosa que leva a formação de micelas a partir da degradação do agente iniciador e pela formação dos radicais livres que são capturados pelas micelas e inchadas pela ação do monômero, com isso levando a formação das nanopartículas poliméricas (CUNHA, 2018).

Figura 6 – Representação química da polimerização aniônica do alquilcianoacrilato



Fonte: Adaptado de GALLARDO e colaboradores (1993)

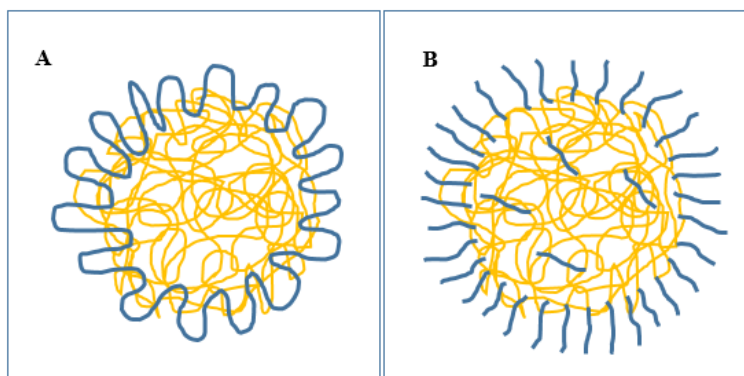
As nanopartículas obtidas irão depender do método de preparo escolhido, em que os métodos de polimerização de monômero ganham destaque por ser simples, podendo ser utilizado no preparo de nanocápsulas, através do método de polimerização interfacial ou no preparo de nanoesferas, através dos métodos de polimerização em emulsões (TAVARES, 2013; PALAZZO et al., 2017).

3.6.2 Nanopartículas obtidas por polimerização de alquilcianoacrilatos

Para a formulação de nanopartículas por polimerização *in situ* é necessário a presença de um monômero, que é adicionado a emulsão, em que o polímero é formado por polimerização para dar origem as nanopartículas. São poucos os monômeros utilizados para obtenção das nanopartículas por polimerização, sendo os derivados de alquilcianoacrilatos os mais utilizados, possibilitando a encapsulação de fármacos hidrofílicos ou lipofílicos (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

A maioria das nanoesferas e nanocápsulas de poli-alquilcianoacrilatos (figura 7) são obtidas por polimerização aniônica do monômero correspondente, que é espontaneamente iniciado por grupos hidroxilas advindos da água ou por qualquer grupo nucleofílico encontrado na molécula dissolvida no sistema de polimerização. As emulsões utilizadas para produzir nanoesferas encontram-se em condições ácidas para retardar a taxa de polimerização aniônica e permitir que as nanoesferas se formem ao invés de agregados de polímeros. São necessários meios de polimerização com ácidos fortes para iniciar a polimerização de radicais redox utilizando um par redox incluindo cério IV e polissacarídeos, em que a polimerização é iniciada na extremidade da cadeia do polissacarídeo (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

Figura 7 – Estrutura de nanoesferas obtidas pelas técnicas de polimerização por emulsão aniônica (A) e por emulsão de radicais redox (B)



Fonte: Criado por CAVALCANTI, 2020.

3.6.3 Nanopartículas de Poli-isobutilcianoacrilato

O poli-isobutilcianoacrilato é um monômero derivado do alquilcianoacrilato que vem sendo utilizado no preparo de nanopartículas com grande potencial como sistema de liberação de fármacos. Desde 1966, que os monômeros derivados do alquil-cianoacrilatos, vem sendo utilizados, devido suas propriedades adesivas, destacando-se em produtos de aplicação médica (OOWAKI et al., 2000; REECE; MAXEY; KRON, 2001).

Em 1979, COUVREUR e colaboradores (1979) desenvolveram uma técnica simples para a produção de nanopartículas matriciais obtidas a partir de metil-cianoacrilato e etil-cianoacrilato, no qual o método consistia no gotejamento do monômero, em solução de HCl, com pH entre 2 a 3, contendo tensoativo não-iônico ou macromolecular, em agitação vigorosa, obtendo nanopartículas com tamanhos que variam entre 100 a 200 nm (DOUGLAS; ILLUM; DAVIS, 1985; NICOLAS; COUVREUR, 2009).

Desde a descoberta de COUVREUR e colaboradores (1979) as nanopartículas com derivados do alquil-cianoacrilatos vem sendo estudados como sistemas de liberação de inúmeros agentes farmacológicos, como também de moléculas de baixo peso molecular, proteínas, peptídeos e DNA (HUANG; CHEN; LEE, 2009; REN et al., 2011). Esses sistemas nanoestruturados são formados a partir de monômeros biocompatíveis e biodegradáveis, sendo a sua principal vantagem, além de apresentarem um método de preparação simples e com possibilidade de transposição para escala industrial (BEHAN; BIRKINSHAW; CLARKE, 2001; VAUTHIER et al., 2003).

A biodegradação dos polímeros sintéticos é um fator importante, por ser necessária para assegurar que o fármaco será liberado e evitar a acumulação do polímero no organismo e desencadear efeitos tóxicos. No caso do poli(n-butil-cianoacrilato) sua degradação ocorre através da hidrólise dos grupos alquil devido a ação das esterases, aumentando a hidrofilicidade do polímero até ele se tornar totalmente solúvel em água (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009).

3.6.4 Purificação das nanopartículas obtidas por polimerização

Após a obtenção das dispersões de nanopartículas é necessário realizar o processo de purificação para remoção das impurezas e excesso de reagentes envolvidos durante a formulação. De acordo com o método de preparação as impurezas podem ser: solventes orgânicos, óleo, surfactantes, monômeros residuais, iniciadores de polimerização, sais e grandes agregados poliméricos. A purificação faz-se necessário para obter dispersões de nanopartículas que possam ser administradas *in vivo* por via específica (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

Vários métodos podem ser empregados para purificação das dispersões de nanopartículas, incluindo a evaporação sob pressão reduzida, centrifugação, técnicas de ultracentrifugação (LAMBERT et al., 2000; BOUCHEMAL et al., 2004), filtração através de malha ou filtros (MURAKAMI et al., 1999; GOVENDER et al., 1999), diálise (CHAUVIERRE et al., 2003; OSUNA et al., 2006), filtração em gel (BECK; SCHERER; KREUTER, 2008), ultrafiltração, diafiltração (TISHCHENKO et al., 2001; TISHCHENKO et al., 2003), microfiltração de fluxo cruzado (GUERRERO et al., 1998; LIMAYEM; CHARCOSSET; FESSI, 2004) e diálise (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

A técnica de evaporação sob pressão reduzida é a mais comumente empregada para remover grandes quantidades de solventes orgânicos voláteis, usualmente utilizado na purificação de suspensões de nanopartículas por nanoprecipitação, emulsificação e policondensação interfacial combinada com emulsificação espontânea (BOUCHEMAL et al., 2004; LEGRAND et al., 2007; CHÉCOT, et al., 2008). Já a técnica de filtração através da malha ou filtros geralmente são aplicadas na remoção de partículas grandes ou agregados de polímeros que são formados durante o processo de preparação das nanopartículas (MURAKAMI et al., 1999; GOVENDER et al., 1999).

Quanto a técnica de centrifugação, não é um método muito adequado por não garantir a eliminação de todo o material não reativo, por aplicar baixa força de gravidade, permitindo a

remoção apenas de agregados e partículas grandes na maioria das suspensões de nanopartículas poliméricas. Esta técnica não é indicada na purificação de nanopartículas com alta densidade por sedimentarem junto com os agregados. O método de ultracentrifugação apresenta-se mais adequado, em que as nanoesferas e nanocapsulas irão se concentrar no sedimento e o meio dispersante pode ser removido e substituído por um meio isento de impurezas. A desvantagem é que as nanoesferas nem sempre são fáceis de redispersar após a ultracentrifugação, necessitando muitas vezes do uso de vórtices ou ultrassons (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

Outra técnica de purificação é a diálise, que pode ser realizada utilizando diferentes membranas de celulose, ao qual permite a remoção de substâncias com baixo ou alto peso molecular, que irão se difundir em direção ao meio de contra-diálise devido ao gradiente de concentração dos solutos. Trata-se de um método simples, mas que pode levar a liberação de nanopartículas durante o longo período de diálise, além de apresentar um alto risco de contaminação microbiana (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). Em contra partida, a filtração de fluxo cruzado com a utilização de uma membrana de microfiltração, permitem a purificação das nanopartículas em menos de 3 horas, requerendo poucas manipulações, sendo mais eficiente que a técnica de diálise. Um dos problemas apresentados pela técnica de filtração por fluxo cruzado é a formação de aglomerados devido a suspensão coloidal ser pressionada através da membrana de filtração, em que esse problema pode ser corrigido com a utilização de membranas hidrofílicas ou usando a técnica de diafiltração com sucção (MADAENI; FANE, 1996; TISHCHENKO et al., 2003; LIMAYEM; CHARCOSSET; FESSI, 2004).

A filtração em gel, é outra técnica de purificação, mais rápida do que as técnicas baseadas em diálise simples, porém o volume da amostra que pode ser purificado é limitado, além de possibilitar a adsorção irreversível de ativos na fase estacionária da coluna e apresentar uma baixa resolução entre nanopartículas pequenas e grandes impurezas, com isso restringindo o uso desta técnica (BECK; SCHERER; KREUTER, 1990).

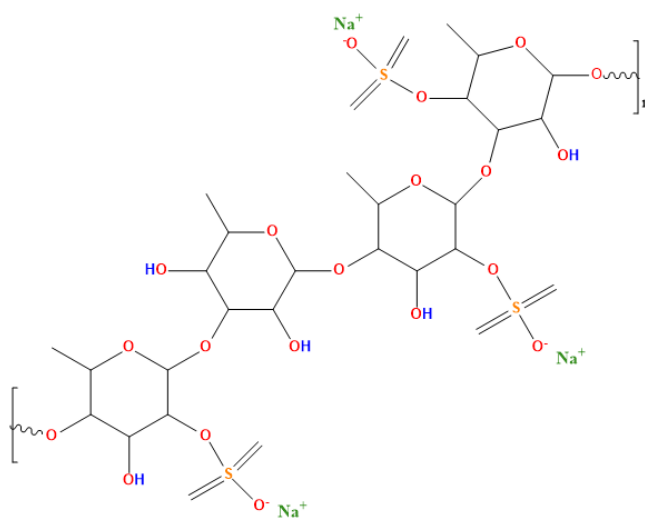
3.7 FUCANA

Os polissacarídeos são estruturas formadas por longas cadeias de unidades de monossacarídeos unidos por ligação glicosídica, apresentando baixo custo e podendo ser facilmente encontrado na natureza. São compostos quimicamente estáveis, não-tóxicas e biodegradáveis podendo ser utilizados no desenvolvimento de sistemas de liberação

controlada (SINHA; KUMRIA, 2001). São encontrados e extraídos de plantas, microrganismos, algas e animais. Os polissacarídeos apresentam uma grande diversidade em sua estrutura química, uma variedade de pesos moleculares podendo apresentar carga positiva, negativa e neutra, atraindo o interesse de muitos pesquisadores por permitir uma ampla utilização (SINHA; KUMRIA, 2001; LIRA, 2009).

A fucana é um polissacarídeo sulfatado (Figura 8) amplamente encontrado na parede celular de algas marrons e invertebrados marinhos, muito estudada devido ao seu amplo espectro de funções biológicas, como efeitos anticancerígenos (KWAK, 2014; PALANISAMY et al., 2017), antioxidantes (QU et al., 2014), anti-inflamatórios e anticoagulantes (KIM et al., 2007; ZAYED et al., 2016), ganhando destaque como um candidato a fármaco natural com menos efeitos colaterais (FITTON; STRINGER; KARPINIEC, 2015).

Figura 8 – Estrutura química parcial da fucana



Fonte: Criado por CAVALCANTI, 2020.

As atividades biológicas da fucana estão relacionadas com estrutura química, grau de sulfatação e com o peso molecular, sendo geralmente heterogêneas e ramificadas, podendo se apresentar como homopolissacarídeo, ou seja, apresenta unicamente unidades de monossacarídeos de fucose com grupos sulfato; ou heteropolissacarídeos como macromoléculas contendo diferentes monossacarídeos, tais como a manose, glicose, galactose, ácidos urônicos, arabinose e xilose, além da fucose (SANJEEWA et al., 2017; ZAYED; ULBER, 2019).

Diversos estudos que evidenciam as propriedades anticancerígenas da fucana mostram resultados interessantes, com grande potencial para o desenvolvimento de fármacos para alguns tipos de câncer além de doenças inflamatórias, como também para serem projetados como compostos funcionais (nutracêuticos, alimentos funcionais ou cosmecêuticos). Alguns estudos indicam que a fucana com baixo peso molecular é biologicamente mais ativa que a fucana de alto peso molecular e que a presença dos grupos sulfato é o que mantém a atividade anticancerígena da fucana (SANJEEWA et al., 2017; ZAYED; ULBER, 2019).

No estudo de CHOI e KIM (2013) foi possível evidenciar a importância dos grupos funcionais na fucana de baixo peso molecular, quando os autores compararam os efeitos da fucana obtido por irradiação gama e da fucana nativa, demonstrando que a fucana de baixo peso molecular obtida por irradiação gama apresenta melhor citotoxicidade para as células cancerígenas e atividade inibitória contra a transformação celular em células de câncer de mama (linhagem MCF-7), células de estômago (linhagem AGS) e células de câncer de fígado (linhagem HepG2). Além disso CHEN e colaboradores (2015) e CHEN e colaboradores (2016) relataram que a fucana de baixo peso molecular isolado de diferentes algas marinhas apresenta efeitos de supressão do tumor.

Estudos também evidenciaram que a fucana induz apoptose em células cancerígenas mediada pela via serina/treonina PI3K/Akt importante via de sinalização celular responsável por regular o crescimento celular e a sobrevivência celular (BOO et al., 2013; CHEN et al., 2016). O estudo de YAN e colaboradores (2015) identificaram que a fucana induz a expressão do microRNA miR-29b, sendo este importante para a prevenção do câncer por regular a apoptose, ciclo celular, modificações epigenéticas e inibição de metástases. Já YAN e colaboradores (2013) observaram que o efeito anticancerígeno da fucana é acompanhado pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, induzindo dano oxidativo mitocondrial, despolarização do potencial da membrana mitocondrial e liberação de citocromo c e ativação da caspase-3 e caspase-9.

Além de atuar sobre diversos mecanismos de apoptose, a fucana também inibe a progressão do ciclo celular em células cancerígenas, evidenciado pelo estudo de PARK e colaboradores (2014) que avaliou os efeitos da fucana sobre células T-24 do câncer de bexiga, mostrando que este composto induz parada da fase G1 nas células do câncer de bexiga. Estudos também evidenciam que a fucana ativa respostas inflamatórias em células cancerígenas (CHEN et al., 2016), atuam também na inibição do potencial de angiogênese (CHEN et al., 2015), além de potencializar os efeitos dos agentes antineoplásicos convencionais (ZHANG et al., 2013; CHEN et al., 2016).

Com isso, a encapsulação da OncoA em nanopartículas de PIBCA revestidas com fucana pode possibilitar a potencialização do efeito terapêutico e reduzir a toxicidade da OncoA. Além disso, pode melhorar as características biofarmacêuticas, permitindo a veiculação da oncoA por via oral e/ou intravenosa. Assim, nesse trabalho propomos a encapsulação da OncoA em nanopartículas e avaliação da sua atividade antiproliferativa frente a células da linhagem MDA-MB-231.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

O poli(isobutilcianoacrilato) (PIBCA) foi obtido da Henkel Biomedical (Dublin, Irlanda). A OncoA foi extraída e isolada da planta *Cordia Oncocalyx* (FERREIRA et al., 2003), no qual a coleta e purificação foi realizada no laboratório da Profa. Dra. Otília Pessoa da Universidade Federal do Ceará. A fucana foi extraída e purificada da alga *Fucus vesiculosus* e gentilmente cedida pela Profa. Dra. Mariane Lira da Universidade Federal de Pernambuco.

