



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus Araraquara
Curso de Pós-Graduação – Ciências Farmacêuticas

FELIPE FALCÃO HADDAD

**AVALIAÇÃO MULTIFACETADA DE NOVA CHALCONA:
ESTUDOS DE BIOCOMPATIBILIDADE,
ANTIANGIOGÊNESE E ANTI-INFLAMATÓRIO POR MEIO
DO MODELO HET-CAM**

Araraquara, SP
2024

FELIPE FALCÃO HADDAD

**AVALIAÇÃO MULTIFACETADA DE NOVA CHALCONA:
ESTUDOS DE BIOCOMPATIBILIDADE,
ANTIANGIOGÊNESE E ANTI-INFLAMATÓRIO POR MEIO
DO MODELO HET-CAM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Cauê Benito Scarim
Coorientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

**Araraquara, SP
2024**

H126a Haddad, Felipe Falcão.
Avaliação multifacetada de nova chalcona: estudos de biocompatibilidade, antiangiogênese e antiinflamatório por meio do modelo HET-CAM / Felipe Falcão Haddad. – Araraquara, 2024.
63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Cauê Benito Scarim.
Coorientador: Jean Leandro dos Santos.

1. Carbonilas α,β -insaturadas. 2. HET-CAM. 3. Novos fármacos. 4. Irritação aguda. 5. Anti-angiogênese. 6. Anti-inflamatório. I. Scarim, Cauê Benito, orient. II. Santos, Jean Leandro dos, coorient. III. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação multifacetada de novas Chalconas: Estudos de biocompatibilidade, antiangiogênese e anti-inflamatório por meio do modelo HET-CAM

AUTOR: FELIPE FALCÃO HADDAD

ORIENTADOR: CAUÊ BENITO SCARIM

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CAUÊ BENITO SCARIM (Participação Presencial)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO (Participação Presencial)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. CASSAMO USSEMANE MUSSAGY (Participação Virtual)
Escuela de Agronomía da Facultad de Ciencias Agronómicas y de los Alimentos / Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV) - Chile

Araraquara, 13 de dezembro de 2024

À minha amada mãe, Maria Ângela Falcão Haddad

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, meus amigos e todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho. Sempre serei grato por isso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Nos últimos anos, o crescente interesse por métodos alternativos ao uso de animais em testes laboratoriais têm levado à exploração de abordagens inovadoras para o desenvolvimento de novos fármacos, cosméticos e nutracêuticos, como o método HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane). Este método oferece uma plataforma *in vitro* que utiliza ovos fertilizados de galinha para avaliar a irritação aguda e os efeitos farmacológicos de novas entidades químicas. Dessa forma, este estudo visa a investigação dos potenciais efeitos de biocompatibilidade, angiogêneses e anti-inflamatórios de derivados de chalconas (D3OH, D3COPH3, D3COH e D1), previamente sintetizadas pelo grupo Lapdesf-UNESP (Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos), utilizando o método HET-CAM como modelo alternativo experimental *in vitro*. As chalconas, conhecidas por suas diversas propriedades farmacológicas, foram escolhidas devido à sua comprovada capacidade de modular processos inflamatórios e inibir o crescimento tumoral. Estudos de biocompatibilidade e angiogênese foram realizados para identificar o potencial de irritabilidade aguda, embriotoxicidade e antiangiogênico que essas moléculas podem apresentar. O ensaio de biocompatibilidade *in vitro* (*in ovo*) em HET-CAM revelou que os derivados de chalconas D3OH, D3COPH3, D3COH e D1 são seguros, apresentando ausência de toxicidade aguda, lise vascular, hemorragia e coagulação em 300 segundos. O ensaio antiangiogênico mostrou que D3OH e D1 inibiram a formação de vasos de forma semelhante ao controle 5-FU. Assim, D3OH e D1 foram selecionados para testes de atividade anti-inflamatória em modelo *in vitro* (*in ovo*) de HET-CAM.

Palavras-chave: carbonilas α,β -insaturadas; HET-CAM; novos fármacos; irritação aguda; anti-angiogênese; anti-inflamatório.

ABSTRACT

In recent years, the increasing interest in alternative methods to animal testing in laboratory studies has driven the exploration of innovative approaches for the development of new pharmaceuticals, cosmetics, and nutraceuticals, such as the HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane) method. This method offers an *in vitro* platform utilizing fertilized chicken eggs to assess acute irritation and the pharmacological effects of novel chemical entities. In this context, the present study aims to investigate the potential biocompatibility, anti-angiogenic, and anti-inflammatory effects of chalcone derivatives (D3OH, D3COPH3, D3COH, and D1), previously synthesized by the Lapdesf-UNESP (Drug Research and Development Laboratory), using the HET-CAM method as an alternative experimental *in vitro* model. Chalcones, recognized for their multifaceted pharmacological properties, were selected due to their demonstrated ability to modulate inflammatory processes and inhibit tumor progression. Biocompatibility and angiogenesis assays were conducted to identify the potential acute irritability, embryotoxicity, and anti-angiogenic properties that these molecules may exhibit. The *in vitro* (*in ovo*) HET-CAM biocompatibility assay revealed that chalcone derivatives D3OH, D3COPH3, D3COH, and D1 are safe, showing no signs of acute toxicity, vascular lysis, hemorrhage, or coagulation within 300 seconds. The anti-angiogenic assay demonstrated that D3OH and D1 inhibited vessel formation to a similar extent as the 5-FU control. Consequently, D3OH and D1 were selected for further anti-inflammatory activity assays in an *in vitro* (*in ovo*) HET-CAM model.

Keywords: α,β -unsaturated carbonyl compounds; HET-CAM; novel drugs; acute irritation; anti-angiogenesis; anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Montagem Total de embrião de galinha com 72h de desenvolvimento, as modificações do coração primitivo.....	15
FIGURA 2. Incubadora de ovos egípcios.....	16
FIGURA 3. Semelhanças entre embriões e seus estágios evolutivos.....	17
FIGURA 4. Os anexos embrionários de aves no início de seu desenvolvimento.....	21
FIGURA 5. (A) Fundo do olho humano saudável; (B) Embrião de galinha no início do desenvolvimento.....	21
FIGURA 6. Membrana corioalantóica em início de desenvolvimento.....	22
FIGURA 7. Ovoluminescência para identificar se ovo está fecundado.....	23
FIGURA 8. Chalconas avaliadas no trabalho.....	29
FIGURA 9. Fluxograma de atividades.....	32
FIGURA 10. Reação irritante em região vascularizada, sendo observados pontos hemorrágicos e coagulação após aplicação do composto.....	33
FIGURA 11. Imagens das reações da membrana corioalantóica (CAM) no tempo de 0 segundos (sem reação) e o tempo de 300 segundos.....	35
FIGURA 12. Resultados do ensaio de biocompatibilidade <i>in vitro</i> (<i>in ovo</i>) em HET-CAM e a análise estatística.....	35
FIGURA 13. Percentual de sobrevivência durante o experimento no tempo de 10 minutos.....	36
FIGURA 14. Imagens <i>in ovo</i> obtidas 48 horas após a aplicação do controle negativo NaCl 0.9%, D3OH, D3POCH ₃ , D1, D3POH e controle positivo 5-FU.....	39
FIGURA 15. Análise quantitativa do número de vasos na membrana corioalantóica do embrião de galinha após 48 horas de tratamento.....	40

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. HET-CAM Escore. (-) Sem reação, ausência de hemorragia, lise vascular e coagulação durante 300 segundos; (+) Reação moderada, hemorragia, lise vascular e coagulação discreta durante 300 segundos; (++) Reação moderada, hemorragia, lise vascular e coagulação moderada durante 300 segundos; (+++) Reação severa, hemorragia, lise vascular e coagulação severa durante 300 segundos.....	36
---	-----------

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sistema de pontuação semi-quantitativa do efeito anti-inflamatório em CAM.....**31**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3 R's – Redução, Refinamento e Substituição

CAM – Membrana corioalantóica

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DCs – Células Dendríticas

DMSO - Dimetilsulfóxido

FCFAR - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

HET-CAM - Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane

Lapdesf – Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos

MDSCs – Células supressoras derivadas de mieloides

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

SDS - Sódio Dodecil Sulfato

Tregs – Células T Reguladoras

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Estudos alternativos ao uso de animais	14
2.2. Uso de embriões de aves em experimentos	14
2.3. Estruturas extra-embrionárias	18
2.4. Teste da membrana corioalantóica (HET-CAM)	21
2.5. Processo de Angiogênese	24
2.6. Chalcona	26
2.7. Derivado de chalcona: Lapdesf-JL22	27
3. OBJETIVO	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. METODOLOGIA	29
4.1. Estudo de biocompatibilidade em CAM	29
4.2. Estudo de atividade antiangiogênica em CAM	30
4.3. Estudo de atividade anti-inflamatória em CAM	31
4.4. Análises estatísticas	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Estudo de biocompatibilidade em CAM	33
5.2. Estudo de atividade antiangiogênica em CAM	37
5.3. Comparação entre NaCl (controle negativo) e os compostos	37
5.4. Comparação entre 5-FU (controle positivo) e os compostos	38
5.5. Relação entre estrutura-atividade dos compostos	40
5.6. Estudo da atividade anti-inflamatória em CAM	42
5. CONCLUSÃO	44
6. PERSPECTIVAS	44
7. REFERÊNCIAS	45

