
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

REGIANE GODOY DE LIMA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS PARA VEICULAÇÃO DE LIGNANAS BIOATIVAS**

ILHA SOLTEIRA

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ilha Solteira

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA
VEICULAÇÃO DE LIGNANAS BIOATIVAS**

REGIANE GODOY DE LIMA

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Rosangela da
Silva de Laurentiz

Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a. Marcia Regina de
Moura Aouada

Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a. Maria Teresa Barros

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia –
UNESP – Campus de Ilha Solteira, para
obtenção do título de Doutora em Ciência dos
Materiais.

Área de conhecimento: Física da Matéria
Condensada.

Ilha Solteira – SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

L732s Lima, Regiane Godoy de.
Síntese e caracterização de nanopartículas poliméricas para veiculação de lignanas bioativas / Regiane Godoy de Lima. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2018
101 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia.
Área de conhecimento: Física da Matéria Condensada, 2018

Orientador: Rosangela da Silva de Laurentiz
Co-orientador: Maria Teresa Barros e Márcia Regina de Moura Aouada.
Inclui bibliografia

1. Nanopartículas. 2. Polímeros . 3. Lignanas. 4. Piper cubeba. 5. Poli (Ácido Lático-Co-Ácido Glicólico). 6. Biodegradável .



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Síntese e caracterização de nanopartículas poliméricas para veiculação de lignanas bioativas

AUTORA: REGIANE GODOY DE LIMA

ORIENTADORA: ROSANGELA DA SILVA DE LAURENTIZ

COORIENTADORA: MARCIA REGINA DE MOURA AOUADA

COORIENTADORA: MARIA TERESA BARROS SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA DOS MATERIAIS, área: FÍSICA DA MATERIA CONDENSADA pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSÂNGELA DA SILVA DE LAURENTIZ
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO MALMONGE
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Dr. ALEXANDRE BORGES
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Profa. Dra. MARIA MARGARIDA CANAS MENDES DE ALMEIDA CARDOSO
Departamento de Química / Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Prof. Dr. MARCIO LUÍS ANDRADE E SILVA
Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnológicas / Universidade de Franca

Ilha Solteira, 20 de abril de 2018

*Dedico este trabalho ao meu irmão Vitor de Lima,
por partilhar dos mesmo sentimentos sobre o valor da ciência.*

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar o meu sincero agradecimento às pessoas e instituições que contribuíram para a concretização da presente tese de doutorado:

À Profa. Dra. Rosangela da Silva de Laurentiz pela orientação, dedicação, comprometimento e apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho. Agradeço também pelos ensinamentos passados, pelas críticas construtivas, suporte, incentivo e amizade manifestada ao longo destes anos.

À Profa. Dra Maria Teresa Barros por contribuir com a co-orientação do trabalho, por me aceitar em seu grupo de investigação Química Orgânica-LAQV, com total confiança em meu trabalho, concedendo-me total acesso a todos os laboratórios e materiais necessário à realização deste trabalho da melhor forma possível, pelo aprendizado, por toda a disponibilidade de tempo, sempre com muita empolgação. ÂNIMO!

À Profa Dra Márcia Regina de Moura Aouada pela co-orientação, comprometimento, discussões construtivas, conhecimento passado, dedicação ao trabalho e amizade.

À Profa Dra Margarida Cardoso por disponibilizar seu laboratório e materiais para a realização dos ensaios de liberação (libertação) no Departamento de Química na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. E disponibilidade e amizade.

À Profa. Dra, Alexandra Fernandes agradeço a colaboração na realização dos ensaios de viabilidade celular *in vitro*, realizados no Departamento de Ciências da Vida na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

À Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, pelos ensaios de citotoxicidade das lignanas, realizados no Departamento de Biologia e Zootecnia.

Ao Prof. Dr. Jorge Caldeira pela disponibilidade do uso do AFM e do seu tempo me ensinando a utilização do equipamento no Departamento de Química na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Ao grupo de Síntese Orgânica e Produtos Naturais do DFQ da UNESP/FEIS, Prof. Dr. Alexandre Borges, Ana Paula Pissurno, Fernanda Amorim, William P. Gomes, Aline Féboli, pela ajuda oferecida ao longo deste trabalho, sendo com explicações teóricas, na parte experimental e em discussões. Agradeço pelas risadas do cotidiano.

Ao grupo de Pesquisa de Síntese Orgânica do Departamento de Química da FCT/UNL Cláudia Raposo, Cristiano Conceição, Joana Costa, Sandro Belchior por todo tempo, toda ajuda fornecida, amizade e comprometimento comigo.

Aos Professores do DFQ da UNESP/FEIS que ao longo desses anos sempre me ofereceram conhecimento e suporte para concretizar este trabalho.

Aos meus amigos da UNESP/FEIS que aos longos desses anos sempre me ajudaram com amizade, carinho e pela ajuda oferecida ao longo deste trabalho.

Aos técnicos do DFQ da UNESP/FEIS e Departamento de Química da FCT/UNL que me deram suporte para a pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação de Ciências dos Materiais da UNESP/FEIS.

Ao Programa de Doutorado em Química Sustentável do Departamento de Química, LAQV-REQUIMTE, FCT, UNL pelo suporte.

À minha mãe Marte Regina Godoy, ao meu pai, Hermínio de Lima, irmã Mariane Godoy de Lima e irmão, Vitor de Lima. Agradeço por tudo! Por todo suporte, carinho, dedicação e amor.

À CAPES pela bolsa concedida.

À CAPES/PDSE (processo: PSDE/88881.134923/2016-01) pela bolsa no período do Doutorado Sanduíche no Exterior.

A todos os que direta ou indiretamente tornaram possível a concretização deste trabalho o meu sincero agradecimento.

“O conhecimento nos faz responsáveis.”

(Che Guevara)

“O tamanho dos seus sonhos deve sempre exceder a sua capacidade atual para alcançá-los. Se os seus sonhos não te assustam, eles não são grandes o suficiente.”

(Ellen Johnson-Sirleaf)

RESUMO

Os produtos naturais são uma fonte inesgotável de compostos químicos com as mais variadas propriedades biológicas, entretanto, muitos deles têm baixa biodisponibilidade e/ou são degradados pelas condições fisiológicas, o que os torna de pouco interesse para uso como potenciais fármacos. Dentre os vários produtos naturais bioativos as lignanas apresentam um significativo potencial citotóxico contra várias linhagens de células tumorais, como a (-)-hinoquinina (HNK), (-)-cubebina (CB) e (-)-6,6'-dinitrohinoquinina (DN), determinado em outros trabalhos. Entretanto, essas lignanas possuem caráter hidrofóbico e podem ser degradadas em condições fisiológicas dependendo do pH. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo estudar a incorporação dessas lignanas em nanopartículas poliméricas (NNPs), como forma de melhorar a biodisponibilidade, perdas por degradação e os efeitos da incorporação sobre a atividade citotóxica desses compostos. Neste estudo a HNK e CB foram extraídas da *Piper cubeba* e a DN foi sintetizada a partir da reação de nitração da HNK. Essas lignanas foram submetidas a ensaios de citotoxicidade contra as linhagens tumorais Hep-2 e Si-Ha. As NNPs com e sem a lignana foram sintetizadas utilizando como matriz polimérica inicialmente o PLGA (Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)). As NNPs sintetizadas foram caracterizadas quanto ao seu tamanho, morfologia e estabilidade utilizando análises de MEV, DSC, MET, UV/Vis, FTIR, DLS e potencial zeta. A eficiência da incorporação foi determinada através de análises de UV/Vis. Nos ensaios de citotoxicidade todas as lignanas foram ativas, com destaque para a inibição de 98% da HNK sobre a linhagem Hep-2. As três lignanas foram incorporadas em NNPs de PLGA utilizando o método de nanoemulsão-evaporação com agitação mecânica e gotejamento, entretanto a estabilidade dessas NNPs e as porcentagens de incorporação indicaram que apenas as NNPs-PLGA-HNK apresentaram os parâmetros necessários para a utilização nos ensaios de citotoxicidade. Portanto, outros

estudos foram realizados com as três lignanas visando a melhora nos métodos de obtenção e estabilidade com o uso de sonicador e diferente composição do PLGA (50:50) e PLGA-PEG. As análises físicas mostraram que as nanopartículas de PLGA (50:50) obtidas através da metodologia por sonicação foram mais estáveis com menores tamanhos e maior potencial zeta em valores absolutos, entretanto, a DN e a CB não foram encapsuladas de forma eficiente. Desta forma, somente a HNK prosseguiu no estudo. O uso do PLGA-PEG alterou de forma significativa os parâmetros físicos e químicos das NNPs-PLGA-PEG-HNK em relação as de PLGA-HKN. Os testes de liberação mostraram melhores resultados com as NNPs-PLGA-HNK, principalmente em pH 7,4. O tempo de liberação total da HNK em todas as NNPs avaliadas foi em torno de 30 minutos o que sugere que as nanopartículas obtidas são nanocápsulas. A comparação dos resultados dos ensaios de citotoxicidade mostraram que o CI_{50} das NNPs de PLGA-HNK foi de 29,8 μ M sobre as células tumorais Si-Ha, enquanto a HNK livre apresentou $CI_{50} = 110 \mu$ M. Para as outras células tumorais mais agressivas as NNPs de PLGA(50:50)-HNK foram menos eficazes do que a HNK livre, com cerca de 50% de perda da atividade. Esses resultados indicam a efetividade das NPPs de PLGA(65:35)-HNK sobre as células da linhagem Si-Ha, e que o encapsulamento da HNK em NNPs de PLGA pode ser uma alternativa para diminuir a decomposição e aumentar a biodisponibilidade para a condução de em ensaios *in vivo*.

Palavras-chave: Sistema de entrega de drogas, (-)-6,6'-dinitrohinoquinina, (-)-hinoquinina, (-)-cubebina, PLGA, PLGA-PEG, materiais biocompatíveis.

ABSTRACT

The natural products are inexhaustible source of chemical compounds with the most varied biological properties; however, many of them have low bioavailability and / or are degraded by physiological conditions, which makes them less interesting for use as potential drugs. Among the several bioactive natural products the lignans present a significant cytotoxic potential against several tumor cell lines, as (-)-hinokinin (HNK), (-)-cubebin (CB) and (-)-6,6'-dinitrohinokinin (DN), determined in previous works. However, these lignans have a hydrophobic character and can be degraded in physiological conditions depending on pH. Thus, the present work aimed to study the incorporation of these lignans into polymeric nanoparticles (PNPs), as a method to improve bioavailability, avoid losses by degradation and evaluate as this incorporation affects the its cytotoxic activity. In this study, the HNK and CB were extracted from *Piper cubeba* and the DN was synthesized from the nitration reaction of the HNK. These lignans were submitted to cytotoxicity assays against tumoral cells Hep-2 and Si-Ha. The empty and content lignans PLGA (Poly Lactic-co-Glycolic Acid, 65:35) PNPs were synthesized using the emulsion-evaporation methodology on mechanical agitation and dripping. The PNPs were investigated for their size, morphology and stability through SEM, DSC, TEM, UV/Vis, FTIR, DLS and zeta potential. Encapsulation efficiency incorporation of the lignan was determined by analysis of UV/Vis. In the cytotoxicity assays all lignans were active, with emphasis on inhibition of 98% da (-)-hinokinin about the Hep-2 tumoral line. The three lignans were incorporated into PLGA (65:35) NNPs, however the stability of these PNPs and the percentages of incorporation indicated that only the PLGA-HNK PNPs had the parameters required for use in the cytotoxicity assays. Therefore, other studies were performed with the three lignans aiming to improve the methods of obtaining and stability from sonicator and different composition in PLGA: (50:50) and PLGA-PEG. The physical

analyses showed that PLGA (50:50) nanoparticles obtained by sonication were more stable with smaller sizes and higher zeta potential in absolute values. However, even in this method, DN e CB were not efficiently encapsulated. In this way, only HNK continued the study. The use of PLGA-PEG altered the physical and chemical parameters of PLGA-PEG-HNK NNPs obtained when compared to PLGA-HNK NNPs. Release tests showed better results with NNPs-PLGA-HNK, especially at pH 7.4. The total release time of HNK in all NNPs evaluated was around 30 minutes, which suggests that the nanoparticles obtained are nanocapsules. Comparison of cytotoxicity assay results showed that PLGA-HNK NNPs IC_{50} was 29.8 μ M on the Si-Ha tumor cells, while the free HNK showed $IC_{50} = 110 \mu$ M. For the other more aggressive tumor cells PLGA (50:50)-HNK NNPs were less effective than free HNK with about 50% loss of activity. These results indicate the effectiveness of PLGA(65:35)-HNK NNPs on cells of the Si-Ha line, and that the encapsulation of HNK in PLGA NNPs may be an alternative to decrease decomposition and increase bioavailability for conducting biological assays *in vivo*.

Keywords: Drug delivery system, (-)-6,6'-dinitrohinokinin, (-)-hinokinin, (-)-cubebin, PLGA, PLGA-PEG, biocompatible materials.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 1. Nanopartículas de sistemas de entrega de drogas em relação a outras escalas.</i>	25
<i>Figura 2. Escalas do desenvolvimento temporal da área da nanotecnologia associada ao transporte de fármacos, proteínas, DNA, etc. Destaque de alguns dos acontecimentos marcantes da história da nanotecnologia.</i>	27
<i>Figura 3. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.</i>	29
<i>Figura 4. Estruturas químicas dos ácidos glicólico e lático.</i>	30
<i>Figura 5. Estrutura química do PLGA-PEG e representação geral de uma partícula de PLGA-PEG com uma molécula encapsulada.</i>	32
<i>Figura 6. Comparação do tecido normal e do tecido tumoral em relação ao arranjo das células e à ação das NNPs.</i>	36
<i>Figura 7. Figura representativa das administrações convencional com liberação controlada de fármacos</i>	37
<i>Figura 8. Subclasses das lignanas</i>	44
<i>Figura 9. Semente seca da Piper Cubeba e estruturas da CB e HNK.</i>	45
<i>Figura 10. Fluxograma da extração das lignanas provenientes dos frutos secos da Piper cubeba.</i>	50
<i>Figura 11. Estrutura da CB.</i>	51
<i>Figura 12. Estrutura da HNK.</i>	52
<i>Figura 12. Estrutura da DN</i>	53
<i>Figura 13. Espectro de RMN de ¹H da HNK em CDCl₃</i>	59
<i>Figura 14. Espectro de RMN de ¹³C da HNK em CDCl₃</i>	60
<i>Figura 15. Espectro de RMN de ¹H da CB em CDCl₃</i>	60
<i>Figura 16. Espectro de RMN de ¹³C da CB em CDCl₃</i>	61
<i>Figura 17. Reação de obtenção da DN.</i>	61
<i>Figura 18 Espectro de RMN de ¹H DN em CDCl₃</i>	62
<i>Figura 19. Espectro de RMN de ¹³C da (-)-6,6'-dinitrohinoquina em CDCl₃.</i>	63
<i>Figura 20. Resultado do ensaio de proliferação celular da DN contra células Hep-2.</i>	64
<i>Figura 21. Resultado do ensaio de proliferação celular da DN sobre a linhagem Si-Ha.</i>	65
<i>Figura 22. Resultado do ensaio de proliferação celular da CB em células Hep-2.</i>	66
<i>Figura 23. Resultado do ensaio de proliferação celular da CB sobre a linhagem Si-Ha.</i>	66
<i>Figura 24. Resultado do ensaio de proliferação celular da HNK em células Hep-2.</i>	67
<i>Figura 25. Resultado do ensaio proliferação celular da HNK sobre a linhagem Si-Ha.</i>	68
<i>Figura 26. Resultado do ensaio de proliferação celular da (-)-podofilotoxina em células Hep-2.</i>	68
<i>Figura 27. Resultado do ensaio de proliferação celular da podofilotoxina sobre a linhagem Si-Ha.</i>	69

<i>Figura 28. Micrografias das NNPs obtidas por MEV: A) PLGA, B) PLGA-HNK, C) PLGA-CB e D) PLGA-DN.</i>	71
<i>Figura 29. Micrografias de MEV da CB.</i>	72
<i>Figura 30. Eficiência de encapsulamento da HNK nas NNPs de PLGA (PLGA-HNK).</i>	74
<i>Figura 31. Resultado do ensaio de viabilidade celular das NNPs PLGA-HNK e da HNK livre sobre a linhagem Si-Ha.</i>	74
<i>Figura 32. Micrografias obtidas das NNPs por MEV: A) PLGA, B) PLGA-HNK, C) PLGA-CB e D) PLGA-DN,</i>	77
<i>Figura 33. Micrografias das NNPs obtidas por MEV: A) PLGA (50:50) e B) PLGA(50:50)/HNK.</i>	78
<i>Figura 34. Micrografias obtidas por MET: A) NNPs de PLGA (50:50) e B) PLGA (50:50)-HNK</i>	79
<i>Figura 35. Micrografias das NNPs obtidas por MEV. A) PLGA-PEG e B) PLGA-PEG-HNK</i>	80
<i>Figura 36. Micrografias das NNPs obtidas por MET: A) PLGA-PEG e B) PLGA-PEG-HNK</i>	81
<i>Figura 37. Termogramas de TG das NNPs PLGA, PLGA-HNK, PLGA-PEG, PLGA-PEG-HNK e HNK.</i>	82
<i>Figura 38. Termogramas das NNPs PLGA, PLGA-HG, PLGA-PEG, PLGA-PEG-HNK e HNK.</i>	83
<i>Figura 39. Eficiência de encapsulação das NNPs de PLGA (50:50)-HNK e PLGA-PEG-HNK .</i>	85
<i>Figura 40. Resultado dos ensaios de liberação com as NNPs de PLGA-HNK e PLGA-PEG-HNK</i>	86
<i>Figura 41. Avaliação da HNK livre e incorporada em NNPs contra a linhagem tumoral HCT116.</i>	87
<i>Figura 42. Avaliação da UNK livre e incorporada em NNPs contra a linhagem tumoral A549</i>	88
<i>Figura 43. Avaliação da HNK livre e incorporada em NNPs contra a linhagem tumoral A2780.</i>	89

LISTAS DE TABELAS

<i>Tabela 1. Estudos comparativos sobre a eficiência de fármacos encapsulados em nanopartículas e sob a forma de veiculação normal.</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 2. Tamanho da distribuição das partículas, polidispersidade e potencial zeta ζ das NPPs PLGA e PLGA-HNK.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 3. Comparação entre tamanho da distribuição das partículas, polidispersidade e potencial zeta ζ das NPPs obtidas com PLGA 65:35 e PLGA 50:50.</i>	<i>78</i>
<i>Tabela 4. Tamanho da distribuição das partículas, polidispersidade e potencial zeta ζ das NPPs preparada pelo método de emulsão/evaporação utilizando o sonicador.....</i>	<i>81</i>

LISTA DE ABREVIACÕES, FÓRMULAS, TERMOS TÉCNICOS E SÍMBOLOS

A2780 – Células de carcinoma ovariano

A549 – Células de adenocarcinoma pulmonar

CB - (-)-Cubebina

CCD - Cromatografia em camada delgada

DN - 6,6'-Dinitrohinoquinina

Dox - Doxobicina

DRX - Difração de raios - X

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

FDA - *Food and drug administration*

FTIR - Espectroscopia no infravermelho

HCT116 – células de carcinoma colo retal,

Hep-2 - Carcinoma de laringe

HKN - (-)-Hinoquinina

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MTS - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazio

NPPs - Nanopartículas poliméricas

PBS - Solução tampão de fosfato de sódio

PDI - Polidispersividade indexada

PEG - Polietilenoglicol

PLA - Poli(ácido lático)

PLGA - Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)

PVA - Álcool polivinílico

PVM-MA - Poli(vinilmetileter-anidrido maleico)

RMN – Ressonância magnética nuclear

SFM – Sistema fagócito molecular

Si-Ha - Linhagem de carcinoma cervical humano infectada pelo HPV-16

TG - Termogravimétrica

UV/Vis- Espectroscopia no ultravioleta e visível

SUMÁRIO

MOTIVAÇÃO	20
1. INTRODUÇÃO	22
1.1 NANOPARTÍCULAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO	23
1.1.1 Perspectiva Histórica	26
1.1.2 Nanopartículas Poliméricas (NPPs).....	28
1.1.3 Polímeros dos Ácidos Lático e Glicólico	30
1.1.4 PEG como co-polímero	31
1.1.5 Métodos de formação de nanopartículas poliméricas	32
1.1.6 Mecanismo de ação das NNPs sobre células tumorais	35
1.1.7 Toxicidade de nanopartículas poliméricas	39
1.1.8 Técnicas para a caracterização físico-química de nanopartículas	40
1.1.9 Biodegradação	42
1.2. LIGNANAS EXTRAÍDAS DA PIPER CUBEBA	43
2. OBJETIVOS	46
3. PARTE EXPERIMENTAL	47
3.1 Materiais e Métodos	47
3.1.1. Equipamentos e Reagentes	47
3.1.2 Extração da lignanas (-)-hinoquinina (HNK) e (-)-cubebina (CB)	50
3.1.3. Síntese da (-)-6,6'-dinitrohinoquinina (DN)	52
3.2 Preparação de Nanopartículas Poliméricas (NNPs) pelo método de nanoemulsificação- evaporação do solvente	53
3.3 Caracterização das Partículas Poliméricas	54
3.3.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ξ).....	54
3.3.2 Morfologia das NPPs - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	54
3.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC - Differential Scanning Calorimetry)	55
3.3.4 Eficiência de Encapsulamento	55
3.3.5 Ensaio de Liberação.....	56
3.3.6 Ensaios de Proliferação Celular	56

3.3.7. Ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade)	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
4.1. Extração das lignanas.	59
4.2. Síntese da (-) 6,6'- dinitrohinoquinina (DN).....	61
4.3. Ensaio de citotoxicidade das lignanas HNK, CB e DN.	63
4.4. Síntese das NNPs PLGA-lignanas, caracterização, eficiência de encapsulamento, velocidade de liberação e citotoxicidade (Realizado na primeira parte do Projeto na FEIS-UNESP, Brasil)	70
4.4.1 Caracterizações das NNPs PLGA-Lignanas preparadas pelo método de emulsão/evaporação utilizando agitador mecânico e sistema de gotejamento com PLGA 65:35.....	70
4.4.2. Eficiência de encapsulamento da HNK nas NPPs PLGA-HNK	73
4.4.3. Ensaio de Proliferação celular das NPPs PLGA-HNK	74
4.5. Síntese das NNPs PLGA-lignanas, PLGA-PEG-lignanas, caracterização, eficiência de encapsulamento, velocidade de liberação e citotoxicidade (Realizado na segunda parte do Projeto na FCT - Universidade Nova de Lisboa, Portugal).....	75
4.5.1 Caracterizações das NNPs PLGA-Lignanas	75
4.5.2. Eficiência de Encapsulamento	84
4.5.3 Ensaio de Liberação.....	85
4.5.4. Avaliação da citotoxicidade das NNPs de PLGA(50:50)-HNK e PLGA-PEG-HNK contra as linhagens tumorais HCT116, A549, A2780	87
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	90
REFERÊNCIAS	92

MOTIVAÇÃO

A grande maioria dos fármacos, usados em tratamentos quimioterápicos, causam muitos e sérios efeitos colaterais devido à grande dosagem necessária, pois somente parte do fármaco é absorvida, devido à degradação antes da chegada ao alvo desejado (células, tecidos ou órgãos). Muitos desses fármacos possuem baixa seletividade, ou seja, atuam também sobre as células normais, além de produzirem metabólitos de alta toxicidade. Desta forma, existe a necessidade de se buscar novos compostos com atividade antitumorais que sejam mais seletivos do que os principais agentes quimioterápicos atualmente em uso. Neste contexto, os produtos naturais extraídos de plantas são sem dúvida uma fonte de estruturas químicas com potencial biológico. As lignanas se encontram entre os produtos naturais que apresentam um grande número de propriedades biológicas, incluindo a atividade antitumoral. Entretanto, o uso de lignanas como possível agente quimioterápico esbarra no problema associado à sua natureza hidrofóbica que diminui a absorção e com isso a biodisponibilidade no meio biológico, assim como acontece com grande parte dos quimioterápicos em uso. Uma das alternativas para diminuir os problemas da insolubilidade é o encapsulamento desses compostos em nanopartículas poliméricas biodegradáveis como as de PLGA. O encapsulamento também evita a decomposição e por isso a quantidade do produto natural que chega inalterado ao alvo (tecidos e órgãos) é maior. Outra vantagem que se pode obter com o encapsulamento em nanopartículas é a diminuição da dose, pois a liberação do princípio ativo é feita lentamente mantendo sua concentração constante por um determinado período maior, sem a necessidade da administração de outra dose. Desta forma, este trabalho teve por objetivo estudar a síntese, caracterização e estabilidade de nanopartículas poliméricas

contendo lignanas bioativas, além de estudar o potencial citotóxico dessas formulações em comparação com as lignanas livres contra diferentes linhagens de células tumorais.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são uma fonte inesgotável de compostos químicos com as mais variadas estruturas químicas e propriedades biológicas, entretanto muitos desses compostos ativos são degradados pelas condições fisiológicas o que os torna de pouco interesse para uso como potenciais fármacos¹. Tendo presente esta limitação, a associação de produtos naturais em nanopartículas se constitui uma linha de pesquisa de futuro promissor. As nanopartículas são consideradas como sendo um dos melhores sistemas de entrega de fármacos devido à natureza química e propriedades físicas que apresentam. Logo introduzir produtos naturais biologicamente ativos em nanopartículas é uma forma de evitar a decomposição destes nas diferentes condições fisiológicas, bem como utilizar dosagens menores o que diminuiu possíveis efeitos colaterais e toxicidade. Entretanto, um problema frequente inerente ao uso de nanopartículas resulta do fato de ser relativamente baixa a porcentagem de incorporação do princípio ativo. Desta forma, é importante explorar e melhorar o uso de nanopartículas poliméricas, como uma alternativa para tentar aumentar a biodisponibilidade do princípio ativo e evitar sua degradação pelas condições fisiológicas².