4.2 PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PIBCA REVESTIDAS COM FUCANA CONTENDO OncoA

As nanopartículas foram preparadas através do método de polimerização em emulsão aniônica (AEP) in situ, na proporção de fucana, PIBCA e OncoA de 79:12:9 (LIRA et al., 2011). Primeiramente 50 mg de fucana (pertencente a espécie de alga *Fucus vesiculosus*) foi solubilizada em 5 mL de água ultrapura (Milli Q[®], Millipore, USA) e o pH corrigido para 2,5 com HCl (1M). Em seguida, a solução de fucana permaneceu sob agitação magnética com velocidade constante (1200 rpm), sendo adicionado logo em seguida 50 µL de Isobutil cianoacrilato (IBCA). A agitação foi mantida por 3 horas, em temperatura ambiente, para obtenção das nanopartículas de PIBCA revestidas com fucana (NP-Fuc). No caso das nanopartículas de PIBCA revestidas com fucana contendo OncoA (OncoA-NP-Fuc) e das nanopartículas de PIBCA revestidas com fucana contendo Rodamina (Rodamina-NP-Fuc), foram obtidas seguindo a metodologia acima citada, em que 50 mg da fucana foi diluída em 4,5 mL de água ultra pura, após 5 minutos da adição do IBCA, foram inseridos 500 µL de solução contendo OncoA ou Rodamina na concentração de 5 mg/mL com solução de acetonitrila:água (50:50 v/v) e mantido em agitação por 3 horas.

4.2.1 Purificação das nanopartículas

As nanopartículas de PIBCA foram purificadas pelo método de diálise (LIRA et al., 2011). Inicialmente, as dispersões foram inseridas em membrana de diálise (Spectra-por[®] membrane 100.000 g/mol molecular weight cutoff, Biovalley, Marne la Vallée, France) e a

membrana adicionada em 1 L de água ultrapura (Milli Q[®], Millipore, USA), sendo a água trocada 3 vezes com intervalos de 30 minutos, em seguida o sistema mantido sob agitação a 300 rpm overnight.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.3.1 Tamanho e carga de superfície das nanopartículas

O tamanho e o índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas foram analisados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malver Instruments Ltd, USA). As medições foram feitas com um ângulo fixo de 90°, a temperatura de 25°C. As formulações foram diluídas em água ultrapura (Milli Q[®], Millipore, USA) na proporção de 1:20 v/v, avaliadas em triplicata. Os dados foram expressos pelo valor médio e desvio padrão.

Quanto ao potencial zeta, da carga superficial das nanopartículas, foi medido pelo equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malver Instruments Ltd, USA) a 25°C. As formulações (NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc) foram diluídas com NaCl (1 mM) também na proporção de 1:20 v/v e analisadas em triplicata. Os dados foram expressos pelo valor médio e desvio padrão.

4.3.2 Taxa de encapsulação da OncoA

4.3.2.1 Curva padrão da OncoA

A OncoA nas formulações foi quantificada a partir da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando o equipamento HPLC (Waters Alliance 2695 Separation Module) acoplado a um detector UV/Vis (2489 UV-Vis detector). Primeiramente foi elaborada uma curva padrão da OncoA. Inicialmente, foram pesadas 5 mg de OncoA e diluída em 600 µL de DMSO completando o volume de 10 mL com fase móvel acetonitrila:água acidificada (0,05% ácido trifluoroacético, pH = 3) (30:70 v/v) obtendo uma solução mãe na concentração de 500 µg/mL. As concentrações para obtenção da curva padrão foram 0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg/mL e os parâmetros inseridos no HPLC foram de acordo com o método validado por TAVARES e colaboradores (2019).

4.3.2.2 Quantificação da OncoA em nanopartículas

O doseamento da OncoA nas nanopartículas foi efetuado a partir da diluição de 50 μL da formulação OncoA-NP-Fuc, antes da diálise e pós-diálise, em 600 μL de DMSO, para promover a dissolução das nanopartículas (REQUENA et al., 2008). Em seguida, foram adicionados solução de acetonitrila:água acidificada (0,05% ácido trifluoroacético, $\text{pH} = 3$) na proporção de 30:70 v/v até volume final de 5 mL e quantificado por HPLC-UV utilizando método validado por TAVARES e colaboradores (2019). O valor da concentração obtida antes da purificação foi considerado, como sendo 100% da concentração da OncoA na formulação e o valor obtido pós-purificação foi considerado o valor total da concentração da OncoA encapsulado nas nanopartículas de PIBCA revestidos com fucana. Com a diferença da concentração antes e pós purificação foi possível obter a taxa de encapsulação da OncoA.

4.3.3 Análise morfológica

Para análise morfológica das nanopartículas foi utilizado a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As formulações NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc foram diluídas em água ultrapura (Milli Q®, Millipore, USA) na proporção de 1:10 v/v. Em placa de silício, as nanopartículas foram espalhadas e mantidas em dessecador a temperatura ambiente por 24 horas. Após secagem, o wafer de silício foi fixado em stubs contendo fita de carbono e metalizados com ouro e paládio com a utilização do metalizador (FINE COAT, ION SPUTTER JFC-1100) e observadas no microscópio eletrônico de varredura (TESCAN, MIRA3). As análises foram realizadas nos Laboratórios de Microscopia Eletrônica do LIKA e no Departamento de Física, ambos da Universidade Federal de Pernambuco.

4.3.4 Análise espectroscópica

Os espectros de infravermelho da OncoA, bem como das formulações (NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc) e da mistura física da NP-Fuc e OncoA foram obtidos por meio da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) na região de 4000-400 cm^{-1} usando o equipamento FT-IR/FT-NIR (PerkinElmer, Spectrum 400) à temperatura ambiente. Os espectros foram adquiridos com uma resolução de 4 cm^{-1} e 20 scans/minuto. Os resultados foram processados no Software Origin 8 (OriginLab Northampton, USA). As análises foram realizadas no Laboratório de Combustíveis da Universidade Federal de Pernambuco.

4.3.5 Análise de difração de raios X por energia dispersiva

As análises de raio X por energia dispersiva (EDX) foram efetuadas para investigar a presença de enxofre nas amostras (OncoA, NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc), utilizando espectrômetro de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDX – 7000/8000, Shimadzu, Japão), no Laboratório de Tecnologia de Nanossistemas Carreadores de Substâncias Ativas (TECNANO) da Universidade Federal de Alagoas.

4.3.6 Análise térmica

As curvas termogravimétricas (TG) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) (PERKIN ELMER, STA 6000) da OncoA e das nanopartículas NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc, como também da mistura física (NP-Fuc + OncoA) foram obtidas a partir da análise térmica simultânea. Em cadinhos de alumínio, foram inseridos 5 mg das amostras, selados e analisados a partir da temperatura de 25°C a 500°C, usando taxa de aquecimento de 10 °C/min. Os resultados foram processados no Software Origin 8 (OriginLab Northampton, USA). As análises foram realizadas no Laboratório de Polímeros e Nanoestruturas da Universidade Federal de Pernambuco.

4.4 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram conservadas em geladeira à temperatura de 4°C para avaliar a sua estabilidade a longo prazo. As nanopartículas foram acompanhadas durante 7 meses, e em cada mês foram verificados parâmetros físico-químicos como tamanho e carga de superfície.

4.4.1 Estabilidade das nanopartículas em diferentes pH

A estabilidade das NP-Fuc foi avaliada em fluidos biológicos simulados: gástrico, intestinal e sanguíneo, sendo preparadas de acordo com o estudo de REZAEI e NASIRPOUR (2019). Resumidamente, foi preparado uma solução de tampão fosfato (pH 7,4), em que uma parte dessa solução foi utilizada como solução de pH 7,4 (pH sanguíneo) e a outra foi adicionado solução de HCl (1 M) para obter um pH 1,2 (pH gástrico). Enquanto para a obtenção da solução de pH 6,8 (pH intestinal) foram preparadas soluções de fosfato de

potássio monobásico e de hidróxido de sódio (0,2 M) e adicionado água ultrapura (Milli Q[®], Millipore, USA), com isso obtendo uma solução a pH 6,8. Assim, em 4 eppendorfs separadamente foram adicionados 750 µL de solução pH 1,2; 6,8 e 7,4 contendo 250 µL da formulação (NP-Fuc). O material permaneceu sob agitação (70 rpm) à temperatura de 37°C por 2 horas. As amostras foram retiradas em intervalos de 30 minutos, sendo 4 amostras referentes a cada grupo. De cada amostra foram retirados 200 µL e diluído em 800 µL de água ultrapura (Milli Q[®], Millipore, USA) para avaliar o diâmetro das partículas e diluída em 800 µL de NaCl (1 mM) para avaliar o potencial zeta, sendo as análises realizadas em triplicata e expressas a partir do seu desvio padrão.

4.5 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE SANGUÍNEA: POTENCIAL HEMOLÍTICO

De um adulto saudável voluntário, foram coletados 4 mL de sangue em tubo heparinizado e diluído com 5 mL de tampão fosfato (pH 7,4) (MOHAMMADI et al., 2019).

O potencial hemolítico das amostras foram analisados de acordo com a metodologia relatada por GOLAFSHAN e colaboradores (2017) e LI e colaboradores (2015). A amostra (NP-Fuc), foi diluída em tampão fosfato (pH 7,4), em diferentes concentrações (330, 160, 80, 40, 20 e 10 µM) e incubadas durante 30 minutos a 37°C. Essas concentrações foram definidas com base na concentração teórica da OncoA encapsulada, visto que o volume de NP-Fuc para administração *in vivo* dependerá da dosagem terapêutica da OncoA. Em seguida, 40 µL de sangue diluído, foram adicionados nas dispersões contendo as NP-Fuc e incubadas por 60 minutos a 37°C. Após esta etapa os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos. A leitura da hemoglobina livre foi realizada a partir de um leitor de microplaca (Thermo Scientific, Multiskan FC)-a 540 nm.

Uma solução contendo 40 µL de sangue diluídos em 2 mL de água destilada foi utilizado como controle positivo e como controle negativo foi utilizado sangue diluído em tampão fosfato (pH 7,4). A porcentagem de hemólise foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Hemólise (\%)} = \left(\frac{\text{amostra} - \text{CN}}{\text{CP} - \text{CN}} \right) \times 100$$

O experimento foi realizado em quadruplicata e os dados foram analisados no software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, Califórnia, EUA). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com o número de CAAE: 25179719.1.0000.5208 (ANEXO A).

4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DE OncoA-NP-Fuc

O estudo de viabilidade celular das formulações foi realizado a partir do uso do reagente brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (LIRA et al., 2011). Células de câncer de mama metastático (MDA-MB-231) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem foi cultivada em garrafas de cultura de células (75 cm²) com meio Leibovitz's L-15 Medium e F-12 Nutrient Mixture na proporção de 1:1 e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina).

As células na oitava passagem, foram cultivadas em placa de 96 poços na concentração de 1×10^4 células/poço e incubadas por 24 horas, a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 horas foram inseridos 100 µL das amostras (OncoA, NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc), diluídas em meio de cultura, nas concentrações de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 e 1.56 µM. O controle utilizado foram células não tratadas, que receberam apenas o meio de cultura. A placa foi incubada por 24, 48 e 72 horas e, em seguida, foram adicionados 20 µL por poço de solução de MTT a 4 mg/mL e as células incubadas novamente por 3 horas. Após formação dos cristais de formazan, observados no controle, o sobrenadante foi removido e adicionados 100 µL de DMSO para dissolução dos cristais de formazan. Os resultados de absorbância foram obtidos com a utilização de um leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan FC) no comprimento de onda de 540 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e os dados analisados no software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, Califórnia, EUA), obtendo os valores de IC₅₀ e os dados estatísticos quanto a análise de variância (ANOVA), com correção de Bonferroni ($P < 0,05$).

4.7 ESTUDO DE MIGRAÇÃO CELULAR

O ensaio de migração celular foi realizado de acordo com os estudos de WU e colaboradores (2014) e FRANCO e colaboradores (2019). Primeiramente as células MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 24 poços, contendo 1×10^5 de células/poço. A incubação foi realizada a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ em meio Leibovitz's L-15 Medium

e F-12 Nutrient Mixture na proporção 1:1 contendo 10% de SFB e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) até confluência de 80-90%. Após adesão celular, a monocamada de célula foi raspada, as células soltas removidas dos poços e os mesmos lavados com PBS. Em seguida, 1 mL de meio de cultura contendo as amostras (OncoA, NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc) nas concentrações de 25 e 3.13 μM foram adicionados. A placa permaneceu em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 , por 24, 48 e 72 horas. Os poços foram observados e fotografados em microscópio óptico e a região onde foram retiradas as células aderidas, foram marcadas utilizando o Software Image J (JAVA 1.8.0).

4.8 ESTUDO DE VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR DAS NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS MDA-MB-231

4.8.1 Espectroscopia de fluorescência da OncoA

O perfil de fluorescência (autofluorescência) da OncoA foi obtido em espectrofotômetro de fluorescência (PERKINS LS55), utilizando diferentes concentrações da OncoA diluída em água ultrapura (0.5, 2, 5, 10, 15 e 200 $\mu\text{g/mL}$). A faixa de comprimentos de onda estabelecida foi de 360-600 nm, com excitação no comprimento de onda de 350 nm, com fendas de excitação e emissão de 10 e 10 nm, respectivamente, e alta sensibilidade. Foi realizado perfil de fluorescência do 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), para fins comparativos. As análises foram realizadas no Laboratório de Biofísica Química da Universidade Federal de Pernambuco.

4.8.2 Visualização microscópica de internalização celular

Para as análises de captura celular utilizou-se a linhagem de célula de câncer de mama metastática (MDA-MB-231) provenientes do BCRJ. Inicialmente, as células foram cultivadas em placa de 24 poços contendo lamínula de vidro redonda (diâmetro 8 mm) na concentração de 1×10^5 células/poço. Após adesão celular, as amostras (Rodamina-NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc) foram diluídas em meio de cultura Leibovitz's L-15 Medium e F-12 Nutrient Mixture contendo 10% de SFB e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), obtendo uma concentração final de 1 μM , e inseridas nos respectivos poços. Como controle foram utilizadas células que receberam apenas meio de cultura. As placas foram incubadas durante 15 minutos, 1 e 3 horas na temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 . As células, após

serem lavadas com tampão PBS, foram fixadas com a adição de paraformaldeído a 4% (500 μ L) durante 20 minutos, seguido de nova lavagem com tampão PBS. Em seguida, adicionados 500 μ L de cloreto de amônio (50 mM) para bloquear a reatividade do aldeído, reagindo durante 10 minutos. Por fim, as células foram lavadas e a lamínula retirada dos poços e seladas em lâmina. O material foi observado em microscópio de fluorescência (Axio, Imager.M2m), no Laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA, na Universidade Federal de Pernambuco.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 NANOPARTÍCULAS DE PIBCA REVESTIDAS COM FUCANA CONTENDO OncoA

As nanopartículas contendo OncoA (OncoA-NP-Fuc) e sem OncoA (NP-Fuc) foram obtidas pela técnica de polimerização por emulsão aniônica (AEP). A concentração de OncoA na formulação foi fixada em 1 mg/mL, o tamanho e o potencial zeta foram avaliados através do equipamento Zetasizer ZS90 com os resultados apresentados na Tabela 1. Os resultados obtidos no tamanho das nanopartículas foram em torno de $305 \pm 6,4$ a $316 \pm 1,3$ nm e potencial zeta em $-38,9 \pm 2,0$ a $-38,5 \pm 1,9$ mV, concordando com o estudo de LIRA e colaboradores (2011), que obteve nanopartículas de PIBCA revestidas com fucana através da técnica de AEP apresentando tamanho de $399 \pm 0,7$ nm e carga de superfície em $-44,2 \pm 1,0$ mV. A carga negativa das nanopartículas está relacionada a presença do grupamento sulfato presente na fucana (HUANG; LAM, 2011).