ANEXO A. Is the carotenoid production from <i>Phaffia rhodozyma</i> yeast genuinely sustainable? A comprehensive analysis of biocompatibility, environmental assessment, and techno-economic constraints.	54
ANEXO B. Chitosan surface modification modulates the mucoadhesive, permeation and anti-angiogenic properties of gellan gum/bevacizumab nanoparticles.	55
ANEXO C. Characterization and in vitro cytotoxicity of piperine-loaded nanoemulsion in breast cancer cells.	56
ANEXO D. Characterization and in vitro cytotoxicity of piperine-loaded nanoemulsion in breast cancer cells.	57
ANEXO E. Eco-sustainable biorefinery to the management of winery waste by integrating sequential ready-to-use pigments and bioenergy through advanced multi-step kinetic slow pyrolysis.	58

1. INTRODUÇÃO

Os métodos alternativos ao uso de animais têm sido adotados com o intuito de simular a fisiologia humana sem a necessidade de utilizar modelos animais, levando em consideração a maior eficiência em termos de tempo de execução dos experimentos e a redução de custos (Doke; Dhawale, 2015). Além disso, estudos recentes indicam que, em alguns casos, voluntários humanos desenvolveram lesões após a administração de compostos previamente considerados seguros em testes com animais, evidenciando limitações deste modelo na previsão da toxicidade de fármacos (Van Norman, 2020). Diante da subjetividade inerente aos resultados obtidos em animais, a pesquisa tem buscado alternativas experimentais mais vantajosas economicamente, alinhadas ao princípio dos 3 R's (*reduction, replacement and refinamento*) traduzido para o português como “redução, substituição e refinamento” e tendo como objetivo diminuir progressivamente o uso de animais em estudos científicos (Huang *et al.*, 2021).

Esses fatores permitem que tais estudos sejam mais atraentes para a pesquisa brasileira, principalmente pelo país estar imerso no grande ramo do agronegócio, tendo a produção de frangos no Brasil ocupando o primeiro lugar na exportação de carne e o segundo lugar em produção, facilitando o desenvolvimento de pesquisas utilizando ovos desses animais. Para alcançar estes resultados, este setor permanece em constante evolução com uso de tecnologias para garantir um bom desenvolvimento dos animais, e dessa forma, para que a eclosão dos pintinhos seja possível, os ovos permanecem na incubadora por um período de 21 dias (Groff *et al.*, 2017).

Essas incubadoras, que têm como função gerar calor e umidade estável e constante, permitindo assim o desenvolvimento embrionário e, posteriormente, seu nascimento (Herr *et al.*, 2019). Além do ovo das aves ser um veículo para reprodução, ele também é utilizado como fonte de alimentação para consumo humano. Ele apresenta tamanho e forma diferentes entre as diversas espécies de aves. No entanto, todas possuem as mesmas três partes: gema, albumina e casca, e estas partes são separadas por membranas (Jacob; Miles; Mather, 2000).

Dada a crescente introdução de produtos químicos no mercado, e os potenciais impactos ambientais e de saúde, houve a necessidade de desenvolver métodos confiáveis para avaliar sua toxicidade. Assim, o teste da membrana corioalantóica em ovo de galinha (Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane - HET-CAM) surgiu como uma alternativa eficaz, rápida e econômica. Esse teste é sensível o suficiente para identificar a toxicidade de compostos, além de fornecer informações sobre embriotoxicidade, efeitos teratogênicos e efeitos metabólicos e imunopatológicos (Luepke; Kemper, 1986; Vargas *et al.*, 2007). Sua precisão em detectar produtos

não irritantes faz dele uma excelente alternativa ao uso de coelhos no teste de Draize (De Araujo Lowndes Viera *et al.*, 2022).

O ensaio HET-CAM tem sido amplamente utilizado em diferentes áreas, incluindo o desenvolvimento de cosméticos, como shampoos e cremes para cuidados com a pele, além de aplicações na indústria farmacêutica, onde é utilizado para avaliar atividades anti-inflamatórias, antiangiogênicas, antitumorais e efeitos teratogênicos de novos fármacos (Derouiche; Abdenmour, 2017; Krenn; Paper, 2009; Mussagy *et al.*, 2023; Özturk *et al.*, 2020; Victorelli *et al.*, 2020).

2. REVISÃO DE LITERATURA

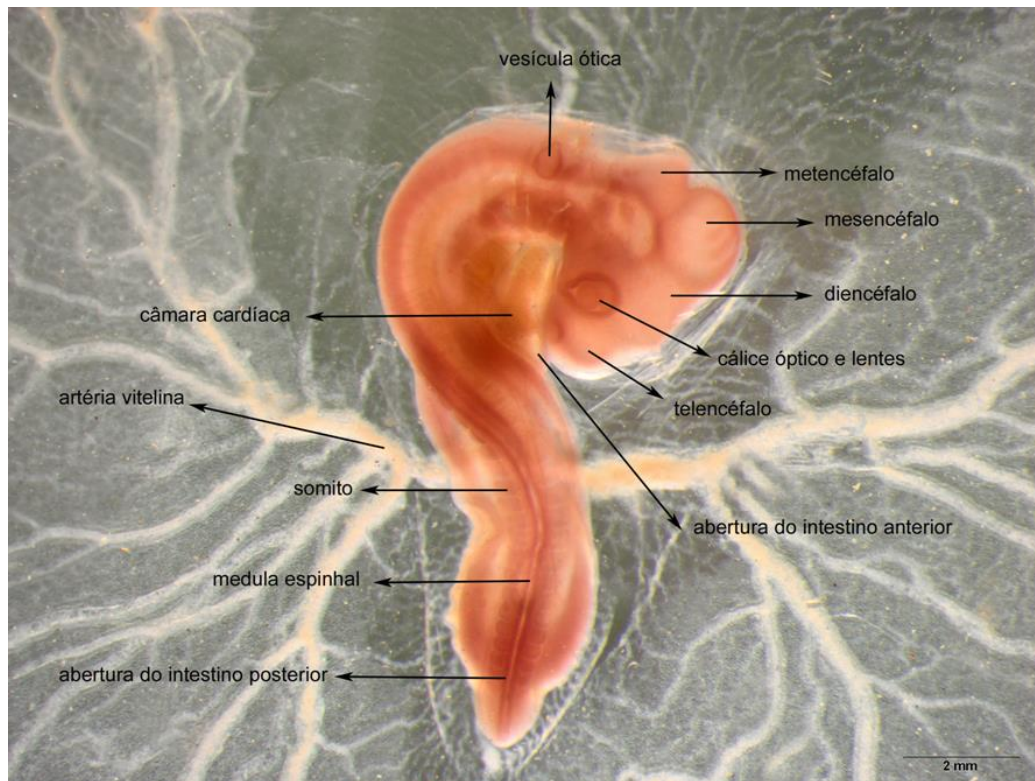
2.1. Estudos alternativos ao uso de animais

Com o intuito de proteger tanto a saúde humana quanto a ambiental, a determinação da toxicidade de substâncias químicas e produtos finalizados se torna um desafio para as agências reguladoras bem como para a comunidade científica, resultando em impactos econômicos e éticos. Com isso, há extrema necessidade por métodos confiáveis que avaliem a toxicidade para identificar, acessar e interpretar as características nocivas destas substâncias. Os testes preditivos para avaliação de toxicidade das substâncias químicas utilizam majoritariamente a experimentação animal como ferramenta principal, e gradativamente tem sido substituída por metodologias sem a necessidade de modelos animais, modelos estes que são satisfatórios para os padrões regulatórios e são aceitáveis, além de financeiramente acessíveis para a sociedade (Bonneau *et al.*, 2022; Fischer; Milton; Wallace, 2020).

2.2. Uso de embriões de aves em experimentos

O embrião das aves auxilia pesquisadores para uma melhor compreensão de questões referentes ao desenvolvimento e biologia celular há mais de dois mil anos. Em 350 Antes de Cristo (A.C.) Aristóteles já descrevia o desenvolvimento embrionário que ocorria dentro do ovo da galinha, mas não houve muitos registros sobre o tópico até o século XIII, quando Albertus Magnus identificou o coração do embrião no terceiro dia de incubação (**FIGURA 1**), e a partir disso mapeou todos os órgãos constituintes até o décimo dia de desenvolvimento embrionário. Apenas no século XVII, o pai da embriologia, Marcello Malpighi, diagramou pela primeira vez a morfogênese microscópica do embrião da galinha, abordando em conjunto uma extensa caracterização de seu sistema cardiovascular (Asai; Bressan; Mikawa, 2021; Vergara; Canto-Soler, 2012; Wolpert, 2004).

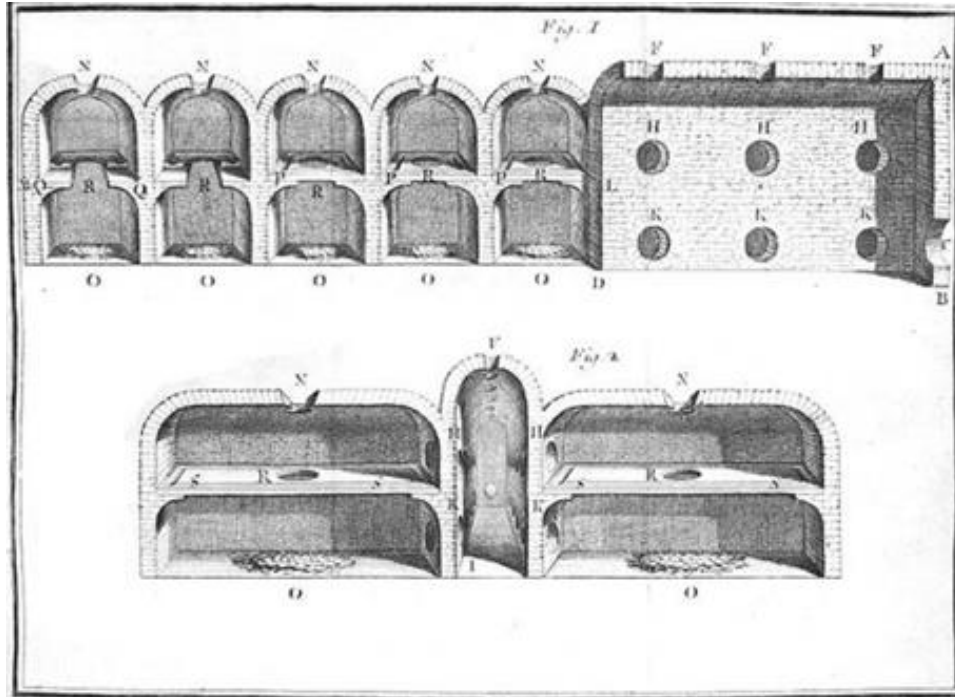
FIGURA 1- Montagem Total de embrião de galinha com 72h de desenvolvimento, as modificações do coração primitivo.