Dentre os vários produtos naturais bioativos estão as lignanas que apresentam diversidade estrutural, grande ocorrência na natureza e variedade de propriedades biológicas^{3,4}. Uma das principais propriedades biológicas desempenhadas pelas lignanas e que merece destaque é a ação citotóxica que algumas apresentam contra diferentes linhagens de células tumorais^{5,6}. A hinoquinina⁷, podofilotoxina⁸ e enterolactona⁹ estão entre as principais lignanas citotóxicas. A *Piper cubeba* tem sido uma importante fonte de lignanas bioativas como a (-)-hinoquinina e a (-)-cubebina que juntas são responsáveis pela publicação de mais de 200 artigos nas últimas duas décadas^{7,10-13}.

As atividades biológicas atribuídas à (-)-cubebina, assim como a de alguns de seus derivados sintéticos, aumentaram a importância desta classe de substâncias como alvos na pesquisa por novas moléculas para o desenvolvimento de fármacos inclusive para o tratamento de câncer^{3,14}. Em 2015, Graidist *et al.* determinaram o efeito citotóxico de extratos bruto de *P. cubeba* em fibroblastos normais (L929), células de mama normal (MCF-12A) e três linhagens de células cancerígenas da mama (MCF-7, MDA-MB-468 e MDA-MB 231)¹⁵. Rajalekshmi *et al.*, em 2016, obteve significativa atividade anticancerígena *in vitro* usando a (-)-cubebina e cinco derivados, obtidos a partir dela, contra seis linhagens celulares de câncer (A549, K562, Si-Ha, KB, HCT116 e HT29)¹⁶. Entretanto, o uso de lignanas como possível agente quimioterápico esbarra no problema associado à sua natureza hidrofóbica que diminui a absorção e com isso a biodisponibilidade no meio biológico, assim como acontece com grande parte dos quimioterápicos em uso¹⁴. Atendendo ao elevado potencial destes compostos, há necessidade de explorar métodos para ultrapassar este problema.

1.1 NANOPARTÍCULAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO

Aliada a novas tecnologias utilizadas pela indústria farmacêutica existem também pesquisas para a maior segurança e eficácia de ativos já conhecidos, incluindo novos dispositivos farmacêuticos para a veiculação desses ao paciente. A aplicação convencional de drogas é caracterizada por uma eficácia limitada, baixa biodistribuição e falta de seletividade, fazendo com que somente uma fração da dose administrada alcance o alvo terapêutico¹⁷.

Desta forma, nas últimas décadas houve um grande avanço nas pesquisas para desenvolver sistemas que fossem capazes de transportar o fármaco até seu alvo específico (células, órgãos e tecidos). A vetorização de fármacos tem grande potencial para solucionar os problemas enunciados. Este sistema é transportado para o local de ação, e assim, a sua influência sobre os tecidos vitais e efeitos secundários indesejáveis, podem ser minimizados.

Além disso, a vetorização protege o fármaco de degradação rápida e aumenta sua concentração nos tecidos-alvo, e com isso, torna-se desnecessário o uso de altas doses¹⁸.

A evolução da nanotecnologia para a medicina abriu a possibilidade do uso de materiais em escala nano como sistemas de entrega das drogas^{19,20}. A utilização das nanopartículas proporciona liberdade inigualável modificando as propriedades fundamentais do fármaco tais como a solubilidade, difusividade, tempo de meia vida no sangue, características de liberação e imunogenicidade²¹. Os dispositivos terapêuticos de nanoescala são nanoestruturas funcionais integradas e não misturas simples de materiais. Suas propriedades emergem como resultado da organização espacial e/ou temporal, coordenação e regulação da ação de componentes individuais. Uma questão-chave no uso de nanossistemas terapêuticos é a sua capacidade de ter farmacocinética alterada em comparação com a substância medicamentosa livre e particularmente na penetração intersticial e internalização dos nanossistemas (intracelular, organela específica), seguida de liberação intracelular da substância ativa²⁰.

Os primeiros estudos sobre a entrega controlada de fármacos datam do início do século XX, quando Paul Ehrlich propôs o seu modelo, que ficou conhecido por “Bala Mágica de Ehrlich”. Neste modelo, o fármaco é ligado a um agente transportador e tem sua ação terapêutica apenas no alvo²². Atualmente, estes sistemas incluem lipossomas, prolipossomas, microesferas, nanopartículas, géis, pró-fármacos e ciclodextrinas entre outros²².

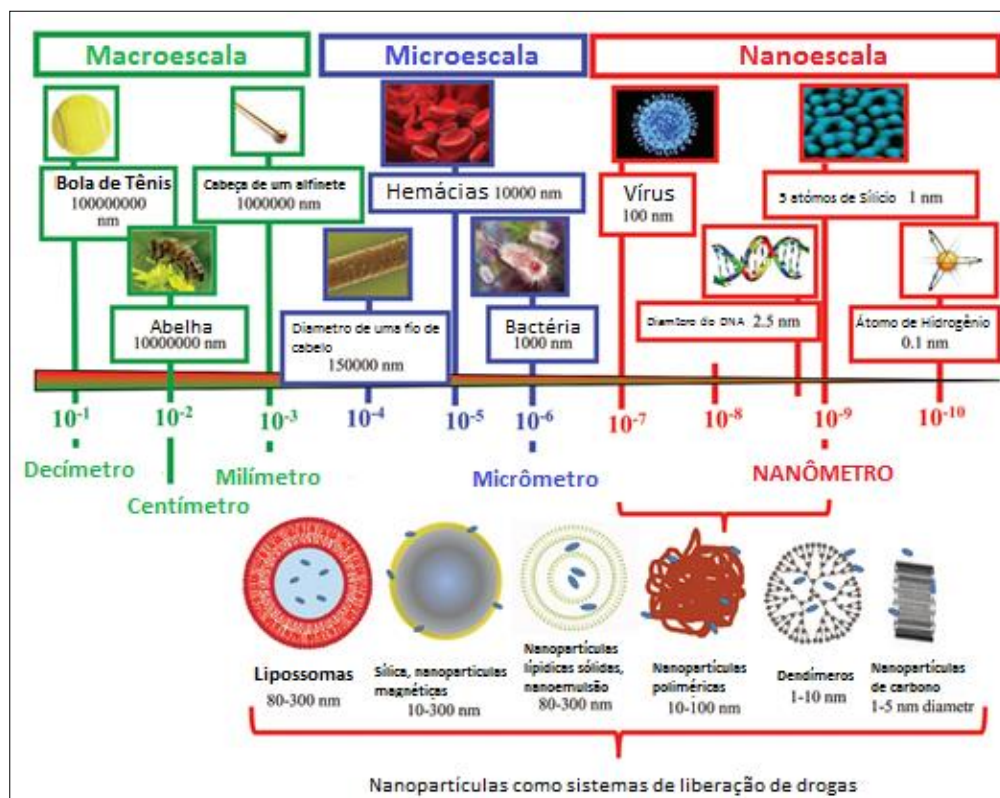
Os tratamentos envolvendo sistemas de liberação de fármacos em nanopartículas podem ser divididos como passivos e ativos. A maneira de combinar o fármaco com o nanoportador e a estratégia do seu alvo é muito importante para uma terapia orientada. Uma droga pode ser adsorvida, covalentemente ligada à superfície de nanoportadores ou então encapsulada^{23,24}. No caso passivo o agente terapêutico é incorporado dentro das nanopartículas, que circulam na corrente sanguínea e são acumuladas dentro das células

através do efeito de permeabilidade vascular e retenção aumentada. O tratamento ativo ocorre quando o agente terapêutico é conjugado com uma nanopartícula que possui um ligante (anticorpo). No tratamento ativo a manipulação pode ser feita através de estímulos físicos, por exemplo, temperatura, pH ou magnetismo ^{23,24}.

Dependendo do método de preparação as nanopartículas podem apresentar diferentes propriedades e características de liberação do agente terapêutico ²⁵.

Vários tipos de nanopartículas já foram avaliadas como sistemas de entrega controlada de fármacos como as lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, nanopartículas magnéticas e nanotubos de carbono (Figura 1) ^{23,26}.

Figura 1. Nanopartículas de sistemas de entrega de drogas em relação a outras escalas.



Fonte: Adaptado Wilczewska, 2011²³.

As nanopartículas usadas para aplicações médicas têm de ser biocompatíveis e atóxicas ao sistema biológico. Os efeitos indesejáveis das nanopartículas dependem de vários fatores

como tamanho hidrodinâmico, forma, quantidade, química de superfície, rota de administração, reações do sistema imunitário e tempo de vida na circulação sanguínea²⁷.

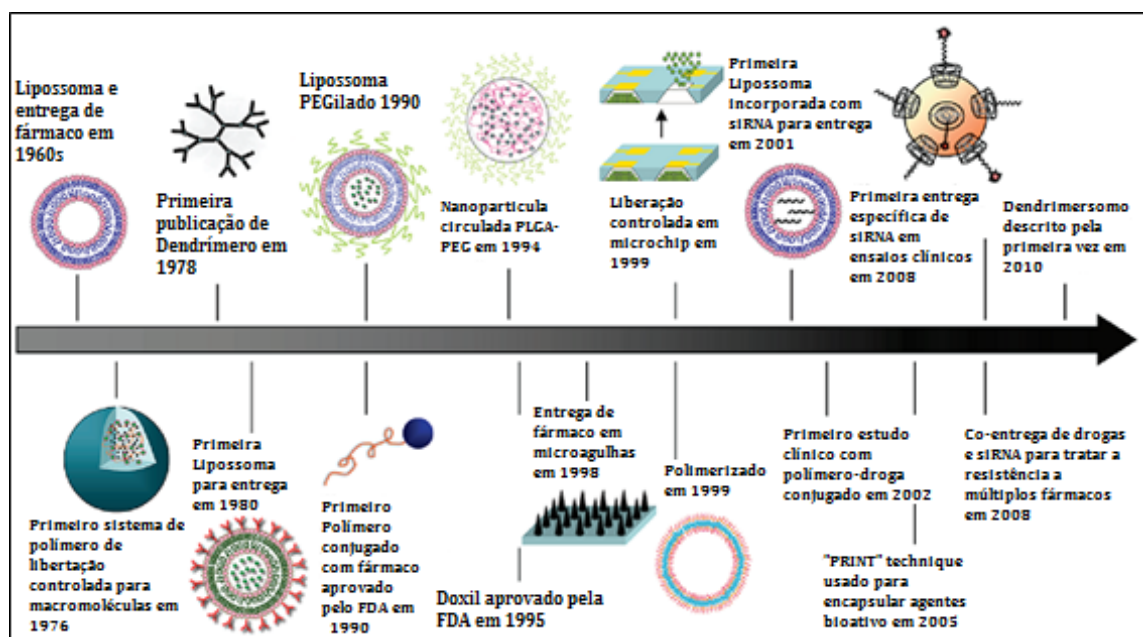
Em relação ao tamanho é possível sugerir que partículas menores têm uma maior área de superfície, com isso, podem ser mais reativas, e, conseqüentemente, mais tóxicas. Geralmente é aceitável que as nanopartículas com diâmetro hidrodinâmico de 10-100 nm tenham propriedades farmacocinéticas para aplicações *in vivo* ideais. Nanopartículas menores são sujeitas a extravasar os tecidos e à depuração renal, enquanto, as maiores são rapidamente opsonizadas e removidas da corrente sanguínea através dos macrófagos do sistema retículo-endotelial^{23,27}.

1.1.1 Perspectiva Histórica

Em 1857, Michel Faraday foi o primeiro a descrever as propriedades das partículas com dimensões na ordem de nanômetros, desenvolvendo um método de síntese baseado na redução dos íons tetracloroaurato III em meio básico²⁵. No início do século XX, Paul Ehrlich propôs o conceito de “Zauberkegeln” traduzido para o inglês como “Magic Bullets”, ou “Bala Mágica”. Este modelo consistia numa partícula transportadora de fármacos para um alvo específico, com um tamanho suficientemente pequeno para ultrapassar diversas barreiras fisiológicas e celulares. Conseqüentemente, a biodisponibilidade do fármaco seria aumentada, diminuindo-se os possíveis efeitos colaterais associados à sua forma livre²⁸. As décadas de 1950 e 1960, foram caracterizadas por enormes progressos na área de farmácia com o desenvolvimento da biofarmácia e farmacocinética, e como resultado desse desenvolvimento, a liberação controlada tornou-se um grande foco de atenção. Em 1959, Richard Feynman foi o primeiro a discursar sobre nanotecnologia²⁹. Ainda nesta época o Professor Peter Paul foi um dos pioneiros da nanotecnologia aplicada à biofarmácia. A sua equipe desenvolveu “contas” de poliacrilamida para administração oral e, posteriormente, obteve um estudo em microcápsulas, desenvolvendo, por fim, as primeiras nanopartículas para transporte de

fármacos e vacinas^{25,28}. Todavia, apesar deste rápido desenvolvimento da área, foi apenas em 1974, em Tóquio, que o Professor Norio Taniguchi, usou o termo “Nanotecnologia” para se referir aos materiais de tamanho menor do que 1 μ m, na escala nano, inspirado no discurso de Richard Feynman. Em 1981, Eric Drexler publicou o primeiro artigo científico desta área, revolucionando toda a nanotecnologia: “An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation”²⁵. O final do século XX e início do século XXI ficaram marcados pelo desenvolvimento de nanopartículas capazes de transportar fármacos de forma direcionada, macromoléculas e vacinas, para um determinado tecido ou célula, sempre com o objetivo de minimizar os efeitos tóxicos do componente específico (Figura 2). Vários estudos já foram efetuados para a aplicação de nanopartículas no transporte de substâncias antineoplásicas, fármacos antivirais ou antibacterianos, sendo a aplicação mais promissora o transporte de componentes nano através da barreira hematoencefálica^{25,28}.

Figura 2. Escalas do desenvolvimento temporal da área da nanotecnologia associada ao transporte de fármacos, proteínas, DNA, etc. Destaque de alguns dos acontecimentos marcantes da história da nanotecnologia.



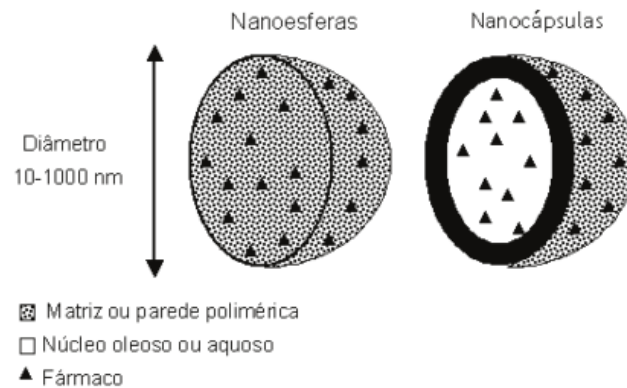
Fonte: Adaptado Shi, 2010³⁰.

1.1.2 Nanopartículas Poliméricas (NPPs)

Dentre as nanopartículas utilizadas às poliméricas desempenham um importante papel, sendo consideradas dentre os sistemas de liberação controlada de fármaco um dos mais estudados³¹. As nanopartículas poliméricas (NPPs) são partículas coloidais sólidas geralmente variando de tamanho de 10 a 1000 nm, embora exista algum grau de ambiguidade em relação ao limite de tamanho superior³². Nas aplicações médicas, os tamanhos bem definidos são de grande importância, pois desempenham um papel crucial na mediação dos efeitos biológicos e do destino *in vivo* da entrega do fármaco. Portanto, como já descrito anteriormente, para garantir o maior potencial de aplicações *in vivo*, as NPPs de tamanho entre 10 a 100 nm têm o maior potencial, dada a sua capacidade de circular na corrente sanguínea por períodos de tempo mais prolongados, bem como seus padrões de biodistribuição³³.

Consoantes ao processo de preparação adotado e as matérias-primas utilizadas são possíveis obter dois tipos de nanopartículas: nanocápsulas e nanoesferas que diferem no modo de encapsular o fármaco. As nanocápsulas tem morfologia de hibridização com uma cavidade aquosa ou oleosa na qual os compostos ativos são confinados e envolvidos por um invólucro de polímero. As nanoesferas^{2,34} têm uma estrutura semelhante à matriz, na qual os compostos ativos e o polímero são dispersos de maneira uniforme (Figura 3). Os métodos de obtenção são semelhantes, com diferenças no mecanismo de polimerização. Existem diferenças morfológicas entre a forma farmacêutica de nanoesfera (sistema polimérico matricial) e da nanocápsula (sistema polimérico do tipo reservatório)³⁵.

Figura 3. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.



Fonte: Adaptado Teixeira, 2008³⁶

As nanocápsulas podem ser comparadas a sistemas vesiculares em que um fármaco é confinado em uma cavidade que consiste em um núcleo líquido interno cercado por uma membrana polimérica. Entretanto, visto de um nível geral, elas podem ser definidas como sistemas nano-vesiculares que exibem uma estrutura típica de núcleo-invólucro na qual o fármaco é confinado a um reservatório ou dentro de uma cavidade circundada por uma membrana ou revestimento de polímero. A cavidade pode conter a substância ativa na forma líquida ou sólida ou como uma dispersão molecular. Da mesma forma, este reservatório pode ser lipofílico ou hidrofóbico de acordo com o método de preparação e as matérias-primas utilizadas. Além disso, tendo em conta as limitações operativas dos métodos de preparação, as nanocápsulas podem também transportar a substância ativa nas suas superfícies ou embebidas na membrana polimérica³⁷.

As NPPs podem ser obtidas a partir de polímeros sintéticos, tais como, poliacrilamida e policrato, ou polímeros naturais, por exemplo, albumina, DNA e quitosana. Baseado em comportamento *in vivo*, NPPs podem ser classificadas como biodegradáveis, como por exemplo, os polímeros de poli(isobutilcionacrilato), poli(vinilmetileter-anidrido maleico)

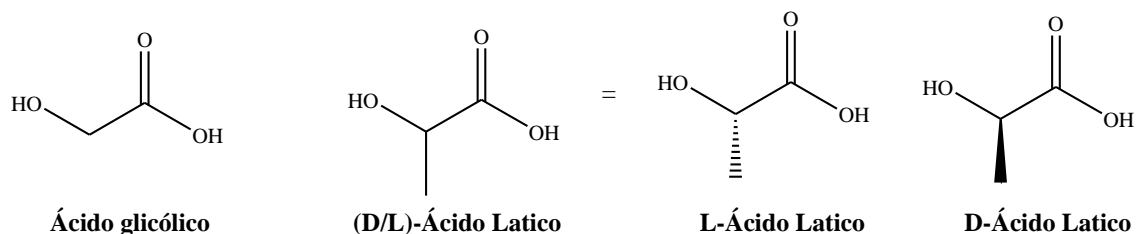
(PVM-MA), poli(ácido lático) (PLA) e poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), e não biodegradáveis, por exemplo, poliuretano^{2,38}.

Quando encapsulado em NNPs o fármaco pode ser liberado gradualmente por dessorção, erosão ou difusão nas NNP (no tecido alvo)^{23,24}. NNPs obtidas por polímeros biodegradáveis como PLGA sofrem hidrólise no corpo, produzindo metabólitos monoméricos biodegradáveis, tais como ácido lático e ácido glicólico. Poucos estudos relatam alguma toxicidade sistêmica mínima associada à utilização de PLGA para a entrega de fármacos ou aplicações de biomateriais²³.

1.1.3 Polímeros dos Ácidos Lático e Glicólico

O poliéster PLGA é um copolímero linear, formado pela polimerização dos monômeros de ácido polilático (PLA), que contém um carbono assimétrico na forma D ou L, e do ácido poliglicólico (PGA) (Figura 4)³⁶. Entre os polímeros sintéticos biodegradáveis presentemente disponíveis, os polímeros do ácido lático (PLA) e os seus copolímeros com o ácido glicólico (PLGA) foram os primeiros a receber aprovação para uso humano por parte das autoridades regulamentares³⁹.

Figura 4. Estruturas químicas dos ácidos glicólico e lático.



A biocompatibilidade e a biodegradabilidade dos polímeros dos ácidos lático e glicólico, dependendo dos solventes orgânicos, possibilitam a extrusão em diversas formas, e

possibilitam a preparação de sistemas adaptados para a veiculação de fármacos, sob a forma de implantes, fibras e micro e nanopartículas³⁶.

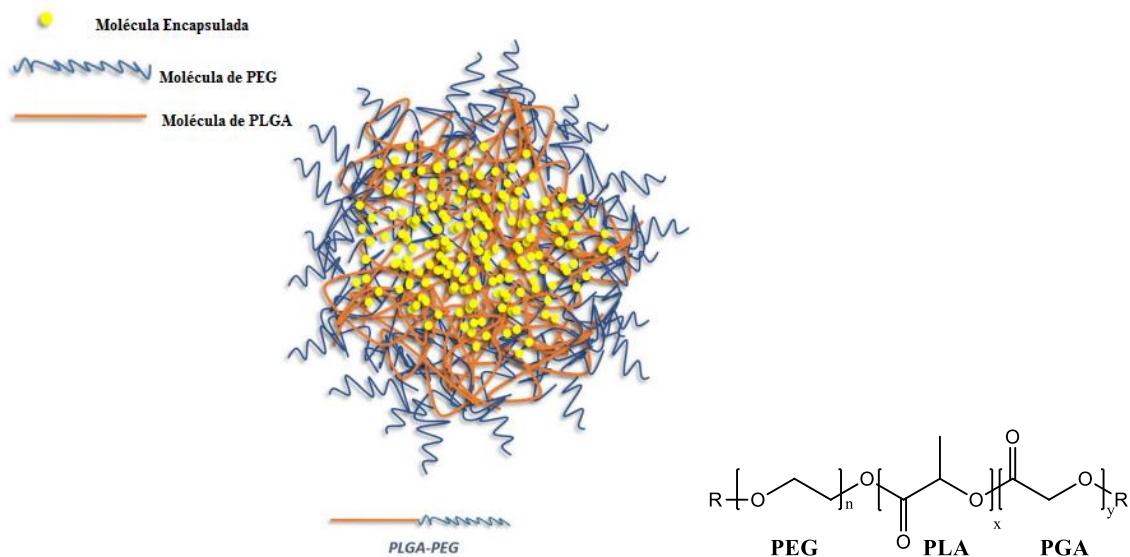
1.1.4 PEG como co-polímero

A superfície das nanopartículas pode ser sujeita a modificações, através do acoplamento de polímeros hidrófilos e/ou de elementos de reconhecimento molecular (Figura 5). A presença de certos tensoativos ou de polímeros hidrófilos, como o polietilenoglicol (PEG), na superfície das nanopartículas tem sido referida como um fator de redução do grau de captura pelo SFM (Sistema Fagócito Molecular), proporcionando, em consequência, maior tempo de permanência dos sistemas na corrente circulatória. A teoria mais aceita para a explicação deste fenômeno baseia-se no conceito de estabilização estérica, que foi inicialmente proposto para os lipossomas^{36,40,41}.

A hidrofobicidade do PLGA pode ser um problema para alguns fármacos. A liberação incompleta é usual se esses fármacos interagirem com o PLGA. A fixação de cadeias de PEG ao PLGA pode resolver essas situações (Figura 5).

A inclusão de PEG no material também pode ser conveniente para melhorar a biocompatibilidade dos sistemas. Se o PEG for ligado ao polímero ou a superfície da NPP fica mais hidrofílico e com isso ocorre maior hidrólise. No entanto, a alta solubilidade do PEG pode acelerar a taxa de liberação do fármaco, o que, em alguns casos, é um efeito indesejável^{42,43}.

Figura 5. Estrutura química do PLGA-PEG e representação geral de uma partícula de PLGA-PEG com uma molécula encapsulada.



Fonte: Adaptado de Almoustafa, 2017 ⁴¹.

1.1.5 Métodos de formação de nanopartículas poliméricas

Embora várias técnicas de micro e nano encapsulamento tenham sido desenvolvidas e relatadas até hoje, a escolha da técnica depende da natureza do polímero, do fármaco, do uso pretendido, do tamanho da partícula desejada e da duração da terapia. O método de encapsulamento empregado deve incluir os seguintes requisitos^{2,34}:

- (a) A estabilidade e atividade biológica do fármaco não deve ser alterada durante o processo de encapsulamento
- (b) O rendimento das partículas obtidas deve ser considerado, bem como as faixas de tamanho adequadas
- (c) A qualidade e a velocidade de liberação do fármaco

(d) as partículas devem ser produzidas como um pó e não devem exibir agregação ou aderência.

Existem vários métodos para a preparação de nanopartículas poliméricas sendo os mais comuns o método de emulsão/evaporação e nanoprecipitação⁴⁴.

1.1.5.1 Nanopartículas formada pelo método de emulsão/evaporação

Processos deste tipo pertencem os métodos clássicos para a preparação de nanopartículas dispersivas em água com compostos ativos insolúveis em água. A preparação das nanopartículas é realizada dissolvendo o composto ativo em conjunto com um surfactante (PVA ou palmitato de ascorbilo), num solvente adequado, por exemplo, clorofórmio ou diclorometano, em seguida, emulsionando a solução com uma solução aquosa de um colóide protetor, e removendo o solvente por evaporação^{17,45}.

A precipitação toma o lugar na gotícula da emulsão durante a evaporação quando o limite de solubilidade é atravessado. A distribuição do tamanho de partícula pode ser ajustada dentro de amplos limites pela distribuição de tamanho de gotícula da emulsão o/w (óleo em água) e através da escolha de homogeneizador (moinho coloidal, alta pressão homogeneizador, sonicador)⁴⁵.

Existem muitas variantes desse processo, mas todas baseadas na utilização de solventes que têm uma fraca miscibilidade em água e são capazes de formar uma emulsão espontânea (por exemplo, carbonato de propileno, álcool benzílico, acetato de etila). Este método oferece a vantagem da utilização de solventes farmacologicamente aceitáveis e não requer a utilização de homogeneizadores de alta pressão para a formação da emulsão o/w como fase preliminar de formação de nanopartículas. A fase de solvente saturado com água (polímero e composto ativo) e a fase aquosa saturada com solvente, que está, em equilíbrio

termodinâmico, é primeiramente emulsionada por agitação intensiva. Com a adição da água para dispersar a emulsão (o/w) o equilíbrio de difusão é perturbado ⁴⁵.