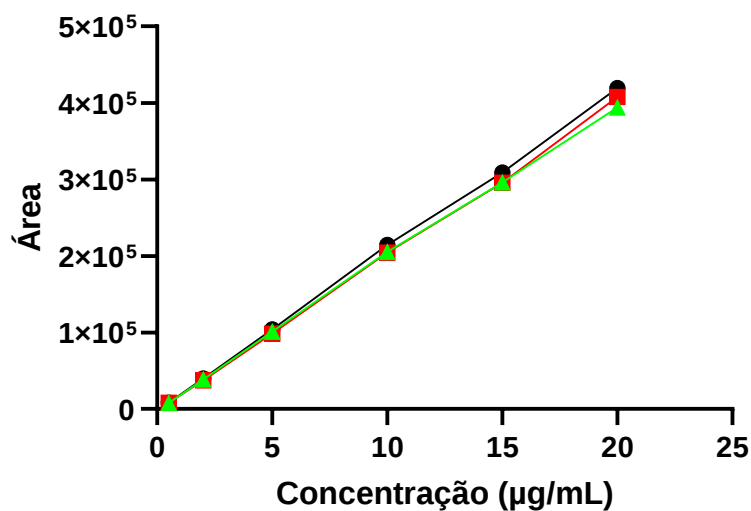
Tabela 1 – Tamanho, potencial zeta e taxa de encapsulação das nanopartículas OncoA-NP-Fuc

Formulações	[OncoA] (mg/mL)	Diâmetro da partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	OncoA (%)
NP-Fuc	-	$316 \pm 1,3$	0,082	$-38,5 \pm 1,9$	-
OncoA-NP-Fuc	1	$305 \pm 6,4$	0,077	$-38,9 \pm 2,0$	$101,5 \pm 1,4$

5.2 QUANTIFICAÇÃO DA OncoA NAS NANOPARTÍCULAS

Foi possível quantificar a OncoA à partir da técnica anteriormente validada por TAVARES e colaboradores (2019) obtendo um valor de correlação linear de 0,9994 em absorbância de 283 nm (Figura 9), mostrando-se método confiável para quantificação da OncoA nos nanossistemas.

Figura 9 – Curva padrão da OncoA. Curva 1 (-▲-), Curva 2 (-■-) e Curva 3 (-●-)



O pico da OncoA presente no cromatograma em diferentes concentrações (Figura 10) apresentam-se no tempo de retenção de 4,25 minutos, bem evidente e sem interferentes, semelhantes aos apresentados no estudo de TAVARES e colaboradores (2019), sendo evidenciado o mesmo pico nas formulações contendo a OncoA (Figura 11). Apesar do método de obtenção das nanopartículas ser em pH ácido (pH 2,5), o fármaco se mantém estável durante o desenvolvimento das nanopartículas. TAVARES e colaboradores (2019) verificaram que mesmo em contato com meios simulados gástrico e intestinal a OncoA apresenta-se estável.

Figura 10 – Cromatograma da OncoA nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (A), 2 $\mu\text{g/mL}$ (B), 5 $\mu\text{g/mL}$ (C), 10 $\mu\text{g/mL}$ (D), 15 $\mu\text{g/mL}$ (E) e 20 $\mu\text{g/mL}$ (F) diluídas em acetonitrila:água acidificada 30:70 v/v

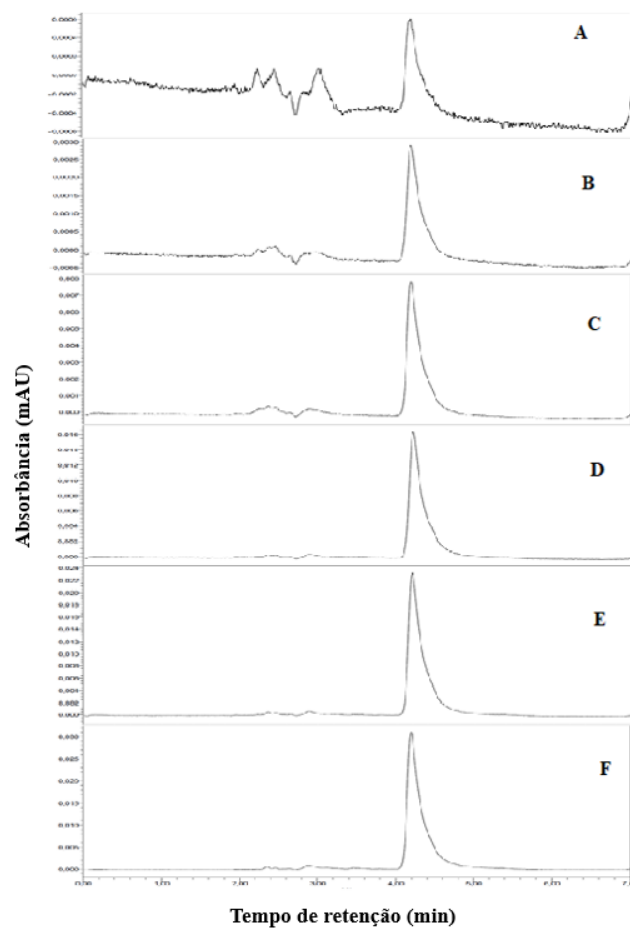
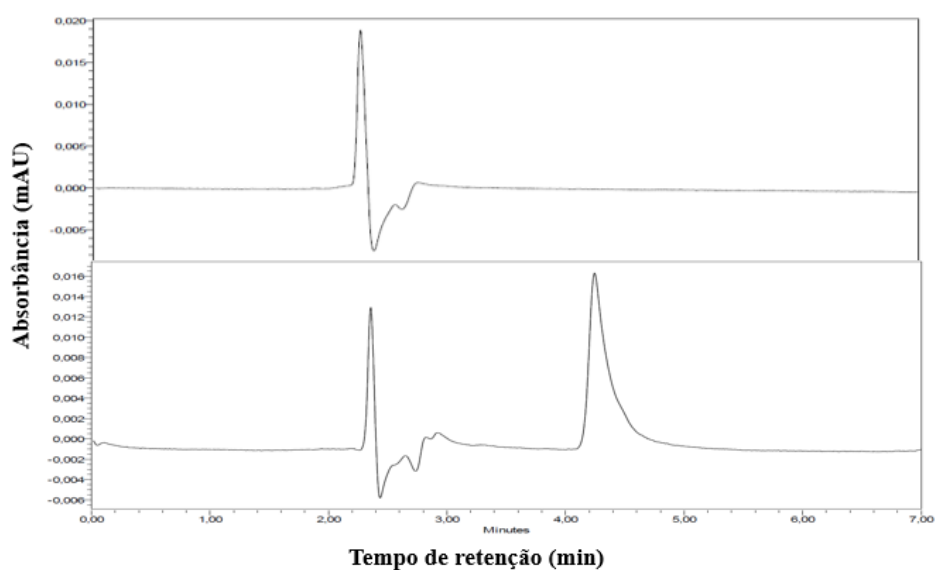


Figura 11 – Cromatograma das nanopartículas NP-Fuc (A) e OncoA-NP-Fuc em concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (B)

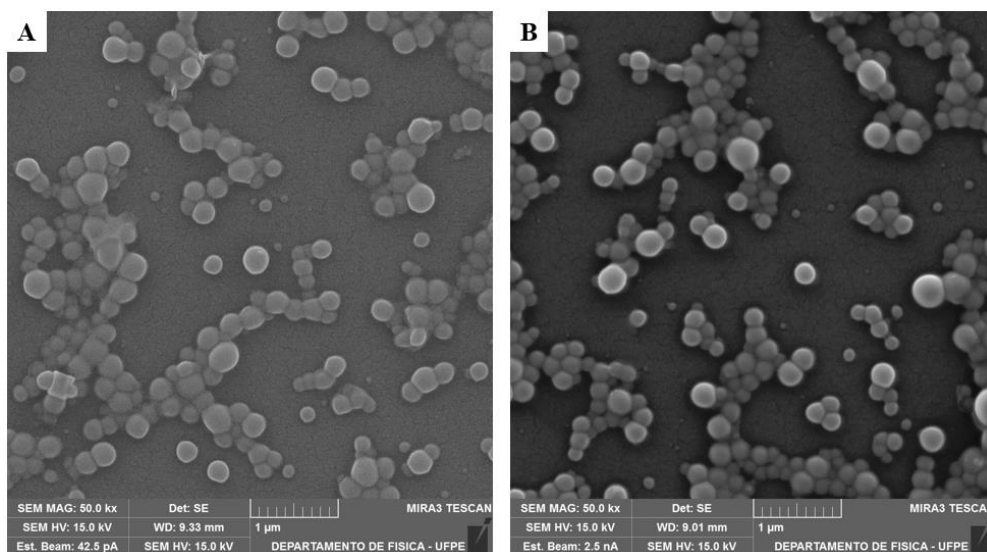


O método utilizado por REQUENA e colaboradores (2008) para dissolução das nanopartículas, mostrou-se ser um método eficaz que possibilitou a dissolução das nanopartículas de PIBCA para quantificação da OncoA por HPLC-UV, evidenciado na Tabela 1. A taxa de encapsulação da OncoA foi de $101,5 \pm 1,4\%$ a uma concentração de 1 mg/mL, tendo taxa de encapsulação superior quando comparado com o estudo de ALHARETH e colaboradores (2010) que obtiveram 74% de taxa de encapsulação da doxorrubicina com concentração de 0,75 mg/mL em nanopartículas de Poli(alquil cianoacrilato) revestidas com dextrana. Esta diferença na encapsulação pode estar relacionada a característica específica de cada fármaco ou pela diferença no método de obtenção das nanopartículas, sendo o método utilizado por ALHARETH e colaboradores (2010) a técnica de Polimerização por Emulsão de Radicais Redox (RREP). SOMA e colaboradores (2000) conseguiram encapsular a ciclosporina A nas nanopartículas revestidas com dextrana apresentando 99% de encapsulação da ciclosporina A (1 mg/mL) quando isolada e 80% de taxa de encapsulação quando associada a doxorrubicina na mesma formulação, mostrando que as nanopartículas de PIBCA permitem a encapsulação de fármacos.

5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura evidenciaram partículas esféricas com formato e tamanho regulares (Figura 12). Partículas esféricas de PIBCA foram observadas por CHAUVIERRE e colaboradores (2003), assim como também LIRA e colaboradores (2011).

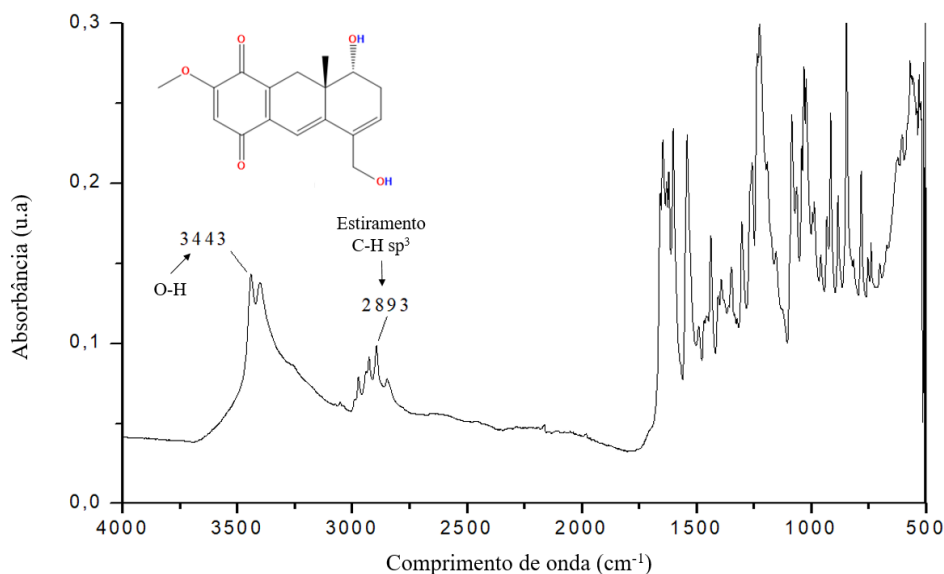
Figura 12 – Morfologia das nanopartículas NP-Fuc (A) e OncoA-NP-Fuc (B) observadas por microscópio eletrônico de varredura



5.4 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA

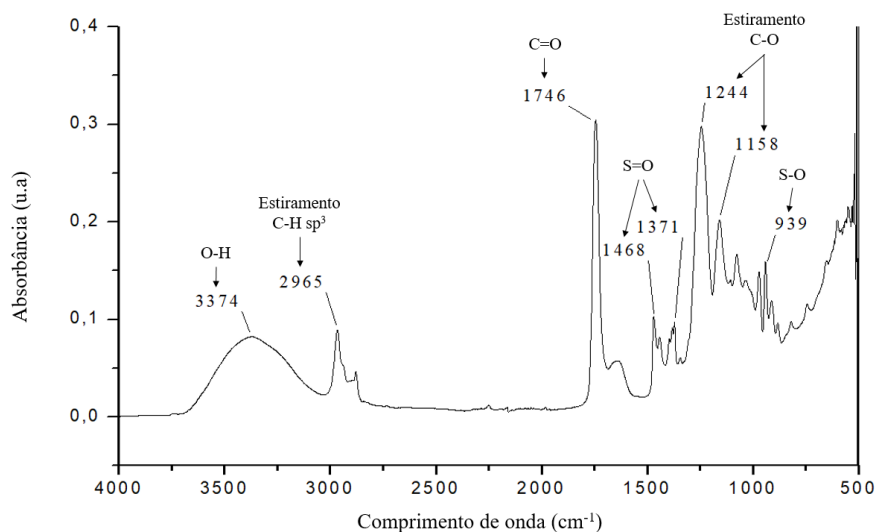
A realização desta técnica possibilitou identificar as bandas de absorção que evidenciam a OncoA (Figura 13), mostrando resultados semelhantes aos apresentados por XAVIER-JUNIOR e colaboradores (2019). No espectro podemos observar uma banda larga de média intensidade na região de 3443 cm^{-1} , indicando a presença de ligações do tipo O-H, como também bandas de baixa intensidade na região de $2977\text{-}2832\text{ cm}^{-1}$ referentes ao estiramento C-H sp^3 . As bandas de absorção na região $1661\text{-}561\text{ cm}^{-1}$ são características da presença de anel aromático na estrutura da OncoA o que corrobora com o desenho da estrutura química da molécula.

Figura 13 – Espectro de FT-IR da OncoA



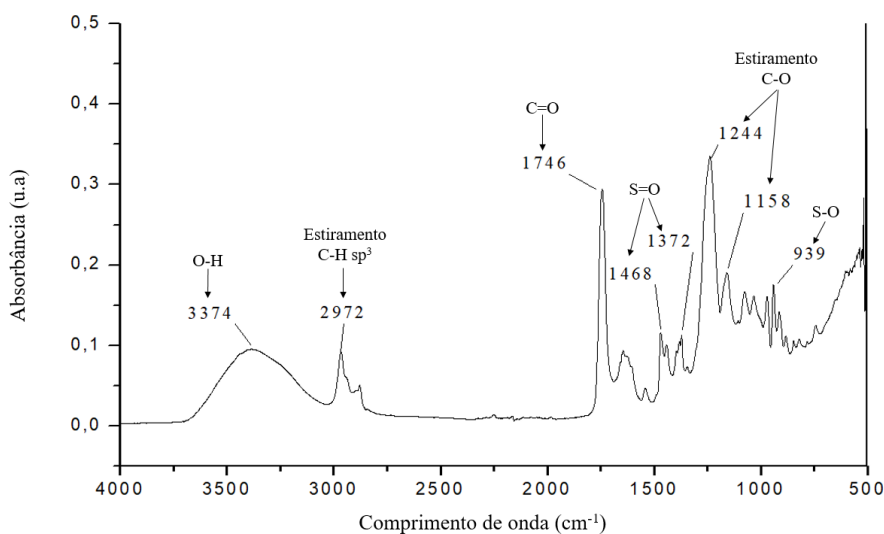
O espectro obtido das NP-Fuc (Figura 14) apresenta bandas de absorção na região de 1244 cm^{-1} e 1158 cm^{-1} referentes a presença de C-O, bandas de baixa intensidade na região de 1468 cm^{-1} e 1371 cm^{-1} referentes ao grupamento enxofre (S=O) presente na estrutura química da fucana, e mais uma banda de absorção do enxofre de baixa intensidade na região de 939 cm^{-1} . Também apresenta uma banda de forte intensidade na região 1746 cm^{-1} referente a presença de C=O podendo esta ligação estar relacionada a um processo de tautomerismo a partir do deslocamento dos átomos de oxigênio possibilitando a formação de dupla ligação entre o carbono e os oxigênios presentes na estrutura molecular da fucana. Outra banda de absorção também presente no espectro foi observada na região de 2965 cm^{-1} referente ao estiramento C-H sp^3 e uma banda larga presente na faixa de 3710 a 3028 cm^{-1} referindo-se a presença de hidroxilas (O-H) nas nanopartículas. As bandas apresentadas no espectro estão de acordo com as bandas de absorção da fucana presente no estudo de CHALE-DZUL e colaboradores (2014) como também no estudo de PALANISAMY e colaboradores (2017).