Fonte: (FAMEMA, 2024).

Técnicas de incubação artificial de ovos de galinha datam dos tempos da 18^a dinastia no Egito (1400 A.C) e antes disso, possivelmente na China antiga. Com as considerações de Plínio, Diodorus e cartas assinadas pelo imperador Adriano, é possível encontrar registros dessas técnicas na literatura romana, onde os ovos eram colocados em grandes fornos e posicionados em pontos mais frios ou quentes da estrutura com intuito de regular a temperatura para permitir o desenvolvimento das aves (**FIGURA 2**). Contudo, a incubação artificial de ovos foi esquecida durante a idade média e só voltou a ganhar destaque no século XVIII (Corti & Vogelaar, 2012.; Mason, 1999).

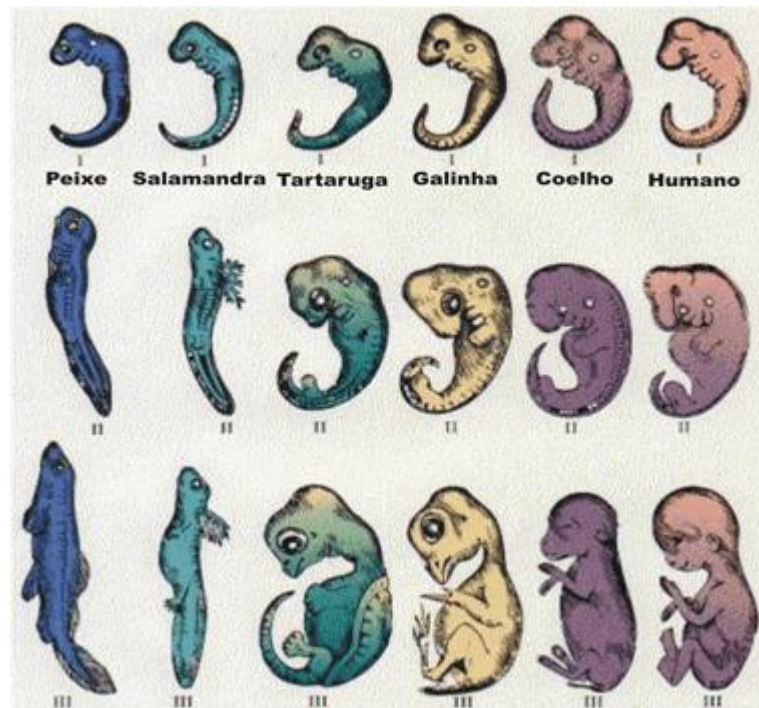
FIGURA 2. Incubadora de ovos egípcios.



Fonte: (Corti; Vogelaar, 2012).

O *Gallus gallus* é considerado um dos modelos animais que têm mais êxito em replicar o desenvolvimento e fisiologia de mamíferos, tendo vantagens significativas para pesquisa devido ao seu rápido desenvolvimento e à fácil acessibilidade para observação e manejo de seus embriões (Wang & White, 2021; Yamagata, 2022). É possível notar a similaridade nos estágios entre os embriões de aves e os embriões das demais espécies animais (**FIGURA 3**), de modo que as etapas de desenvolvimento de gastrulação e neurulação permitem o desenvolvimento de estruturas como a presença de mesoderme e endoderme, notocorda, coração ventral, sistema nervoso dorsal e cauda pós-anal. Essas etapas admitem estudos comparativos entre espécies e a utilização destes embriões em pesquisas científicas (Scott F. Gilbert *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2021; Voiculescu, 2020).

FIGURA 3 - Semelhanças entre embriões e seus estágios evolutivos.



Fonte: (SÓ BIOLOGIA, 2024).

A comparação entre embriões de aves e humanos pode ser realizada até o surgimento de estruturas embrionárias específicas do segundo mês gestacional intrauterino, que tem o início da clivagem 24 horas após a reprodução, enquanto nas aves esse processo ocorre apenas 3 horas após a fecundação. Os ovos fecundados começam a desenvolver estruturas como cérebro, olhos, somitos e componentes do sistema vascular em um período de 72 horas, em paralelo com o desenvolvimento humano, onde essas etapas correspondem à terceira e quarta semana. As espécies começam a se diferenciar com suas especificidades a partir do quarto dia de incubação dos ovos, que equivale ao segundo mês da gestação do ser humano (Silva et al., 2021; “The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, 9e - 1st Edition | Elsevier Shop”)

Após a fecundação do ovo, o oviduto da galinha começa o processo de divisão celular, conhecido como clivagem. Nesse processo, o blastodisco é visível a olho nu. Após a postura do ovo, o epiblasto e o hipoblasto formam um disco bilaminar do embrião. Esses discos posteriormente irão desenvolver o assoalho da cavidade amniótica e o teto da cavidade exocelômica, bem como o embrião e as estruturas extra-embrionárias, como âmnio, cório, alantoide e saco vitelínico, iniciando assim a fase de gastrulação (Gadelha *et al.*, 2021a; Gilbert, 2001; Scott F. Gilbert, 2019; Yamamoto *et al.*, 2018).

2.3. Estruturas extra-embrionárias

Embora o ovo de galinha recém-postado (**FIGURA 4**) contenha a maioria dos recursos necessários para o desenvolvimento embrionário, a ausência de oxigênio e calor adequados pode comprometer esse processo. Dessa forma, poros microscópicos na casca do ovo permitem que o O₂ se disperse do ambiente para dentro do ovo e o calor e CO₂ produzidos pelo embrião dispersem para fora. A ave adulta desempenha o papel fundamental de fornecer calor para o ovo, além de controlar o microclima do ambiente, mas em objetivos voltados para a indústria e pesquisa, as aves são substituídas por incubadoras (Mueller; Burgreen; Tazawa, 2015).

Com estruturas multifuncionais, a casca do ovo possui características defensivas que garantiram o sucesso evolutivo das aves ao longo dos anos. De um modo, a casca deve ser fina o suficiente para que o fluxo de gases seja possível para efetuar a troca gasosa, mas ela também não pode ser fina o suficiente para admitir a entrada de patógenos ou de ter o risco de quebra e lesões. Ainda, ela não deve ser forte o suficiente, visto que dessa forma o pintinho não estará apto para quebrá-la quando alcançar seu total desenvolvimento. Portanto, a espessura da casca e o número, forma e tamanho dos poros definem o período de incubação do ovo (Maina, 2017).

Além de proteção física, a casca do ovo também atua com fornecimento de cálcio para o embrião para mineralização óssea. Ela possui mais de 900 matrizes proteicas de que são responsáveis pela mineralização e regulação de microestruturas, além de proteínas e peptídeos antimicrobianos que contribuem para a proteção do ovo. Algumas dessas proteínas são consideradas determinantes cruciais da textura da casca e suas propriedades mecânicas, porque durante o desenvolvimento embrionário a solubilização da casca ocorre com o objetivo de liberar cálcio para o embrião e, dessa forma, alguns antimicrobianos são liberados dentro do ovo para reforçar suas defesas e protegê-lo contra patógenos externos que ultrapassaram a casca fragilizada (D'Alba; Shawkey, 2015; Moreau *et al.*, 2022).

A primeira membrana que se forma é a do saco vitelino, que é inicialmente avascular, mas ao longo do desenvolvimento do embrião ela se torna o primeiro local de vasculogênese (Burton; Tullett, 1985; Mossman, 1987). A formação do sistema vascular do saco vitelino e sua conexão para a circulação embrionária são cruciais para o desenvolvimento e sobrevivência do embrião porque ela é um órgão multifuncional extraembrionário que é responsável pela absorção de nutrientes, de modo que ela nutre o embrião a partir da absorção da gema e junto com a membrana corioalantóide, atuando nas trocas gasosas (Le Noble *et al.*, 2004; Mortola, 2009; Starck, 2021). Os nutrientes da gema podem ser transferidos diretamente para o intestino do embrião pelo pendúculo vitelínico ou através da membrana do saco vitelino que é altamente vascularizada (Van Der Wagt *et al.*, 2020).

A principal função do saco vitelínico é manter as reservas nutricionais do pintinho; ele consiste em aproximadamente 32% de lipídios, 17% de proteínas, 1% de carboidratos e 50% de água. Este anexo permite o desenvolvimento de vasos e o início da hematopoiese e multiplicação de células tronco. O epitélio de absorção e a rede de capilares farão parte de toda a gema na primeira semana de crescimento embrionário (Kadam *et al.*, 2013).