Isto ocorre pelo desenvolvimento de flutuações de concentração na camada limite, região causada por difusão do solvente, quando o limite de solubilidade é estreitamente excedido localmente a precipitação do polímero e do material ativo são induzidos. A interação das moléculas de coloides protetores presentes na fase aquosa com estas proto-nanopartículas suprime a sua outra aglomeração e assim determina a distribuição do tamanho de partícula da nanodispersão, a qual é obtida após remoção do solvente por evaporação ⁴⁵.

1.1.5.2 Nanopartículas formada pelo método de nanoprecipitação

O método de nanoprecipitação foi desenvolvido por Fessi et al. (1989)⁴⁶, sendo um dos procedimentos mais fáceis de preparação de nanoesferas. Além de sua simplicidade, este procedimento é reproduzível, rápido e econômico e usa polímeros pré-formados como materiais de partida em vez de monômeros⁴⁷.

O princípio básico desta técnica é semelhante ao descrito para a preparação de emulsões por emulsificação espontânea. A nanoprecipitação é realizada utilizando três ingredientes básicos: a matriz polimérica, o solvente do polímero e água (mas pode ser outro solvente como etanol). O solvente do polímero é escolhido entre solventes orgânicos sendo miscível em água e de fácil remoção por evaporação, a acetona é um dos solventes mais utilizados. Para produzir as nanopartículas, a solução de polímero é adicionada à água. As nanopartículas se formam instantaneamente durante a rápida difusão do solvente da solução de polímero à água. A suspensão coloidal resultante contém partículas de polímero com tamanho aproximado de 200 nm de diâmetro. As partículas obtidas por esse método são menores do que as produzidas pelo procedimento de emulsificação e evaporação do solvente⁴⁷.

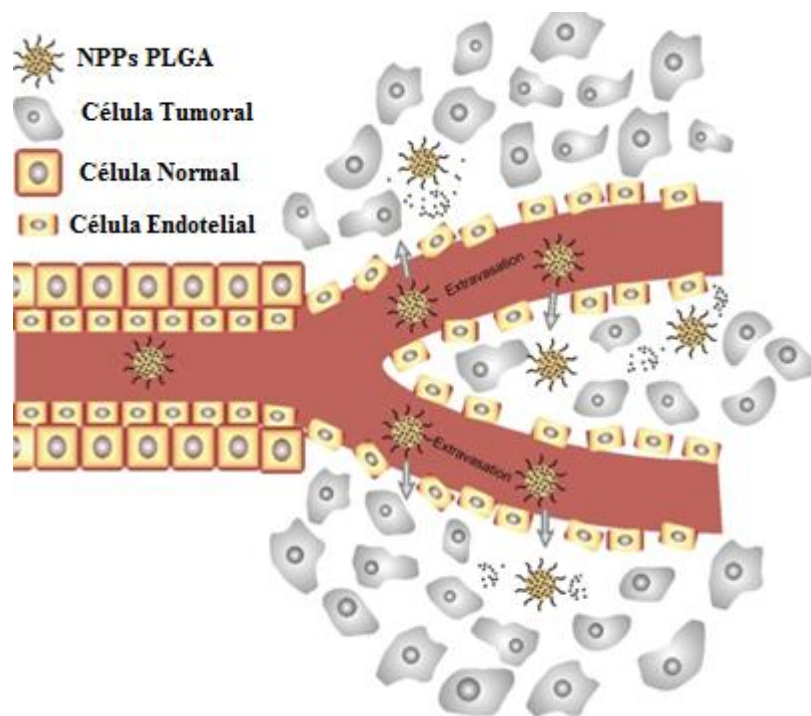
1.1.6 Mecanismo de ação das NNPs sobre células tumorais

O câncer é a doença mais letal dos seres humanos. A estimativa mundial, realizada em 2012, pelo projeto Globocan/Iarc apontou 14,1 milhões de novos casos de câncer por ano no mundo, com estimativa de 19,3 milhões de novos casos de cânceres por ano até 2025. Cirurgia, radiação, quimioterapia e imunoterapia são os quatro principais métodos usados globalmente para terapia do câncer. No entanto, a alta toxicidade, a baixa biodisponibilidade oral, baixos índices terapêuticos, inconsistência na circulação e baixa especificidade do medicamento antineoplásico às células cancerígenas são as principais deficiências do tratamento convencional. Portanto, tratamentos imediatos e mais eficientes são imediatamente necessários para restringir essas estatísticas de alta mortalidade e morbidade⁴⁸. Atualmente, o desenvolvimento de terapias contra o câncer tem se tornado um desafio multidisciplinar, necessitando da colaboração da área clínica com as áreas de ciências biológicas, ciências dos materiais e engenharia biomédica.

As NNPs contendo fármacos encapsulados agem mais seletivamente sobre as células tumorais do que sobre as células normais, pois o tecido tumoral tem vascularização diferente daquela dos tecidos normais. O tecido tumoral é mais heterogêneo na distribuição, maior em tamanho, tem maior densidade vascular e é mais permeável e gotejante, com tamanhos de 100 nm a 2 μ m de distâncias entre as células, dependendo do tipo de tumor, ao contrário do endotélio endurecido dos vasos sanguíneos normais. Além disso, a produção extensiva de mediadores vasculares facilita o extravasamento. Isso, juntamente com a drenagem linfática prejudicada de macromoléculas em tumores sólidos, permite maior acúmulo e retenção de drogas de alto peso molecular em tumores sólidos. Isso é popularmente conhecido como “efeito de permeação e retenção aprimorado”, que permite o extravasamento de

nanopartículas poliméricas circulantes dentro do interstício do tumor e também aumenta as concentrações do agente quimioterápico dentro do tecido tumoral (Figura 6).

Figura 6. Comparação do tecido normal e do tecido tumoral em relação ao arranjo das células e à ação das NNPs.



Fonte: Adaptado Dinarvand, et al., 2011⁴⁹

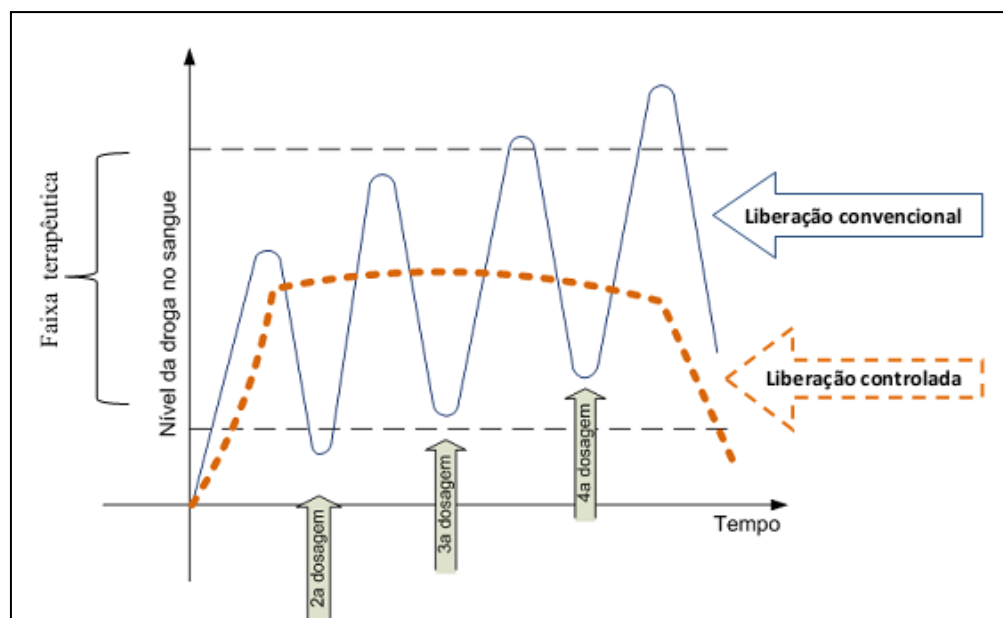
Muitos são os fármacos já encapsulados em NNPs, mas somente alguns foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em quimioterapia como o Doxil® e Daunoxome® que são liposomas peguados contendo, respectivamente, Doxorubicina e Daunorubicina, para o tratamento do sarcoma de Kaposi, o Abraxane® cujo princípio ativo é o Paclitaxel (100 a 200 nm) incorporado em nanopartículas associadas à albumina^{17,50} que é aplicado na terapia de câncer da mama metastático.

Os exemplos citados acima são fármacos já em uso na forma de NNPs, entretanto, muitos outros estudos já foram realizados e outros em estudos em curso visam à otimização

para a obtenção dessas formulações a fim de determinar a eficácia, toxicidade desses sistemas e possíveis aplicações⁵¹.

Comparando as nanopartículas com os fármacos na forma usual pode-se observar que a utilização do fármaco incorporado à nanopartícula produz um efeito farmacológico mais potente e com menores efeitos colaterais (Figura 7).

Figura 7. Figura representativa das administrações convencional com liberação controlada de fármacos



Fonte: Adaptado Wang e colaboradores, 2005⁵².

Em formulações convencionais, as concentrações plasmáticas de fármacos são diretamente proporcionais à dose administrada²⁶. Nessas formulações é difícil manter constante a concentração do fármaco durante períodos mais prolongados, requerendo desta forma, administrações múltiplas para obter um efeito terapêutico. Além disso, a circulação sistêmica de altas concentrações de fármaco, frequentemente, induz o efeito adverso, porque neste caso, a entrega do fármaco depende unicamente da difusão simples ou partição do fluxo de sangue para direcionar o local. Além disso, a pequena solubilidade de fármacos hidrofóbicos nos fluidos orgânicos e a toxicidade sistêmica de medicamentos são dois dos

problemas adicionais que comprometem a eficiência terapêutica da administração convencional de fármacos convencionais. A grande vantagem do uso das formulações convencionais é que o custo do desenvolvimento é mais baixo do que das formulações envolvendo NNPs, entretanto apesar do custo o sistema de entrega controlada de fármaco foi desenvolvido para contornar as deficiências apresentadas pelas formulações convencionais.²⁶ Alguns exemplos de fármacos já administrados via nanopartículas estão apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Estudos comparativos sobre a eficiência de fármacos encapsulados em nanopartículas e sob a forma de veiculação normal.

Ativo e alvo	Veiculação	NNPs	Comparação dos sistemas de veiculação
Praziquantel /Esquistosomose	Oral/Comprimido	Lipossoma	Maior eficiência do lipossoma com aumento da concentração do fármaco na circulação; redução do número de ovos; morte dos parasitas ⁵³ .
Teniposide/ câncer	Intravenoso	Polimérica	Maior eficiência na biodisponibilidade da droga, menores efeitos colaterais ⁵⁴ .
Etoposide/ câncer	Intravenoso/	Lipídicas sol.	Melhoria da atividade antitumoral e taxa de sobrevivência dos animais ⁵⁵ .
Daunoxome®/câncer	intravenoso	liposomas	Mais eficiente com redução significativa da toxicidade cardíaca da droga ⁵⁶ .
Paclitaxel/ câncer	intravenoso	NNPs-albumina	13 vezes mais eficiente do que a droga livre ⁵⁰ .

1.1.7 Toxicidade de nanopartículas poliméricas

Os materiais biocompatíveis são utilizados em dimensões convencionais e quando utilizados em escala nano podem provocar reações completamente adversas. Isso ocorre porque, nesta escala, a superfície, as forças de repulsão e atração e as especificidades químicas, estão muito mais pronunciadas. Segundo Mahmoudi e colaboradores (2004)⁵⁷, a razoável mudança de carga das partículas no organismo deve ser ponderada, pois as cargas podem afetar o ciclo normal de células por provocar interações diretas ou indiretas com o DNA. Além do mais, as partículas com dimensões nano podem atingir células e organelas que as partículas de maior tamanho não atinge, de maneira que não é possível afirmar que um material seguro nas macrodimensões continuará seguro na escala nano⁵⁷.

Para a avaliação da toxicidade das nanopartículas, são feitos ensaios de viabilidade celular inicialmente *in vitro*, sendo os ensaios mais utilizados MTT e MTS, ambos são sais de imidazol. Esses ensaios são fotométricos, onde a medida da absorbância está relacionada à viabilidade celular. A viabilidade celular é quantificada através da redução do MTT ou MTS (de coloração amarela) a formazan (sal de coloração azul-violeta) pelo NADH gerado pelo metabolismo celular a partir da ação das desidrogenases mitocondriais das células durante o período de exposição dessas às NNPs. Dessa forma, a redução do MTT ou MTS a formazan, é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular⁵⁷. Portanto, quanto mais células viáveis maior é a produção de NADH e, assim haverá maior formação de formazan, resultando em maior coloração azul-violeta e aumento na absorbância.

A maioria dos ensaios iniciais sobre citotoxicidade são realizados utilizando linhagens de células tumorais provenientes de tecido neoplásico cultivadas *in vitro*. Se for possível estabelecer estas células como linhagem celular tumoral, elas podem se propagar indefinidamente em cultura de células⁵⁸.

A cultura de células animais (cultura de tecidos ou de células sanguíneas/hematopoiéticas ou outras) inicia-se pela dispersão das células obtidas a partir de um fragmento de tecido (hematopoiético, muscular, epitelial ou outro) num meio nutritivo apropriado, colocado em frasco ou placa de cultura, após o que se verifica que a maioria das células adere à superfície sólida e cresce em monocamada ou em suspensão. A obtenção de uma população ou cultura de células é possível de várias formas, das quais se indicam duas:

– Crescimento ou migração de células de um fragmento de tecido – onde a seleção se baseia na capacidade virtual de as células migrarem da amostra de tecido;

– Dispersão celular – cuja seleção resulta da capacidade de as células sobreviverem à metodologia aplicada e que pode ser a desagregação enzimática ou mecânica do tecido. Comparativamente ao primeiro método, a dispersão celular, apesar de mais trabalhosa, permite obter, em menos tempo, um maior número de células representativas de todo o tecido⁵⁹.

As linhagens de células tumorais escolhidas para este trabalho foram escolhidas a partir de estudos previamente realizados^{15,16,60}.

1.1.8 Técnicas para a caracterização físico-química de nanopartículas

A caracterização física das NNPs é um pré-requisito importante para se determinar a estabilidade, tamanho e possível aplicação. Atualmente, não há metodologias padronizadas ou protocolos regulatórios de agências governamentais ou de pesquisa para a caracterização de nanopartículas⁶¹. No entanto, as interações fisiológicas dependem das propriedades físico-químicas das partículas.

As avaliações morfológicas podem ser observadas através das microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou de transmissão (MET). Outra técnica para verificar a morfologia é a microscopia de força atômica, a qual fornece informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo capaz ainda de resolver detalhes de

superfície em nível atômico. Informações importantes sobre a estabilidade de suspensões de nanopartículas podem ser obtidas utilizando o monitoramento do pH, em função do tempo³⁵.

A maioria das partículas dispersas em um sistema aquoso adquirem carga na superfície, principalmente por ionização de grupos ou adsorção de espécies carregadas. As cargas das superfícies modificam a distribuição dos íons na interface, resultando em uma camada ao redor da partícula da solução. O potencial Zeta é uma das principais forças que medem as interações interpartículas³⁵.

A Calorimetria Exploratória Diferencial (CED) é uma técnica de análise térmica que mede a energia calorífica absorvida ou liberada durante o aquecimento ou resfriamento de uma substância, em relação a uma amostra de referência. Estas medidas fornecem dados qualitativos e quantitativos de processos endotérmicos e exotérmicos permitindo obter informações referentes a alterações de propriedades físicas e/ou químicas, como, por exemplo, temperaturas de fusão, cristalização e transição vítrea⁶².

Técnicas empregadas para a determinação da forma de associação do fármaco à nanopartícula incluem a calorimetria exploratória diferencial, a difração de raios X (DRX) e a espectroscopia no infravermelho (FTIR).

As análises de calorimetria exploratória também são de grande utilidade para verificar a estabilidade térmica das NNPs e têm sido utilizados também para investigar interações entre os polímeros e os fármacos em diversas formulações de microesferas e nanopartículas³⁵.

As análises por FTIR permitem avaliar a associação do fármaco às nanopartículas. Pelas análises é possível visualizar as bandas de absorção de grupos químicos específicos (funções orgânicas) da matriz polimérica e do fármaco antes e depois do encapsulamento.

1.1.9 Biodegradação

A velocidade de degradação depende de vários fatores, como as propriedades intrínsecas do polímero (proporção de ácidos láctico e glicólico na cadeia polimérica, peso molecular, temperatura de transição vítrea e cristalinidade), as características das partículas (forma e dimensões) e a presença de compostos de baixo peso molecular (como monómeros e catalisadores)⁶³. Em regra, o tempo de degradação é menor para os polímeros de baixo peso molecular e maior hidrofília, para os polímeros amorfos e para os que possuem maior conteúdo em ácido glicólico⁴⁴.

Os mecanismos de liberação controlada são sistemas fundamentados normalmente no controle por difusão, grau de inchamento, erosão ou estímulos como pH, temperatura e presença de biomoléculas. A conjugação entre o material (normalmente polimérico) e o fármaco também pode resultar em sistemas que aumentam o tempo de circulação e a estabilidade do fármaco na corrente sanguínea. Neste caso, a ativação do fármaco pode ocorrer quando há degradação do material ou das ligações entre polímero e o fármaco conjugado quimicamente em sítios específicos²⁶.

É essencial reconhecer que a degradação do polímero é um processo químico, ao passo que a erosão é um fenômeno físico dependente de processos de dissolução e difusão. Dois mecanismos de erosão do polímero podem ser identificados: superfície e erosão da parte volumosa. Para a maioria dos polímeros biodegradáveis, ambos os mecanismos ocorrem, mas a extensão relativa de superfície ou de erosão em massa varia radicalmente com a estrutura química da cadeia principal do polímero. Após um encapsulamento eficiente de um fármaco, a sua liberação pode efetuar-se de diversas formas, sendo a solubilidade, modo de encapsulamento (por conjugação química ou encapsulamento físico) e a constituição do sistema transportador (polímeros biodegradáveis, co-polímeros anfífilicos ou lípidos, etc.), fatores importantes na determinação do seu perfil de liberação^{64,65}.

Para o PLGA a biodegradação ocorre por hidrólise abiótica das ligações éster da cadeia polimérica, ocorrendo homogeneamente em toda a matriz polimérica. O envolvimento de enzimas neste processo ainda não se encontra devidamente esclarecido. Os produtos resultantes (ácido láctico e/ou ácido glicólico) são metabolizados no organismo via ciclo de Krebs e eliminados sob a forma de dióxido de carbono e água³⁶

Raghuvanshi e colaboradores (1993)⁶⁶ propuseram um mecanismo constituído por três fases para a degradação destes polímeros. Na fase inicial, ocorre uma diminuição significativa do peso molecular do polímero, devida à cisão aleatória das cadeias poliméricas, sem apreciável perda de massa do sistema nem formação de monómeros solúveis. Na fase intermédia, verifica-se uma diminuição significativa do peso molecular do polímero, acompanhada por perda de massa do sistema e formação de oligómeros e monómeros solúveis. Na fase final, ocorre a formação de monómeros solúveis a partir de frações de oligómeros, conduzindo à degradação total do polímero⁶⁶.

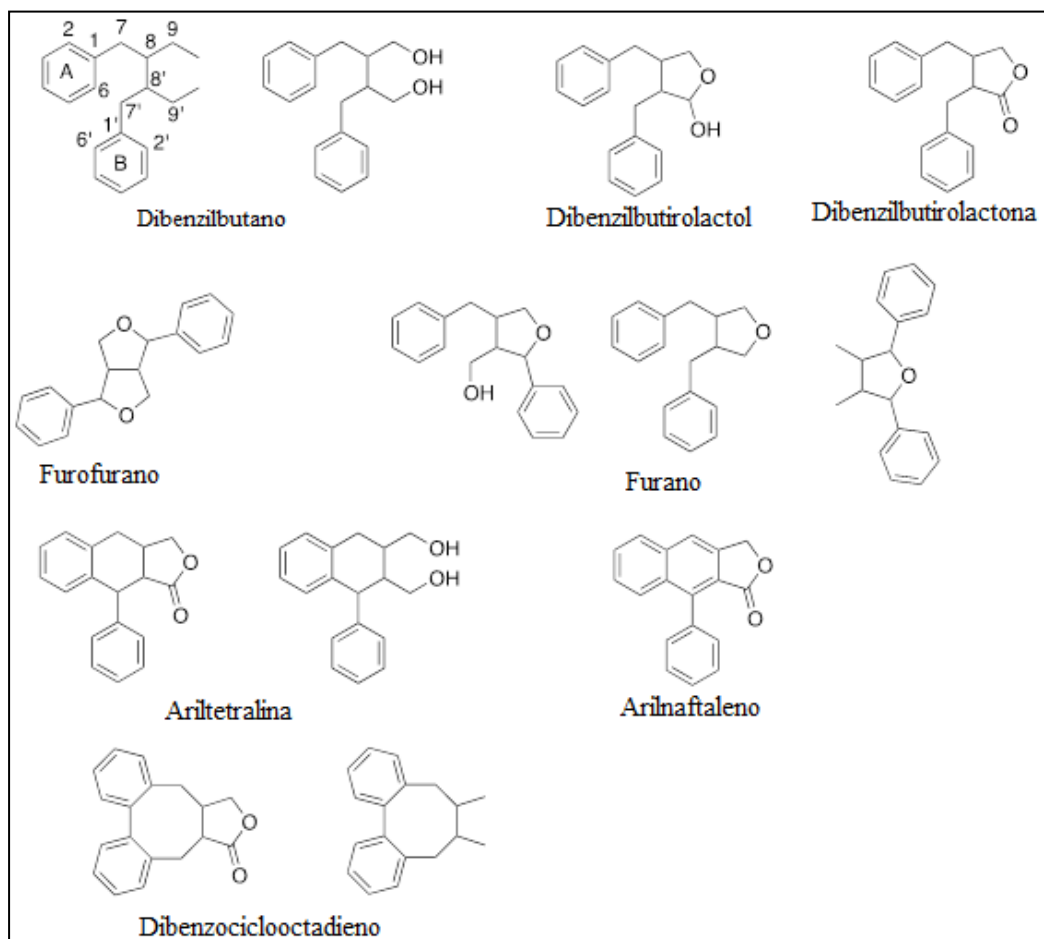
1.2. LIGNANAS EXTRAÍDAS DA *PIPER CUBEBA*

Lignanas são metabólitos especiais produzidos pelas plantas e desempenham as mais variadas funções nesses organismos como defesas contra fungos, insetos e em resposta a ferimentos mecânicos. Essa diversidade de propriedades biológicas que apresentam nos vegetais chama a atenção para uma possível aplicação no controle de algumas enfermidades que afetam também humanos e animais⁴.

A grande variedade de propriedade biológicas atribuídas às lignanas está diretamente relacionada à diversidade estrutural que esses compostos apresentam. As lignanas são formadas pelo acoplamento de duas unidades fenilpropanóides através dos carbonos 8 da estrutura carbônica de cada uma dessas unidades. Devido à grande variedade estrutural as lignanas foram divididas em oito subclasses de acordo com o nível de oxidação do carbono 9

em furofurano, furano, dibenzilbutano, dibenzilbutirolactona, ariltetralina, arilnaftaleno, dibenzociclooctadieno e dibenzilbutirolactol (Figura 8)^{7,67,68}.

Figura 8. Subclasses das lignanas



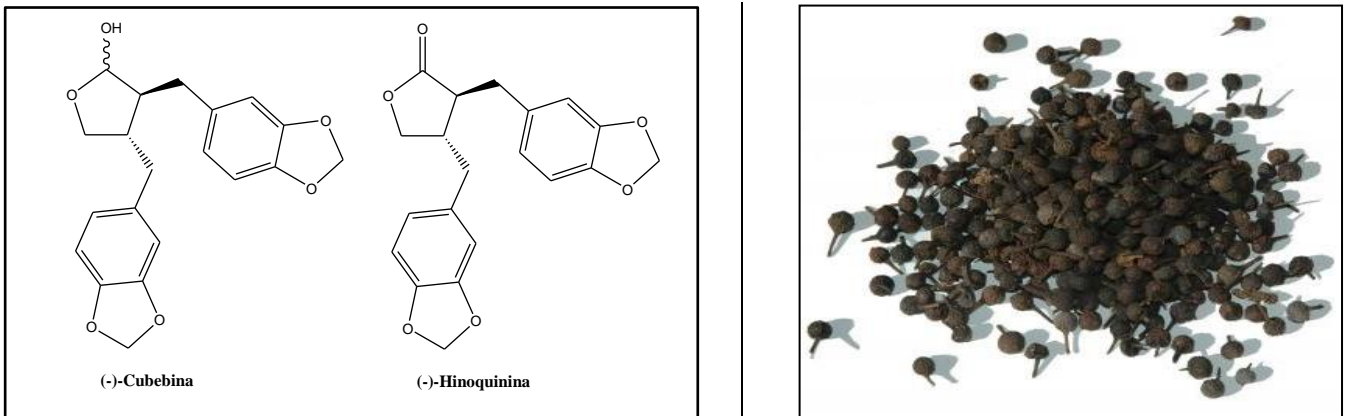
Fonte: Adaptado Marcotulio,2014⁷

Dentre as principais propriedades biológicas desempenhadas pelas lignanas merece destaque a ação citotóxica que algumas delas apresentam contra diferentes linhagens de células tumorais.^{5,6,8} A podofilotoxina foi uma das primeiras lignanas naturais a se tornar um fármaco para o tratamento de câncer, assim como, seus derivados semissintéticos etoposídeo e tenoposídeo⁶⁹ despertando o interesse farmacológico para outras lignanas. Uma fonte de grande variedade de lignanas é a *Piper Cubeba* uma pimenta de origem Asiática (Figura 9),^{16,70} utilizada na medicina tradicional para tratar doenças associadas a problemas inflamatórios, distúrbios renais, gonorreia, sífilis, dor abdominal, enterite e asma^{71,72}. Além de

seu uso medicinal a *Piper cubeba* ainda contém em seus frutos quantidades significantes de (-)-hinoquinina (HNK) e a (-)-cubebina (CB) duas lignanas que nas últimas décadas tem merecido a atenção de vários grupos de pesquisa.