Figura 14 – Espectro de FT-IR das NP-Fuc



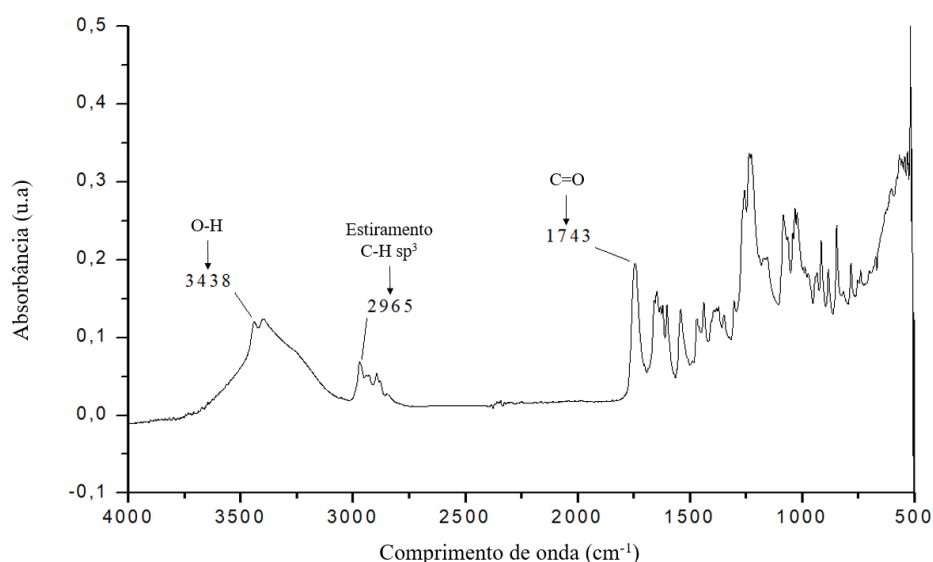
O espectro das OncoA-NP-Fuc (Figura 15) é semelhante ao espectro da NP-Fuc, no qual os dois espectros apresentam bandas na mesma região, entretanto no espectro das OncoA-NP-Fuc as bandas na região de 1244 cm^{-1} e 1158 cm^{-1} são mais intensas, como também a banda na região 1746 cm^{-1} , podendo este aumento está relacionado a presença das ligações presentes na estrutura da OncoA e com isso aumentando a intensidade das bandas de absorção. A banda que se refere a presença de hidroxilas, na região 3374 cm^{-1} , mostra-se mais larga e mais intensa em comparação com o espectro das Np-Fuc, podendo estar relacionada a soma das bandas da NP-Fuc e da OncoA o que indica a presença da OncoA na formulação.

Figura 15 – Espectro de FT-IR das OncoA-NP-Fuc



No espectro obtido a partir da mistura física (Figura 16) entre a OncoA e a NP-Fuc, podemos observar sobreposição de bandas de absorção principalmente na região de 1600 a 600 cm^{-1} , como também a presença de bandas características de cada componente da mistura física. A banda de absorção presente na região de 1743 cm^{-1} relacionada a presença de ligação do tipo C=O, bem evidente no espectro da NP-Fuc. Quanto as bandas de absorção presentes nas regiões 3438 cm^{-1} e 2965 cm^{-1} estão mais semelhantes ao espectro da OncoA. A presença de bandas de absorção que indicam a presença da OncoA como também das NP-Fuc supõe que nas formulações OncoA-NP-Fuc, por não apresentar bandas de absorção característica da OncoA, é um indício que o fármaco foi encapsulado.

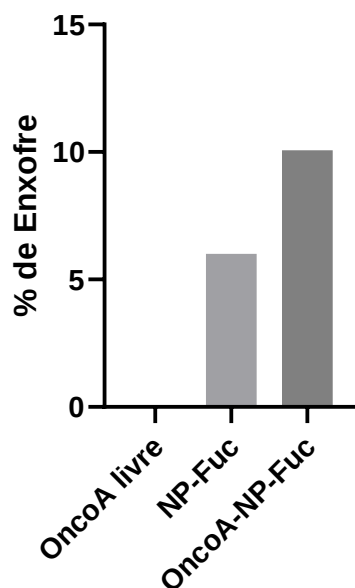
Figura 16 – Espectro de FT-IR da mistura física entre a OncoA e NP-Fuc



5.5 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA

Os resultados da análise de EDX (Figura 17) evidenciam a presença do enxofre nas amostras NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc nas concentrações de 6% e 10% respectivamente, com isso evidenciando a presença da fucana nas nanopartículas, uma vez que é um polissacarídeo sulfatado (PUVANESWARY et al., 2015; YU et al., 2015). A presença do enxofre em formulações contendo fucana também foi evidência por KARUNANITHI e colaboradores (2016), em que foi possível observar pela técnica de EDX uma concentração de enxofre de cerca de 1% no hidrogel de alginato-fucana. Esta concentração de enxofre de apenas 1% está relacionada a concentração da fucana utilizada na formulação que foi de 0,5%.

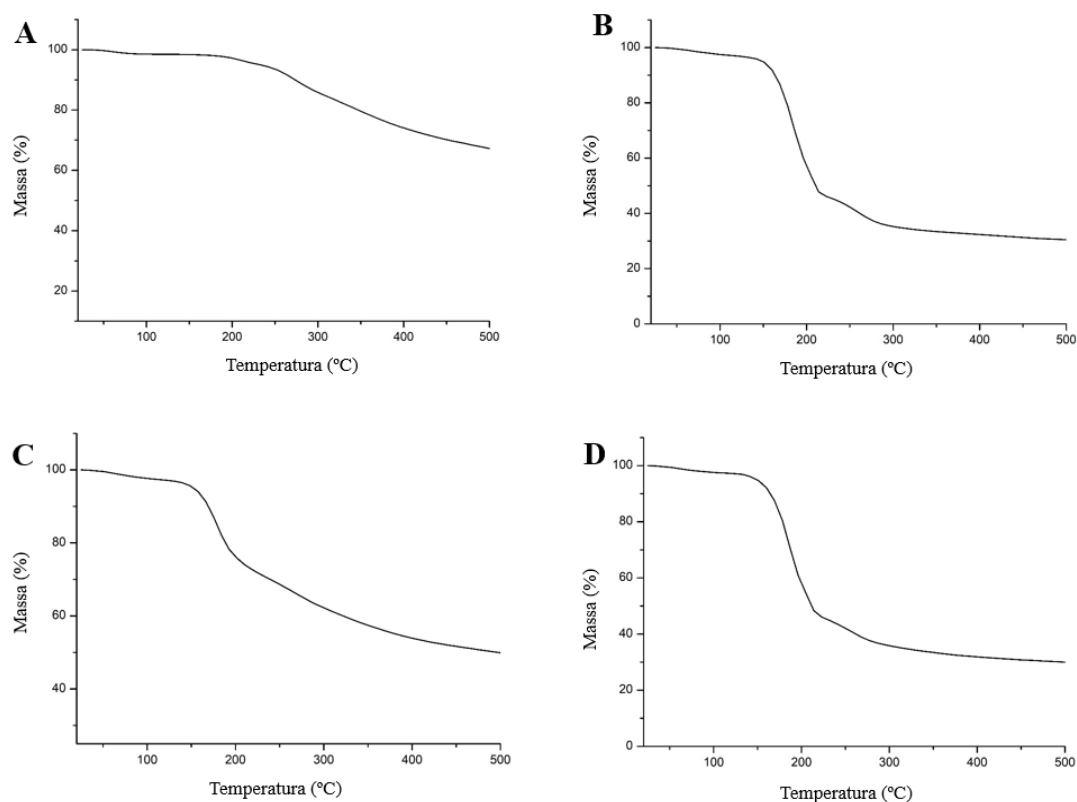
Figura 17 – Análise de EDX evidenciando a presença do enxofre nas amostras



5.6 ANÁLISE TÉRMICA

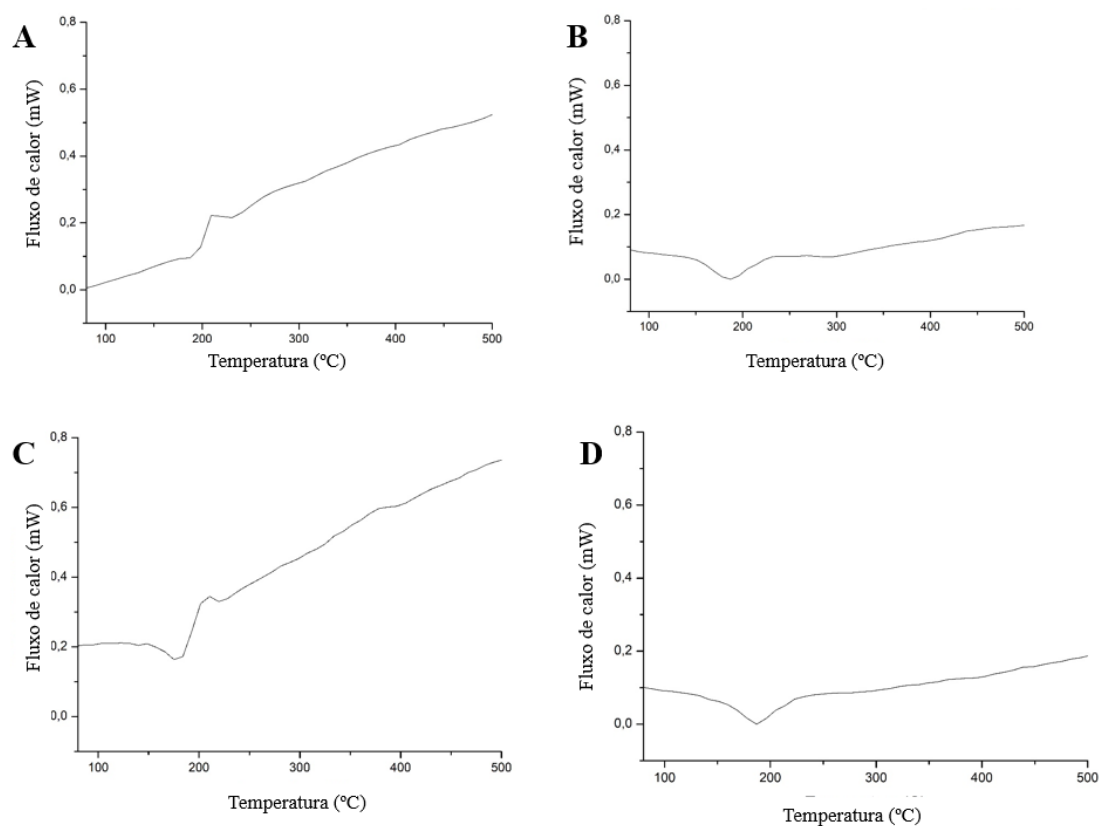
Os resultados obtidos pela técnica de análise térmica confirmam a encapsulação da OncoA nas nanopartículas de PIBCA revestidas com fucana. A Figura 18 apresenta os resultados da curva termogravimétrica (TG) mostrando que a OncoA (Figura 18A) inicia sua decomposição em torno de 180°C se decompondo gradativamente com o aumento da temperatura, estes resultados estão de acordo com o estudo de XAVIER-JUNIOR e colaboradores (2019). Já as nanopartículas NP-Fuc (Figura 18B) iniciam sua degradação por volta de 150°C com decomposição acima dos 250°C, sendo este resultado coerente com os estudos de RODRÍGUEZ-JASSO e colaboradores (2011) e RODRÍGUEZ-JASSO e colaboradores (2013) que avaliaram o perfil de decomposição do extrato de fucana. As OncoA-NP-Fuc (Figura 18D) apresenta o mesmo perfil de decomposição das NP-Fuc indicando encapsulação da OncoA no sistema. Quando comparamos os resultados da mistura física (Figura 18C) podemos perceber os perfis de degradação das nanopartículas como também da OncoA.

Figura 18 – Gráficos de análise termogravimétrica da OncoA (A), NP-Fuc (B), Mistura física (C) e OncoA-NP-Fuc (D)



Quanto as curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) os perfis de decomposição são os mesmos entre as NP-Fuc (Figura 19B) e OncoA-NP-Fuc (Figura 19D) com evento endotérmico na faixa de 150-200°C, coerente com os estudos de RODRÍGUEZ-JASSO e colaboradores (2011) e RODRÍGUEZ-JASSO e colaboradores (2013). A OncoA (Figura 19A) mostra evento único em torno de 180°C, confirmando a presença do composto em seu estado cristalino, corroborando com o estudo de XAVIER-JUNIOR e colaboradores (2019). Quando comparamos com a mistura física (Figura 19C), podemos ver um evento endotérmico na faixa de 150-200°C referente a decomposição das nanopartículas, como também apresenta evento exotérmico na faixa de 200-250°C referente a OncoA, com isso evidenciando a encapsulação da OncoA nas nanopartículas de PIBCA revestidas com fucana.

Figura 19 – Gráficos de Calorimetria Diferencial de Varredura da OncoA (A), NP-Fuc (B), Mistura física (C) e OncoA-NP-Fuc (D)



5.7 ESTABILIDADE DAS NP-Fuc EM DIFERENTES pH

Após contato a pH ácido (pH 1,2) as NP-Fuc aumentaram seu tamanho de partícula de $245 \pm 3,3$ nm para $287,9 \pm 2,5$ nm após 30 minutos, mantendo o tamanho estável durante as duas horas de experimento. Por outro lado, as NP-Fuc em contato com o pH intestinal (pH 6,8) e pH sanguíneo (pH 7,4), o tamanho das partículas diminuíram de $245 \pm 3,3$ nm para $214,9 \pm 2,0$ e $218,9 \pm 4,1$ nm, respectivamente (Figura 20). Quanto ao potencial zeta, as nanopartículas em contato com o pH gástrico apresentaram carga constante, em torno de $-37,4 \pm 1,7$ mV, enquanto as nanopartículas em contato com o pH intestinal e o pH sanguíneo aumentaram a carga superficial para $-44,9 \pm 1,7$ mV e $-43,4 \pm 2,2$ mV, respectivamente, como está evidenciado na Figura 21. FERNANDO e ZHOU (2019) realizaram estudo de estabilidade de nanopartículas de prata em diferentes pH, obtendo resultados contrários ao do estudo, com o aumento no tamanho das nanopartículas estando relacionado ao aumento do pH, com formação de agregados.

Apesar de apresentar diferenças significativas quanto ao tamanho, a carga superficial e o PDI mostram que as nanopartículas continuam estáveis, com resultados de PDI abaixo de 0,1, não apresentando agregados, diferente dos resultados apresentados por FERNANDO e ZHOU (2019).

HUANG e LAM (2011) também avaliaram a estabilidade de nanopartículas de quitosana e fucana, em pH 1,2; 2,5; 6,0; 7,0 e 7,4. Os resultados foram similares aos apresentados neste estudo, com reduzidas variações no tamanho ($219,4 \pm 1,7$ a $234,7 \pm 9,5$ nm) e na carga superficial das nanopartículas ($-19,7 \pm 0,9$ a $-39,4 \pm 1,9$ mV). A presença da fucana parece promover uma maior estabilidade as nanopartículas quanto em contato com diferentes pH.