Dentre esses nutrientes, o embrião também recebe anticorpos maternos como o IgY que estão presentes na gema do ovo. Isso ocorre porque na primeira semana depois que os ovos foram incubados, os embriões não estão desenvolvidos o suficiente para produzir linfócitos B. A transferência de imunoglobulina materna desempenha um papel fundamental na conferência de imunidade passiva aos neonatos. No caso das espécies aviárias, a imunoglobulina Y (IgY) presente no sangue materno é transportada para os pintos recém-nascidos em duas etapas: 1) a IgY é transportada da circulação materna para a gema dos ovócitos em maturação, 2) a IgY depositada na gema é transportada para a circulação do embrião através da membrana do saco vitelino (Okamoto *et al.*, 2024; Ulmer-Franco *et al.*, 2012).

O âmnio, um saco membranoso que contém o líquido amniótico, protege o embrião de danos mecânicos e agentes microbianos (Monteiro, 2017). Uma característica funcionalmente importante da membrana amniótica é sua contratilidade miogênica que move o embrião em suas fases iniciais e evita que ele fique aderido em materiais extraembrionários quando está em crescimento (Starck; Stewart; Blackburn, 2021).

San *et al.* (2005) destacaram que o líquido amniótico é vital para o desenvolvimento dos sistemas musculoesqueléticos, gastrintestinais e respiratórios dos fetos de aves enquanto Hincke *et al.* (2019) pontuaram que a membrana amniótica é a última barreira física antes de atingir o embrião durante a incubação do ovo aviário. A plasticidade dessa membrana é fundamental para apoiar a entrada de água no início do desenvolvimento e no albúmem durante a segunda metade da incubação, período em que há reabsorção direta ou indireta do fluido proveniente do âmnio pelo embrião para que ele tenha um metabolismo mais rápido durante seu desenvolvimento.

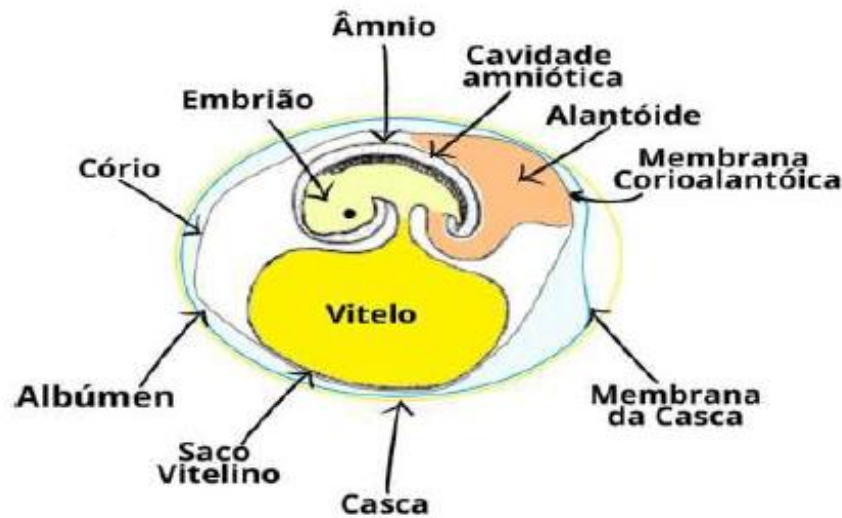
Conforme discutido por (Monteiro, 2017), o alantoide é uma membrana extraembrionária derivada da endoderme, cuja formação é descrita de maneira mais específica por Vanderley e Santana (2019) como originada a partir do divertículo da parede ventral do intestino posterior. Inicialmente, o alantoide assume a forma de um saco e, posteriormente, expande-se entre as paredes do âmnio, envolvendo tanto a cavidade amniótica quanto o saco vitelínico.

O alantoide desempenha diversas funções no ovo, atuando no armazenamento de excreções do embrião, fazendo com que o ácido úrico e outras excreções renais sejam direcionadas para a região da cloaca através do ducto alantoide (Vanderley; Santana, 2019). Ele também atua na função respiratória quando se desenvolve o suficiente para entrar em contato com a casca do ovo e realizar as trocas gasosas e hematopoiese, além transportar cálcio da casca para o embrião auxiliando na formação óssea do mesmo (Epple; Gill; Nibbio, 1992; Jaffredo; Yvernogeu, 2014; Monteiro, 2017).

O cório, localizado logo abaixo da casca, é uma membrana extraembrionária que se une ao alantoide para executar a função de respiração. Ele isola o embrião e interage seletivamente com o ambiente, permitindo que certas substâncias, como nutrientes e/ou oxigênio entrem em contato com o feto. Ele se desenvolve abaixo das membranas da casca e permite a difusão de oxigênio além de proteger o embrião dos danos ambientais devido à sua espessura e resistência mecânica (Scottá *et al.*, 2015).

De acordo com Vanderley e Santana (2019), a membrana do cório é fortemente conectada às membranas da casca, o que permite a mobilização de minerais da casca para a construção do esqueleto. Ao longo da incubação do ovo, esta membrana interage com o alantoide para formar a membrana corioalantóide. Ribatti *et al.* (2010, 2012, 2017, 2021) descobriu que em frangos, o aumento rápido da vesícula alantóica, que ocorre no quarto ao décimo dia de incubação, promove a fusão entre o cório e o alantoide para formar a membrana corioalantóide (Ribatti, Domenico, 2010, 2012, 2017, 2021).

FIGURA 4 - Os anexos embrionários de aves no início de seu desenvolvimento.

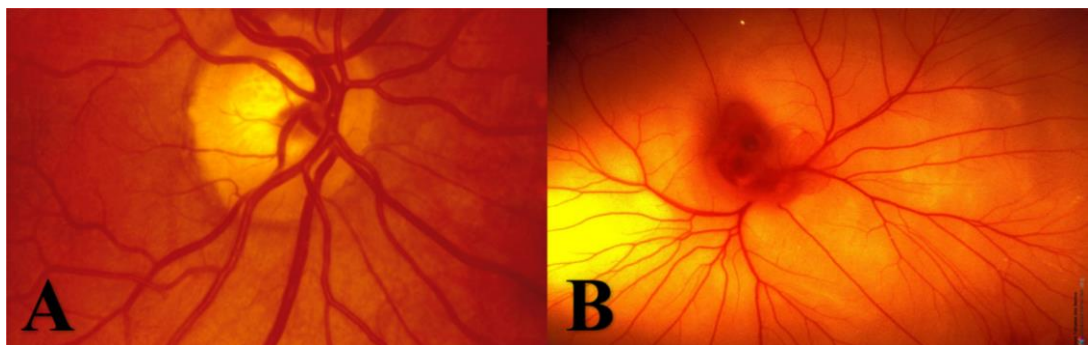


Fonte: (Gadelha et al., 2021).

2.4. Teste da membrana corioalantóica (HET-CAM)

Dentre esses modelos, o teste da membrana corioalantóica em ovo de galinha (HET-CAM) é um método alternativo ao uso de animais válido que é utilizado para definir o potencial de irritação de substâncias químicas. Este é o teste mais utilizado para avaliar a irritação ocular de produtos cosméticos, porque é o único método que consegue simular a fisiologia do olho humano (**FIGURA 5**) com o auxílio de métodos semi-quantitativos com o objetivo de definir o potencial de irritação de um composto químico na membrana corioalantóica por meio da observação dessas estruturas após a aplicação da substância química (De Araujo Lowndes Viera *et al.*, 2022a; Rivero *et al.*, 2021)

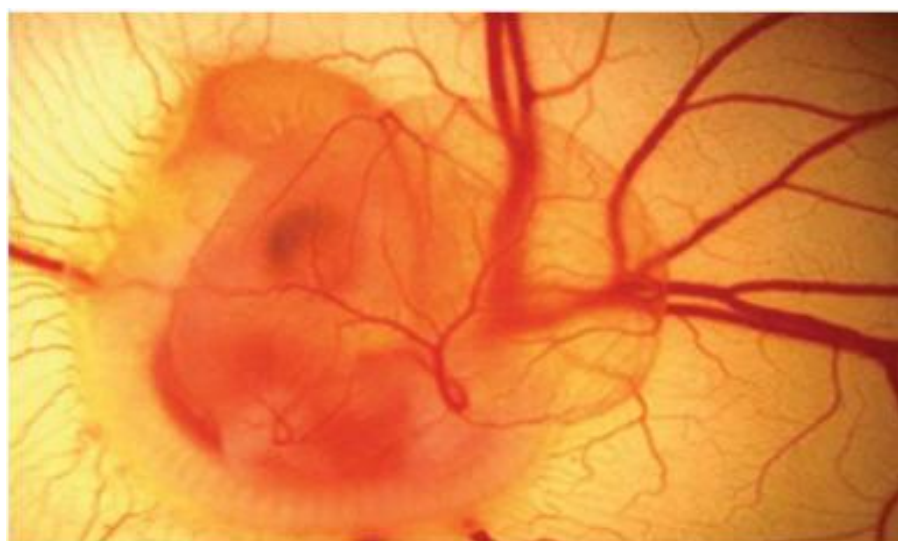
FIGURA 5 - (A) Fundo do olho humano saudável; (B) Embrião de galinha no início do desenvolvimento.



Fonte: (ARTMED360, 2024; CASA DAS CIÊNCIAS, 2013).

Considerada uma simples e altamente vascularizada membrana extraembrionária, a CAM (**FIGURA 6**) é responsável por inúmeras funções durante o desenvolvimento embrionário, sendo uma delas as trocas gasosas (Nowak-Sliwinska; Segura; Iruela-Arispe, 2014). Por ser um modelo de pesquisa de custo baixo e resultados rápidos, ela é utilizada na triagem de diversas amostras farmacológicas em um curto período, além de não haver necessidade de aprovação em comitês éticos para experimentação animal (Ribatti, Domenico, 2017).