As atividades biológicas atribuídas à CB e HNK, assim como a de alguns de seus derivados sintéticos, aumentaram a importância dessa classe de substâncias como alvos na pesquisa por novas moléculas para o desenvolvimento de fármacos inclusive para o tratamento de câncer.⁵ Entretanto, um dos problemas associados às estruturas dessa lignanas, assim como de grande parte dos fármacos utilizados como quimioterápicos, é sua insolubilidade e com isso baixa disponibilidade, além de possível degradação antes de chegar ao alvo.

Figura 9. Semente seca da *Piper Cubeba* e estruturas da CB e HNK



Fonte: Resende, 2016⁷³

2. OBJETIVOS

Gerais:

- Sintetizar nanopartículas poliméricas contendo lignanas, caracteriza-lás e avaliar suas citotoxicidades contra diferentes linhagens de células tumorais.

Específicos

- Avaliação citotóxica de lignanas naturais (extraídas da *Piper cubeba*) e sintéticas sobre diferentes linhagens celulares tumorais.
- Encapsulamento das lignanas mais ativas em NNPs.
- Caracterização das nanopartículas obtidas através das técnicas de MEV, MET, AFM, DRX, DSC, FTIR, UV, RMN, TG-DTA, DLS e Potencial Zeta.
- Determinação da eficiência do encapsulamento e da cinética de liberação *in vitro*.
- Determinação da citotoxicidade *in vitro* das lignanas incorporadas nos sistemas nanoparticulados sobre as diferentes linhagens celulares de carcinoma.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1. Equipamentos e Reagentes

Os frutos secos da *Piper cubeba* foram importados de Floral Seed Company, Dehradun. Todos os reagentes e solventes foram adquiridos de fontes comerciais (Alfa Aesar, Sigma-Aldrich e Synth) e usados sem purificação adicional. Foram utilizados copolímeros pré-formados de PLGA com a razão ácido láctico: ácido glicólico: 65:35 ($M_w = 45000 - 70000$), 50:50 ($M_w = 7,000 - 17,000$) e PLGA-PEG 10%-diblock ($M_w \sim 600000$) todos adquiridos da Sigma-Aldrich. O surfactante Mowiol® 18-88 foi adquirido da Sigma Aldrich ($M_w = 130000$). As extrações, purificações e reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de sílica gel Merck 60 F₂₅₄ e visualizada por detecção por UV com auxílio de uma lanterna de emissão de radiação UV 254 nm e 365 nm BOITTON ou por revelação com solução de vanilina sulfúrica seguida de revelação em chapa de aquecimento. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN de ¹H e ¹³C) foram obtidos em espectrômetro Bruker DRX-400 e 500 MHz, alocado no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP). Os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em parte por milhão (ppm). Nos espectros de RMN de hidrogênio a multiplicidade dos sinais é colocada entre parênteses de acordo com as normas recomendada pela AUREMN (2011)⁷⁴ (*s* = simpleto, *sl* = simpleto largo, *d* = duplete, *dl* = duplete largo, *dd* = duplo duplete, *t* = tripleto, *m* = multiplete). O número de hidrogênios foi deduzido da integral relativa e a constante de acoplamento (*J*) dada em Hertz (Hz). Para as análises de RMN de ¹H e ¹³C foi utilizado como padrão interno o CDCl₃. A numeração dos compostos foi realizada para

facilitar a atribuição dos átomos de carbono e hidrogênio a partir dos espectros de RMN e não obedeceu a nenhuma regra da IUPAC.

As rotações ópticas foram medidas em um polarímetro de atividade óptica AA-1000 a 589 nm e os valores são dados em unidades de $10^{-1}\text{deg.cm}^3.\text{g}^{-1}$ a 26 °C.

Os solventes das reações foram removidos em rotaevaporador BUCHI, modelo R210, acoplado a uma bomba de vácuo Brinkmann, modelo B-169. Todos os pontos de fusão foram realizados no equipamento Fisatom modelo 431, com temperatura máxima de 300 °C. As análises de UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro Ultravioleta-Visível Shimadzu, modelo UV-1800. Todos esses equipamentos se encontram alocados no Laboratório de Síntese Orgânica localizado no Departamento de Física e Química da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS-UNESP). As análises de MEV foram realizadas com os equipamentos ZEISS modelo EVO LS15 e JEOL 7001F FEG-SEM -SEM-FIB – Zeiss Auriga CrossBeam alocados, respectivamente, no Departamento de Física e Química da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS-UNESP), no Microlab do Instituto Superior Técnico de Lisboa (IST) e no Departamento de Ciência dos Materiais da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL). As análises de MET foram realizadas num equipamento Hitachi H8100 TEM alocado no Microlab do Instituto Superior Técnico de Lisboa (IST). As análises de DSC foram realizadas nos equipamentos SDT Q600 TA e TGA-DSC-STA 449 F3 Jupiter da Netzsch, alocados, respectivamente, no Departamento de Física e Química da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS-UNESP) e no Laboratório de Materiais Eletrônicos, Optoeletrônicas e Nanotecnologia do Departamento de Ciência dos Materiais da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL). As medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (ξ) foram realizadas através do instrumento de dispersão de laser (SZ-100 nanopartica, Horiba) alocados no Laboratório Fotoquímica e Química

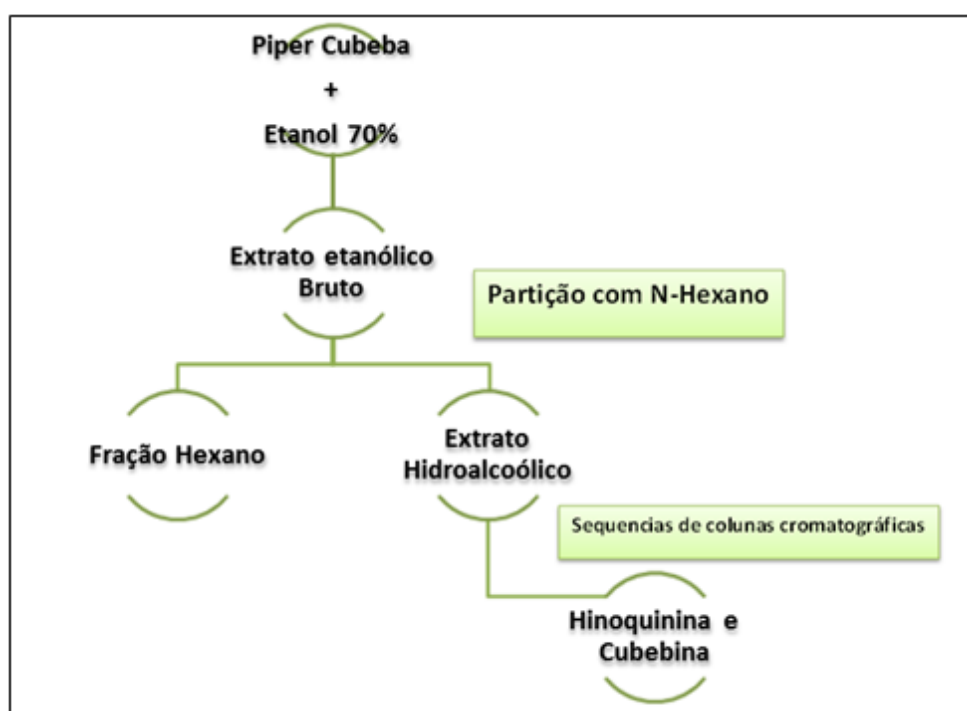
Supramolecular do Departamento de Química da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL). Para as sínteses das NNPs foram utilizados um agitador mecânico FISATOM Mod-713D e um sonicador Sonifer® BRANSON SFX550, alocados respectivamente no Departamento de Física e Química da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS-UNESP) e no Departamento de Química da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL).

A execução dos experimentos deste trabalho foi realizada em duas localizações diferentes. A primeira etapa do trabalho foi realizada na Universidade Estadual Paulista-FEIS. Onde a separação das lignanas da *Piper cubeba* e síntese das NNPs foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais-DFQ, as caracterizações das NNPs foram realizadas em equipamentos alocados no Departamento de Física e Química e as avaliações da proliferação celular sobre as linhagens tumorais Si-Ha e Hep-2 foram realizadas no Laboratório de Genética no Departamento de Biologia e Zootecnia. Nesta primeira parte do trabalho as nanopartículas foram obtidas através do método de emulsão-evaporação do solvente usando agitação mecânica (5000 rpm) e a adição da fase orgânica à fase aquosa por meio de seringa (gota a gota). Essas NNPs foram caracterizadas e o resultado dessas caracterizações motivaram outros estudos que foram então realizados nos Laboratório de Pesquisa da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL) em colaboração com vários pesquisadores. A pesquisa realizada na Universidade Nova de Lisboa envolveu a síntese das NNPs contendo as lignanas utilizando o mesmo método de emulsão-evaporação do solvente, mas utilizando a adição total da fase orgânica a fase aquosa numa única alíquota e agitação magnética seguida de sonicação, utilizando como matrizes poliméricas o PLGA(50:50) e PLGA-PEG. Também foram realizadas as caracterizações, os ensaios de liberação e avaliação da viabilidade celular sobre as linhagens de células tumorais HCT116 - carcinoma colorretal, A549- adenocarcinoma pulmonar e A2780 - carcinoma ovariano dessas NNPs.

3.1.2 Extração da lignanas (-)-hinoquinina (HNK) e (-)-cubebina (CB)

As lignanas CB e HNK foram extraídas a partir dos frutos secos e pulverizados da *Piper cubeba* de acordo com metodologia escrita por Silva et al. (2005)¹⁴. As sementes de *P. cubeba* foram secas em estufa de circulação de ar a 40° C e pulverizadas em moinhos de facas (Marconi). Foram utilizados 2,0 Kg do material pulverizado para o processo de extração o quais foram imersos em 6L de etanol à temperatura ambiente em um frasco de vidro durante 7 dias utilizando o método de extração por maceração exaustiva de acordo como fluxograma descrito na Figura 10. Após este período, o extrato foi filtrado e concentrado em vácuo.

Figura 10. Fluxograma da extração das lignanas provenientes dos frutos secos da *Piper cubeba*.

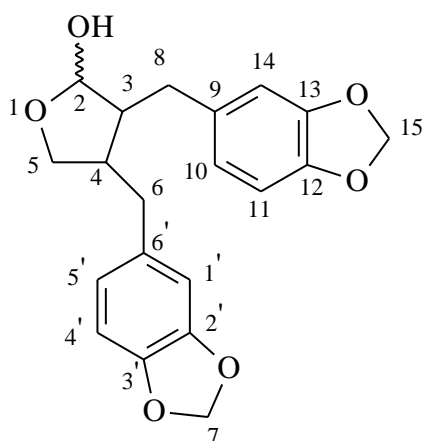


O extrato etanólico bruto foi submetido a sucessivas colunas cromatográficas de sílica gel utilizando gradiente de solventes iniciando com hexano, elevando lentamente a polaridade com acetato de etila até o uso somente de diclorometano puro. Foram obtidas dez frações contendo a HNK e oito frações contendo a CB. As frações contendo a HNK foram juntadas e submetidas novamente a separação e purificação por cromatografia em coluna. O mesmo

procedimento descrito para a HNK foi realizado para as frações contendo a CB. A CB ainda foi recristalizada em metanol e apresentou, assim como a hinoquinina pura, determinada por HPLC, superior a 98%. CB e HNK tiveram suas estruturas confirmadas por RMN de ^1H e ^{13}C .

3.1.2.1. Dados de caracterização da CB

Figura 11. Estrutura da CB



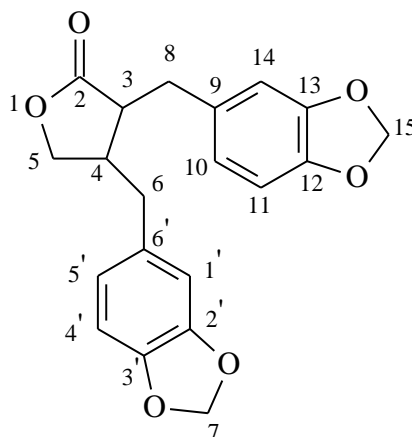
Pf. 130-132 °C e $[\alpha]_d^{26} = -2,09$ (*c* 0,008, CHCl_3) (lit⁷⁵. Pf. 130-131 °C e $[\alpha]_d^{25} = -8,12$ (*c* 0,46, CHCl_3).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6,8-6,5 m (H aromáticos); 6,6 (sl, H7 e H15); 5,2 (sl, H2); 4,1 (dd, H5a do epímero em menor proporção, $J = 7,1$ Hz e $J = 14,4$ Hz); 4,0 (dd, H5a, $J = 7,1$ Hz e $J = 8,6$ Hz); 3,8 (dd, H5b, $J = 7,8$ Hz e $J = 8,4$ Hz); 3,6 (dd, H5b do epímero em menor proporção, $J = 7,1$ Hz e $J = 8,4$ Hz); 2,7-2,2 (m, OH, H8, H3, H6,); 2,0 (m, H4).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 148,0; 147,9; 143,6; 146,1; 134,9; 134,5; 122,1; 121,8; 109,7, 109, 5; 108,6; 108,5; 101,3, 101,2; 99,2; 72,6; 53,5; 46,2; 39,6; 34,0.

3.1.2.2. Dados de caracterização da HNK

Figura 12. Estrutura da HNK.



$[\alpha]_D^{26} = -30$ (c 0,99, CHCl_3) (lit.¹⁴ $[\alpha]_D^{26} = -30$ (c 0,99, CHCl_3))

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6,8-6,4 (m, H arom); 5,9 (sl, H 7 e H 15); 4,15 (dd, H5a, $J = 7,1$ Hz e $J = 9,3$ Hz); 3,85 (dd, H5b, $J = 7,1$ Hz e $J = 9,1$ Hz); 3,0 (dd, H8a, $J = 5,1$ Hz e $J = 14,2$ Hz), 2,85 (dd, H8b, $J = 7,3$ Hz e $J = 14,2$ Hz); 2,6 (d, H6a ou H6b, $J = 7,1$ Hz); 2,55 (m, H3); 2,45(d, H6a ou H6b, $J = 8,6$ Hz); 2,4 (m, H4).

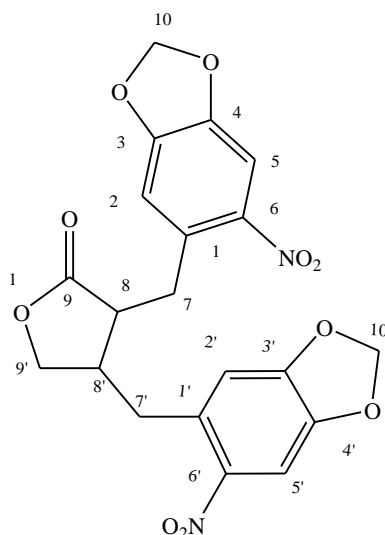
^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 178,4; 147,9; 147,8; 146,5; 146,4; 131,6; 131,3 ($\text{C6}'$); 122,2; 121,55; 109,4; 108,8; 108,4; 108,3; 101,0; 71,2; 46,4; 41,3; 38,4; 34,8.

3.1.3. Síntese da (-)-6,6'-dinitrohinoquinina (DN)

A DN foi sintetizada a partir da reação da HNK com ácido nítrico como descrito por Silva et al, (2005)¹⁴. Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,3561 g (1 mmol) de HNK e 20 mL de diclorometano. A mistura foi agitada e resfriada a -10 °C e então 6 mmol de ácido nítrico foram adicionados gota a gota por um período de 1 h. A reação foi acompanhada por CCD e agitada por mais 4 horas à temperatura ambiente. A DN foi submetida a análises de RMN de ^1H e ^{13}C e os dados obtidos estão de acordo com os publicados na literatura ¹⁴.

3.1.3.1. Dados de caracterização da DN

Figura 13. Estrutura da DN



Pf. 192-193 °C e $[\alpha]_d^{26} = -29$ (c 0,008, CHCl_3) (lit¹⁴. Pf. 191-193 °C)

¹H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.5 (s, 1H5'); 7.49 (s, 1H5); 6.8 (s, 1H2); 6.6 (s, 1H2'); 6.1 (m, 4H); 4.32 (dd, 1H9'a, $J = 7.1$ Hz e $J = 9.2$ Hz); 4.0 (dd, 1H9'b, $J = 7.2$ Hz e $J = 9.2$ Hz); 3.26 (m, 2H7, $J = 6.8$ Hz); 3.2 (dd, 1H8, $J = 6.3$ Hz e $J = 13.6$ Hz); 3.0 (dd, 1H7'b, $J = 7.8$ Hz e $J = 13.5$ Hz); 2,8 (m, 2H, H8' e H7b'). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 178.00, 152.3, 152.2, 147.6, 143.0, 130.9, 130.7, 112.4, 111.2, 106.5, 106.1, 103.6, 103.5, 71.4, 45.7, 41.6, 37.1, 34.2.

3.2 Preparação de Nanopartículas Poliméricas (NNPs) pelo método de nanoemulsificação-evaporação do solvente

As nanopartículas poliméricas foram preparadas utilizando um método modificado de nanoemulsificação-evaporação de solvente o/w (óleo/água)⁷⁶. O polímero e a lignana foram dissolvidos em CH_2Cl_2 fornecendo uma solução a 10% (w/v) do polímero e com proporção polímero:lignana de 10:1. Essa solução foi então adicionada a uma solução aquosa 2,2% (w/v) de álcool polivinílico (PVA). Foram utilizados dois métodos de adição da fase orgânica à fase

aquosa: por meio de uma seringa com a fase aquosa sendo agitada por agitador mecânico a 5000 rpm e pela adição total em uma única alíquota com agitação por 5 minutos a 1000 rpm e depois aplicação de sonicador Sonifer® Branson SFX550 por 90 segundos em 70% A, e vibração contínua com ponta de 1/2" de diâmetro. A suspensão das NPPs resultante foi deixada sob agitação durante 24 h à temperatura ambiente para evaporar completamente o solvente orgânico. As NPPs foram centrifugadas (15 minutos a 14000 rpm) e lavadas três vezes com água Millipore. Em seguida, a suspensão de NPPs obtida foi congelada em nitrogênio líquido e liofilizada a -55 °C e 0,5 kPa. As NPPs em pó foram armazenadas a -10°C até serem usadas.

3.3 Caracterização das Partículas Poliméricas

3.3.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (ξ)

O tamanho médio e distribuição de tamanho de partícula foram medidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) usando um instrumento de dispersão de luz em um ângulo de espalhamento de 90°. O índice de refração foi de 1,330 e a temperatura foi mantida a 25 °C durante as medidas. A média ponderada da intensidade foi registrada como a média de três medidas. As nanopartículas estavam liofilizadas em solução e dispersas em água Mili-Q.

As medidas de potencial zeta (ξ) das NPPs foram determinadas pela técnica de eletroforese do laser Doppler. As medidas de potencial zeta (ξ) refletem o potencial de superfície das partículas, verificando a estabilidade dos sistemas.

3.3.2 Morfologia das NPPs - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As avaliações morfológicas das NPPs foram efetuadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) e microscópio eletrônico de transmissão (MET). As imagens de MEV

foram obtidas com um aumento de 5000 vezes, as NPPs analisadas foram depositadas, após liofilização, num *stub* de metal, no qual foi pulverizada uma película fina de um metal condutor na superfície das amostras. Uma gota de solução aquosa de nanopartículas (0,1 mg/mL) foi depositada na grelha de cobre revestida com carbono para ser visualizada pelo MET. Para cada amostra, o diâmetro médio foi calculado com base nas medições de 100 partículas escolhidas aleatoriamente utilizando o Programa ImageJ⁷⁷.

3.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC - Differential Scanning Calorimetry)

Esta técnica foi utilizada para caracterizar o estado físico das lignanas nas nanopartículas e para elucidar a existência de eventuais interações entre as lignanas e os polímeros.

Para essas análises foram utilizados suportes de alumina com intervalos de temperaturas de varrimento compreendido entre 25 °C a 500 °C, a velocidade de aquecimento foi fixada em 10°C/min.

3.3.4 Eficiência de Encapsulamento

A eficiência de encapsulamento foi determinada através da medida da absorvância de uma solução da NNPs contendo a lignana (3 mg em 3 mL de diclorometano) e comparando com uma curva de calibração da lignana (absorvância x concentração) em cinco diferentes concentrações. Os comprimentos de ondas utilizados foram específicos para cada lignana incorporada.

A eficiência de encapsulamento foi medida em termos de porcentagem de acordo com a fórmula (%) de encapsulamento = quantidade total de determinada da lignana em NPPs

(através da absorvância) $\times 100$ / quantidade total da lignana teoricamente associada com NNPs.

3.3.5 Ensaio de Liberação

Com o objetivo de estudar os perfis de liberação das lignanas foram efetuados testes *in vitro* em dois meios aquosos distintos durante um máximo de 12 h onde as NNPs contendo as lignanas foram submetidas às condições que simulam os pHs fisiológicos: solução de 0,15 M HCl em pH=1,2 simulando o fluido gástrico e solução tampão de fosfato (PBS) em pH 7,4 simulando o fluido intestinal e também próximo ao pH do sangue (6,8 a 7,2). Para os testes 5 mg de NNPs-Lignanas foram adicionadas a 200 mL de cada uma das soluções, pH=1,2 e pH=7,4, em frasco hermeticamente fechado, em uma estufa com agitação uniforme em 160 rpm e à temperatura de 37°C. Foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada uma dessas misturas durante intervalos de 3 min aumentando gradativamente durante 12 h. A fim de manter constante a razão massa de partículas/volume do meio, ao longo do ensaio de liberação foi adicionado 1 mL de meio fresco por cada 1 mL de amostra recolhida. Para extrair as lignanas do meio aquoso cada alíquota de 1 mL foi misturada com 800 μ L de CH₂Cl₂ através de um vortex. A parte orgânica dessa mistura foi removida com seringa e analisada através do espectrofotômetro de UV-Vis. O valor obtido de absorvância foi comparado a uma curva de calibração da lignana pura (absorvância x concentração).

3.3.6 Ensaios de Proliferação Celular

Para analisar o índice de proliferação foi realizada uma curva de crescimento para cada concentração a ser testada, com contagem de células cultivadas em placas de cultura de 6 poços, semeadas na concentração de 5×10^4 em 2mL de meio MEM com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37°C em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO₂, por 24 horas, até se

fixarem no substrato. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura sem soro (MEM 0%), a fim de deixar todas as células na mesma etapa celular. Após 24 horas foi trocado o meio de cultura, substituído de acordo com os experimentos referidos acima. Nesse dia zero do experimento, o meio sem soro foi substituído pelo meio completo adicionando as lignanas nas concentrações desejadas.

Após 4 h de experimento, as células dos primeiros poços da placa foram tripsinizadas, coradas com Azul de Tripán e contadas no contador de células *Countess Automated Cell Counter II* (Life Technologies). As células das outras placas foram tripsinizadas e contadas após 24, 48 e 72 h do experimento, o qual foi realizado em triplicatas. O contador de células *Countess II* utiliza lâminas específicas e o corante vital Tripán blue, no qual ele distingue as células viáveis das células mortas, gerando assim três contagens para cada tempo, uma de células totais, outra de células viáveis e outra de células mortas, no próprio visor.

A partir das curvas de crescimento se calculou a porcentagem de inibição da proliferação celular de cada composto nas diferentes concentrações em relação ao controle negativo o qual é constituído pelas células, o solvente usado para solubilizar os compostos avaliados e o meio de cultura.

As linhagens de células utilizadas neste ensaio foram a Hep-2 (carcinoma de garganta) e a Si-Ha (carcinoma de colo de útero).

3.3.7. Ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade)

A viabilidade celular das células avaliadas (10^3 ou 10^4) na presença e ausência de cada lignana e das NNPs-Lignana foi realizada utilizando o Kit CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, EUA) usando o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol (MTS) como indicador de viabilidade celular. Este método colorimétrico homogêneo determina o número

de células viáveis após exposição por 24 das células aos compostos avaliados onde o MTS (roxo) é bio-reduzido pelo NADH produzido pelas células viáveis em um produto que possui uma coloração amarela. A absorvância desse composto a 490 nm foi medida diretamente a partir de placas de cultura de 96 poços por um leitor de microplacas Bio-Rad Modelo 680 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), uma vez que a absorvância é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura é possível determinar a viabilidade celular ou a porcentagem de inibição da proliferação celular.

As linhagens de células utilizadas foram Si-Ha (carcinoma de colo de útero) HCT116 (arcinoma colorretal), A549 (adenocarcinoma pulmonar) A2780 (carcinoma ovariano). Doxobicina e podofilotoxina foram utilizadas como controles positivos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Extração das lignanas.

As lignanas HNK e CB forma extraídas dos frutos da *P. cubeba* em rendimento de 1 e 1,5%, respectivamente, considerando a massa de 100g de extrato bruto submetida à purificação em coluna de sílica gel. A estruturas das duas lignanas foram confirmadas por análises de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 13 a 16) e estão em acordo com os dados publicados por Silva et al., (2005)¹⁴.