Figura 20 – Estabilidade das nanopartículas em pH 1.2 (○), 6.8 (□) e 7.4 (●). Tamanho das nanopartículas através do tempo de contato em meios biológicos simulados

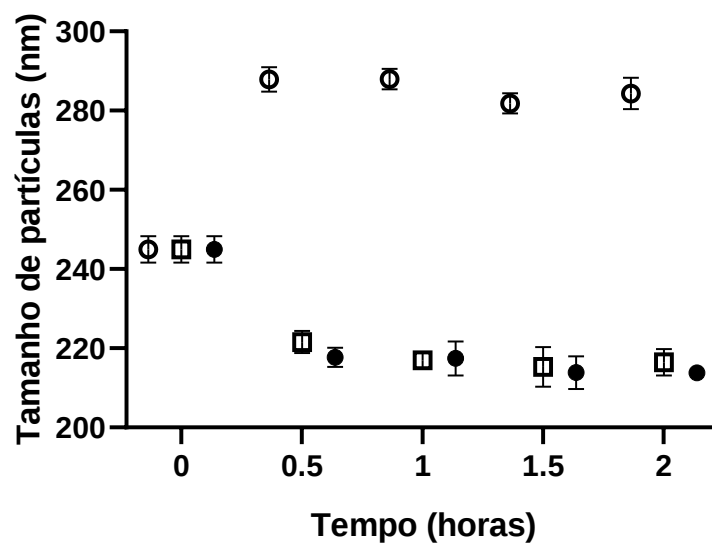
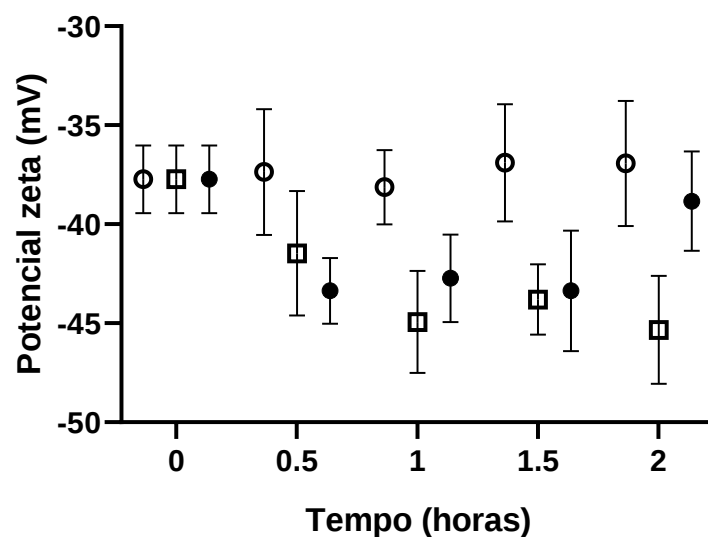


Figura 21 – Estabilidade das nanopartículas em pH 1.2 (○), 6.8 (□) e 7.4 (●). Potencial zeta das nanopartículas através do tempo de contato em meios biológicos simulados



5.8 ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DAS NP-Fuc E OncoA-NP-Fuc

Os resultados obtidos da estabilidade das nanopartículas mostraram que elas se mantiveram estáveis durante 7 meses com poucas variações no tamanho ($305 \pm 2,3$ a $317 \pm 0,9$ nm) e carga superficial ($-35 \pm 2,3$ a $-38 \pm 1,9$ mV), sendo estes dados presentes nas Figuras 22 e 23. LIRA e colaboradores (2011) avaliaram a estabilidade das nanopartículas de PIBCA revestida com fucana e dextrana a 4 °C, também evidenciando que as nanopartículas permaneceram estáveis por pelo menos 6 meses.

Figura 22 – Avaliação do tamanho das nanopartículas NP-Fuc (○) e OncoA-NP-Fuc (■) armazenadas a 4°C

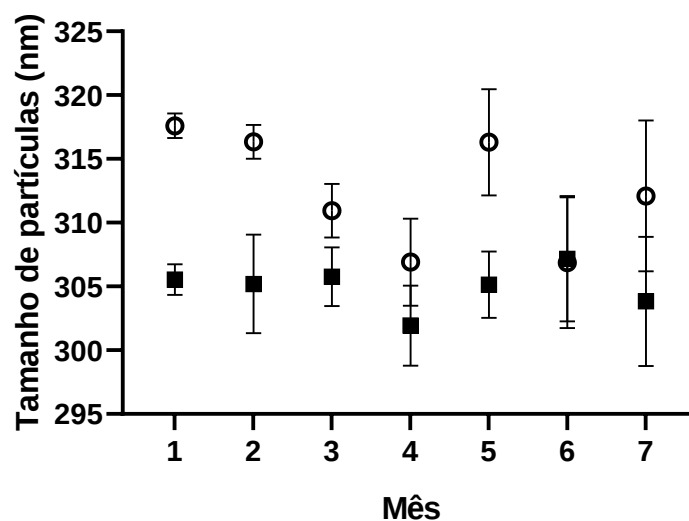
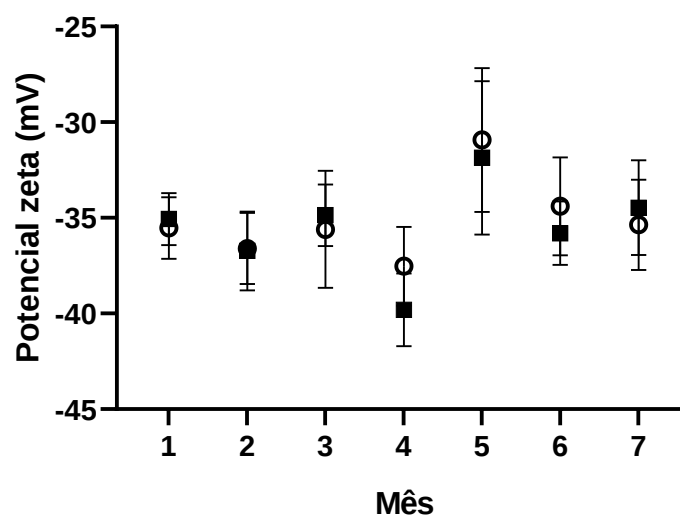


Figura 23 – Avaliação da carga de superfície das nanopartículas NP-Fuc (○) e OncoA-NP-Fuc (■) armazenadas a 4°C



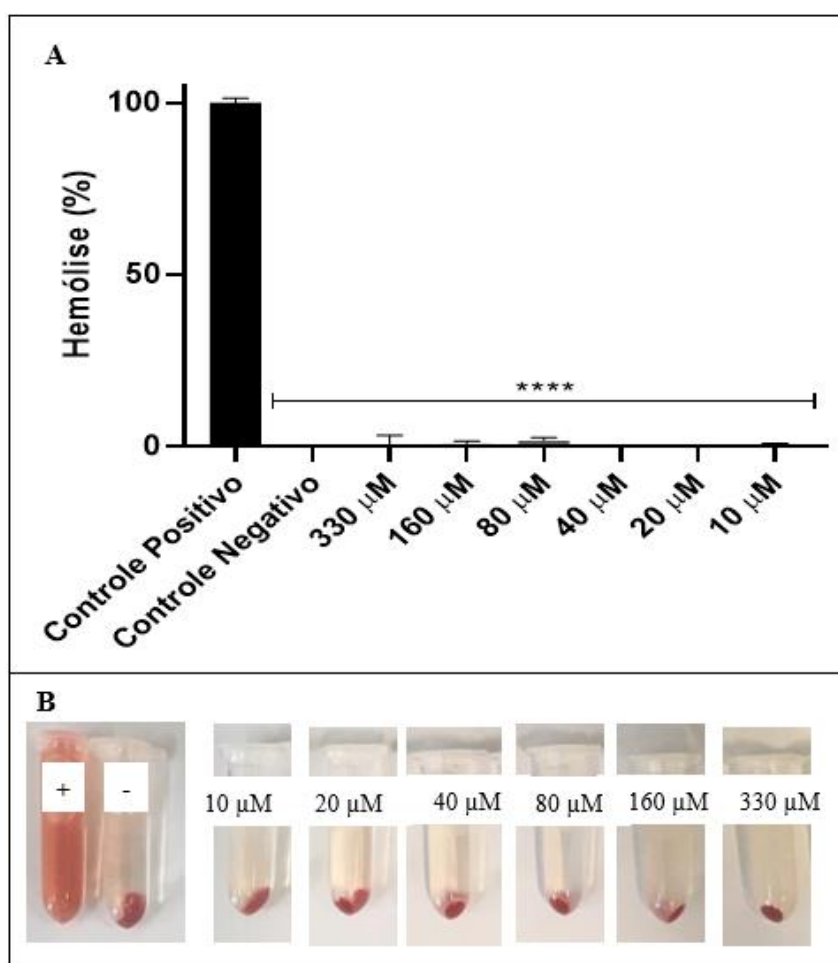
A estabilidade das nanopartículas de PIBCA na encapsulação de fármacos permite o desenvolvimento de nanocarreadores estáveis para uma possível administração *in vivo* (CHEN et al., 2008; LIU; THAYUMANAVAN, 2017; PALANIKUMAR et al., 2018).

5.9 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE SANGUÍNEA: POTENCIAL HEMOLÍTICO

O estudo de compatibilidade sanguínea avaliou o potencial hemolítico das nanopartículas (NP-Fuc). O experimento foi realizado através da leitura da absorbância (540 nm) da liberação de hemoglobina após exposição a diferentes concentrações (330, 160, 80, 40, 20 e 10 μM) de NP-Fuc em sangue humano.

Os resultados obtidos (Figura 24) sugerem que as NP-Fuc são compatíveis com o sangue humano mesmo em concentrações altas, uma vez que a taxa de hemólise foi de 0%. Segundo a literatura, taxas de hemólise variando de 0 a 2% são consideradas seguras (BRANDAL; YAO; NAVEED, 2015). Ao observar os resultados da análise macroscópica das amostras (Figura 24B), é perceptível a visualização do precipitado referente a presença de hemácias não hemolisadas, quando comparados ao controle positivo, com a presença de hemoglobina diluída na água destilada.

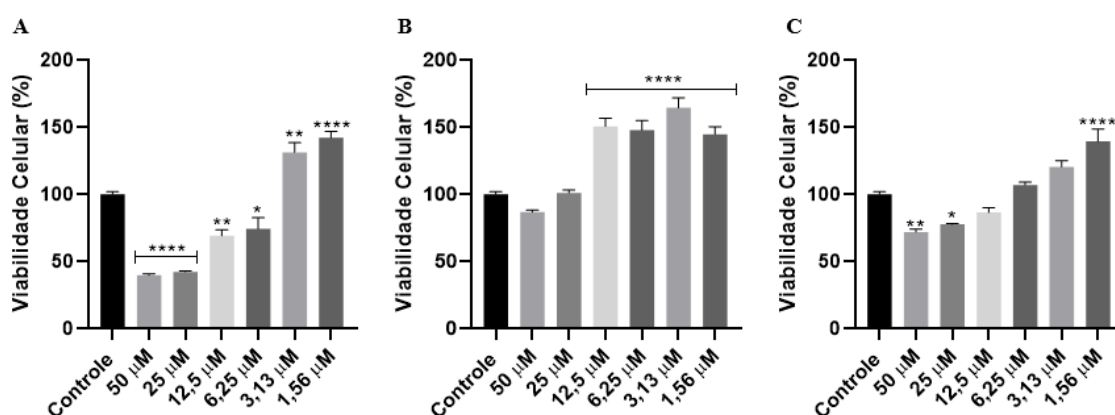
Figura 24 – Potencial hemolítico da NP-Fuc em amostra de sangue humano. (A) Taxa de hemólise; (B) Aspectos macroscópicos. ***** p-valor (<0.0001)



5.10 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DE OncoA-NP-Fuc

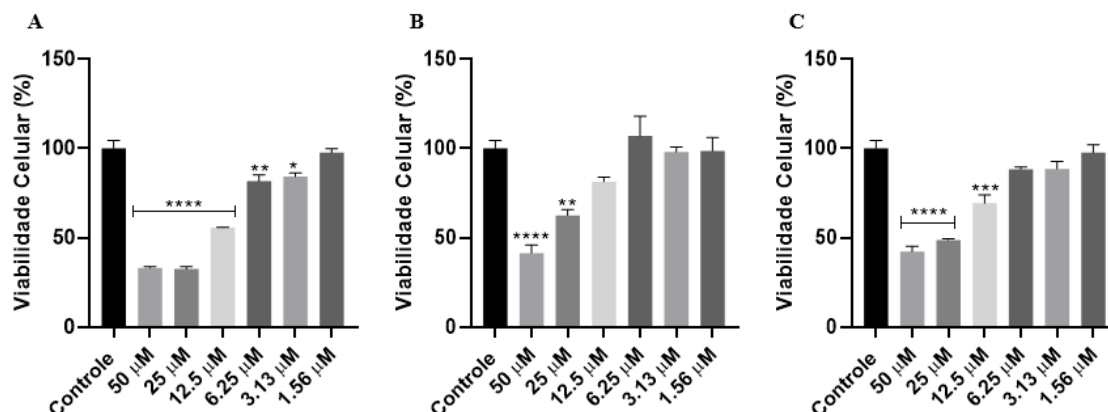
A atividade das OncoA-NP-Fuc como também das NP-Fuc e OncoA frente a células de câncer de mama (MDA-MB-231) foram avaliadas através da técnica de MTT. Após 24 horas de contato com as células, as OncoA-NP-Fuc (Figura 25A) apresentaram atividade antiproliferativa significativa frente as células MDA-MB-231, com resultado de viabilidade celular de 39 e 42% nas concentrações de 50 e 25 μ M, respectivamente. Quando livre, a OncoA (Figura 25B) não demonstra ter atividade, com valores de viabilidade celular de 86% na concentração mais alta (50 μ M), enquanto que a formulação NP-Fuc (Figura 25C) apesar de apresentar atividade antiproliferativa, é inferior as OncoA-NP-Fuc, com taxa de viabilidade celular em 71% na concentração de 50 μ M.

Figura 25 – Viabilidade das células MDA-MB-231 expostas a OncoA-NP-Fuc (A), OncoA (B) e NP-Fuc (C) após 24 horas. * p-valor (<0.05) ** p-valor (<0.003) **** p-valor (<0.0001)



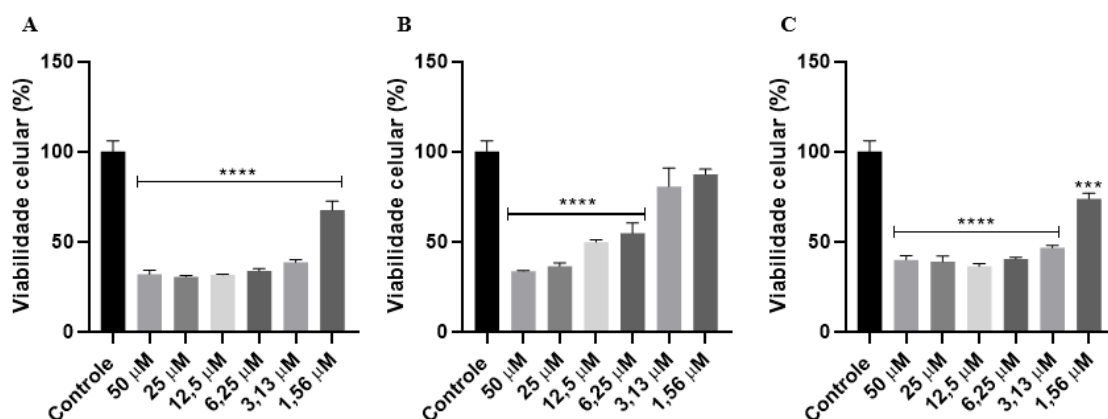
Quando comparamos os resultados após 48 horas de contato, a formulação OncoA-NP-Fuc (Figura 26A) parece manter sua atividade antiproliferativa, com valor de IC_{50} de $10,5 \pm 0,74 \mu$ M ($3,17 \pm 0,22$ g/mL), enquanto que a OncoA (Figura 26B) começa a evidenciar a sua atividade antiproliferativa em concentrações altas (50 e 25 μ M), com valor de IC_{50} de $20,8 \pm 1,36 \mu$ M ($6,28 \pm 0,41 \mu$ g/mL). As NP-Fuc (Figura 26C) mantém sua atividade antiproliferativa com valor de IC_{50} de $13,24 \pm 0,78 \mu$ M ($4,0 \pm 0,53 \mu$ g/mL).

Figura 26 – Viabilidade das células MDA-MB-231 expostas a OncoA-NP-Fuc (A), OncoA (B) e NP-Fuc (C) após 48 horas. * p-valor (<0.03) ** p-valor (<0.003) **** p-valor (<0.0001)



Os resultados com 72 horas de contato demonstram a atividade antiproliferativa das OncoA-NP-Fuc (Figura 27A), com perfil citotóxico superior aos resultados de exposição a 24 e 48 horas, evidenciando possível liberação controlada, com atividade antiproliferativa mesmo em concentrações baixas (6,25 e 3,13 µM), com taxa de viabilidade celular de 33 e 38% respectivamente. A OncoA (Figura 27B) também apresentou perfil citotóxico superior quando comparado com os resultados nos tempos de 24 e 48 horas, sendo em concentrações mais altas (50 e 25 µM) com taxa de viabilidade celular de 33 e 36% respectivamente, como também a NP-Fuc (Figura 27C) com taxa de viabilidade celular de 40 e 46% nas concentrações de 6,25 e 3,13 µM.

Figura 27 – Viabilidade das células MDA-MB-231 expostas a OncoA-NP-Fuc (A), OncoA (B) e NP-Fuc (C) após 72 horas. *** p-valor (0.0001) **** p-valor (<0.0001)



Os estudos de SBARDELOTTO (2013), PESSOA e colaboradores (2004) e LEYVA e colaboradores (2000) comprovaram a ação da OncoA frente a células cancerígenas com citotoxicidade em células leucêmicas (CEM) e de câncer de pulmão (SW1573), com valores de IC_{50} de $1,4 \pm 0,5 \mu M$ e $4,9 \pm 1,5 \mu g/mL$ após incubação de 72 horas. A inibição na proliferação celular das MDA-MB-231 pela OncoA pode estar relacionada a sensibilidade das células cancerígenas ao estresse oxidativo, já que estudos demonstram que compostos quinoides inibem a proliferação das células cancerígenas através da inibição do complexo das topoisomerasas, induzindo a célula a apoptose (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; GLORIEUX; CALDERON, 2019).