FIGURA 6 - Membrana corioalantóica em início de desenvolvimento.



Fonte: (Ribatti, Domenico, 2010).

O método HET-CAM foi primeiramente descrito por Luepke (1985), onde foi definido como um teste de toxicidade rápido, de baixo custo que fornecia informações sobre embriotoxicidade, teratogenicidade, efeitos imunopatológicos e sistêmicos, mas também surge como forma de avaliar o potencial de irritação de substâncias químicas na membrana mucosa do ovo. Ele foi destacado como um modelo intermediário entre os sistemas *in vitro* e *in vivo*, além de não ter conflitos éticos e legais, principalmente envolvendo leis de proteções animais. Luepke também aponta que ovos de galinha da raça Leghorn foram amplamente utilizados em estudos experimentais por conta de sua qualidade, alta reprodutibilidade e pela raça ser conhecida como livre de defeitos hereditários (Luepke, 1985; Luepke; Kemper, 1986).

O ensaio da CAM é um substituto ao teste de Draize, que consiste na aplicação de compostos na pele e olhos de coelhos para avaliar irritação de potenciais medicamentos e produtos cosméticos (Vinardell; Mitjans, 2006). No entanto, além das considerações éticas por conta do bem estar animal, o ensaio também não apresenta resultados satisfatórios para o meio

científico e, portanto, diversos laboratórios iniciaram uma busca por métodos alternativos mais humanizados e com resultados mais encorajadores (Sharpe, 1985). O uso da CAM para tais estudos é de grande interesse científico devido ao fato de o embrião ser considerado um animal apenas após 80% de seu desenvolvimento, com 17 dias de vida, e por conta disso não há necessidade de obter uma aprovação por Comitês de Ética para experimentação em animais (Ribatti, Domenico, 2017). Ademais, a eutanásia dos embriões pode ser realizada por prolongação estendida ao CO₂ (mais que 20 minutos), resfriamento (4°C por 4 horas) ou congelamento (Leary; Johnson, 2020; Winter *et al.*, 2020).

O protocolo original de Luepke (1985) utiliza ovos que são submetidos à ovoluminescência (**FIGURA 7**) com o objetivo de descartar os que apresentam algum tipo de defeito. Ovos que pesam menos de 50 gramas e mais de 60 gramas também devem ser descartados. Atualmente, com as inovações na criação de aves e produções de ovos, o controle de qualidade é majoritariamente realizado pela sua iluminação (ovoscopia) que permite a avaliação de clara, gema, câmara de ar e possíveis anormalidades (Luepke, 1985; Stadelman; Cotterill, 1995). Depois dessa triagem, os ovos são colocados em bandejas dentro de incubadoras com a base voltada para cima e automaticamente rotacionados com uma temperatura média de 37.5 °C. A partir do quinto dia de incubação os ovos passam novamente pela ovoluminescência, com o descarte de embriões não viáveis. No décimo dia de incubação a casca do ovo é raspada ao redor da câmara de ar por uma serra de dentista e após remoção da casca e das membranas internas com muito cuidado, há exposição da CAM. A substância avaliada é aplicada na membrana corioalantóica, dissolvida ou suspensa em um volume de 0,2 ml, mas em casos de materiais sólidos, 0,1 gramas são colocados na CAM e irrigado com 5 ml de água morna após 20 segundos. Neste ensaio são utilizados 4 ovos por grupo e 2 ovos para os controles.

Ao longo do tempo, diversos estudos com HET-CAM foram realizados, tendo algumas modificações do protocolo inicial como os fenômenos avaliados, procedimentos de coleta de dados e as formas de análises dos resultados (Hayashi *et al.*, 2012; ICCVAM Test Method Evaluation Report, 2006; ICCVAM Test Method Evaluation Report, 2010; Luepke, 1985; Luepke & Kemper, 1986; Spielmann, 1995; Spielmann *et al.*, 1991).

O ensaio em HET-CAM teve êxito ao testar diversas formas farmacêuticas voltadas para uso oftálmico, como emulsões e microemulsões, niossomas, géis líquidos e películas de gelificação *in situ*. Mesmo que atualmente não haja testes com capacidade de substituir os ensaios *in vivo*, o HET-CAM, além de não apresentar conflitos éticos e possuir baixo custo, apresenta metodologias simples e consegue simular uma irritação conjuntival em humanos

(Silva *et al.*, 2021). Recentemente, em 20 de março de 2024, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) lançou uma nota informativa CONCEA Nº 01/2024 do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação aborda o uso de embriões, fetos e formas larvais em atividades de ensino e pesquisa científica. A nota determina que projetos que utilizem animais em diferentes estágios de desenvolvimento sejam submetidos às Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs), considerando fatores como estágio de desenvolvimento, capacidade de alimentação independente, percepção de dor e invasividade dos procedimentos. Há um foco especial em projetos que envolvam sentiência em estágios iniciais. O CEUA local da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR) avaliou a Nota Informativa CONCEA Nº 01/2024 e determinou que, conforme a normativa, a necessidade de avaliação de determinados projetos pode ser definida pelo próprio comitê. No caso do ensaio HET-CAM, ficou estabelecido que os embriões serão eutanasiados antes de atingir 50% de seu desenvolvimento, conforme as diretrizes do CONCEA. Assim, esses experimentos não requerem submissão ao CEUA local, uma vez que estão em conformidade com as normas, otimizando o processo de pesquisa sem comprometer a ética.

FIGURA 7 - Ovoluminescência para identificar se ovo está fecundado



Fonte: Próprio autor.

2.5. Processo de Angiogênese

A angiogênese, definida como o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, ocorre ao longo de toda a vida, desde a formação no útero até o envelhecimento (Akbarian; Bertassoni; Tayebi, 2022; TH; JP, 2010). Esse processo é crucial para o desenvolvimento de vertebrados, pois desempenha um papel essencial na fisiologia humana, participando da reprodução, desenvolvimento fetal, cicatrização de ferimentos e

regeneração de tecidos (Chung & Ferrara, 2011; Yoo & Kwon, 2013). Entretanto, um desequilíbrio na angiogênese está diretamente ligado à patogênese de várias doenças, incluindo câncer, psoríase, artrite, obesidade, asma e esclerose. O crescimento anormal de vasos sanguíneos também está associado a condições como isquemia cerebral e cardíaca, neurodegeneração, hipertensão, osteoporose, dificuldades respiratórias, endometriose, cardiomiopatia pós-parto e síndrome da hiperestimulação ovariana (Griffioen; Dudley, 2022; Tahergorabi; Khazaei, 2012).

A angiogênese é regulada por fatores inibidores e estimulantes, com destaque para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores, que controlam a proliferação e migração de células endoteliais para formar novos vasos (Karamysheva, 2008). O VEGF é composto por cinco ligantes (VEGF-A, -B, -C, -D e o fator de crescimento da placenta, PlGF) que se conectam aos receptores de tirosina quinase (VEGFRs) para iniciar o processo angiogênico (Melincovici et al., 2018). Entre os receptores VEGFR 1 e 2, o VEGFR 2 desempenha um papel mais intenso na promoção da angiogênese, com maior atividade das tirosinas quinases, enquanto o VEGF-A se liga tanto ao VEGFR 1 quanto ao VEGFR 2, e o VEGF-B e o PlGF se ligam apenas ao VEGFR 1 (Lecouter et al., 2003; Uemura et al., 2021).

Além de seu papel na promoção do crescimento de vasos tumorais, o VEGF atua como imunossupressor. Ele pode inibir a função das células T, aumentar o recrutamento de células T reguladoras (Tregs) e células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs), além de dificultar a diferenciação e ativação de células dendríticas (DCs) (Yang; Yan; Liu, 2018). Esse conhecimento é essencial para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de modular a angiogênese, sendo necessárias avaliações pré-clínicas apropriadas para entender melhor os mecanismos envolvidos (Duffy; Bouchier-Hayes; Harmey, 2013; Ghalehbandi et al., 2023). O ensaio CAM permite avaliar a angiogênese em diferentes contextos, como tecidos normais, inflamados e tumorais, identificando efeitos pró-angiogênicos e anti-angiogênicos (Ribatti et al., 1996).

A angiogênese também está envolvida em doenças crônicas inflamatórias, como artrite reumatoide e psoríase, além de participar do desenvolvimento de cânceres (J R Jackson et al., 1997; Lee; Hong; Kim, 2021). O método HET-CAM é amplamente utilizado na triagem de potenciais fármacos anti-inflamatórios, auxiliando na avaliação de efeitos antiangiogênicos e anti-inflamatórios por meio de sistemas semi-quantitativos de pontuação (Öztürk et al., 2020).

Além das preocupações éticas, a substituição de animais em ensaios se deve à necessidade de testar um grande número de substâncias, como aditivos alimentares e materiais de embalagens. Embora a cultura celular 2D e a modelagem *in silico* tenham sido usadas para

suprir essa demanda, esses sistemas não conseguem refletir completamente as atividades metabólicas, fazendo com que métodos alternativos desempenhem um papel intermediário entre ensaios celulares e pré-clínicos (Sandner *et al.*, 2022).