Figura 14. Espectro de RMN de ^1H da HNK em CDCl_3

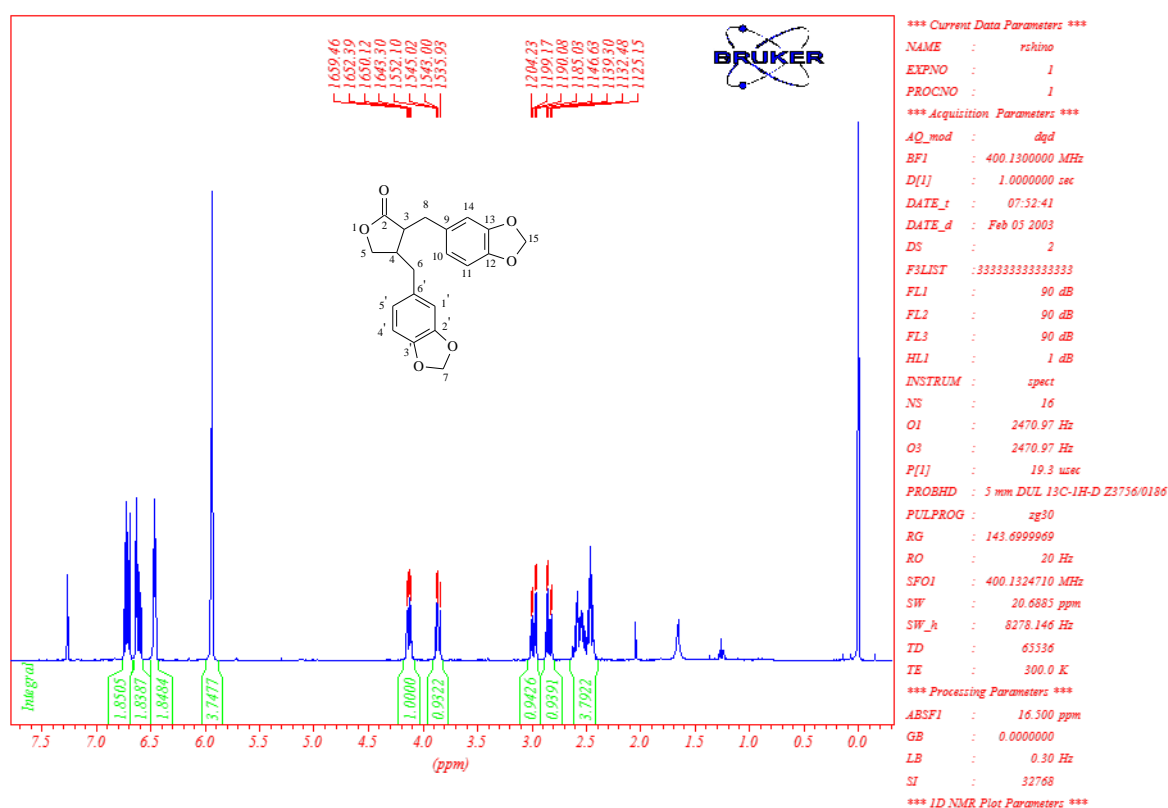


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C da HNK em CDCl_3

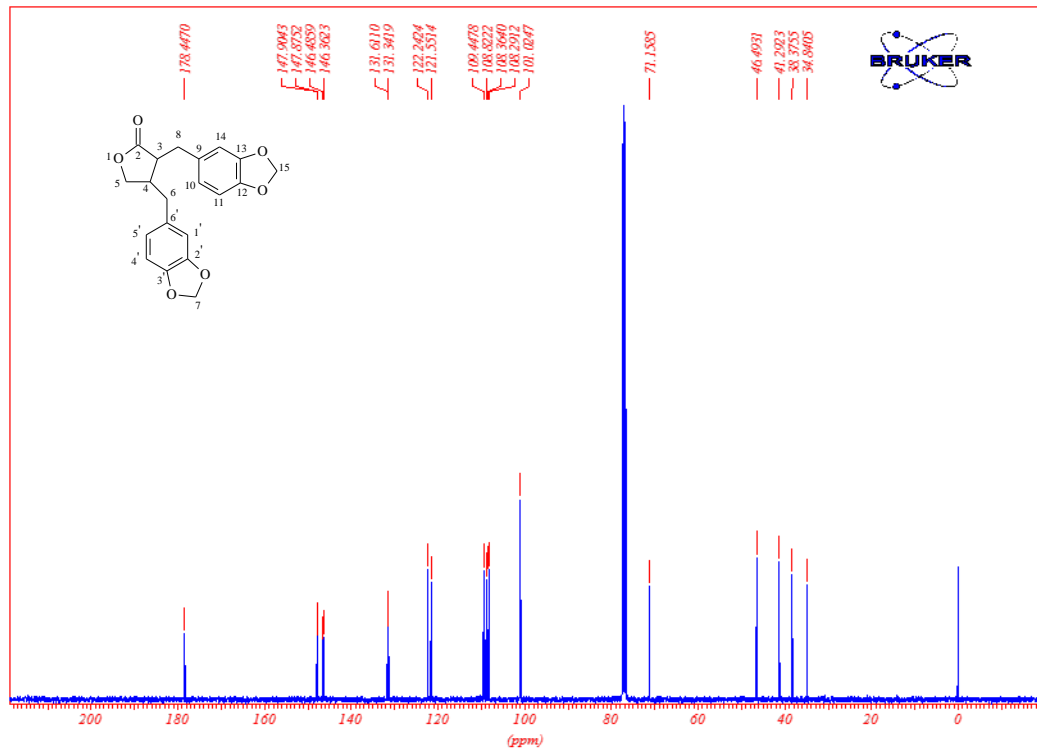


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H da CB em CDCl_3

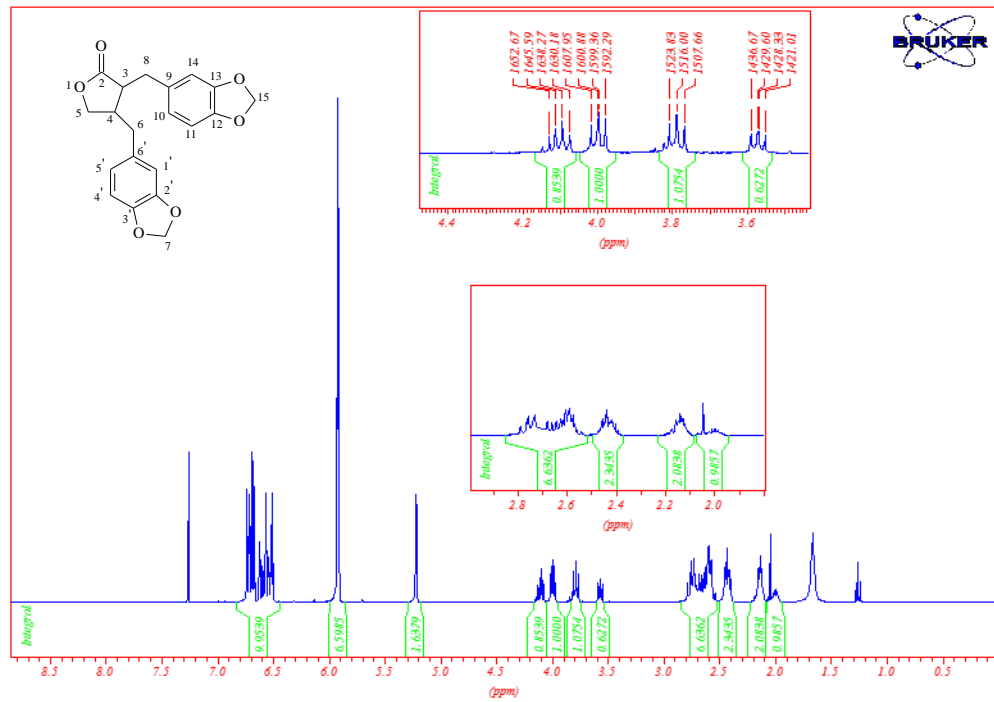
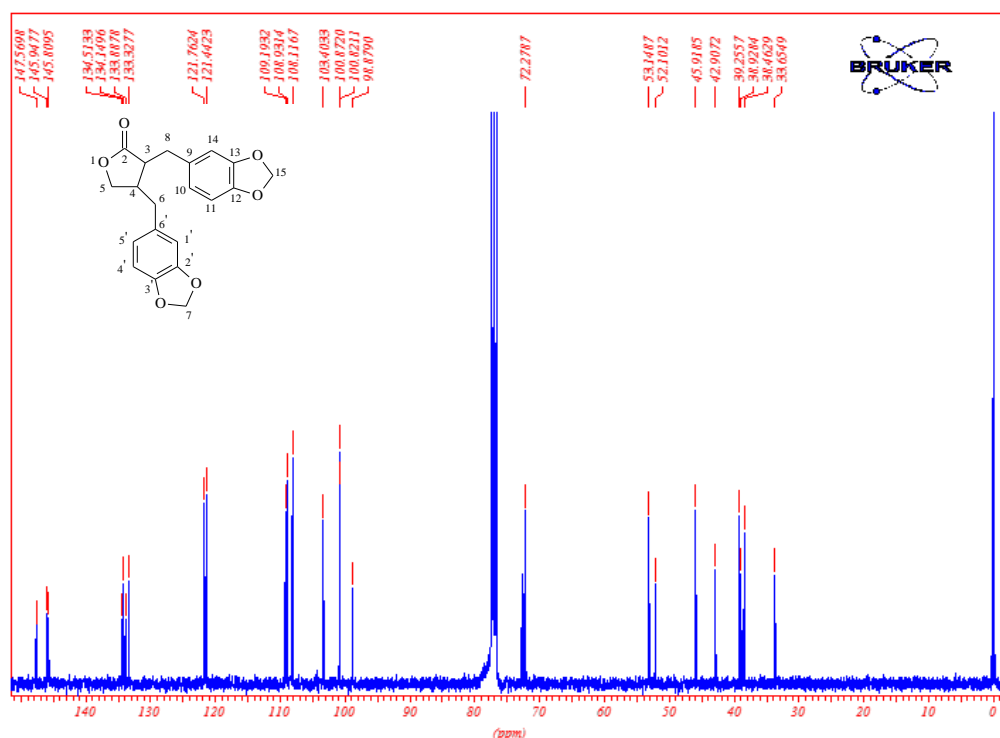


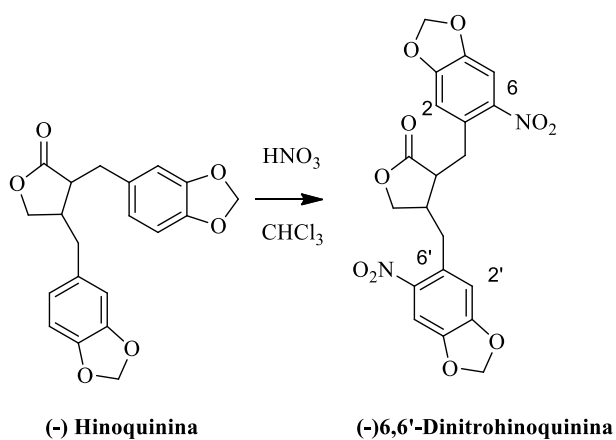
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C da CB em CDCl_3



4.2. Síntese da (-) 6,6'- dinitrohinoquinina (DN)

A seguir a HNK foi utilizada como material de partida para a síntese da DN que foi obtida em rendimento de 92% após a reação de nitração (Figura 17).

Figura 18. Reação de obtenção da DN.



A estrutura da DN foi confirmada por análises de RMN de ^1H (Figura 18) e ^{13}C (Figura 19). A confirmação da nitração dos anéis aromáticos da HNK foi evidenciada no

espectro de RMN de ^1H pelo surgimento de singletos na região de hidrogênios aromáticos com integral de um hidrogênio cada, além da constatação de que os hidrogênios ligados aos carbonos 5 e 5' apresentaram singletos em campo mais baixo indicando a presença de substituintes sacadores de elétrons ligados próximos a essas posições. Os dados estão de acordo com os descritos por Silva et al., (2005)¹⁴.

Figura 19 Espectro de RMN de ^1H DN em CDCl_3

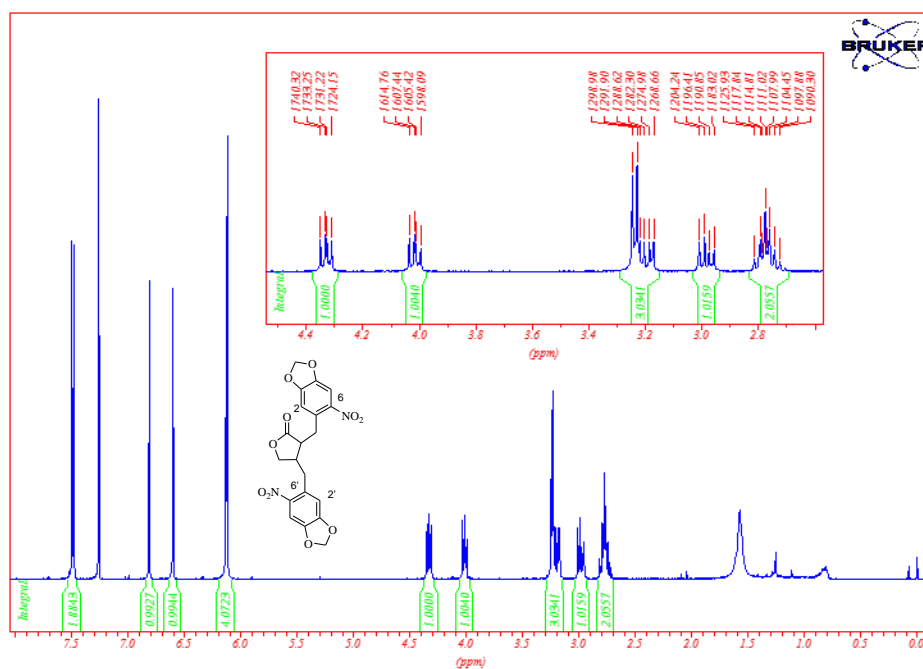
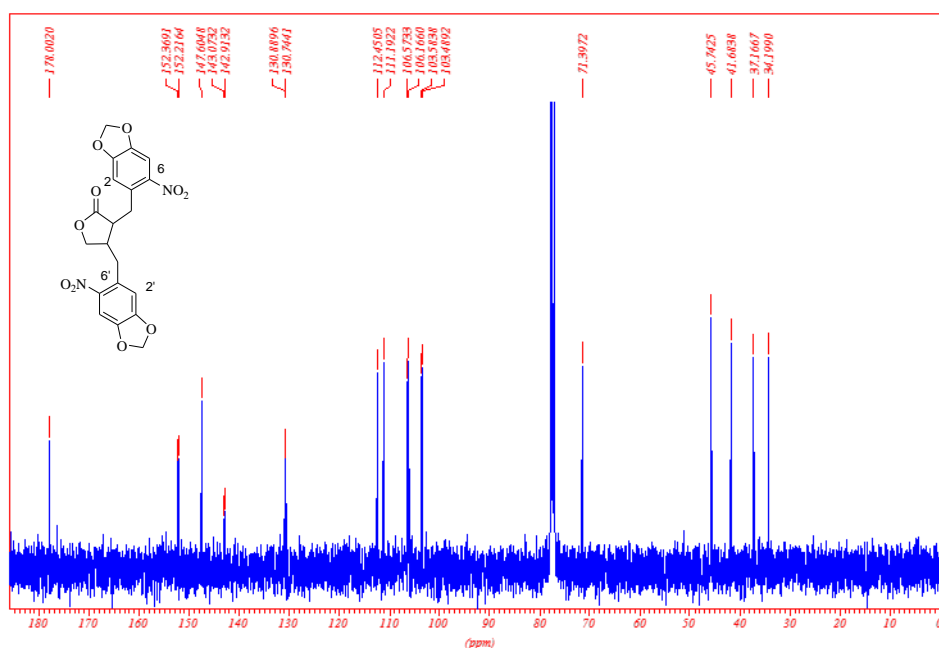


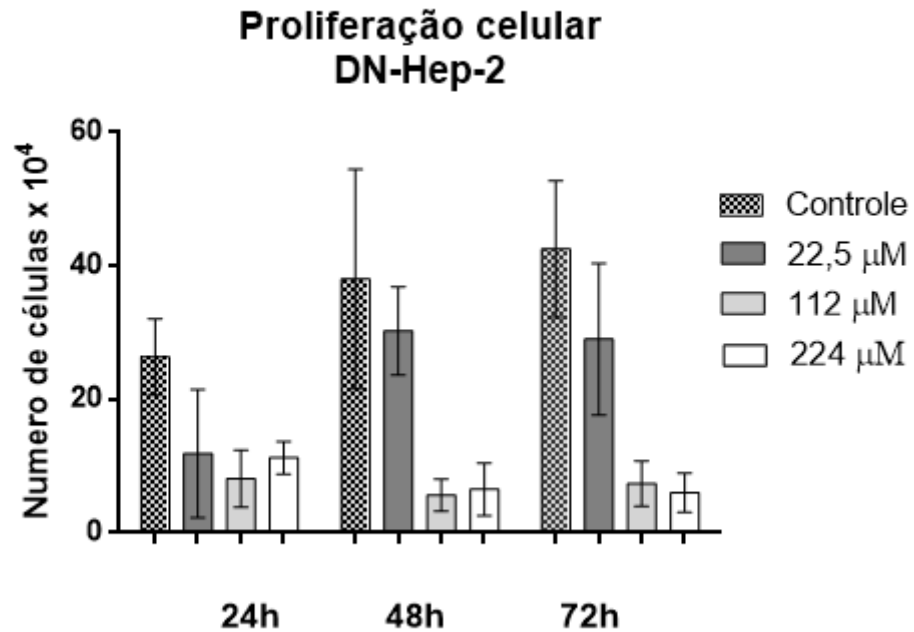
Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C da (-)-6,6'-dinitrohoquinina em CDCl_3



4.3. Ensaios de citotoxicidade das lignanas HNK, CB e DN.

As lignanas HNK, CB e DN foram submetidas inicialmente a ensaios de proliferação celular utilizando as células tumorais da linhagem Si-Ha e Hep-2. Os ensaios mediram a proliferação celular dessas linhagens de células quando expostas às lignanas em três diferentes concentrações e períodos (variando de 24 a 72 h). Os resultados dessas avaliações são apresentados separadamente para cada lignana contra as duas linhagens tumorais. A lignana (-)-podofilotoxina foi usada como controle positivo.

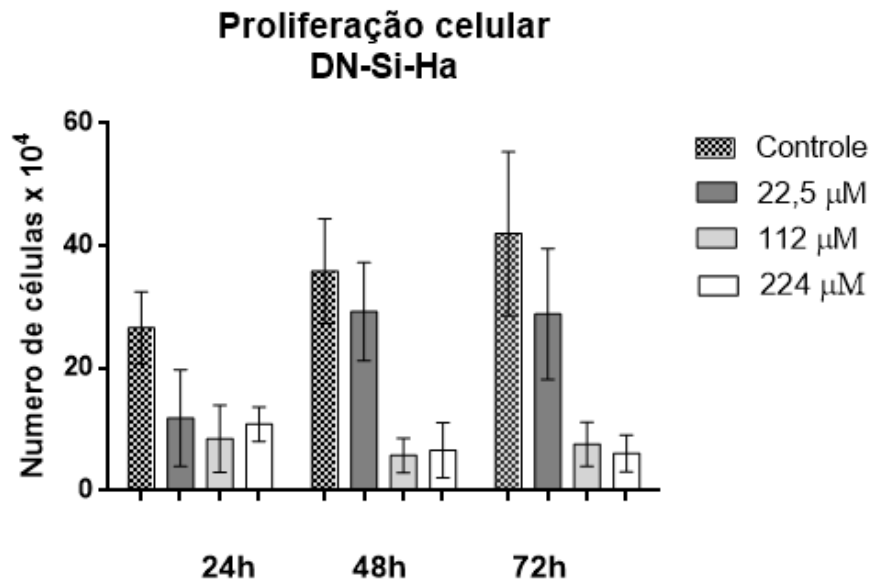
Figura 21. Resultado do ensaio de proliferação celular da DN contra células Hep-2



A DN apresentou inibição da proliferação celular sobre a linhagem tumoral Hep-2 nas primeiras 24 h de exposição em relação ao controle (Figura 20). O maior valor em porcentagem de inibição do crescimento celular em relação ao controle foi na concentração de 224 µM em 72h de exposição (86%), mas não houve diferença estatística em relação à dose de 112 µM. Em relação ao tempo de exposição de 48h e 72h nas mesmas doses também não houve diferença estatística. Esse resultado demonstra que a partir da concentração de 112 µM a dose passa a ser suficiente para a obtenção de uma porcentagem de inibição da proliferação celular maior do que 80%.

O mesmo comportamento foi observado para a linhagem Si-Ha onde somente nas maiores concentrações foi observada considerável inibição da proliferação celular após 48h de exposição (86%), mas não houve variação do nível de inibição quando o tempo foi de 72h entre as concentrações de 112 µM e 224 µM. Para ambas as linhagens tumorais a DN manteve o mesmo nível de inibição da proliferação celular (Figura 21).

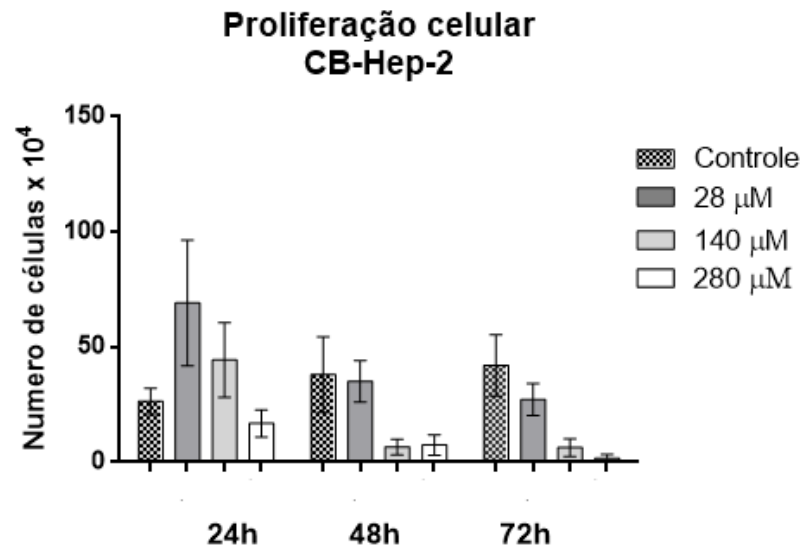
Figura 22. Resultado do ensaio de proliferação celular da DN sobre a linhagem Si-Ha



A CB apresentou 96% de inibição da proliferação celular sobre a linhagem Hep-2, em relação ao controle, na concentração de 280 µM em 72h de exposição (Figura 22), porém não houve diferença estatística em comparação com a dose de 140 µM. Em relação ao tempo de 48h e 72h também não houve diferença estatísticas entre as porcentagens de inibição nessas duas concentrações.

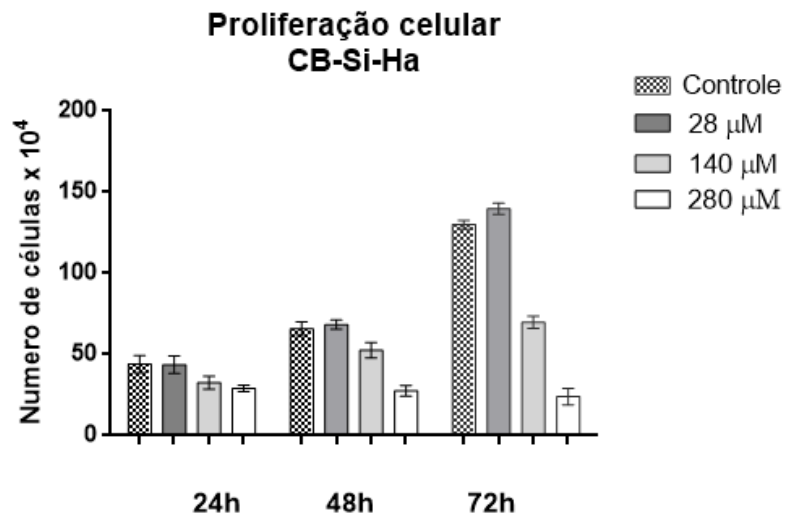
Desta forma, a partir de 120 µM após 48 h de exposição das células à CB o nível de inibição da proliferação celular foi maior do que 90%.

Figura 23. Resultado do ensaio de proliferação celular da CB em células Hep-2



Para linhagem Si-Ha a CB foi menos ativa com 81% de inibição na concentração de 140 μM (Figura 23) em 72h de exposição. Desta forma, é possível afirmar que as células tumorais Hep-2 foram mais sensíveis à CB do que as células da linhagem Si-Ha.

Figura 24. Resultado do ensaio de proliferação celular da CB sobre a linhagem Si-Ha

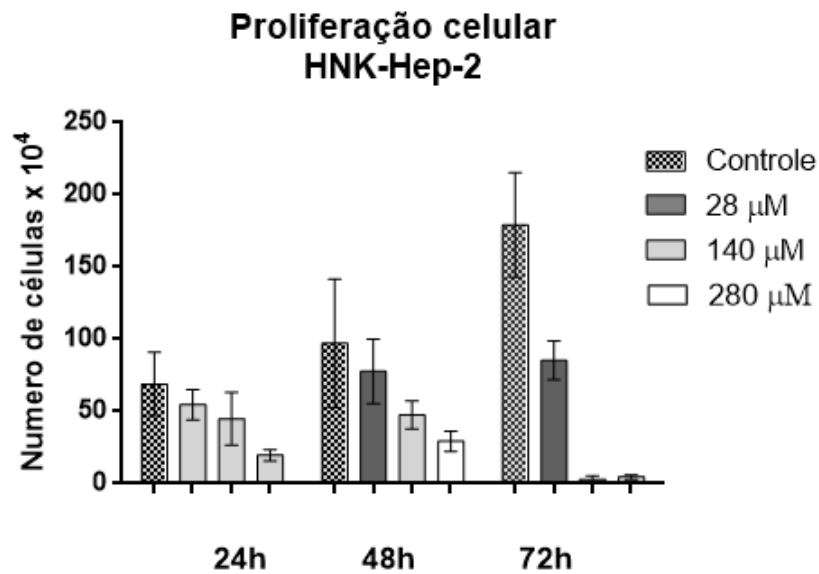


O modo de ação de um mesmo composto pode diferir sobre diferentes linhagens de células tumorais, por isso é importante a avaliação de um mesmo compostos sobre diferentes

linhagens. Esse comportamento é observado também para diferentes quimioterápicos que geralmente apresentam ação específica apenas sobre um ou poucos tipos de célula tumorais.⁷⁸

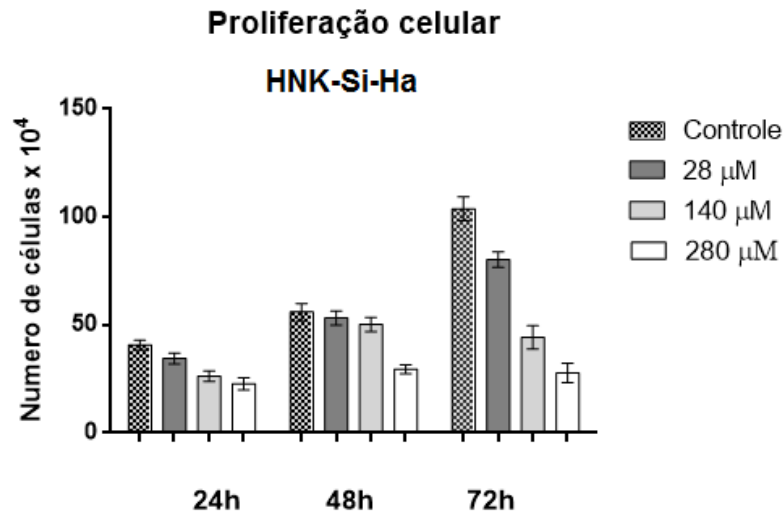
Em relação à HNK, a avaliação mostrou resultados mais promissores na concentração de 140 μM onde a inibição da proliferação das células Hep-2 foi de 98% (Figura 24).