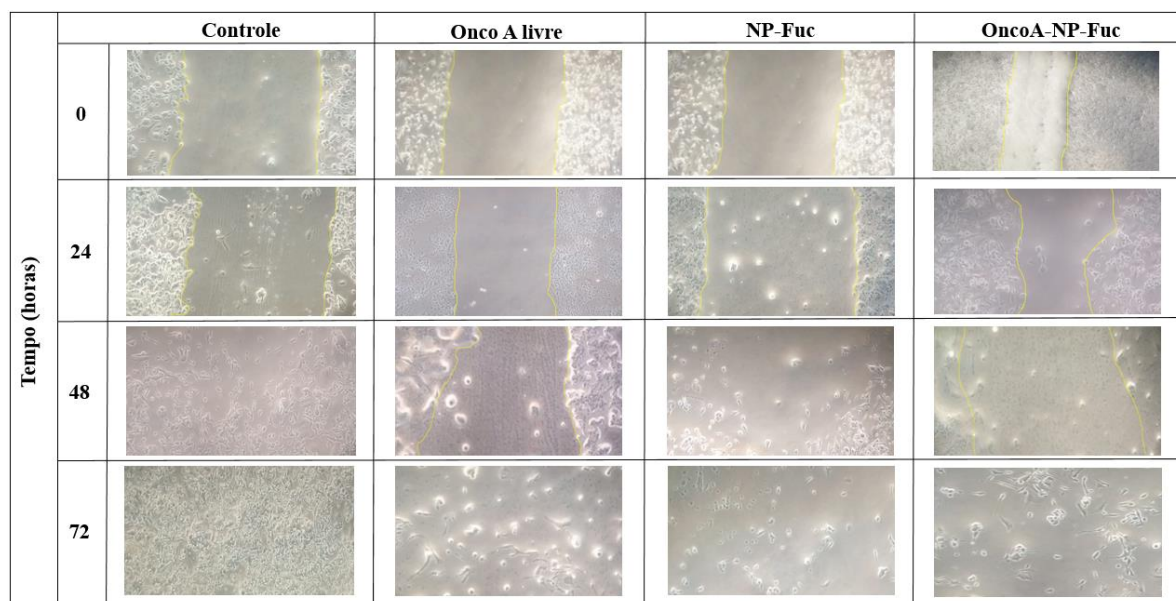
Com relação as nanopartículas NP-Fuc, a atividade apresentada pode estar relacionada a presença da fucana. Segundo ZHANG e colaboradores (2011), a fucana apresenta atividade citotóxica frente a células MDA-MB-231 e MCF-7, ambas linhagens de câncer de mama. Além disso, a fucana atua em sinergismo com agentes quimioterápicos devido a inibição do crescimento celular através da indução da apoptose e parada do ciclo celular (ZHANG et al., 2013; LU et al., 2017). A potencialização do efeito citotóxico da OncoA-NP-Fuc parece estar relacionado com a presença da fucana e possível internalização das nanopartículas, fazendo com que a OncoA seja liberada intracelularmente.

5.11 ESTUDO DE MIGRAÇÃO CELULAR

O ensaio de migração celular permite a observação da migração celular bidimensional em culturas de células com monocamada confluentes (FRANCO et al., 2019). A escolha das células MDA-MB-231 foi devido a sua capacidade de metástase e a rápida proliferação. Avaliamos a proliferação celular em três tempos (24, 48 e 72 horas), utilizando as amostras OncoA, NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc nas concentrações baixas ($3,13 \mu M$) (Figura 28) e altas ($25 \mu M$) (Figura 29) da IC_{50} .

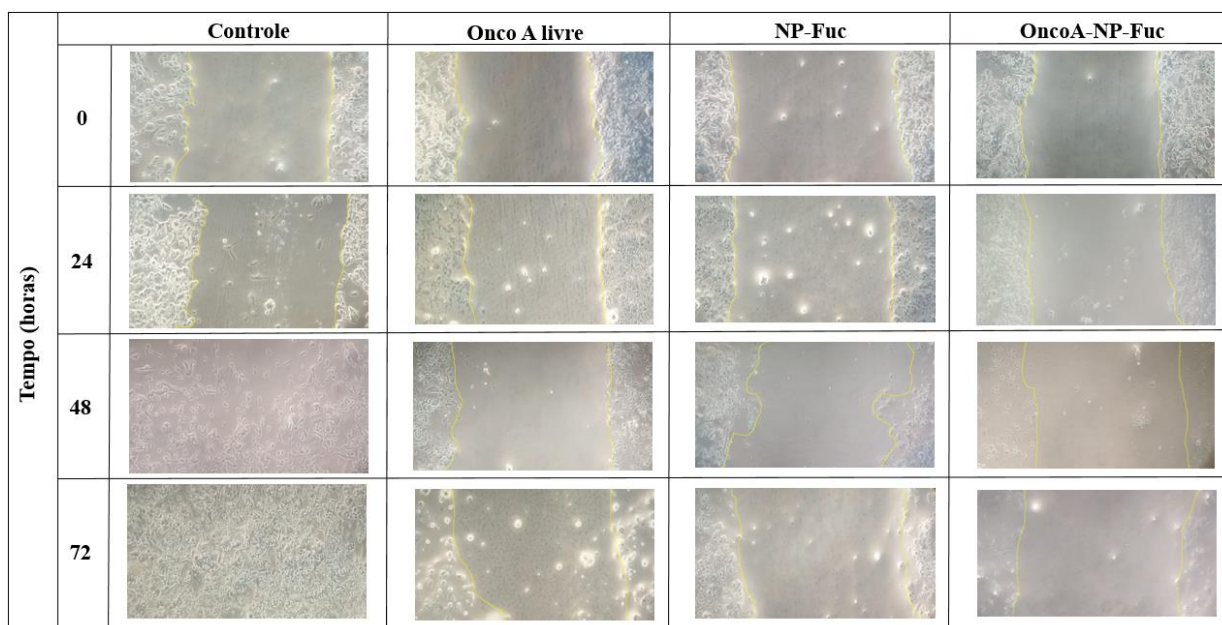
Os resultados obtidos sugerem que as formulações inibem a migração celular nas duas concentrações após 24 horas. Após contato de 48 horas e 72 horas parece não haver inibição da migração, em que as células continuam a se proliferar. Apenas nas OncoA-NP-Fuc que mesmo em concentrações mais baixas (Figura 28) parece inibir a proliferação celular, estando de acordo com os resultados apresentados no estudo de citotoxicidade.

Figura 28 – Fotografias das células MDA-MB-231, em microscópio óptico com objetiva 10x, expostas as amostras OncoA, NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc na concentração de 3,13 μM



Os resultados obtidos na concentração de 25 μM (Figura 29) são mais evidentes, por tratar-se de uma concentração acima do IC_{50} ($10,5 \pm 0,74 \mu\text{M}$), sendo evidenciado a morte celular principalmente após contato das células com as formulações por 48 horas. A OncoA apresenta um perfil de morte e crescimento celular reduzido em comparação com as formulações (NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc), estando os resultados coerentes com os resultados obtidos da citotoxicidade. Apesar das NP-Fuc apresentar inibição celular por conta da presença da fucana, quando associada a OncoA na formulação OncoA-NP-Fuc, ocorre potencialização do efeito, provavelmente causado pela liberação intracelular da OncoA (LU et al., 2017).

Figura 29 - Fotografias das células MDA-MB-231, em microscópio óptico com objetiva 10x, expostas as amostras OncoA, NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc na concentração de 25 μ M



5.12 ESTUDO DE VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR DAS NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS MDA-MB-231

5.12.1 Espectroscopia de fluorescência da OncoA

De acordo com os resultados obtidos a partir do espectro de fluorescência verificamos que a OncoA (Figura 30) apresentou perfil de fluorescência mais intenso que o DAPI (Figura 31) nos parâmetros avaliados. Ambas as substâncias emitem fluorescência no azul, em que o DAPI apresentou comprimento de onda em 392 nm enquanto a OncoA em baixa concentração apresentou comprimento de onda em 393 nm, tendo um perfil semelhante ao DAPI. Com o aumento da concentração da OncoA o pico se deslocou para a luz visível com comprimento de onda de 430 nm.

Figura 30 – Perfil de fluorescência da OncoA

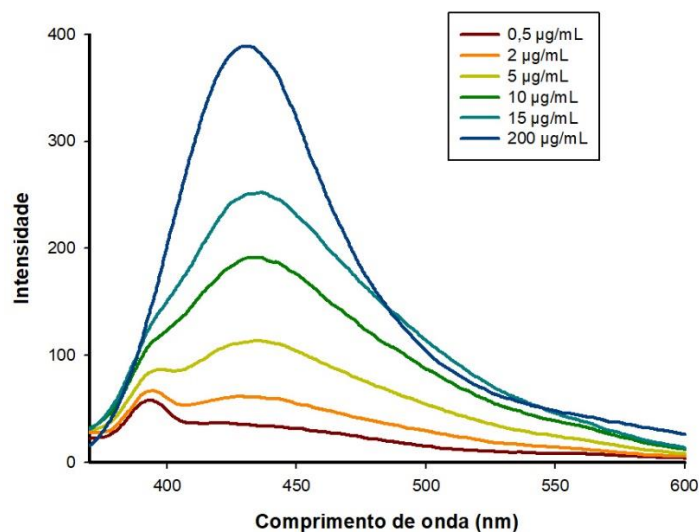
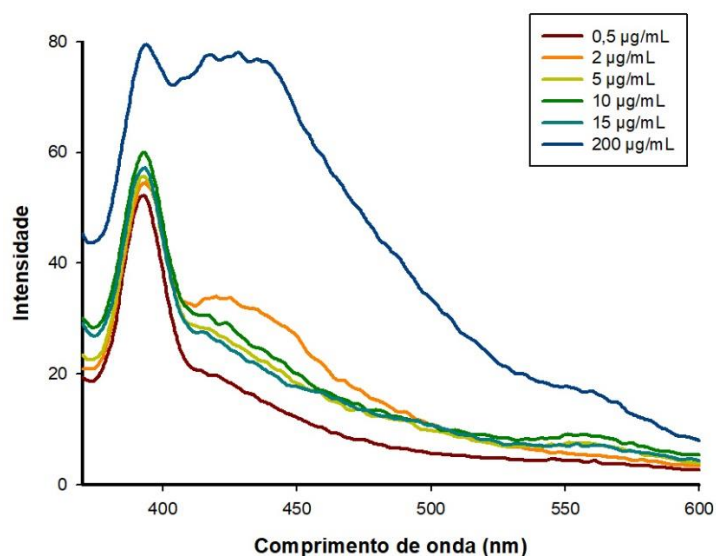


Figura 31 – Perfil de fluorescência do DAPI



O DAPI é um corante fluorescente muito utilizado em citometria de fluxo, microscopia de fluorescência, coloração cromossômica, visualização e quantificação de DNA, por se ligar fortemente ao DNA e emitir fluorescência na cor azul (FARAHAT et al., 2017). Apesar dos resultados do DAPI terem sido inferiores ao da OncoA quanto a intensidade, muitos estudos associam a fluorescência do DAPI ao se intercalar ao DNA (WILSON et al., 1990; KAPUSCINSKI, 1995; FARAHAT et al., 2017; HAROONE et al., 2019), justificando com isso a baixa intensidade por nesse estudo utilizarmos apenas água ultrapura no preparo das diluições, já que o nosso foco foi apenas ter um produto de comparação com a OncoA.

5.12.2 Visualização microscópica de internalização celular

Com o objetivo de avaliar a internalização celular das nanopartículas e complementar os estudos de autofluorescência da OncoA, realizou-se o estudo de captura celular, utilizando a rodamina e a OncoA como marcadores fluorescente, na concentração de 1 μ M, sendo esta concentração escolhida por ser abaixo do IC₅₀ das amostras (OncoA, NP-Fuc e OncoA-NP-Fuc), com isso evitando possíveis interferências do efeito tóxico das nanopartículas sobre as células MDA-MB-231.

O controle foram células MDA-MB-231 que receberam apenas meio de cultura. Verificamos, com os resultados do controle presentes nas figuras 32 e 33, que a célula MDA-MB-231 apresenta autofluorescência na cor verde. A captura celular foi avaliada durante os tempos de 15 minutos, 1 e 3 horas, a 37 °C. Podemos observar que na temperatura a 37°C ocorre a captura celular nos primeiros 15 minutos, sendo nítida a captura após as 3 horas de incubação, devido ao aumento na intensidade da fluorescência, indicando um maior número de células capturadas. Também é possível observar a fluorescência da OncoA na cor azul presente nas amostras contendo apenas OncoA-NP-Fuc, esses resultados apresentam-se de acordo com os resultados da espectroscopia de fluorescência que demonstra que a OncoA emite fluorescência no azul. Além disso, as Rodamina-NP-Fuc apresenta o mesmo perfil de intensidade de fluorescência das OncoA-NP-Fuc apresentando coerência em ambos os dados.

Figura 32 – Captura celular da Rodamina-NP-Fuc a 37 °C. Coluna A: Alexa fluor; Coluna B: DAPI; Coluna C: Rodamina

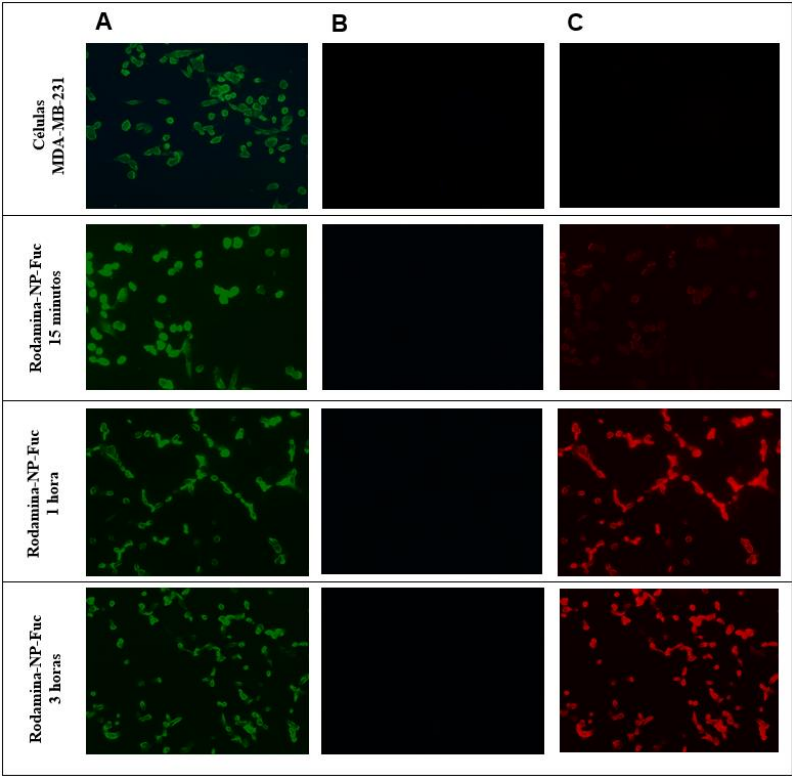
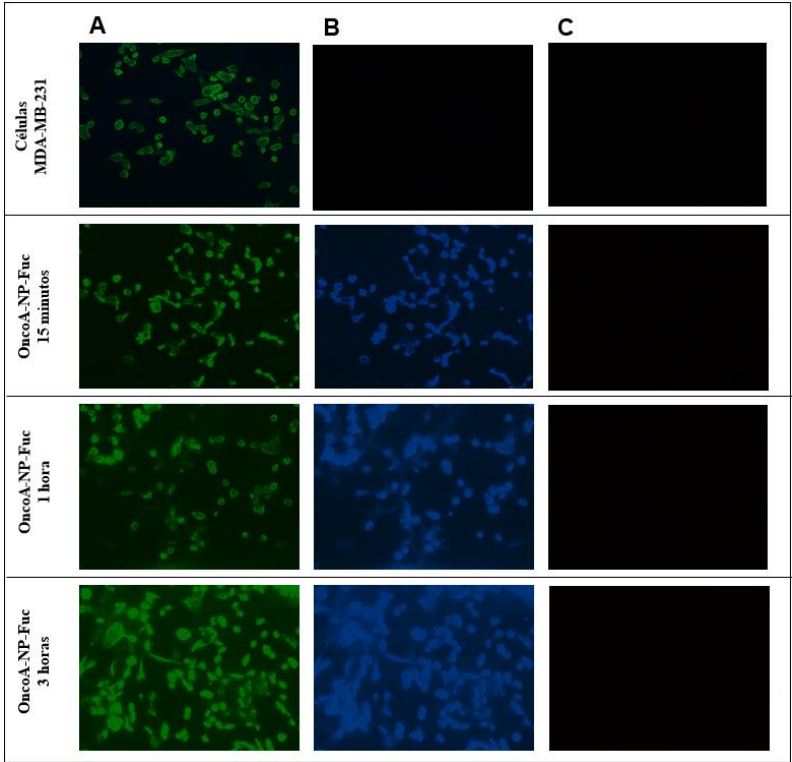


Figura 33 – Captura celular da OncoA-NP-Fuc a 37 °C. Coluna A: Alexa fluor; Coluna B: DAPI; Coluna C: Rodamina



De acordo com LU e colaboradores (2017) a presença da proteína p-selectina nas células MDA-MB-231 pode mediar a captura celular da fucana pelas células. Com isso, a presença da fucana nas nanopartículas pode facilitar a internalização celular, justificando os resultados apresentados na captura celular da NP-Fuc.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

OncoA foi encapsulada em nanopartículas de PIBCA revestidas com fucana, sendo comprovados através dos resultados obtidos da caracterização com as técnicas de FT-IR, EDX, MEV, DSC e TG, como também dos resultados obtidos quanto a taxa de encapsulação de $101,5 \pm 1,4\%$. Além disso, as nanopartículas apresentaram-se estáveis durante 7 meses e quando em contato com meios biológicos simulados, além de serem compatíveis com sangue humano, evidenciando possível segurança na administração dessas nanopartículas por via oral ou injetável.