2.6. Chalcona

A chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona) é uma cetona aromática que forma o núcleo central de diversos compostos biológicos significativos. Elas são os precursores de flavonoides e isoflavonóides, compostos conhecidos por serem fartos em inúmeras plantas e devido às suas largas atividades biológicas que tem chamado atenção para potenciais clínicos contra doenças e atividades antitumorais (Ouyang *et al.*, 2021; Rammohan *et al.*, 2020). Dentre os abundantes mecanismos de ação desta molécula, foram documentados: indução de apoptose, autofagia e outros tipos de mortes celulares; alterações em ciclos celulares e modulação de sinalizações de diversos caminhos associados à morte e vida celular (Michalkova *et al.*, 2021).

As chalconas também têm sido muito descritas na literatura por conta de suas atividades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e anticâncer, e dessa forma, uma avaliação melhor detalhada das atividades desta molécula e seus derivados, bem como mecanismos moleculares e atividades farmacológicas devem ser realizadas (Dhaliwal *et al.*, 2022). Seus derivados são considerados valiosos graças à sua porção cetoetilênica CO-CH=CH- e pela presença de um grupo carbonil α,β -insaturado que possui um grande espectro de propriedades farmacológicas antiproliferativas, antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antileishmania e antimalarial (Elknazi *et al.*, 2022).

Com a procura de novas moléculas protótipo, houve a necessidade de investir no desenvolvimento de novos fármacos que tivessem uma maior eficácia e menores efeitos adversos (Rebello, 2005). A chalcona, continua sendo objeto de estudo pelos pesquisadores atuais devido à sua química simples, facilidade para sua síntese e uma grande variedade de atividades biológicas muito promissoras.

As chalconas e seus derivados podem ser sintetizados através de uma reação de condensação de Claisen-Schmidt em meio básico contendo hidróxido de sódio. A literatura aborda o emprego de três estratégias que se destacam para o efeito anticâncer das chalconas: a manipulação de ambos os anéis de arilo, substituindo esses anéis por heteroaril, hibridização molecular através de conjugações scaffolds interessantes farmacologicamente que possam aprimorar as atividades anticâncer; substituição dos metoxis em ambos os anéis de arilo (A e B, Figura 2) das chalconas, porque dependendo da posição que esses anéis se encontram pode haver uma influência anticâncer, além de outras atividades. Os anéis heterocíclicos tantos nos

anéis A e B das chalconas também podem influenciar atividade anticâncer. As chalconas híbridas, formuladas por chalconas ligadas quimicamente a outros scaffolds anticâncer como pirrol[2,1-c] [1,4] benzodiazepínicos, benzotiazóis e imidazolonas têm demonstrado ótimas atividades farmacológicas (Karthkeyan *et al.*, 2014). Muitas chalconas naturais e sintéticas apresentaram interessante atividade anticâncer graças ao seu potencial inibitório contra vários alvos, incluindo ABCG2/P-gp/BCRP, aromatase, proteassoma e tubulina (Mahapatra; Bharti; Asati, 2015; Moreira *et al.*, 2021).

2.7. Derivados de chalcona: Lapdesf-JL22

Entre os quimiotipos de origem natural, as chalconas destacam-se por seus amplos efeitos pleiotrópicos descritos na literatura (Zhuang *et al.*, 2017). Especificamente, chalconas que possuem ácido borônico em sua estrutura têm sido relatadas por apresentarem atividade inibitória contra diferentes linhagens de câncer de mama (Achanta *et al.*, 2006). O ácido borônico, caracterizado por um átomo de boro ligado a duas hidroxilas, possui a capacidade de formar ligações covalentes reversíveis com resíduos de treoninas e serinas, o que pode favorecer sua interação com o sítio ativo de proteínas-alvo (Diaz *et al.*, 2016). Diversos fármacos contendo ácido borônico, como bortezomibe e ixazomibe, já foram aprovados pelo Food and Drug Administration para o tratamento de mieloma múltiplo.

Nesse contexto, os derivados de chalconas que incorporam ácido borônico em sua estrutura apresentam um potencial significativo como inibidores de diferentes tipos de câncer, além de abrir caminho para a investigação detalhada de seus mecanismos de ação, ainda não completamente elucidados. Recentemente, o grupo de pesquisa Lapdesf (UNESP, Araraquara-SP) desenvolveu uma série de chalconas derivadas, observando-se um efeito antitumoral promissor contra linhagens de carcinoma de células escamosas, como SCC 25. Os compostos D1, D3OH, D3POH e D3POCH3 apresentaram valores de IC₅₀ promissores para SCC-25, sendo 139 µM, 53,28 µM, 105,2 µM e 33,8 µM, respectivamente (Lopes, 2024).

No entanto, os efeitos dessa chalcona ainda não foram avaliados em modelos *in ovo* (xenográficos) ou *in vivo* (indução química). Assim, este projeto propõe investigar os efeitos dos derivados de chalcona em modelos alternativos e complementares de carcinoma de células escamosas, buscando ampliar o conhecimento sobre seu potencial terapêutico e mecanismos de ação.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Este trabalho visa avaliar *in vitro* (*in ovo*) a biocompatibilidade, atividade antiangiogênica e anti-inflamatória de novas chalconas em modelo alternativo ao uso de animais, o HET-CAM.

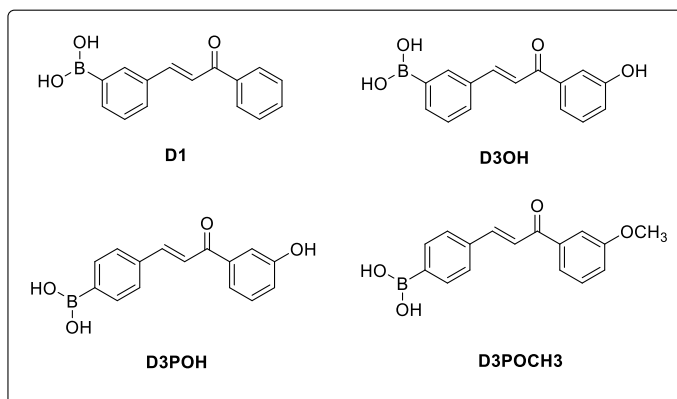
3.2 Objetivos específicos

- Avaliação de biocompatibilidade *in vitro* (*in ovo*)
- Quantificação de vasos para avaliação de angiogênese *in vitro* (*in ovo*)
- Avaliação do efeito anti-inflamatório *in vitro* (*in ovo*) do derivado de chalcona mais promissor.

4. METODOLOGIA

Neste trabalho, foram avaliadas quatro chalconas (D1, D3OH, D3POH e D3POCH3), com as seguintes estruturas químicas (**FIGURA 8**):

FIGURA 8 - Chalconas avaliadas no trabalho.



Fonte: Próprio autor.

4.1. Estudo de biocompatibilidade em CAM

Ovos de galinha da raça Leghorn originados da granja Globoaves Agro Avícola Ltda foram higienizados com álcool 70% e colocados em posição horizontal em incubadoras automáticas Eclopinto sob temperatura controlada de 37.5 (a temperatura da incubadora tem variação de 35 a 41 °C) e umidade relativa entre 55% e 65% por 6 dias. Durante esse período, ovos não viáveis foram descartados. No quarto dia de desenvolvimento embrionário, a membrana externa foi descolada da casca através da câmara de ar e uma janela cirúrgica foi feita no ovo para permitir a visualização do embrião e seus vasos em desenvolvimento. Após o procedimento, a janela foi coberta com fita parafilm com o intuito de proteger o embrião de agentes externos e contaminação.

No sexto dia de desenvolvimento embrionário, os ovos foram separados em 8 grupos com n = seis, sendo utilizados três ovos para avaliar o controle positivo NaOH 0.1 M; três ovos para o controle negativo NaCl 0.9%; três ovos para avaliar o grupo veículo DMSO 0.6% e três ovos para avaliar cada uma das cinco moléculas derivadas de chalconas: D₃OH, D₃COPH₃, D₉, D₁ e D₃OCH₃. Para realizar a avaliação, uma micropipeta foi utilizada para aplicar 300 µL de cada composto em uma região vascularizada da CAM e seus efeitos foram observados por 300 segundos (s). O escore de irritação registra características como lise vascular, hemorragia e coagulação, que foram anotadas em segundos de acordo com a fórmula (BATISTA-DUHARTE *et al.*, 2016):

$$\text{Escore de Irritação} = \left[(301 - H) \times \frac{5}{300} \right] + \left[(301 - L) \times \frac{7}{300} \right] + \left[(301 - C) \times \frac{9}{300} \right]$$

Onde:

H: Tempo de início da hemorragia

L: Tempo de início da lise

C: Tempo de início da coagulação

Sendo assim, os dados resultantes definidos como 0-0.9 = não irritante; 1-4.9 = levemente irritante; 5-8.9 = moderadamente irritante; 9-21 = fortemente irritante. A taxa de sobrevivência dos embriões também é avaliada por um período de 10 minutos após a aplicação das substâncias (Mussagy et al., 2023, Kalweit et al., 1990). Além disso, o escore semi-quantitativo do HET-CAM também foi avaliado, onde (-) correspondendo à ausência de irritação; (+) correspondendo à irritação leve; (++) correspondendo à uma irritação moderada e (+++) correspondendo à uma irritação severa. Após a administração dos compostos, a taxa de sobrevivência dos embriões (embriotoxicidade) foi monitorada por 10 minutos.