Figura 25. Resultado do ensaio de proliferação celular da HNK em células Hep-2.



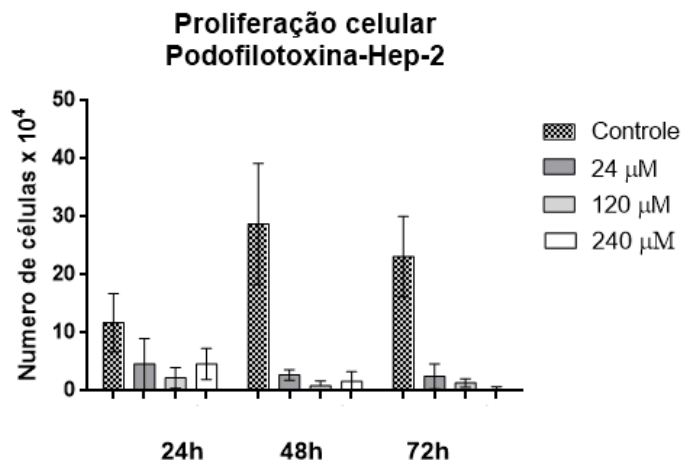
A inibição da proliferação das células Si-Ha pela HNK foi de 73% em relação ao controle (Figura 24), na concentração de 280 μM , indicando menor seletividade dessa lignana para as células Si-Ha do que para Hep-2.

Figura 26. Resultado do ensaio proliferação celular da HNK sobre a linhagem Si-Ha



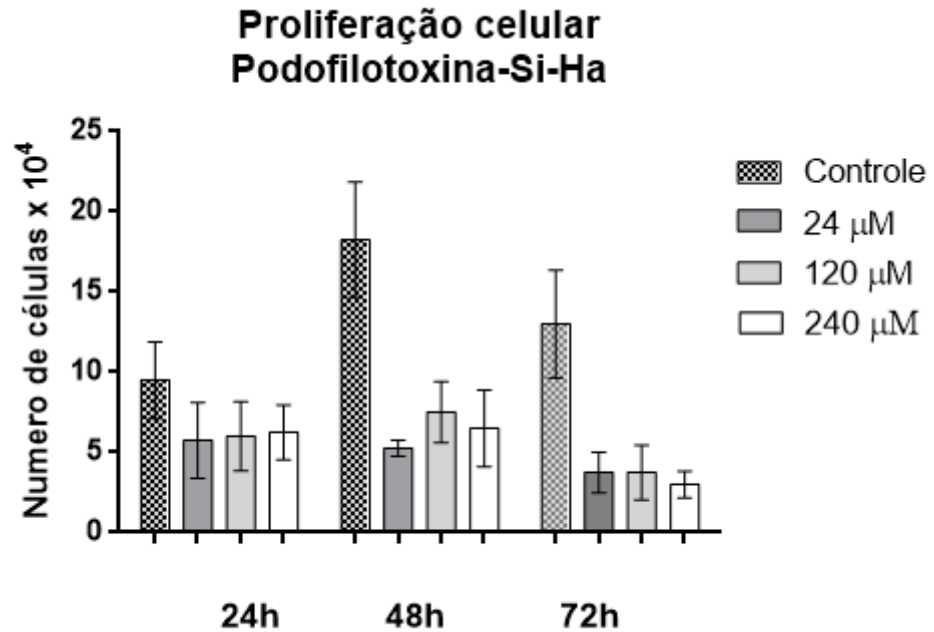
A linhagem Hep-2 também foi exposta à podofilotoxina (controle positivo) e no tempo de exposição de 48h foi possível observar que na concentração de 120 μM o índice de inibição da proliferação celular foi de 97%, esse índice sobre para 99% na concentração de 240 μM após 72h de exposição (Figura 26).

Figura 27. Resultado do ensaio de proliferação celular da (-)-podofilotoxina em células Hep-2.



Em relação à linhagem Si-Ha a podofilotoxina foi menos ativa com inibição da proliferação celular de 77% (Figura 27) sem diferença estatística entre as três concentrações no tempo de 72h, apresentando um comportamento tempo-dependente.

Figura 28. Resultado do ensaio de proliferação celular da podofilotoxina sobre a linhagem Si-Ha.



A comparação dos resultados das lignanas avaliadas com os obtidos com o controle podofilotoxina mostram que o modo de ação possivelmente é semelhante para esses compostos, pois todas mostraram resultados mais promissores sobre a linhagem Hep-2. De forma geral os resultados dos ensaios realizados apontam um comportamento tempo-dependente para essas lignanas.

Apesar da ação antiproliferativa desses compostos ser mais seletiva para a linhagem tumoral Hep-2, todas essas lignanas apresentaram potencial citotóxico, também sobre a linhagem Si-Ha.

4.4. Síntese das NNPs PLGA-lignanas, caracterização, eficiência de encapsulamento, velocidade de liberação e citotoxicidade (Realizado na primeira parte do Projeto na FEIS-UNESP, Brasil)

4.4.1 Caracterizações das NNPs PLGA-Lignanas preparadas pelo método de emulsão/evaporação utilizando agitador mecânico e sistema de gotejamento com PLGA 65:35.

4.4.1.1 Estudo da Morfologia das NNPs de PLGA

Após as sínteses por emulsão-evaporação do solvente as NNPs foram obtidas como pós com rendimentos massa/massa (PLGA inicial /NNPsPLGA final) de 10%, 11% e 9%, respectivamente, para as NNPs PLGA-HNK, PLGA-CB e PLGA-DN. O estudo da morfologia das NNPs (vazias e contendo as lignanas) foi realizado através de análises de MEV. Nas micrografias (Figura 28) foi possível observar que as NNPs-PLGA (Figura 28A) vazias e as NNPs-PLGA-HNK (Figura 28B) possuem forma esférica quase perfeita com diâmetro variando de 500 nm a 4 µm. A micrografia referente às NNPs-PLGA-CB mostra a presença de CB na forma de agulhas sobre as NNPs esféricas também com diâmetros variando no intervalo acima citado (Figura 28C). Essa micrografia indica que a CB não foi incorporada às NNPs de PLGA ou apenas parcialmente incorporada. Este fato pode estar relacionado com a baixa solubilidade da CB aliada a uma possível interação entre as moléculas de cubebina (ligações de hidrogênio) e os grupos carboxilas finais do polímero impossibilitando essa molécula de ser incorporada de forma eficiente nesta matriz polimérica. Para confirmar a morfologia da CB foi feito uma micrografia (Figura 29) das lignanas dissolvida em diclorometano. A micrografia das NNPs-PLGA-DN mostram que as nanopartículas de PLGA, de menor tamanho em relação às outras, envolveram os cristais da DN não permitindo avaliar se houve ou não encapsulamento, ainda que parcial (Figura 28D).

Para que o encapsulamento de um fármaco nas NNPs aconteça de forma eficiente a emulsão primária formada no processo de síntese deve ser suficientemente estável para reter o fármaco na fase interna. A presença dos grupos nitro na DN (fortemente eletronegativo) pode ter contribuído para a instabilidade da emulsão, pois é o único fator que diferencia essa substância da HNK cujas moléculas foram incorporadas as NNPs de PLGA.

Figura 29. Micrografias das NNPs obtidas por MEV: A) PLGA, B) PLGA-HNK, C) PLGA-CB e D) PLGA-DN.

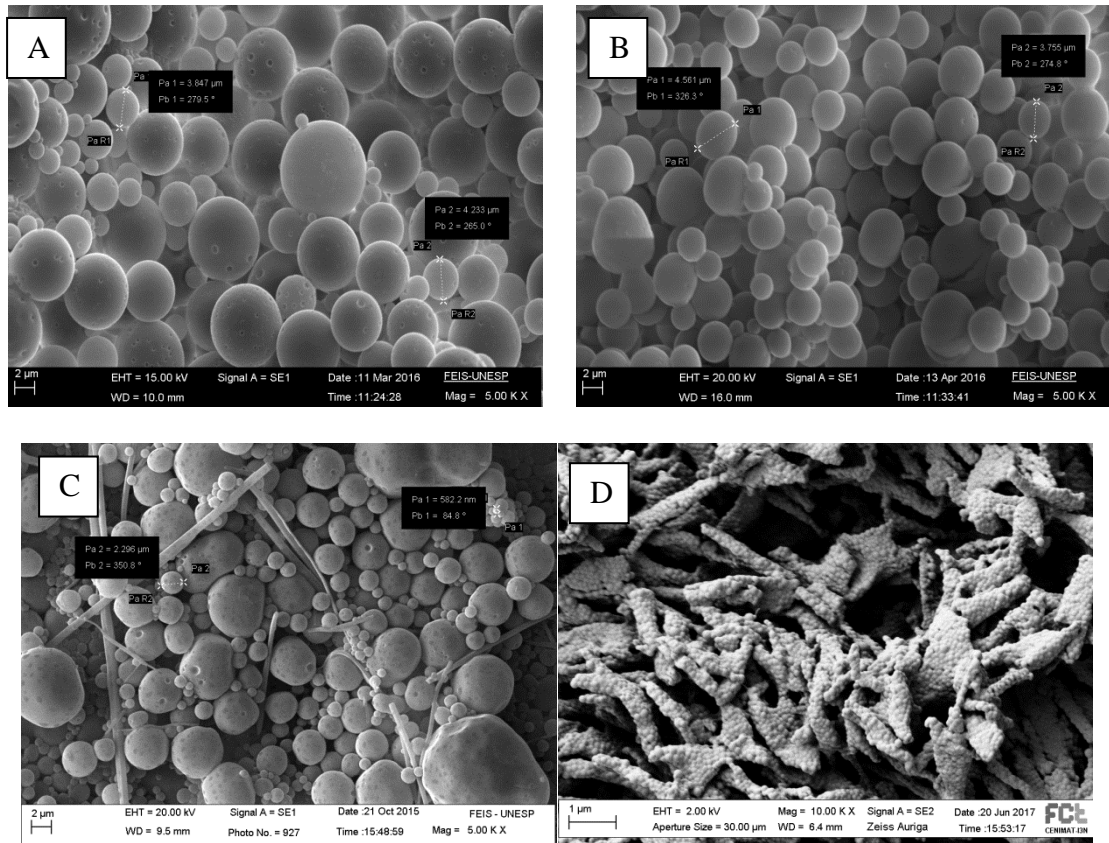
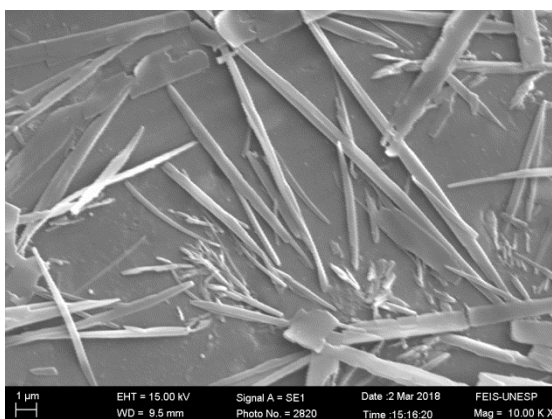


Figura 30. Micrografias de MEV da CB.



4.4.1.2 Caracterização do tamanho e estabilidade das partículas

As características médias de tamanho da partícula e distribuição de tamanho das suspensões coloidais obtidas foram determinadas por experimentos de espalhamento de luz. Como as partículas apresentaram tamanho de diâmetro heterogêneo, o aparelho de DLS apresenta um erro devido à grande diferença entre as partículas em tamanho médio e o tamanho de uma única partícula. A estabilidade das NPPs foram investigadas por medidas do potencial zeta ξ . Observou-se que os polímeros de PLGA produzem NPPs com potencial negativo devido às carboxilas terminais do PLGA na superfície das partículas⁷⁹. A estabilidade aumentou com a incorporação da HNK (Tabela 2). No caso das NNPs PLGA-CB e PLGA-DN a presença da lignana na forma de sólido sem incorporação não permitiu a medida do potencial zeta.

Diante desses resultados somente as NNPs PLGA-HNK deram sequência ao trabalho em relação a porcentagem de incorporação, velocidade de liberação e avaliação da citotoxicidade, todos esses procedimentos realizados na primeira etapa do trabalho na FEIS-UNESP.

Tabela 2. Tamanho da distribuição das partículas, polidispersidade e potencial zeta ξ das NPPs PLGA e PLGA-HNK

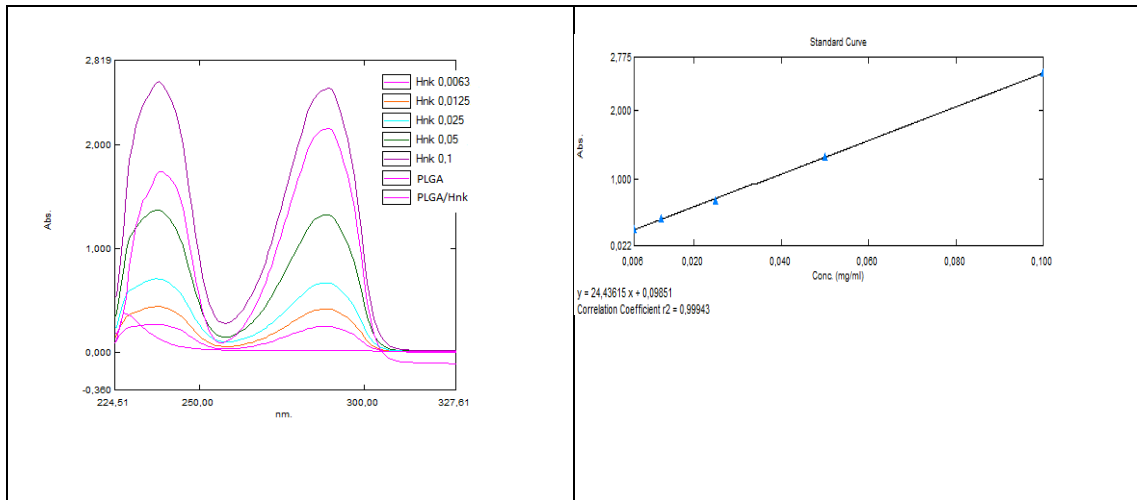
Polímero- Lignana	Tamanho médio	P.D.I.	Tamanho das	Potencial Zeta ξ (mV)
	das partículas (nm)		partículas (nm)	
PLGA	8789	0,768	336,4	-15,4
PLGA-HNK	7482	0,254	220,2	-18,5

4.4.2. Eficiência de encapsulamento da HNK nas NPPs PLGA-HNK

A eficiência de encapsulamento foi obtida a partir dos espectros de refração do UV/Vis no comprimento de onda variável, ajustado no comprimento de 288 nm para a HNK. O solvente utilizado foi o diclorometano, para rampa foram utilizadas 5 concentrações diferentes da HNK. As NNP de PLGA vazio não apresentam pico de absorção em 288 nm. A porcentagem de HNK encapsulada no PLGA (65:35) foi representada pela equação: eficiência de encapsulação (%) = quantidade total de determinada HNK em NPPs \times 100 / quantidade total de HNK teoricamente associada com NPPs, usando a equação linear $y = 24,43615x + 0,09851$ com coeficiente de correlação, $r^2 = 0,99943$, obteve-se o valor de porcentagem de incorporação de 84% (Figura 30).

A eficiência de encapsulamento foi muito boa em relação a muitos outros fármacos já encapsulados como o Docetaxel (quimioterápico)³³, onde as porcentagens de encapsulamento variam de 5 a 73% dependendo das condições empregadas na síntese das NPPs.

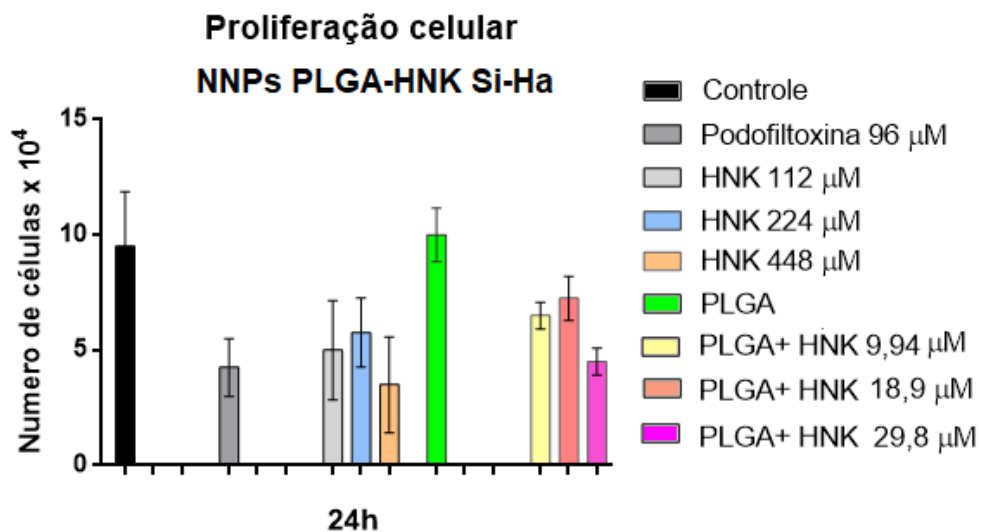
Figura 31. Eficiência de encapsulamento da HNK nas NNPs de PLGA (PLGA-HNK)



4.4.3. Ensaio de Proliferação celular das NNPs PLGA-HNK

O ensaio de viabilidade celular das NNPs PLGA-HNK foi realizado com a linhagem Si-Ha para a qual a HNK livre foi menos seletiva, a fim de verificar se o encapsulamento melhora a ação antiproliferativa da HNK sobre essa linhagem (Figura 31).

Figura 32. Resultado do ensaio de viabilidade celular das NNPs PLGA-HNK e da HNK livre sobre a linhagem Si-Ha



As nanopartículas de PLGA não apresentaram citotoxicidade sobre as células em comparação com o controle negativo. A HNK livre não apresentou diferença estatística entre

as três concentrações avaliadas com máximo de inibição da viabilidade celular de 63% (Figura 30) em relação ao controle negativo. Em relação às NNPs-PLGA-HNK houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre as três concentrações avaliadas e o controle negativo, porém não houve diferença estatística significativa entre a concentração de 29,8 μM e o controle positivo podofilotoxina (Figura 31). A maior porcentagem de inibição da viabilidade celular das NNPs-PLGA-HNK avaliadas foi de 50% na concentração de 29,8 μM .

Em comparação com a HNK livre as NNPs PLGA-HNK foram mais tóxicas às células da linhagem Si-Ha, pois, a concentração da HNK livre necessária para uma inibição de 50% das células foi muito superior àquela da HNK encapsulada (Figura 31), ou seja, o IC_{50} para a HNK livre foi 110 μM e para a encapsulada foi de 29,8 μM .

Esses resultados demonstram que o encapsulamento aumentou a ação citotóxica da HNK sobre a linhagem Si-Ha.

4.5. Síntese das NNPs PLGA-lignanas, PLGA-PEG-lignanas, caracterização, eficiência de encapsulamento, velocidade de liberação e citotoxicidade (Realizado na segunda parte do Projeto na FCT - Universidade Nova de Lisboa, Portugal)

4.5.1 Caracterizações das NNPs PLGA-Lignanas

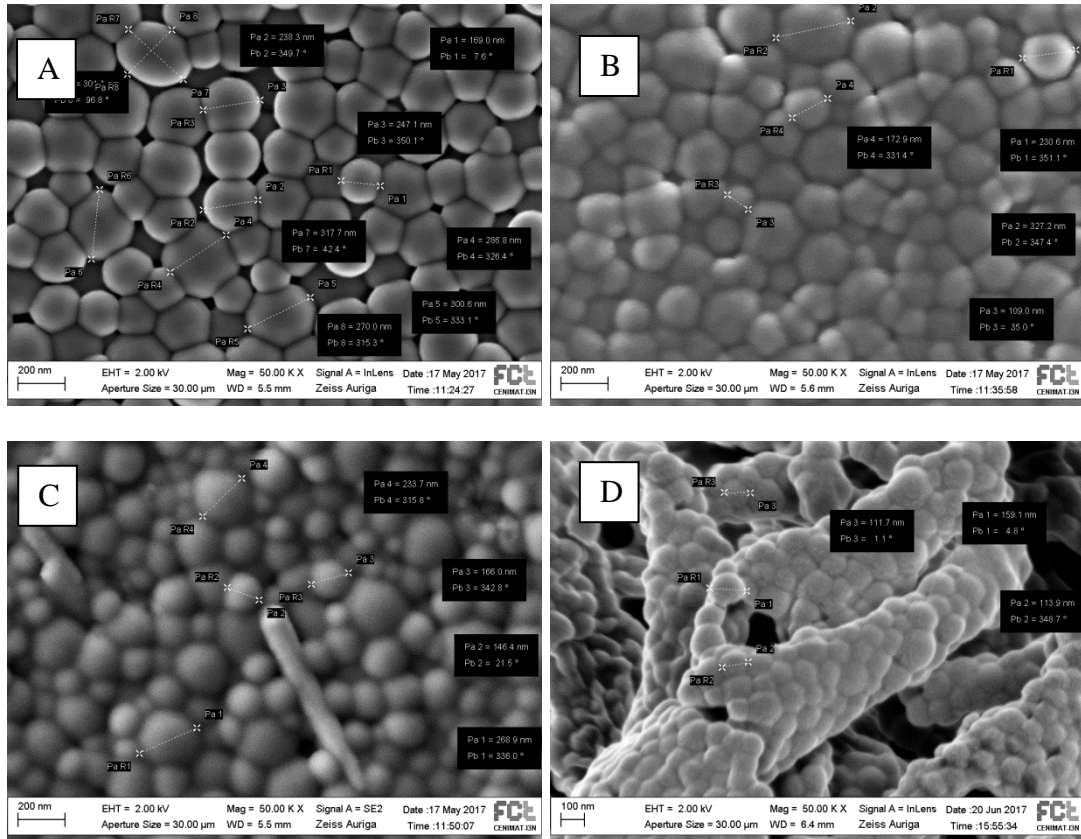
4.5.1.1 Estudo da Morfologia das NNPs de PLGA

Após as sínteses por nanoemulsão-evaporação do solvente utilizando o sonicador as NNPs foram obtidas como pós com rendimentos massa/massa de 26%, 23%, 30% e 24% respectivamente, para as NNPs PLGA-HNK, PLGA-CB e PLGA-DN. Essas NNPs foram obtidas em formas esféricas, mas agora com tamanhos menores variando de 320 nm a 150 nm (Figura 32). Para as NNPs PLGA-HNK o método de sonicação forneceu NNPs com menores tamanhos sem aparente interação externa da lignana com as NNPs de PLGA (Figura 32B). Entretanto, mesmo utilizando o sonicador as micrografias mostram novamente que parte da

CB (Figura 32C) e da DN (Figura 32D) não foram encapsuladas adequadamente restando muito composto livre misturado às NNPs do PLGA. A CB se apresenta na forma de longas agulhas sobre as NNPs de PLGA, enquanto para DN a micrografia (Figura 32D) indica que as NNPs de PLGA envolvem a DN sólida formando aglomerados que se parecem com pele de cobra. A lavagem e centrifugação das NNPs após a síntese, justamente para eliminar o polímero, o surfactante e o fármaco não encapsulado não foi eficaz, provavelmente devido a insolubilidade desses compostos aliadas a uma possível interação física com as NNPs de PLGA. Desta forma, o excesso dessas lignanas não incorporadas torna difícil a realização do teste de eficiência do encapsulamento e ensaios biológicos para as NNPs de PLGA-CB e PLGA-DN

A partir da obtenção das NNPs de PLGA:HNK foi comprovada a eficiência do uso do sonicador em relação à agitação mecânica. Bilati et al. (2005)⁸⁰ estudaram a influência do processo de sonicação sobre as características das nanopartículas de PLGA obtidas pelo mesmo método e comprovou que a duração e a intensidade da sonicação tem à capacidade de modificar o tamanho e a distribuição da população de nanopartículas. Esse autor demonstrou que a duração do segundo passo de mistura, que conduz à emulsão a / o / a, tem uma influência maior no tamanho médio final das partículas do que no primeiro passo para a emulsão de água em óleo. Este estudo sugeriu que existe um limiar para a intensidade de sonicação levando a um tamanho de partícula controlado com uma distribuição estreita³¹.

Figura 33. Micrografias obtidas das NNPs por MEV: A) PLGA, B) PLGA-HNK, C) PLGA-CB e D) PLGA-DN,



A constatação de que a incorporação da CB e DN não ocorreu mostrou que independentemente do método de agitação essas duas lignanas não são facilmente incorporadas o que novamente indica o efeito de suas estruturas no processo de formação e estabilidade da emulsão.