Os estudos de atividade antiproliferativa mostraram que as OncoA-NP-Fuc potencializaram a atividade antiproliferativa da OncoA frente a linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231). Os resultados de citotoxicidade corroboram com os resultados de migração celular, mostrando que as OncoA-NP-Fuc inibiram a proliferação celular, como também inibiram a migração celular após 24 horas em contato com as células, mesmo em concentrações abaixo da IC_{50} ($10,5 \pm 0,74 \mu M$). O efeito antiproliferativo mais evidente da OncoA encapsulada comparado ao da OncoA pode estar relacionada ao fato de que as NP-Fuc são capturadas pelas células MDA-MB-231 com isso promovendo a liberação da OncoA intracelular e potencializando seu efeito citotóxico. Os resultados também mostraram que OncoA apresentou fluorescência intrínseca, podendo ser utilizada como marcador fluorescente. As nanopartículas obtidas apresentam características promissoras na potencialização da atividade antiproliferativa da OncoA, bem como na inibição da migração celular.

6.1 PERSPECTIVAS

Estudos são necessários para otimizar a concentração de fucana, OncoA e polímero, com objetivo de aumentar a concentração da OncoA encapsulada nas nanopartículas. Além disso, avaliar o perfil de liberação da OncoA das nanopartículas de PIBCA *in vitro* e comprovar a sua segurança na administração em modelo animal, avaliando seu perfil de toxicidade *in vitro* e *in vivo*, bem como a sua atividade antiproliferativa em outras linhagens de câncer de mama e antitumoral *in vivo*, buscando complementar os resultados obtidos nesse estudo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A.M.; MATSUMO, K.; WATANABE, H. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.400, p.89-97, 2000.
- ADÃO, R. et al. Cardiotoxicity associated with cancer therapy: pathophysiology and prevention strategies. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 32, n. 5, p. 395-409, 2013.
- ALEXANDER, A.; AJAZUDDIN; PATEL, R.J.; SARAF, S.; SARAF, S. Recent expansion of pharmaceutical nanotechnologies and targeting strategies in the field of phytopharmaceuticals for the delivery of herbal extracts and bioactives. **Journal of Controlled Release**, v.241, p.110-124, 2016.
- ALHARETH, K. et al. Doxorubicin loading and *In Vitro* release from poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles produced by redox radical emulsion polymerization. **Journal of Applied Polymer Science**, v.119, p.816-822, 2010.
- ALVES, G.P.; MARTINS, F.; SANTANA, M.H.A. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos. **Fármacos & Medicamentos**. São Paulo, ano 9, p.44-50, 2008.
- ASCHE, C. Antitumour quinones. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.5, n.5, p.449-467, 2005.
- BARRETO, A.C.H. et al. Magnetic nanosystem for cancer therapy using oncocalyxone A, an antitumour secondary metabolite isolated from a Brazilian plant. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p.18269-18283, 2013.
- BAYEN, S. et al. Synthesis, structure and electrochemical properties of 2,5 bis(alkyl/arylamino)1,4-benzoquinones and 2-arylamino-1,4 naphthoquinones. **Dyes and Pigments**, v.75, n.3, p.770-775, 2007.
- BECK, P.; SCHERER, D.; KREUTER, J. Separation of drug-loaded nanoparticles from free drug by gel filtration. **Journal of Microencapsulation**, v.7, n.4, p.491-496, 1990.
- BEHAN, N.; BIRKINSHAW, C.; CLARKE, N. Poly n-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerization and particle formation. **Biomaterials**, v.22, n.11, p.1335-1344, 2001.
- BELISARIO, M.A. et al. Effect of avarol and avarone on *in vitro*-induced microsomal lipid peroxidation. **Toxicology**, v.72, p.221-233, 1992.
- BELISARIO, M.A. et al. In vitro effect of avarone and avarol, a quinone/hydroquinone couple of marine origin, on platelet aggregation. **Pharmacology and Toxicology**, v.79, n.6, p.300-304, 1996.
- BOO, H.J. et al. The anticancer effect of fucoidan in PC-3 prostate cancer cells. **Marine Drugs**, v.11, n.8, p.2982-2999, 2013.

- BOUCHEMAL, K. et al. Synthesis and characterization of polyurethane and poly(ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v.269, n.1, p.89-100, 2004.
- BRANDAL, G.; YAO, Y.L.; NAVEED, S. Biocompatibility and corrosion response of laser joined NiTi to stainless steel wires. **Journal of Manufacturing Science and Engineering**, v.137, n.3, 2015.
- CHALE-DZUL, J. Hepatoprotective effect of the fucoidan from the brown seaweed turbinaria tricostata. **Journal of Applied Phycology**, v.27, n.5, p.2123-2135, 2014.
- CHAUVIERRE, C. et al. Novel polysaccharide-decorated poly(isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v.20, n.11, p.1786-1793, 2003.
- CHÉCOT, D.M. et al. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.317, n.2, p.458-468, 2008.
- CHEN, H. et al. Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Förster resonance energy transfer imaging. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, n.18, p.6596-6601, 2008.
- CHEN, M.C. et al. Low molecular weight fucoidan inhibits tumor angiogenesis through downregulation of HIF-1/VEGF signaling under hypoxia. **Marine Drugs**, v.13, n.7, p.4436-4451, 2015.
- CHEN, M.C. et al. Combined administration of fucoidan ameliorates tumor and chemotherapy-induced skeletal muscle atrophy in bladder cancer-bearing mice. **Oncotarget**, v.7, n.32, p.51608-51618, 2016.
- CHOI, J.I.; KIM, H.J. Preparation of low molecular weight fucoidan by gamma-irradiation and its anticancer activity, **Carbohydrate Polymers**, v.97, p.358-362, 2013.
- CHUNG, M.I. et al. Antiplatelet effects and vasorelaxing action of some constituents of Formosan plants. **Journal of Natural Products**, v.57, p.313-316, 1994.
- CRUCHO, C.I.C.; BARROS, M.T. Polymeric nanoparticles: a study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering: C**, v.80, p.771-784, 2017.
- COSTA, C.O. et al. Oncocalyxone A: Electrochemical, spectroscopic investigation and studies of its interaction with DNA, nucleobases and N-Acetylcysteine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 6, p. 1174-1185, 2012.
- COSTA, J.G.M. et al. High-performance liquid chromatographic analysis of bioactive quinones from *Auxemma glazioviana*. **ARKIVOC**, n.6, p.72-79, 2004.

COSTA, J.G.M. et al. Benzoquinonas, hidroquinonas e sesquiterpenos de *Auxemma glazioviana*. **Química Nova**, v.28, n.4, p.591-595, 2005.

COSTA, L.L.M. **Toxicidade oral aguda e avaliação dos efeitos pressóricos e renais causados pela quinona oncocalicxona A isolada da *Auxemma oncocalyx***. 2016. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. Toxicity to sea urchin egg development of the quinone fraction obtained from *Auxemma oncocalyx*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 8, p.927-930, 2002.

COUVREUR, P. et al. Polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.31, p.331-332, 1979.

COZZOLINO, R. et al. Biological activities of avarol derivatives, 1. Amino derivatives. **Journal of Natural Products**, v.53, n.3, p.699-702, 1990.

CUNHA, N.A. **Nanopartículas de PMMA obtidas por polimerização em miniemulsão via emulsão dupla para encapsulamento de biomoléculas**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto Alberto Luiz Coimbra, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

ĆURIĆ, A. et al. Development and lyophilization of itraconazole loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanospheres as a drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.78, p.121-131, 2015.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.L.; DIAS, D.A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v.14, p.299-315, 2015.

DER MARDEROSIAN, A.; BEUTLER, J.A. The review of natural products. 3rd ed. St. Louis (MO): Facts and Comparisons. 2002.

DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v.2, p.303-336, 2012.

DOUGLAS, S.L.; ILLUM, L.; DAVIS, S.S. Particle size and size distribution of poly (butyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. II. Influence of stabilizers. **Journal of colloid and interface science**, v.103, n.1, p.154-163, 1985.

DOWD, P.; ZHENG, Z.B. On the mechanism of the anticlotting action of vitamin E quinone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, n.18, p.8171-8175, 1995.

EL-SAY, K.M.; EL-SAWY, H.S. Polymeric nanoparticles: promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.528, n.1-2, p.675-691, 2017.

FARAHAT, A.A. et al. Exploration of DAPI analogues: Synthesis, antitrypanosomal activity, DNA binding and fluorescence properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.128, p. 70-78, 2017.

FDA – Food and Drug Administration. **Guidance for industry considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology**. U.S. Department of Health and Human Services. 2014.

FERRÁNDIZ, M.L. et al. Avarol and avarone, two new anti-inflammatory agents of marine origin. **European Journal of Pharmacology**, v.253, p.75-82, 1994.

FERREIRA M. A. D., LEAL L. K. A. M., PESSOA O. D. L., LEMOS T. L. G., BARROS S. B. M., VIANA G. S. B., Antioxidant activity of quinones isolated from *Auxemma oncocalyx* TAUB., Proceedings of the 6th Pharmatech, 3rd Annual Meeting of the SBTF, APGI Symposium on Membrane Transport, 3rd Meeting of Pharmaceutical Quality Control-ENECQ, 2001.

FERREIRA, M.A. et al. Inhibition of platelet activation by quinines isolated from *Auxemma oncocalyx* Taub. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v.106, n.1-2, p.97-107, 1999.

FERREIRA M.A.D. et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx*. **Phytomedicine**, v. 11, n.4, p. 315-322, 2004.

FERREIRA, M.A.D. et al. Antioxidant effects in the quinine fraction from *Auxemma oncocalyx* TAUB. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.26, p. 595-599, 2003.

FERREIRA, M.A.D. et al. Oncocalyxone A inhibits human platelet aggregation by increasing cGMP and by binding to GP Iba glycoprotein. **British Journal of Pharmacology**, v.154, p.1216-1224, 2008.

FERNANDO, I.; ZHOU, Y. Impacto f pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. **Chemosphere**, v.216, p.297-305, 2019.

FITTON, J.H.; STRINGER, D.N.; KARPINIEC, S.S. Therapies from fucoidan: an update. **Marine Drugs**, v.13, n.9, p.5920-5946, 2015.

FLORY, P.J. **Principles of polymer chemistry**. 1ª edição. Estados Unidos: Ithaca, 1953.

FRANCO, M.S. et al. Investigation of the antitumor activity and toxicity of long-circulating and fusogenic liposomes co-encapsulating paclitaxel and doxorubicin in a murine breast câncer animal model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.109, p.1728-1739, 2019.

GLORIEUX, C.; CALDERON, P.B. Cancer cell sensitivity to redox-cycling quinones is influenced by NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1 polymorphism. **Antioxidants**, v.8, n.9, p.369-378, 2019.

GOLAFSHAN, N. et al. Nanohybrid hydrogels of laponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material. **Carbohydrate polymers**, v.176, p.392-401, 2017.

GOMES, F.E.S. **Obtenção de sistemas microemulsionados e estudo de simulação por dinâmica molecular de sistemas micelares objetivando a veiculação de produtos naturais**

bioativos. 2010. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

GOTTSCHLING, M.C.; MILLER, J.S. Clarification of the taxonomic position of *Auxemma*, *Patagonula*, and *Saccellium* (Cordiaceae, Boraginales). **Systematic Botany**, v.31, n.2, p.361-367, 2006.

GOVENDER, T. et al. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release**, v.57, n.2, p.171-185, 1999.

GUERRERO, D.Q. et al. Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. **Journal of Microencapsulation**, v.15, n.1, p.107-119, 1998.

GUIMARÃES, I. P.; COELHO, M. F. B., AZEVEDO, R. A. B. Pau branco (*Cordia oncocalix* Allemão) – Boraginaceae: Árvore endêmica da Caatinga. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p.31-39, 2013.

HAROONE, M.S. et al. Fluorescence enhancement strategy for evaluation of the minor groove binder DAPI to complementary ssDNA sequence including telomere mimics in (ssDNA@DAPI/LDH)*n* ultrathin films. **Dyes and Pigments**, v.166, p.422-432, 2019.

HARTLEY, J.A.; RESZKA, K.; LOWN, J.W. Photosensitization by antitumor agents-7. Correlation between anthracenedione-photosensitized DNA damage, NADH oxidation and oxygen consumption following visible light illumination. **Photochemistry and Photobiology**, v.48, n.1, p.19-25, 1988.

HAYES, A.W. **Principles and methods of toxicology**. 5º Ed. Informa: Healthcare, 2007.

HILLIAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, n.17, p.2873-2896, 2009.

HOUGHTON, P.I. et al. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leucocytes and membrane lipid peroxidation. **Planta Medica**, v.61, p.33-36, 1995.

HUANG, C.H.; CHEN, C.M.; LEE, Y.D. Synthesis of high loading and encapsulation efficient paclitaxel-loaded poly(n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v.338, n.1-2, p.267-275, 2009.

HUANG, Y.C.; LAM, U.I. Chitosan/fucoidan pH sensitive nanoparticles for oral delivery system. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.58, n.6, p.779-785, 2011.

ICHIKAWA, Y. et al. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 2, p. 617-630, 2014.

ILAYARAJA, S.; PRABAKARAN, K.; MANIVANNAN, R. Evaluation of anti-bacterial, analgesic and anti-inflammatory activities of oncocalyxone A isolated from *Prenanthes sarmentosus*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 10, p.88-91, 2014.

- ITOIGAWA, M. et al. Antitumor agents. 203. Carbazole alkaloid murrayaquinone A and related synthetic carbazolequinones as cytotoxic agents. **Journal of Natural Products**, v.63, n.7, p.893-897, 2000.
- JOSHI, B.D. et al. Study of molecular structure, vibrational, electronic and NMR spectra of oncocalyxone A using DFT and quantum chemical calculations. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 113, p.367-377, 2013.
- KAPUSCINSKI, J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. **Biotech Histochem**, v.70, n.5, p.220-233, 1995.
- KARUNANITHI, P. et al. Three dimensional alginate-fucoidan composite hydrogel augments the chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 294-303, 2016.
- KIM, W.J. et al. Purification and anticoagulant activity of a fucoidan from Korean undaria pinnatifida sporophyll. **ALGAE**, v.22, n.3, p.247-252, 2007.
- KOYAMA, J. Anti-infective quinone derivatives of recente patents. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v.1, n.1, p.113-125, 2006.
- KUMAR, C.S.S.R. Nanotechnology tools in pharmaceutical R&D. **Materialstoday**, v.12, n.Supplement 1, p.24-30, 2010.
- KWAK, J.Y. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. **Marine Drugs**, v.12, n.2, p.851-870, 2014.
- LAMBERT, G. et al. Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides. **Pharmaceutical Research**, v.17, n.6, p.707-714, 2000.
- LEGRAND, P. et al. Influence of polymer behavior in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.344, p.1-2, p.33-43, 2007.
- LESO, V.; FONTANA, L.; LAVICOLI, I. Biomedical nanotechnology: Occupational views. **Nanotoday**, v.24, p.10-14, 2019.
- LEYVA, A. et al. Oncocalyxones A and C, 1,4-Antracenediones from *Auxemma oncocalyx*: Comparison with Anticancer 1,9-Anthracenediones. **Anticancer Research**, v.20, p.1029-1032, 2000.
- LI, C. et al. Gelatin effects on the physicochemical and hemocompatible properties of gelatin/PAAm/laponite nanocomposite hydrogels. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.7, n.33, p.18732-18741, 2015.
- LIMAYEM, I.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Purification of nanoparticle suspensions by a concentration/diafiltration process. **Separation and Purification Technology**, v.38, n.1, p.1-9, 2004.