4.2. Estudo de atividade antiangiogênica em CAM

Ovos de galinha fertilizados (Leghorn) foram limpos e desinfetados com uma solução de etanol a 70% e incubados horizontalmente a 37 °C (a temperatura da incubadora tem variação de 35 a 41 °C) com 70% de umidade por três dias. No quarto dia de desenvolvimento embrionário, a janela cirúrgica descrita na metodologia anterior foi realizada para visualização do interior do ovo. As janelas dos ovos foram cobertas com fita plástica (parafilm) para evitar contaminação e os ovos foram incubados sob as condições descritas inicialmente. Os vasos sanguíneos subdesenvolvidos formados nos primeiros quatro dias de desenvolvimento crescem muito rapidamente devido à proliferação capilar; portanto, os compostos foram aplicados no quarto dia de desenvolvimento embrionário. Para uma melhor análise da atividade antiangiogênica na CAM, os ovos foram abertos e fotografados com um estereoscópio 48 horas após a aplicação dos compostos, no sexto dia de desenvolvimento embrionário, sendo avaliados 6 grupos com n = 6. Foram testados: NaCl como controle negativo, 5-FU (0.2 mg/ml) como controle positivo e as moléculas derivadas de chalcona D3OH, D3COPH3, D9 e D1 com a aplicação de volume de 300 µL de cada amostra (Carvalho *et al.*, 2024).

4.3. Estudo de atividade anti-inflamatória em CAM

Ovos de galinha embrionados serão incubados por 72 horas (3 dias de vida) em uma temperatura de 36.5 °C (a temperatura da incubadora tem variação de 35 a 41 °C) e umidade relativa de 80% serão posicionados em uma posição horizontal e rotacionados diversas vezes. Os ovos terão de 10 a 15 ml de albumina retirados para que seja realizada uma janela cirúrgica que será coberta com fita plástica (parafilme) e os ovos retornem para as circunstâncias de incubação descritas anteriormente por mais 72 horas (6 dias de vida).

Pellets de agarose (pellet/ovo, n = 6) serão colocados nas CAMs junto com os controles positivos de sulfato dodecil de sódio (SDS), diclofenaco, hidrocortizona e o derivado de chalcona selecionado em uma concentração de 50 µg/pellet. Após um dia (7 dias de vida), os ovos serão avaliados por um estereoscópio e scores de inflamação serão definidos pela inibição em porcentagem do granuloma ou lesão causada, sendo: ≤ 40 = Sem efeito anti-inflamatório; 40–55 = efeito anti-inflamatório incerto; 55–70 = efeito anti-inflamatório fraco; 70–85 = efeito anti-inflamatório bom; > 85 = efeito anti-inflamatório forte (Burgermeister *et al.*, 2002; Marchesan *et al.*, 1998; Öztürk; Kiyan, 2020). O efeito anti-inflamatório também serão avaliados pelo sistema de pontuação representado na **TABELA 1** (Öztürk *et al.*, 2020).

TABELA 1 - Sistema de pontuação semi-quantitativa do efeito anti-inflamatório em CAM.

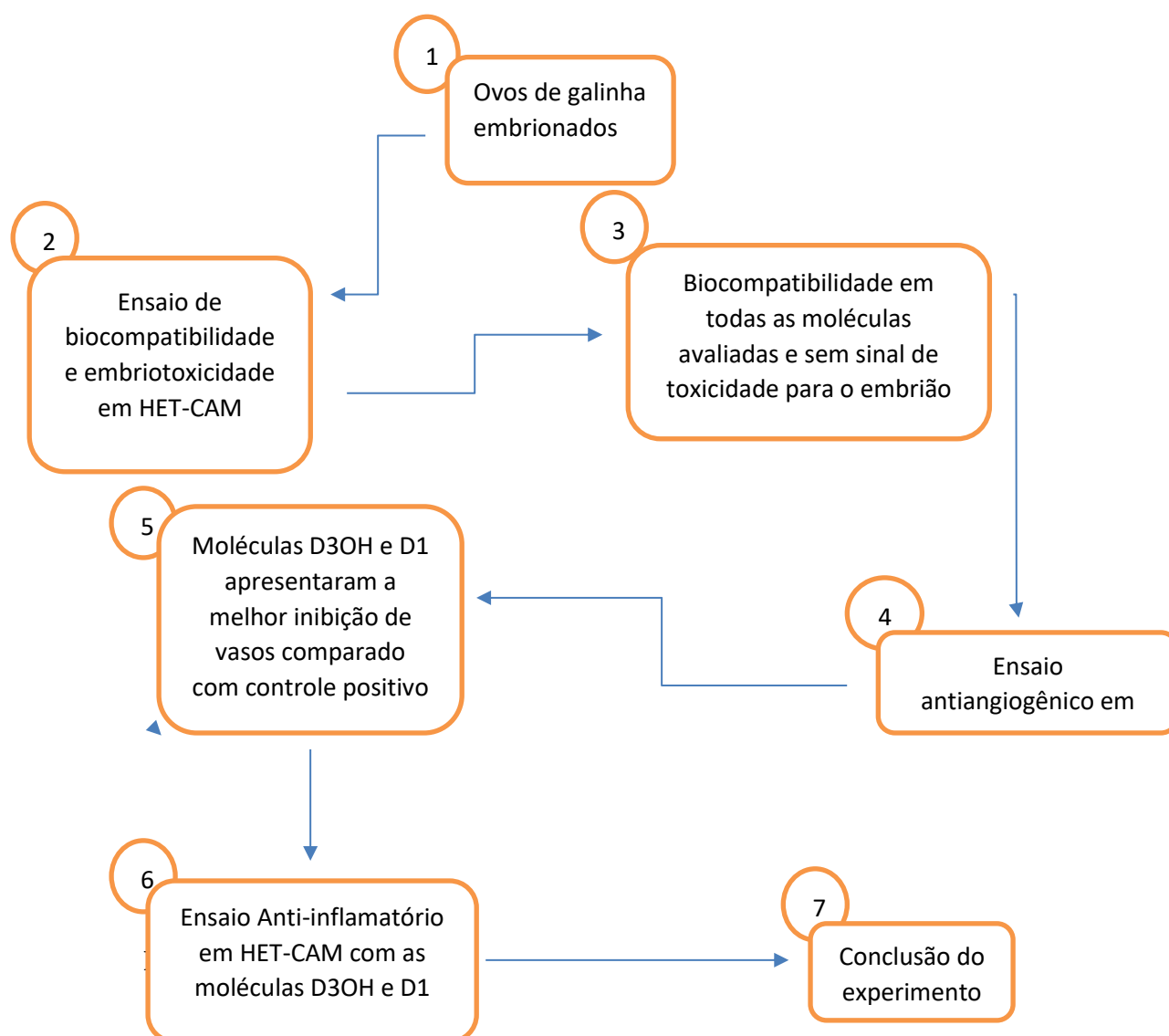
<i>Categoria</i>	<i>Tipo</i>	<i>Efeitos observados na CAM após tratamento</i>
1	Irritado	O granuloma está fortemente vascularizado. Uma rede em forma de estrela se desenvolve ao redor do granuloma
	Levemente irritado	O granuloma está levemente vascularizado. Uma rede fina em forma de estrela se desenvolve ao redor do granuloma
	Levemente normalizado	O granuloma é menor que os definidos nas categorias 1 e 2 e levemente vascularizado
	Normalizado	Sem granulomas ou percepção de resquício cicatricial. A rede vascularizada está normal como o controle negativo

Fonte: (Öztürk *et al.*, 2020).

4.4. Análises estatísticas

Previamente foram avaliadas a normalidade de todas as variáveis quantitativas possíveis por meio do teste de ANOVA e *Tukey* com o intuito de determinar a utilização ou não de testes paramétricos. O nível de significância de 0,05 foi adotado para todos os testes estatísticos. No experimento de biocompatibilidade, foram realizadas análises de sobrevida de Kaplan-Meier. Também foram efetuadas análises de cálculo de potência a posteriori para aquelas variáveis em que os testes estatísticos não encontrarem diferenças significativas. Os resultados foram analisados no programa estatístico *GraphPad Prism*® versão 8.1.0. A **FIGURA 9** representa o plano (fluxograma) deste trabalho.

FIGURA 9. Fluxograma de atividades.



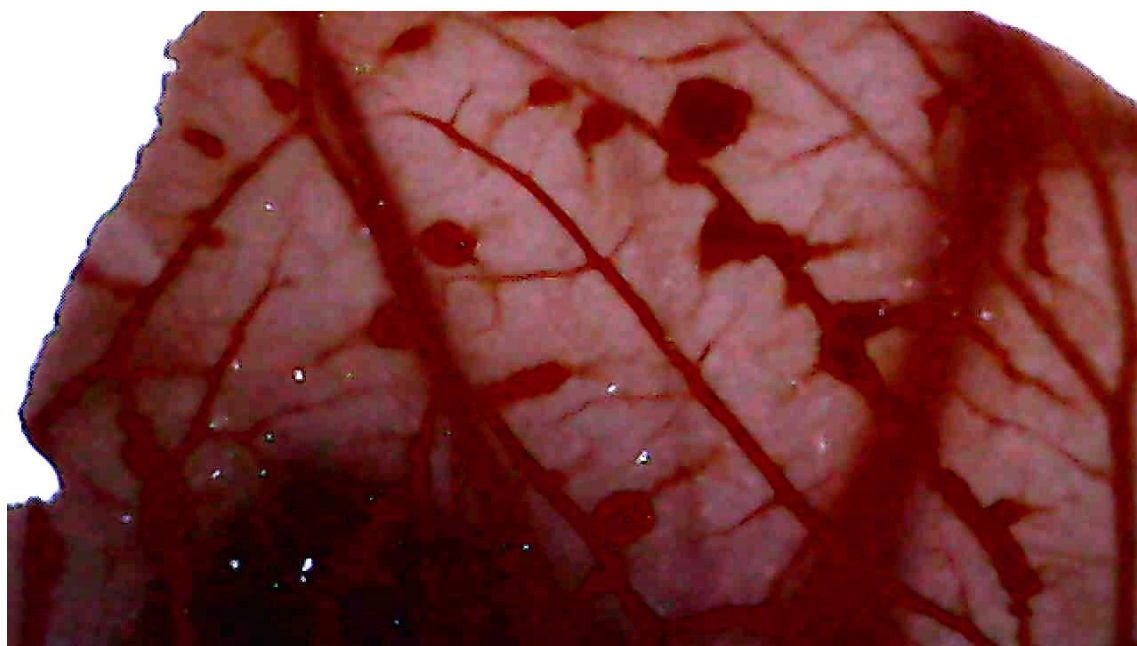
Fonte: Próprio Autor

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo de biocompatibilidade em CAM