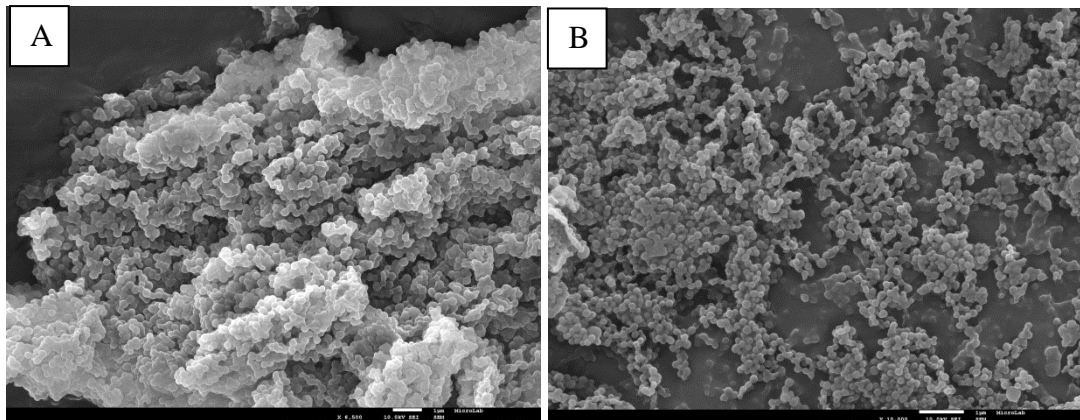
Com base nos resultados obtidos para essa três lignanas, todas as etapas posteriores de continuação do estudo foram conduzidas apenas com a HNK.

4.5.1.2 Caracterização do tamanho e estabilidade das partículas

Os tamanhos e a estabilidade das NNPs de PLGA-HNK na proporção PLA: PGA de 50:50 foram comparados a aqueles obtidos com as NNPs de PLGA 65:35 (Figura 28A e 28B)

com o objetivo de avaliar a influência da constituição do PLGA sobre a estabilidade das NNPs formadas. As características médias de tamanho de partícula, determinadas pelo DLS realizadas com as NNPs com os dois tipos de PLGA (Tabela 3) condizem com o observado nas micrografias de MEV (Figura 28A e 28B para o PLGA 65:35 e Figura 33A e 33B para o PLGA 50:50)

Figura 34. Micrografias das NPPs obtidas por MEV: A) PLGA (50:50) e B) PLGA(50:50)/HNK



Os valores numéricos de potencial zeta indicam que para as NNPs vazias de PLGA a proporção de PLA e PGA tem pouca significância, entretanto quando ocorre a incorporação da HNK as partículas obtidas com o PLGA 50:50 foram mais estáveis com valores de potencial zeta muito superiores (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre tamanho da distribuição das partículas, polidispersidade e potencial zeta ξ das NNPs obtidas com PLGA 65:35 e PLGA 50:50.

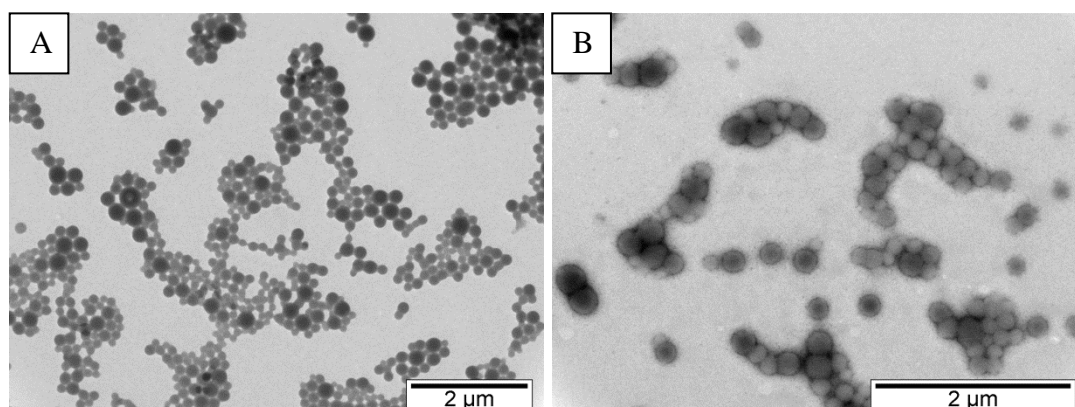
Polímero-Lignana	Tamanho médio das partículas (nm)	P.D.I.	Tamanho das partículas (nm)	Potencial Zeta ξ (mV)

PLGA (65:35)	242,3	0,087	230,7	-53,7
PLGA(65:35)-HNK	221,8	0,083	315	-65,6
PLGA (50:50)	238,8	0,130	252,1	-57,3
PLGA (50:50)-HNK	249,8	0,123	258,2	-85,9

Em relação ao tamanho das partículas, o PLGA 50:50 forneceu NNP valores menores nas NNP vazias e naquelas onde a HKN foi incorporada. As partículas de PLGA 50:50 apresentaram maior polidispersividade o que significa um maior número de partículas com tamanhos diferentes em relação ao PLGA 65:35. A polidispersividade está relacionada com a distribuição do tamanho de partículas na solução. Partículas com PDI menores do que 0,1 a 0,4 são consideradas com média polidispersividade, acima de 0,4 são consideradas muito polidispersivas⁸¹.

As micrografia obtidas por MET mostram que antes (Figura 34A) e depois da incorporação com a HNK (figura 34B) as NNPs se encontram em aglomerados. Isso ocorre quando o PVA é retirado, pois diminui a estabilidade das partículas ocasionando a aglomeração.

Figura 35. Micrografias obtidas por MET: A) NNPs de PLGA (50:50) e B) PLGA (50:50)-HNK

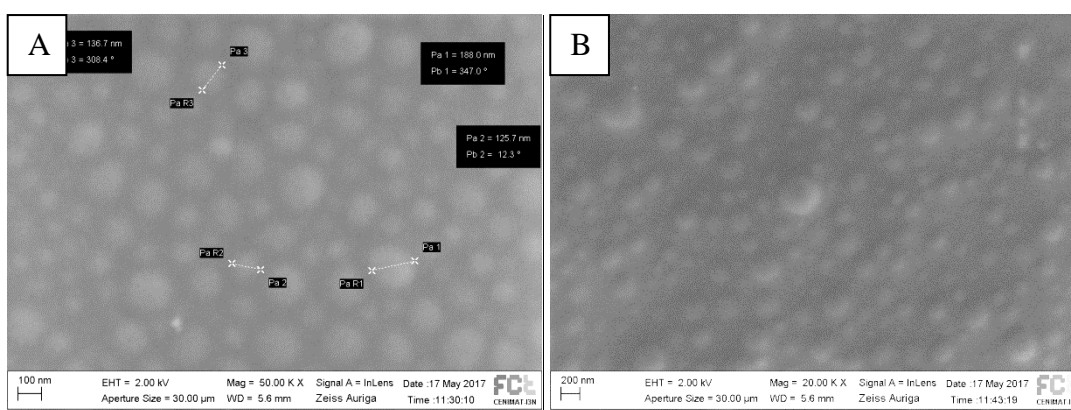


4.5.1.3 Estudo da Morfologia das NPPs de PLGA-PEG e PLGA-PEG-HNK

Além dos PLGA 65:35 e 50:50 também foi utilizado o PLGA-PEG 10% a fim de avaliar como a introdução de um maior grau de hidrofiliicidade afeta a estabilidade das NNPs quando a HNK é incorporada. As micrografias obtidas por MEV mostraram as NNPs PLGA-PEG-HNK com valores de diâmetros variando de 270 a 230 nm e as NNPs de PLGA-PEG com diâmetros de 125 a 200 nm (Figura 35). Portanto, houve aumento no tamanho da partícula com a incorporação da HNK assim como relatado na literatura para alguns fármacos, entretanto, o tamanho da NNPs com o fármaco depende das condições empregadas nas sínteses³¹.

Essas micrografias mostraram partículas esféricas indicando que a introdução do PEG aparentemente não alterou a forma das NNPs e nem a aglomeração entre elas, mas mostra uma camada aparentando um filme fino sob as partículas, que pode ser a peguilação do PLGA, que forma uma cadeia em torno de suas partículas⁴¹.

Figura 36. Micrografias das NPPs obtidas por MEV. A) PLGA-PEG e B) PLGA-PEG-HNK



Esta camada também pode ser observada nas micrografias de MET (Figura 36). Ao observar os resultados de potencial zeta é possível observar maiores valores absolutos para as NNPs PLGA-PEG em relação às NNPs PLGA (50:50) (Tabela 4) e na comparação entre as

NNPs de PLGA(50:50)-HNK (Tabela 3) e PLGA-PEG-HNK esses valores foram muito maiores, ou seja, com base nos valores obtidos, a incorporação do PEG aumentou significativamente a estabilidade da NNPs contendo a HNK.

Figura 37. Micrografias das NNPs obtidas por MET: A) PLGA-PEG e B) PLGA-PEG-HNK

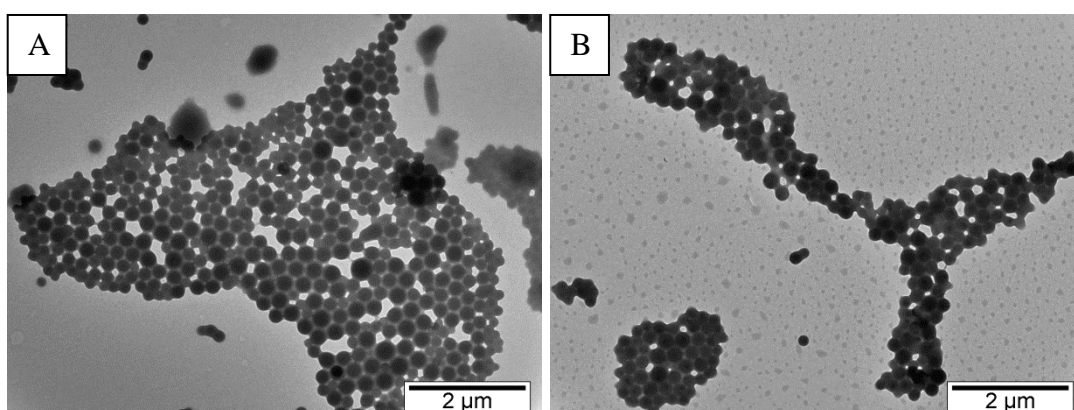


Tabela 4. Tamanho da distribuição das partículas, polidispersidade e potencial zeta ξ das NNPs preparada pelo método de emulsão/evaporação utilizando o sonicador.

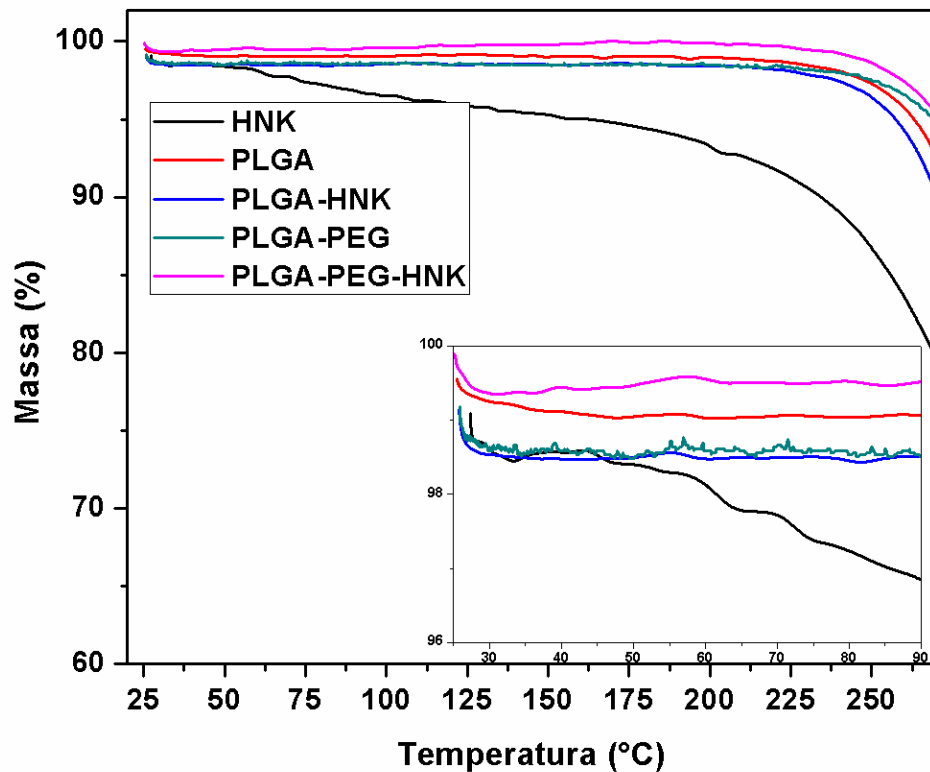
Polímero-Lignana	Tamanho das partículas (nm)	P.D.I.	Tamanho das partículas (nm)	Potencial Zeta ξ (mV)
PLGA-PEG	266	0,078	278,5	-69,5
PLGA-PEG-HNK	268,7	0,119	293,4	-114,3

4.5.1.4 Análises térmicas

A estabilidade térmica da HNK e das NNPs com e sem a HNK foi avaliada através da termogravimétrica (TG) que mede a variação de massa de uma substância como uma função da temperatura e/ou do tempo⁸².

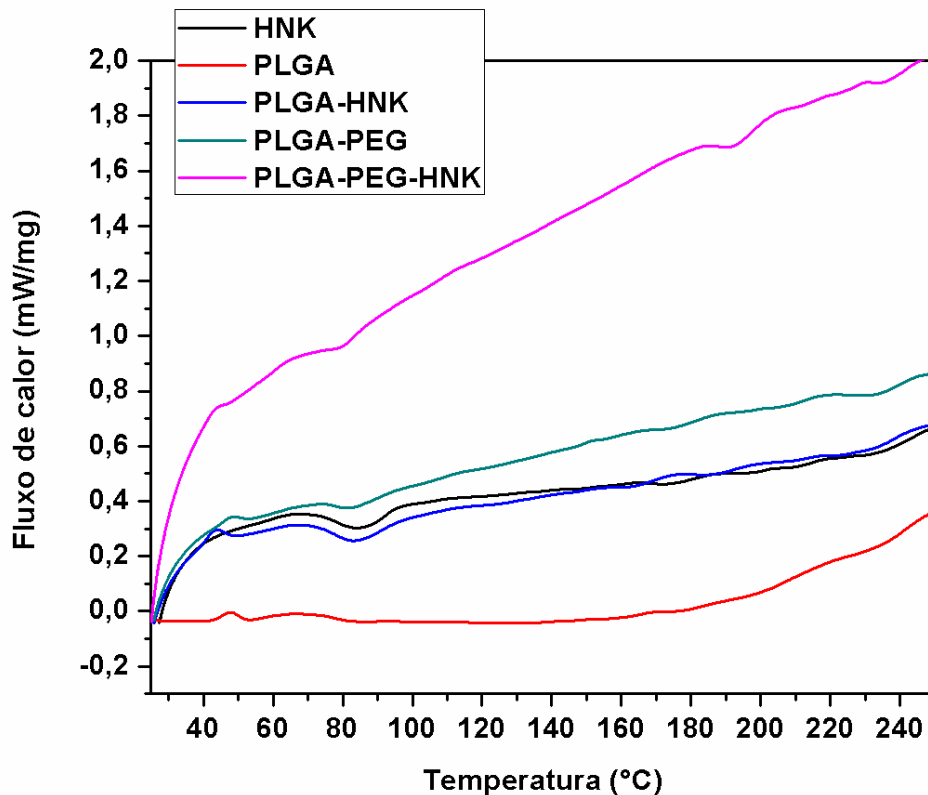
Na figura 37 pode-se observar o início da perda de massa da HNK a partir dos 50°C e outra perda significativa a 220 °C indicando decomposição do composto. As NPPs PLGA vazias e as de PLGA-HNK e PLGA-PEG-HNK apresentaram comportamento semelhante, mas a PLGA-HNK apresentou perda de massa mais significativa do que as NPPs de PLGA vazias indicando que a HNK tem influência sobre o comportamento térmico da partícula. Em relação as NPPs de PLGA-PEG e PLGA-PEG-HNK pode-se observar que as NPPs contendo a HNK são mais estáveis termicamente, pois a perda de massa acontece em maior temperatura. Na comparação entre as duas NPPs contendo a HNK, a presença do PEG contribui para o aumento da estabilidade térmica, pois as forças que mantem a estabilidade das partículas são mais fortes e por isso as partículas mais estáveis⁴¹.

Figura 38. Termogramas de TG das NPPs PLGA, PLGA-HNK, PLGA-PEG, PLGA-PEG-HNK e HNK.



A Calorimetria Diferencial de Varredura é uma técnica utilizada para medir a temperatura e a entalpia associadas à transição de fase dos materiais em função do tempo e da temperatura. Os termogramas (Figura 38) foram feitos para a comparação entre NPPs PLGA, PLGA-HNK, PLGA-PEG-HNK e a HNK. A transição vítrea (T_g) do PLGA (46°C)⁸², foi observada em todas as NPPs. O pico endotérmico aos 83°C da HNK é observado nas NPPs incorporadas, assim como o pico endotérmico característico desse composto em torno de 191°C . As NPPs PLGA-PEG e PLGA apresentam comportamentos diferentes na degradação devido cada um à sua constituição.

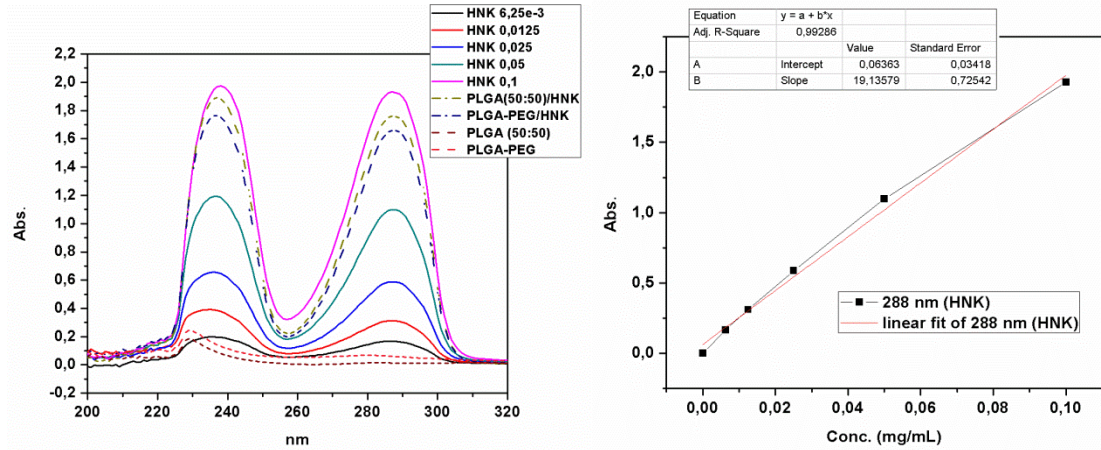
Figura 39. Termogramas das NPPs PLGA, PLGA-HG, PLGA-PEG, PLGA-PEG-HNK e HNK.



4.5.2. Eficiência de Encapsulamento

A eficiência de encapsulamento da HNK foi avaliada para as NNPs de PLGA (50:50)-HNK e PLGA-PEG-HNK que se mostraram mais estáveis. As análises foram realizadas como descrito anteriormente através um detector de UV de comprimento de onda variável, ajustado no comprimento de 288 nm (Figura 39). A porcentagem de HNK encapsulada nas NNPs de PLGA (50:50) e nas NNPs de PLGA-PEG foi representada pela equação: eficiência de encapsulação (%) = quantidade total de determinada HNK em micropartículas \times 100 / quantidade total de HNK teoricamente associada com NNPs, usando a equação linear $y = 19,13579x + 0,06363$ e o coeficiente de correlação, $r^2 = 0,99286$, podendo-se afirmar que a porcentagem de incorporação foi de 88% para as de NNPs de PLGA(50:50)-HNK e de 83% para as NNPs de PLGA-PEG-HNK. Comparando-se as duas NNPs analisadas a menor porcentagem de incorporação da HKN nas NNPs de PLGA-PEG pode ser devido ao processo de peguilação que reduz a capacidade de incorporação de composto hidrofóbicos como a HNK. Na peguilação há a formação de micelas onde as cadeias do PEG ficam orientadas para fora na parte externa da partícula e com isso repelem as moléculas dos compostos mais hidrofóbicos⁴¹.

Figura 40. Eficiência de encapsulação das NPPs de PLGA (50:50)-HNK e PLGA-PEG-HNK .



4.5.3 Ensaio de Liberação

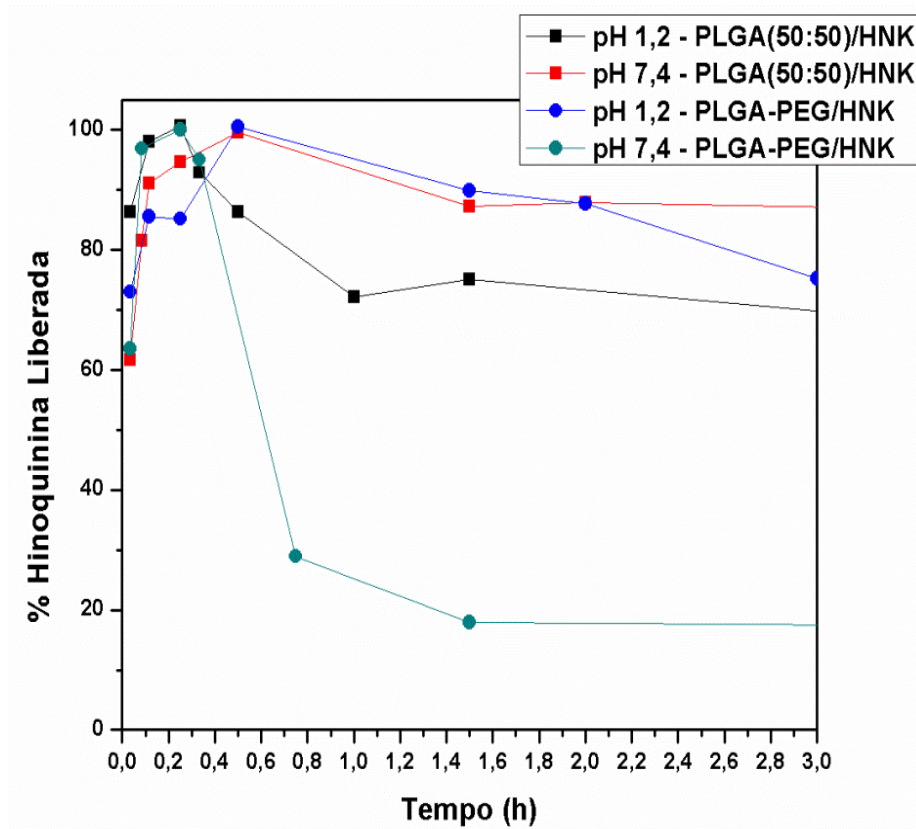
Os ensaios de liberação foram realizados em dois pHs diferentes que simulam os encontrados no estomago (1,2), intestino e sangue (7,4).

Em relação ao pH 1,2 as NNPs PLGA-PEG-HNK atingiram seu máximo de liberação após 30 minutos, caindo para 75% após 3h de ensaio, essa queda pode estar relacionada à decomposição da HNK neste pH ácido. As NNPs de PLGA-HNK atingiram o máximo de liberação mais rápido com tempo de 18 minutos e depois caiu para 75%, provavelmente pelo mesmo motivo acima (Figura 40).

No pH 7,4 as NNPs de PLGA-HNK apresentaram máxima liberação (100%) após 30 minutos, depois ocorre uma diminuição muito provavelmente devido à precipitação da HNK no meio aquoso o que dificulta a sua obtenção a partir da coleta para a análise de UV. Neste mesmo pH as NNPs de PLGA-PEG-HNK liberaram mais rapidamente a HNK (15 minutos) (Figura 39), sendo que a taxa de liberação com o passar do tempo caiu drasticamente, diferente do observado para o outro pH (1,2), este fato pode indicar que além da precipitação,

após liberação, a HNK pode estar interagindo com as moléculas dos polímeros e com isso não foi detectada livre detectada quando a análise de UV foi realizada.

Figura 41. Resultado dos ensaios de liberação com as NNPs de PLGA-HNK e PLGA-PEG-HNK

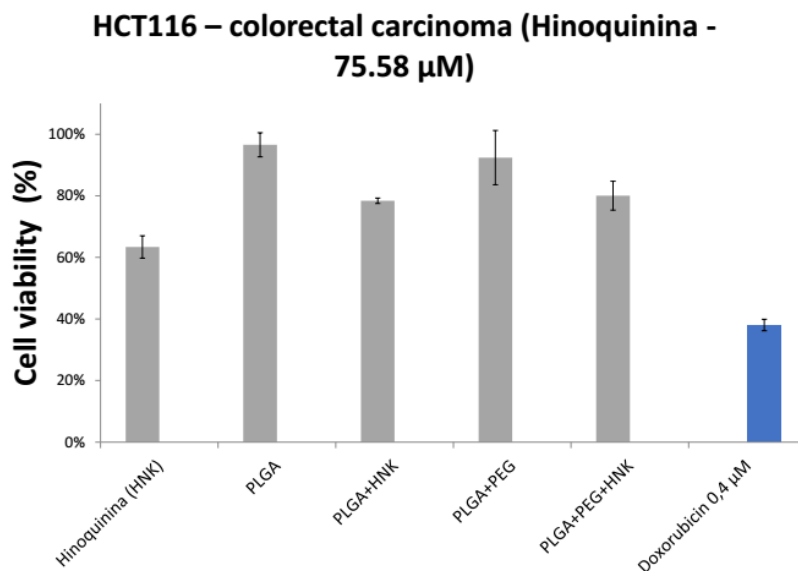


De forma geral, as NNPs de PLGA-PEG-HNK foram as mais estáveis, entretanto no ensaio de liberação da essas NNPs não apresentaram resultados promissores no pH que faz analogia ao pH do intestino e do sangue e que corresponde à principal via de administração de NNPS contendo fármacos: a intravenosa⁵⁴. Entretanto, ambas as NNPs de PLGA(50:50)-HNK e PLGA-PEG-HNK foram avaliadas contra as células tumorais das linhagens HCT116, A549, A2780.