LIN, T.S. et al. Synthesis and antimalarial activity of 2-aziridinyl-and 2,3-bis(aziridinyl)-1,4-naphthoquinonyl sulfonate and acylate derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.34, n.5, p.1634-1639, 1991.

LIRA, M.C.B. **Estudo da utilização de fucana como agente de direcionamento de nanopartículas para macrófagos**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

LIRA, M.C.B. et al. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.79, p.162-170, 2011.

LITTLE, R.D. et al. The intramolecular Michael reaction. **Organic Reactions**, v.47, p.315-552, 1995.

LIU, B.; THAYUMANAVAN, S. Substituent effects on the pH sensitivity of acetals and ketals and their correlation with encapsulation stability in polymeric nanogels. **Journal of the American Chemical Society**, v.139, n.6, p.2306-2317, 2017.

LOBERMANN, F.; WEISHEIT, L.; TRAUNER, D. Intramolecular vinyl quinone diels-alder reactions: asymmetric entry to the cordiachrome core and synthesis of (-)-isoglaziovianol. **Organic Letters**, v.15, n.17, p.4324-4326, 2013.

LU, K.Y. et al. Development of a new type of multifunctional fucoidan-based nanoparticles for anticancer drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v.165, p.410-420, 2017.

MADAENI, S.S.; FANE, A.G. Microfiltration of very dilute colloidal mixtures. **Journal of Membrane Science**, v.113, n.2, p.301-312, 1996.

MANO, E.B.; MENDES, L.C. **Introdução à polímeros**. 2ª edição. São Paulo: Edgard Blucher, 2004.

MATIAS, E. F. F. et al. The genus *Cordia*: botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p.542-552, 2015.

MATOS, T.S. et al., Neuroinhibitory meroterpenoid compounds from *Cordia oncocalyx*. **Fitoterapia**, v.123, p.65-72, 2017.

MEI, L. et al. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, n.6, p.880-890, 2013.

MELO, I.S.V. et al., Oncocalyxone A functions as an anti-glycation agent *in vitro*. **Plos ONE**, v.10, n.6, p.1-8, 2015.

MOHAMMADI, F. et al. Chitosan-heparin nanoparticle coating on anodized NiTi for improvement of blood compatibility and biocompatibility. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.12, p.159-168, 2019.

MONKS, T.J. et al. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.112, n.1, p.2-16, 1992.

MORAES, S.B. **Polimerização em massa para a síntese de nanocompósitos poliméricos usando hidroxissais lamelares (HSLs)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

MORELLO, A. et al. Effects and mode of action of 1,4-naphthoquinones isolated from *Calceolaria sessilis* on tumoral cells and trypanosome parasites. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v.112, p.119-128, 1995.

MULLER, W.E.G. et al. Potent antileukemic activity of the novel cytostatic agent avarone and its analogues in vitro and in vivo. **Cancer Research**, v.45, n.10, p.4822-4826, 1985.

MURAKAMI, H. et al. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. **International Journal of Pharmaceutics**, v.187, n.2, p.143-152, 1999.

NICOLAS, J.; COUVREUR, P. Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v.1, n.1, p.111-127, 2009.

ODIAN, G. **Principles of polymerization**. 4ª edição. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004.

ODUKOYA, O.A.; HOUGHTON, P.J.; RAMAN, A. Lipoxigenase inhibitors in the seeds of *Aframomum danelli* K. Schum. (Zingiberaceae). **Phytomedicine**, v.6, p.251-256, 1999.

OOWAKI, H. et al. Non-adhesive cyanoacrylate as an embolic material for endovascular neurosurgery. **Biomaterials**, v.21, p.1039-1046, 2000.

OSUNA, I.B. et al. Elaboration and characterization of thiolated chitosan-coated acrylic nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.316, n.1-2, p.170-175, 2006.

PALANIKUMAR, L et al. Importance of encapsulation stability of nanocarriers with high drug loading capacity for increasing in vivo therapeutic efficacy. **Biomacromolecules**, v.19, n.7, p.3030-3039, 2018.

PALANISAMY, S. et al. Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: structural characterization, *in vivo* antioxidant and anticancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.102, p.405-412, 2017.

PALAZZO, C. et al. Mucoadhesive properties of low molecular weight chitosan- or glycol chitosan- and corresponding thiomers-coated poly (isobutylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.117, p.315-323, 2017.

- PARK, H.Y. et al. Fucoidan inhibits the proliferation of human urinary bladder cancer T24 cells by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Molecules**, v.19, n.5, p.5981-5998, 2014.
- PESSOA, C. et al. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of northeast Brazil. **Phytotherapy Research**, v.14, p.187-191, 2000.
- PESSOA, C. et al. Cytotoxicity of derivatives of oncocalyxone A from *Auxemma oncocalyx* Taub. **ARKIVOC**, p.89-94, 2004.
- PESSOA, C. et al. Oncocalyxone A from *Auxemma oncocalyx* lacks genotoxic activity in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, Suppl 1, p.215-220, 2003.
- PESSOA, O.D.L. et al. Cordiachromes from *Auxemma oncocalyx*. **Phytochemistry**, v.40, n.6, p.1777-1786, 1995.
- PIMENTEL, L.F. et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.4, p.503-514, 2007.
- PINTO, A.C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.Supl.1, p.45-61, 2002.
- PKCSM. Pharmacokinetic Properties. Oncocalyxone A. Disponível em: <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>. Acesso em: 09 fev 2019.
- PLETSCBI, M. Compostos naturais biologicamente ativos. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.4, p.12-15, 1998.
- PUBCHEM. Open Chemistry Database. Oncocalyxone A. National Institutes of Health – NIH, 2019a. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/404386#section=Top>. Acesso em: 09 fev 2019.
- PUBCHEM. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. Fucoidan. National Institutes of Health – NIH, 2019b. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/92023653#section=Structures>. Acesso em: 01 jun 2019.
- PUVANESWARY, S. et al. Fabrication and *in vitro* biological activity of β TCP-chitosan-fucoidan composite for bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 799-807, 2015.
- QU, G. et al. Isolation and characterization of fucoidans from five brown algae and evaluation of their antioxidant activity. **Journal of Ocean University of China**, v.13, n.5, p.851-856, 2014.
- REECE, T.B.; MAXEY, T.S.; KRON, I.L. A prospectus on tissue adhesives. **American Journal of Surgery**, n.182, p.40-44, 2001.

REN, F. et al. Paclitaxel-loaded poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticle delivery system to overcome multidrug resistance in ovarian cancer. **Pharmaceutical Research**, v.28, p.897-906, 2011.

REQUENA, V.H.C. et al. Encapsulation of leu-enkephalin in core-shell isobutylcyanoacrylate-thiolated chitosan nanoparticles for oral administration. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v.53, n.4, p.1677-1681, 2008.

REVILLA, J.L. **Teste de toxicidade da fração da *Auxemma oncocalyx* e onconcalixona A sobre o desenvolvimento folicular e embrionário in vitro**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Ceará, Fortaleza, 2016.

REZAEI, A.; NASIRPOUR, A. Evaluation of release kinetics and mechanisms of curcumin and curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex incorporated in electrospun almond Gum/PVA nanofibers in simulated saliva and simulated gastrointestinal conditions. **BioNanoScience**, v.9, n.2, p.438-445, 2019.

ROCHA, T.N. **Solubilização do fármaco griseofulvina e da droga onconcalixona A utilizando misturas dos copolímeros F127/P123/PEG35K como aditivo**. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

RODRÍGUEZ-JASSO, R.M. et al. Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1137-1144, 2011.

RODRÍGUEZ-JASSO, R.M. et al. Extraction of sulfated polysaccharides by autohydrolysis of brown seaweed *Fucus vesiculosus*. **Journal of Applied Phycology**, v.25, n. 1, p. 31-39, 2013.

SANJEEWA, K.K.A. et al. The potential of brown-algae polysaccharides for the development of anticancer agents: an update on anticancer effects reported for fucoidan and laminaran. **Carbohydrate Polymers**, v.177, p.451-459, 2017.

SARIN, P.S. et al. Inhibition of replication of the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (human T-lymphotropic retrovirus/lymphadenopathy-associated virus) by avarol and avarone. **Journal of the National Cancer Institute**, v.78, n.4, p.663-666, 1987.

SARKER, S.D.; LATIF, Z.; GRAY, A.L. *Methods in biotechnology: natural product isolation* Satyajit DS. 2nd ed. Totowa (NJ): Human Press Inc. 2005.

SBARDELOTTO, A.B. **Estudo do mecanismo de citotoxicidade da onconcalixona-A em leukemia promielocítica humana – linhagem HL-60**. 2013. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SCHAFFAZICK, S.R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

- SIEPMANN, J. et al. Lipids and polymers in pharmaceutical technology: lifelong companions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.558, p.128-142, 2019.
- SILVA, A.J.M. et al. Antitumoral, antileishmanial and antimalarial activity of pentacyclic 1,4-naphthoquinone derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20, n.1, p.176-182, 2009.
- SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v.26, n.3, p.407-416, 2003.
- SIMUNEK, T. et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 1, p. 154-171, 2009.
- SINHA, V.R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.224, n.1-2, p.19-38, 2001.
- SIVAGNANAM, I.; KALAIVANAN, P.; RAJAMANICKAM, M. Anti-diabetic activity of oncocalyxone A isolated from *Prenanthes sarmentosus*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, n.4, p.630-633, 2013.
- SOMA, C.E. et al. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporine A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. **Biomaterials**, v.21, p.1-7, 2000.
- SOUSA, E.T.; LOPES, W.A.; ANDRADE, J.B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v.39, n.4, p.486-495, 2016.
- SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros – Parte I. **Polímeros**, v.22, n.1, p.96-100, 2012.
- TAVARES, C.A. et al. Validation of na HPLC-UV method for quantifying oncocalyxone A in different media and nanocapsules. **Chromatographia**, v.82, n.5, p.809-818, 2019.
- TAVARES, G.D. **Nanopartículas de poli(n-butil-cianoacrilato) revestidas com N,N,N-trimetil quitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade in vitro**. 2013. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- TENG, C.M. et al. Frangulin B, an antagonist of collagen-induced platelet aggregation and adhesion, isolated from *Ramulus formosana*. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.70, p.1014-1018, 1993.
- TISHCHENKO, G. et al. Ultrafiltration and microfiltration membranes in latex purification by diafiltration with suction. **Separation and Purification Technology**, v.30, n.1, p.57-68, 2003.

TISHCHENKO, G. et al. Purification of polymer nanoparticles by diafiltration with polysulfone/hydrophilic polymer blend membranes. **Separation and Purification Technology**, v.22-23, p.403-415, 2001.

TORCHILIN, V.P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **The AAPS Journal**, v.9, p.E128-147, 2007.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v.26, n.5, p.1025-1058, 2009.

VAUTHIER, C. et al. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.55, n.4, p.519-548, 2003.

VAZQUEZ, B. et al. Anti-inflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v.55, p.69-75, 1996.

VIANA, S.M. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of quinones from *Auxemma oncocalyx* Taub. On *Leishmania braziliensis*. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.9, n.5, p.132-139, 2015.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337. 2006.

WILSON, W.D. et al. DNA sequence dependente binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). **Biochemistry**, v.29, n.36, p.8452-8461, 1990.

WU, J. et al. Optimization of 2-(3-(arylalkyl amino carbonyl) phenyl)-3-(2-methoxyphenyl)-4-thiazolidinone derivatives as potent antitumor growth and metastasis agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.80, p.340-351, 2014.

XAVIER-JUNIOR, F.H. et al. Elucidation of the mechanism of complexation between oncocalyxone A and cyclodextrins by isothermal titration calorimetry and molecular modeling. **Journal of Molecular Liquids**, v. 274, p.165-172, 2019.

YADAV, H. et al. Polymer-based nanomaterials for drug-delivery carriers. In: **Nanocarriers for Drug Delivery**. Elsevier, p.531-556, 2019.

YAN, L. et al. Fucoidan derived from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via the ROS-mediated mitochondrial pathway. **Marine Drugs**, v.11, n.6, p.1961-1976, 2013.

YAN, M.D. et al. Fucoidan elevates microRNA-29b to regulate DNMT3B-MTSS1 axis and inhibit EMT in human hepatocellular carcinoma cells. **Marine Drugs**, v.13, n.10, p.6099-6116, 2015.

YU, S.H. et al. Preparation of fucoidan-shelled and genipin-crosslinked chitosan beads for antibacterial application. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 97-107, 2015.

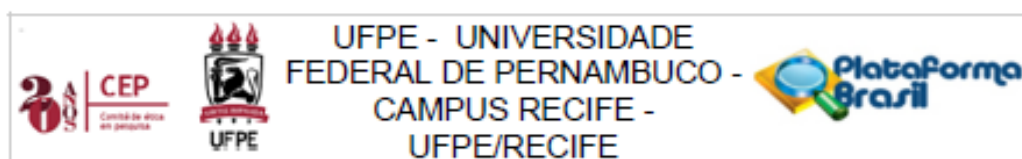
ZAYED, A. et al. Physicochemical and biological characterization of fucoidan from *Fucus vesiculosus* purified by dye affinity chromatography. **Marine Drugs**, v.14, n.4, p.79-93, 2016.

ZAYED, A.; ULBER, R. Fucoidan production: approval key challenges and opportunities. **Carbohydrate Polymers**, v.211, p.289-297, 2019.

ZHANG, Z. et al. Fucoidan extract induces apoptosis in MCF-7 cells via a mechanism involving the ROS-dependent JNK activation and mitochondria-mediated pathways. **Plos ONE**, v.6, n.11, p.e27441-e27454, 2011.

ZHANG, Z. et al. Fucoidan extract enhances the anti-cancer activity of chemotherapeutic agents in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. **Marine Drugs**, v.11, n.1, p.81-98, 2013.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTI-TUMORAL IN VITRO E IN VIVO, PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS E TOXICIDADE IN VIVO DA ONCOCALIXONA A ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS DE POLI (ISOBUTIL-CIANOACRILATO)

Pesquisador: Iago Dillion Lima Cavalcanti

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 25179719.1.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.794.871

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTI-TUMORAL IN VITRO E IN VIVO, PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS E TOXICIDADE IN VIVO DA ONCOCALIXONA A ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS DE POLI (ISOBUTIL-CIANOACRILATO). Projeto de pesquisa para Tese do Curso de doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco tendo como pesquisador responsável Iago Dillion Lima Cavalcanti, sob a orientação da Profa. Nereide Stela Santos Magalhães e co-orientadora a Profa. Mariane Cajubá de Brito Lira Nogueira.

A ONCO A é uma quinona isolada principalmente do cerne do caule da *Cordia oncocalyx*. Estudos demonstram que a ONCO A apresenta atividades citotóxicas, antioxidantes, antiplaquetária, analgésica e anti-inflamatória. Apesar do amplo potencial

terapêutico da ONCO A, muitos dos compostos obtidos de plantas, apresentam deficiências biofarmacêuticas que os impossibilitam a sua aplicação terapêutica. No caso da ONCO A, alguns estudos evidenciam que ela pode ser tóxica para os rins, pulmão e coração, sendo tais toxicidades comum em compostos pertencente a classe das

quinonas. Devido a estas limitações, novas abordagens terapêuticas têm surgido com o intuito de modificar os perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos de moléculas terapêuticas, promovendo uma vetorização de ativos para sítios alvos, reduzindo toxicidade e cessando o progresso de doenças. Neste sentido, o uso da nanotecnologia farmacêutica traz alternativas a partir da

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-9588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br