4.5.4. Avaliação da citotoxicidade das NNPs de PLGA(50:50)-HNK e PLGA-PEG-HNK contra as linhagens tumorais HCT116, A549, A2780

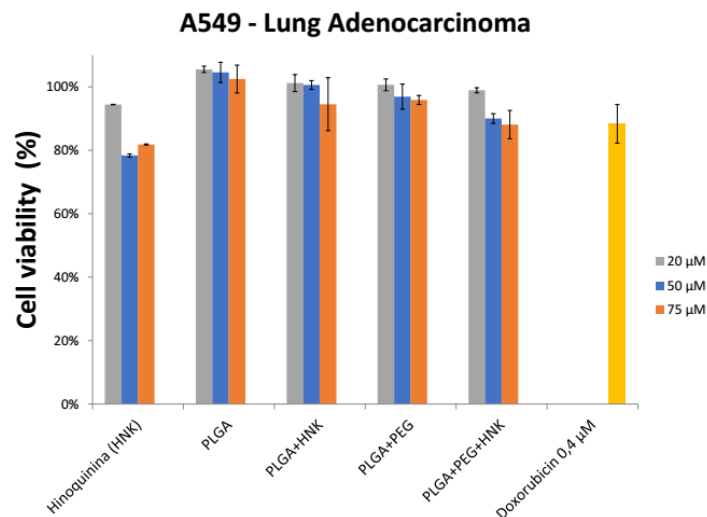
Os ensaios *in vitro* foram realizados usando os ensaios colorimétricos com MTS como descrito no procedimento experimental com tempo de exposição das células às NNPs de 24h. A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism v6.01 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). Para as células HCT116 de câncer colo-retal as NNPs com a HNK apresentaram resultados semelhantes, mas com inibição da viabilidade celular abaixo do 20% em relação ao controle negativo (PLGA e PLGA-PEG vazias). A HNK livre apresentou inibição da proliferação celular de 36%, ou seja, maior do que quando incorporada e menor do que o controle doxorubicina que apresentou 60% de inibição (Figura 41). A doxorubicina é um agente quimioterápico muito utilizado, entretanto, neste ensaio não apresentou considerável eficácia indicando o potencial agressivo desse tipo de célula^{83,84}.

Figura 42. Avaliação da HNK livre e incorporada em NNPs contra a linhagem tumoral HCT116



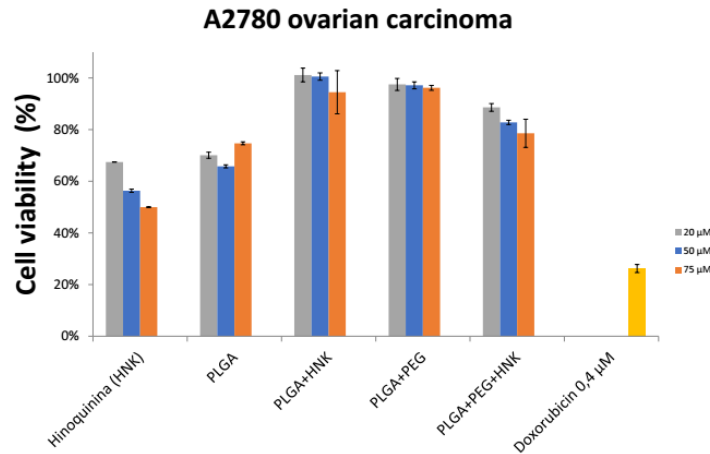
Para a linhagem tumoral A549 de câncer de pulmão os ensaios foram feitos em três diferentes concentrações (Figura 42). A HNK livre foi a que apresentou maior inibição dessas células na concentração de 50 μM (20%), enquanto as NNPs com e sem HNK, assim como o controle doxorrubicina apresentaram valores inferiores de inibição da viabilidade celular. Esses valores atestam a ineficiência de todas as formulações avaliadas bem como do controle positivo doxorrubicina sobre essa linhagem de célula.

Figura 43. Avaliação da HNK livre e incorporada em NNPs contra a linhagem tumoral A549



No ensaio contra as células A2780 novamente a HNK livre se mostrou mais ativa do que quando incorporada nas NNPs (Figura 43). Na concentração de 75 μM a HNK inibiu 50% a viabilidade celular enquanto o controle doxorrubicina inibiu 70%, mas na concentração de 0,4 μM , ou seja, possui maior atividade. Entre as NNPs as de PLGA-PEG-HNK foram mais ativas do que as PLGA-HNK com inibição da proliferação celular de 22%. As NNPs de PLGA e de PLGA-PEG vazias não apresentaram diferenças estatísticas significantes quando comparadas ao controle negativo, portanto não foram tóxicas às células.

Figura 44. Avaliação da HNK livre e incorporada em NNPs contra a linhagem tumoral A2780.



Nestes ensaios as NNPs incorporadas com a HNK não apresentaram o comportamento típico de fármacos encapsulados que apresentam maior citotoxicidade do que o fármaco livre. O tipo de célula avaliada também deve ser observado, pois as três linhagens avaliadas são de tumores de células de rápida multiplicação e com alto grau de comprometimento do órgão ou tecido em que ocorrem.

Contra a linhagem Si-Ha somente as NNPs de PLGA(65:35):HNK foram avaliadas e sobre essa linhagem essas NNPs foram mais ativas do que a HNK livre.

5. CONCLUSÕES GERAIS

As lignanas CB e (-)-HNK foram extraídas da *Piper cubeba*, caracterizadas com sucesso apresentado a pureza adequada para os ensaios biológicos;

A reação de nitração da HNK foi eficiente na obtenção da DN em 92% de rendimento

As três lignanas foram avaliadas em ensaios *in vitro* contra células tumorais Hep-2 e Si-Ha e apresentaram boas porcentagens de inibição da proliferação celular para ambas as linhagens mas em elevadas concentrações;

O método de emulsão e evaporação do solvente com uso do sonicador foi mais eficaz em fornecer nanopartículas de menores tamanhos e maior estabilidade;

A proporção entre PLA e PGA no PLGA (65:35 ou 50:50) não tem significância em relação à partícula vazia, mas quando a HNK foi incorporada as NNPs de PLGA 50:50 foram mais estáveis;

O uso de PLGA-PEG na incorporação da HNK quase dobrou o valor do potencial zeta para essas NNPs em relação ao obtido para as NNPs de PLGA(50:50)-HNK o que mostra a importância do PEG para a estabilidade da nanopartícula.

As técnicas utilizadas para a determinação da morfologia mostraram que todas as NNPs contendo a HNK apresentaram forma esférica com tamanhos variando de 150 a 350 nm sendo as de PLGA-PEG-HNK as de menor tamanho;

A HNK foi encapsulada com 84% de eficiência nas NNPs de PLGA(65:35)-HNK, 88% no PLGA(50:50)-HNK e com 83% no PLGA-PEG-HNK;

Nos ensaios de velocidade de liberação as NNPs de PLGA-HNK tiveram seus máximos de liberação após 30 minutos em pH 7,4 e 18 minutos em pH 1,2. Para as NNPs de PLGA-PEG-HNK os máximos de liberação foram após 30 minutos para pH 1,2 e 15 minutos para o pH 7,4 o que pode indicar que a HNK foi incorporada em nanocapsulas;

Em relação à atividade citotóxica das NNPs é possível afirmar que as NNPs de PLGA(50:50)-HNK e PLGA-PEG- HNK não foram mais ativas do que HNK livre contra as células de tumores mais agressivos, entretanto as NNPs de PLGA(65:35)- HNK apresentaram ação antiproliferativa bastante satisfatória em comparação com a HNK livre contra as células da linhagem Si-Ha;

Os resultados comprovaram a eficiência das NNPs PLGA(65:35)-HNK somente contra as células da linhagem Si-Ha.

REFERÊNCIAS

- (1) Gurnani, N.; Mehta, D.; Gupta, M.; Mehta, B. K. Natural Products : Source of Potential Drugs. *African J. Basic Appl. Sci.* **2014**, *6* (6), 171–186.
- (2) Crucho, C. I. C.; Barros, M. T. Polymeric Nanoparticles: A Study on the Preparation Variables and Characterization Methods. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *80*, 771–784.
- (3) Lima, R. G. De; Barros, M. T.; de Laurentiz, R. da S. Medicinal Attributes of Lignans Extracted from Piper Cubeba : Current Developments. *ChemistryOpen* **2018**, *7* (2), 180–191.
- (4) Cunha, W. R.; Luis, M.; Sola, R. C.; Ambrósio, S. R.; Bastos, J. K.; Franca, D.; Paulo, D. S. Lignans : Chemical and Biological Properties. In *Phytochemicals*; 2008; pp 213–234.
- (5) Pusztai, R.; Abrantes, M.; Sherly, J.; Duarte, N.; Molnar, J.; Ferreira, M. J. U. Antitumor-Promoting Activity of Lignans: Inhibition of Human Cytomegalovirus IE Gene Expression. *Anticancer Res.* **2010**, *30* (2), 451–454.
- (6) Ezzat, A.; Wu, M.; Li, X.-L.; Kwoh, C.-K. Computational Prediction of Drug–target Interactions Using Chemogenomic Approaches: An Empirical Survey. *Brief. Bioinform.* **2018**, No. February, 1–21.
- (7) Marcotullio, M. C.; Pelosi, A.; Curini, M. Hinokinin, an Emerging Bioactive Lignan. *Molecules* **2014**, *19* (9), 14862–14878.
- (8) Ardalani, H.; Avan, A.; Ghayour-mobarhan, M. Podophyllotoxin : A Novel Potential Natural Anticancer Agent. *Avicenna J. Phytomedicine* **2017**, *7* (4), 285–294.
- (9) Penalvo, J. L.; Heinonen, S.; Aura, A.; Adlercreutz, H. Dietary Sesamin Is Converted to Enterolactone in Humans. *J. Nutr.* **2005**, *135* (5), 1056–1062.
- (10) e Silva, M. L. A.; Coímbra, H. S.; Pereira, A. C.; Almeida, V. A.; Lima, T. C.; Costa, E. S.; Vinhólis, A. H. C.; Royo, V. D. A.; da Silva, R.; Filho, A. A. da S.; et al.

- Evaluation of Piper Cubeba Extract, (-)-Cubebin and Its Semi-Synthetic Derivatives against Oral Pathogens. *Phyther. Res.* **2007**, *21*, 420–422.
- (11) Niwa, A. M.; Marcarini, J. C.; Sartori, D.; Maistro, E. L.; Mantovani, M. S. Effects of (-)-Cubebin (Piper Cubeba) on Cytotoxicity, Mutagenicity and Expression of P38 MAP Kinase and GSTa2 in a Hepatoma Cell Line. *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *30* (1), 1–5.
- (12) Barbosa, L. C.; Furtado, R. A.; Bertanha, H. C. C.; Tomazella, I. M.; Costa, E. S.; Bastos, J. K.; E Silva, M. L. A.; Tavares, D. C. Chemopreventive Effects of (-)-Hinokinin against 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Genotoxicity and Preneoplastic Lesions in Rat Colon. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (10), 2312–2315.
- (13) Niwa, A. M.; De Paula, N. A.; Vesenick, D. C.; Sartori, D.; Maistro, E. L.; Ribeiro, L. R.; Mantovani, M. S. Evaluation of Lignan (-)-Cubebin Extracted from Piper Cubeba on Human Colon Adenocarcinoma Cells (HT29). *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* **2016**, *79* (2), 92–100.
- (14) Da Silva, R.; De Souza, G. H. B.; Da Silva, A. A.; De Souza, V. A.; Pereira, A. C.; Royo, V. D. A.; E Silva, M. L. A.; Donate, P. M.; De Matos Araújo, A. L. S.; Carvalho, J. C. T.; et al. Synthesis and Biological Activity Evaluation of Lignan Lactones Derived from (-)-Cubebin. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (4), 1033–1037.
- (15) Graidist, P.; Martla, M.; Sukpondma, Y. Cytotoxic Activity of Piper Cubeba Extract in Breast Cancer Cell Lines. *Nutrients* **2015**, *7* (4), 2707–2718.
- (16) Rajalekshmi, D. S.; Kabeer, F. A.; Madhusoodhanan, A. R.; Bahulayan, A. K.; Prathapan, R.; Prakasan, N.; Varughese, S.; Nair, M. S. Anticancer Activity Studies of Cubebin Isolated from Piper Cubeba and Its Synthetic Derivatives. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (7), 1767–1771.
- (17) Jain, K. K. Drug Delivery Systems - an Overview. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *437*, 1–

- 50.
- (18) Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J. M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Pr  at, V.; Shaji, J.; Lal, M.; Hami, Z.; Amini, M.; et al. Nanocarriers for Targeting in Inflammation. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2013**, *6* (2), 3–12.
- (19) Ochekepe, N. A.; Olorunfemi, P. O.; Ngwuluka, N. C. Nanotechnology and Drug Delivery Part 1: Background and Applications. *Trop. J. Pharm. Res.* **2009**, *8* (3), 265–274.
- (20) Leucuta, S. E. Nanotechnology for Delivery of Drugs and Biomedical Applications. *Curr. Clin. Pharmacol.* **2010**, *5* (4), 257–280.
- (21) Ochekepe, N. A.; Olorunfemi, P. O.; Ngwuluka, N. C. Nanotechnology and Drug Delivery Part 2: Nanostructures for Drug Delivery. *Trop. J. Pharm. Res.* **2009**, *8* (3), 275–287.
- (22) Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B. LIPOSSOMAS: A BALA MÁGICA ACERTO? *Quim. Nova* **2002**, *25* (6), 1181–1185.
- (23) Wilczewska, A. Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K. H.; Car, H. Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Pharmacol. Reports* **2012**, *64* (5), 1020–1037.
- (24) Faraji, A. H.; Wipf, P. Nanoparticles in Cellular Drug Delivery. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17* (8), 2950–2962.
- (25) M. Singh, S. Manekandan, A. K. K. Nanoscience and Nanotechnology. *Res. J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *1* (1), 1–11.
- (26) Kim, S.; Kim, J. H.; Jeon, O.; Kwon, I. C.; Park, K. Engineered Polymers for Advanced Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71* (3), 420–430.
- (27) De Jong, W. H.; Borm, P. J. A. Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards. *Int. J. Nanomedicine* **2008**, *3* (2), 133–149.
- (28) Kreuter, J. Nanoparticles-a Historical Perspective. *Int. J. Pharm.* **2007**, *331* (1), 1–10.

- (29) Feynman, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. *J. Microelectromechanical Syst.* **1992**, *1* (1), 60–66.
- (30) Shi, J.; Votruba, A. R.; Farokhzad, O. C.; Langer, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Lett.* **2010**, *10* (9), 3223–3230.
- (31) Rao, J. P.; Geckeler, K. E. Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36* (7), 887–913.
- (32) Jiang, W.; Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Nanoparticle-Mediated Cellular Response Is Size-Dependent. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3* (3), 145–150.
- (33) Iversen, T. G.; Skotland, T.; Sandvig, K. Endocytosis and Intracellular Transport of Nanoparticles: Present Knowledge and Need for Future Studies. *Nano Today* **2011**, *6* (2), 176–185.
- (34) Crucho, C. I. C. Stimuli-Responsive Polymeric Nanoparticles for Nanomedicine. *ChemMedChem* **2015**, *10* (1), 24–38.
- (35) Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; De Lucca Freitas, L.; Pohlmann, A. R. Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados Para Administração de Fármacos. *Quim. Nova* **2003**, *26* (5), 726–737.
- (36) Teixeira, C. M. B. Nanopartículas Poliméricas de Derivados Xantônicos, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2008.
- (37) Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-Based Nanocapsules for Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, *385* (1–2), 113–142.
- (38) Crucho, C. I. C. Synthesis of Polymeric Nanoparticles for Biomedical Delivery Applications, 2015.
- (39) Tng, D. J. H.; Song, P.; Lin, G.; Soehartono, A. M.; Yang, G.; Yang, C.; Yin, F.; Tan,

- C. H.; Yong, K. T. Synthesis and Characterization of Multifunctional Hybrid-Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery and Multimodal Imaging of Cancer. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 5771–5786.
- (40) Allen, T. M.; Hansen, C.; Martin, F.; Redemann, C.; Yau-Young, A. Liposomes Containing Synthetic Lipid Derivatives of Poly(Ethylene Glycol) Show Prolonged Circulation Half-Lives in Vivo. *BBA - Biomembr.* **1991**, *1066* (1), 29–36.
- (41) Almoustafa, H. A.; Alshawsh, M. A.; Chik, Z. Technical Aspects of Preparing PEG-PLGA Nanoparticles as Carrier for Chemotherapeutic agents by Nanoprecipitation Method. *Int. J. Pharm.* **2017**, *533* (1), 275–284.
- (42) Letchford, K.; Burt, H. A Review of the Formation and Classification of Amphiphilic Block Copolymer Nanoparticulate Structures: Micelles, Nanospheres, Nanocapsules and Polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *65* (3), 259–269.
- (43) Pereira, E. D.; Souza, F. G.; Pinto, J. C. C. S.; Cerruti, R.; Santana, C. Synthesis, Characterization and Drug Delivery Profile of Magnetic PLGA-PEG-PLGA/Maghemite Nanocomposite. *Macromol. Symp.* **2014**, *343* (1), 18–25.
- (44) Stevanović, M.; Uskoković, D. Poly (Lactide-Co-Glycolide) -Based Micro and Nanoparticles for the Controlled Drug Delivery of Vitamins. *Curr. Nanosci.* **2009**, *5* (1), 1–15.
- (45) Horn, D.; Rieger, J. Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase - Theory, Experiment, and Use. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, *40* (23), 4330–4361.
- (46) Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55* (1), 1–4.
- (47) Vauthier, C.; Bouchemal, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (5), 1025–1058.

- (48) Masood, F. Polymeric Nanoparticles for Targeted Drug Delivery System for Cancer Therapy. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *60*, 569–578.
- (49) Dinarvand, R.; Sepehri, N.; Manoochehri, S.; Rouhani, H.; Atyabi, F. Polylactide-Co-Glycolide Nanoparticles for Controlled Delivery of Anticancer Agents. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 877–895.
- (50) Jain, K. Advances in the Field of Nanooncology. *BMC Med.* **2010**, *8* (1), 83.
- (51) Etheridge, M. L.; Campbell, S. A.; Erdman, A. G.; Haynes, C. L.; Wolf, S. M.; McCullough, J. The Big Picture on Nanomedicine: The State of Investigational and Approved Nanomedicine Products. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2013**, *9* (1), 1–14.
- (52) Wang, B.; Siahaan, T.; Soltero, R. *Drug Delivery: Principles and Applications*; Wang, B., Siahaan, T., Soltero, R., Eds.; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, New Jersey, 2005.
- (53) Fonseca, L. B. da. Desenvolvimento de Nanopartículas Poliméricas Contendo Praziquantel Para o Tratamento Da Esquistossomose, UFRJ/ COPPE, 2012.
- (54) Mo, L.; Hou, L.; Guo, D.; Xiao, X.; Mao, P.; Yang, X. Preparation and Characterization of Teniposide PLGA Nanoparticles and Their Uptake in Human Glioblastoma U87MG Cells. *Int. J. Pharm.* **2012**, *436* (1–2), 815–824.
- (55) Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C. Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, *75* (1), 1–18.
- (56) Rossi-Bergmann, B. A Nanotecnologia: Da Saúde Para Além Do Determinismo Tecnológico. *Cienc. Cult.* **2008**, *60* (2), 54–57.
- (57) Mahmoudi, M.; Azadmanesh, K.; Shokrgozar, M. A.; Journeay, W. S.; Laurent, S. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (5), 3407–3432.
- (58) Peixoto, D.; Figueiredo, M.; Roma-rodrigues, C.; Baptista, P. V; Fernandes, A. R.;

- Barroso, S.; Carvalho, L.; Afonso, C. A. M.; Ferreira, M.; Branco, P. S. Synthesis , Cytotoxicity Evaluation in Human Cell Lines and in Vitro DNA Interaction of a Hetero-Arylidene-9 (10 H) Anthrone. *European J. Org. Chem.* **2018**, *9*, 545–549.
- (59) Cruz, M.; Enes, M.; Pereira, M.; Dourado, M.; Sarmiento Ribeiro, A. B. Experimental Models in Oncology: Contribution of Cell Culture on Understanding the Biology of Cancer. *Rev. Port. Pneumol.* **2009**, *15* (4), 669–682.
- (60) Mgbeahuruike, E. E.; Yrjönen, T.; Vuorela, H.; Holm, Y. Bioactive Compounds from Medicinal Plants: Focus on Piper Species. *South African J. Bot.* **2017**, *112*, 54–69.
- (61) Lin, P. C.; Lin, S.; Wang, P. C.; Sridhar, R. Techniques for Physicochemical Characterization of Nanomaterials. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32* (4), 711–726.
- (62) Skoog, D. A.; Holler, J. F.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*, 6^a.; Education, T. H., Ed.; CL; 6th edition (2006): Belmont, CA, 2007.
- (63) Jain, R. A. The Manufacturing Techniques of Various Drug Loaded Biodegradable Poly(Lactide-Co-Glycolide) (PLGA) Devices. *Biomaterials* **2000**, *21* (23), 2475–2490.
- (64) Mainardes, R. M.; Silva, L. P. Drug Delivery Systems: Past, Present, and Future. *Curr. Drug Targets* **2004**, *5*, 449–455.
- (65) Hans, M. .; Lowman, A. . Biodegradable Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2002**, *6* (4), 319–327.
- (66) Raghuvanshi, R. S.; Singh, M.; Talwar, G. P. Biodegradable Delivery System for Single Step Immunization with Tetanus Toxoid. *Int. J. Pharm.* **1993**, *93*, R1–R5.
- (67) Pissurno, A. P. da R.; de Laurentiz, R. da S. Cubebin: A Small Molecule with Great Potential. *Rev. Virtual Química* **2017**, *9* (2), 656–671.
- (68) Lima, T. C.; Lucarini, R.; Volpe, A. C.; de Andrade, C. Q. J.; Souza, A. M. P.; Pauletti, P. M.; Januário, A. H.; Símaro, G. V.; Bastos, J. K.; Cunha, W. R.; et al. In Vivo and in Silico Anti-Inflammatory Mechanism of Action of the Semisynthetic (-)-Cubebin

- Derivatives (-)-Hinokinin and (-)-O-Benzylcubebin. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, 27 (2), 176–179.
- (69) Medrado, H. H. S.; David, J. M.; David, J. P.; Brandão, H. N. Distribuição, Atividade Biológica, Síntese e Métodos de Purificação de Podofilotoxina e Seus Derivados. *Quim. Nova* **2015**, 38 (2), 243–258.
- (70) Elfahmi; Ruslan, K.; Batterman, S.; Bos, R.; Kayser, O.; Woerdenbag, H. J.; Quax, W. J. Lignan Profile of Piper Cubeba, an Indonesian Medicinal Plant. *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, 35 (7), 397–402.
- (71) Perazzo, F. F.; Rodrigues, I. V.; Maistro, E. L.; Souza, S. M.; Nanaykkara, N. P. D.; Bastos, J. K.; Carvalho, J. C. T.; De Souza, G. H. B. Anti-Inflammatory and Analgesic Evaluation of Hydroalcoholic Extract and Fractions from Seeds of Piper Cubeba L. (Piperaceae). *Pharmacogn. J.* **2013**, 5 (1), 13–16.
- (72) Ganz, C. Heilpflanze Des Jahres 2016: Kubeben-Pfeffer (Piper Cubeba). *Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin / Swiss J. Integr. Med.* **2016**, 28 (1), 20–22.
- (73) Rezende, K. C. S.; Lucarini, R.; Símaro, G. V.; Pauletti, P. M.; Januário, A. H.; Esperandim, V. R.; Martins, C. H. G.; Silva, M. A.; Cunha, W. R.; Bastos, J. K.; et al. Antibacterial Activity of (-)-Cubebin Isolated from Piper Cubeba and Its Semisynthetic Derivatives against Microorganisms That Cause Endodontic Infections. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2016**, 26 (3), 296–303.
- (74) AUREMN. AUREMN - Associação Dos Usuários de RMN. <<http://auremn.org/wp/pt/>>. 2011.
- (75) Rezende, K. C. S.; Lucarini, R.; Símaro, G. V.; Pauletti, P. M.; Januário, A. H.; Esperandim, V. R.; Martins, C. H. G.; Silva, M. A.; Cunha, W. R.; Bastos, J. K.; et al. Antibacterial Activity of (-)-Cubebin Isolated from Piper Cubeba and Its

- Semisynthetic Derivatives against Microorganisms That Cause Endodontic Infections. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2016**, 26 (3), 296–303.
- (76) Rafiei, P.; Haddadi, A. Docetaxel-Loaded PLGA and PLGA-PEG Nanoparticles for Intravenous Application: Pharmacokinetics and Biodistribution Profile. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, 12, 935–947.
- (77) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ : 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, 9 (7), 671–675.
- (78) De Almeida, V. L.; Leitão, A.; Barrett Reina, L. D. C.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P. CâNcer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Com o DNA: Uma Introdução. *Quim. Nova* **2005**, 28 (1), 118–129.
- (79) Ahlin, P.; Kristl, J.; Kristl, A.; Vrečer, F. Investigation of Polymeric Nanoparticles as Carriers of Enalaprilat for Oral Administration. *Int. J. Pharm.* **2002**, 239 (1–2), 113–120.
- (80) Bilati, U.; Allémann, E.; Doelker, E. Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Protein-Loaded Nanoparticles Prepared by the Double Emulsion Method - Processing and Formulation Issues for Enhanced Entrapment Efficiency. *J. Microencapsul.* **2005**, 22 (2), 205–214.
- (81) Bhattacharjee, S. Review Article DLS and Zeta Potential – What They Are and What They Are Not? *J. Control. Release* **2016**, 235, 337–351.
- (82) Terry, A. B.; Salaam, A. D.; Nyairo, E.; Thomas, V.; Dean, D. R. PLGA Nanoparticles for the Sustained Release of Rifampicin. *J Nanogenomics Nanomedicine* **2014**, 2 (1), 1–9.
- (83) Mendes, R.; Pedrosa, P.; Lima, J. C.; Fernandes, A. R.; Baptista, P. V. Photothermal Enhancement of Chemotherapy in Breast Cancer by Visible Irradiation of Gold Nanoparticles. *Sci. Rep.* **2017**, 7 (10872), 1–9.

- (84) Silva, T. F. S.; Smolen, P.; Guedes, M. F. C.; Fernandes, A. R.; Luis, D.; Silva, A.; Santos, S.; Borralho, P. M.; Rodrigues, C. M. P.; Pombeiro, A. J. L. Cobalt and Zinc Compounds Bearing 1,10-Phenanthroline- and Cell Selectivity Studies. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 3651–3658.