Após a aplicação do composto, a CAM, os vasos sanguíneos e albumina são examinados com intuito de identificar efeitos irritantes como hiperemia, hemorragia e coagulação (**FIGURA 10**), sendo avaliados 30, 150 e 300 segundos após o tratamento. Os valores que marcam os tempos em que esses fenômenos aconteceram são somados para obter um único valor que indica o potencial de irritação da substância testada com uma escala de valor máximo 21. A hiperemia ocorre quando capilares que antes não eram perceptíveis passam a ter visibilidade após a adição da substância, de modo que os capilares que eram visíveis desde o início começam a ficar mais avermelhados. Em paralelo, a hemorragia ocorre quando há liberação de sangue dos vasos e capilares, podendo aparentar diversas formas, dando ênfase para o formato de “couve-flor”, enquanto a coagulação ou trombose ocorre quando o fluxo sanguíneo dos vasos é rompido e resulta em uma aparência segmentada (Delgado *et al.*, 2023).

FIGURA 10 - Reação irritante em região vascularizada, sendo observados pontos hemorrágicos e coagulação após aplicação do composto.



Fonte: Próprio autor.

Na utilização dos grupos controles positivos nestes ensaios, a solução de hidróxido de sódio (NaOH) e sódio dodecil sulfato (SDS) são consideradas fortemente irritantes, podendo causar hemorragia e vasoconstrição intensa com potenciais de irritação 13,5 e 14,3, respectivamente (Vinardell; Mitjans, 2006). O sódio lauril sulfato 1% também é considerado

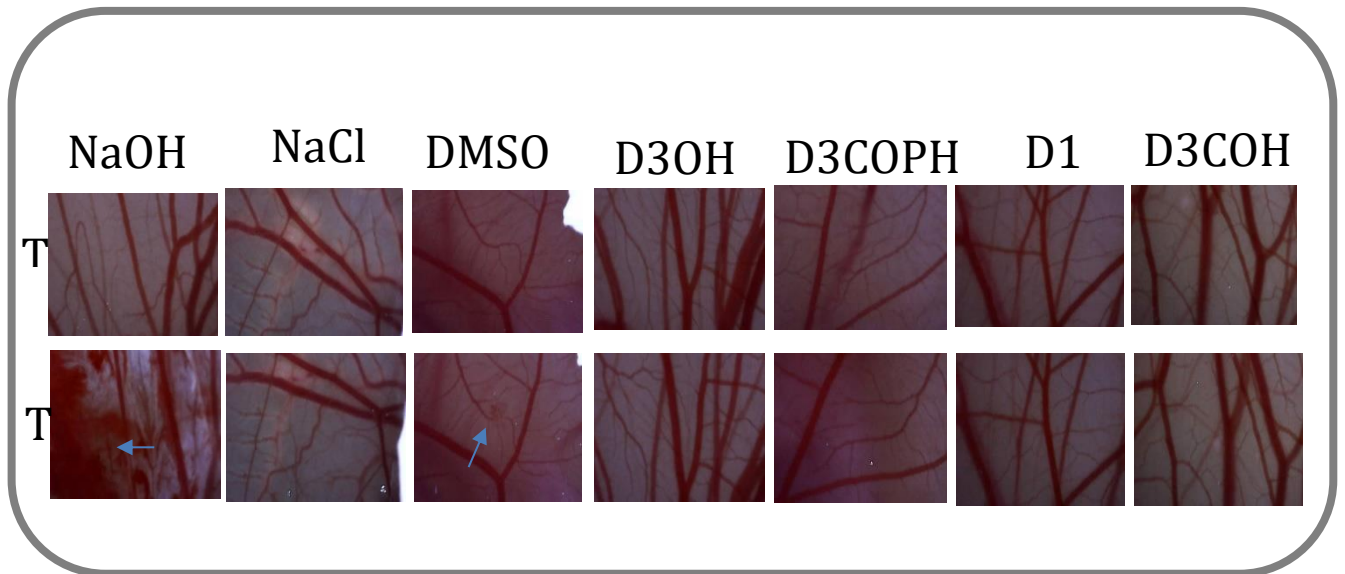
um composto aceitável para controle positivo por indicar uma irritação extrema na região vascularizada da CAM (Carneiro *et al.*, 2022; Cazedey *et al.*, 2009).

Após a aplicação de 300 µL de NaOH 0,1 M na CAM, os resultados obtidos demonstraram a presença de lise vascular seguido de hemorragia severa e, posterior, coagulação dos vasos (**FIGURA 11**), definindo a solução como irritante severo para os tecidos. Em paralelo, após a aplicação de 300 µL de NaCl 0,9% na região vascularizada da CAM, características de irritação não foram observadas durante os 300 segundos de avaliação. As aplicações de 300 µL das moléculas D3OH, D3COPH3, D1 e D3OCH3 apresentaram resultado similar ao grupo controle negativo ($p < 0,0001$), com ausência de lise vascular, hemorragia e coagulação dos vasos (**FIGURA 11, QUADRO 1**). Apenas o grupo veículo DMSO 0,6% apresentou irritação moderada com lise vascular e hemorragia de pequenos vasos, entretanto, comparado ao grupo controle negativo, também houve significância estatística ($p < 0,0001$) (**FIGURA 12**). Quanto às taxas de sobrevivência dos embriões após a aplicação dos compostos, o grupo tratado com NaOH 0,1 M apresentou quatro embriões vivos de um total de seis, enquanto os grupos tratados com NaCl 0,9%, veículo DMSO 0,6% e os derivados de chalconas mantiveram todos os embriões vivos (**FIGURA 13**).

No experimento HET-CAM, os resultados mostraram uma clara distinção entre os efeitos irritantes do DMSO a 0,6% e das chalconas diluídas nesse mesmo solvente. O DMSO sozinho demonstrou um nível considerável de irritação, o que é consistente com sua conhecida capacidade de aumentar a permeabilidade das membranas celulares, facilitando a penetração de substâncias, mas também podendo causar danos aos tecidos em concentrações mais altas. Esse efeito pode ser exacerbado pelo fato de que o DMSO, mesmo em concentrações moderadas como 0,6%, pode ser irritante para os vasos sanguíneos e tecidos delicados testados no ensaio HET-CAM.

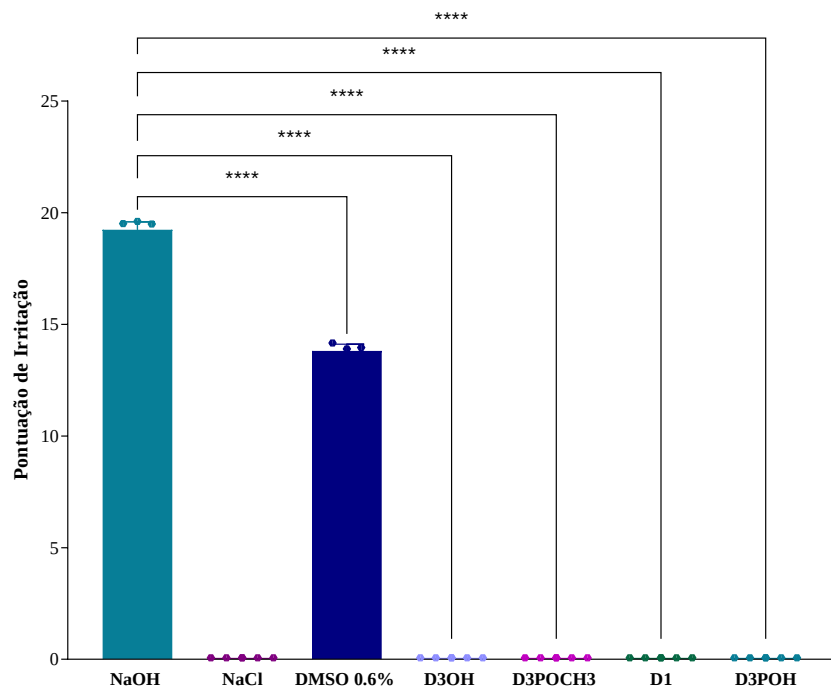
Por outro lado, as chalconas diluídas no DMSO não apresentaram o mesmo nível de irritação. Isso pode ser atribuído às suas propriedades bioativas, como anti-inflamatórias, antioxidantes e estabilizadoras de membranas. As chalconas possuem estruturas conjugadas que podem interagir com as células de forma a reduzir a permeabilidade ou modular a resposta inflamatória. Dessa forma, essas moléculas podem neutralizar ou mitigar o efeito irritante que o DMSO teria sozinho, promovendo uma proteção adicional aos tecidos. Além disso, as chalconas podem estar sequestrando espécies reativas ou modulando a interação do DMSO com as membranas celulares, o que contribui para a ausência de irritação observada nos testes.

FIGURA 11 - Imagens das reações da membrana corioalantóica (CAM) no tempo de 0 segundos (sem reação) e o tempo de 300 segundos.

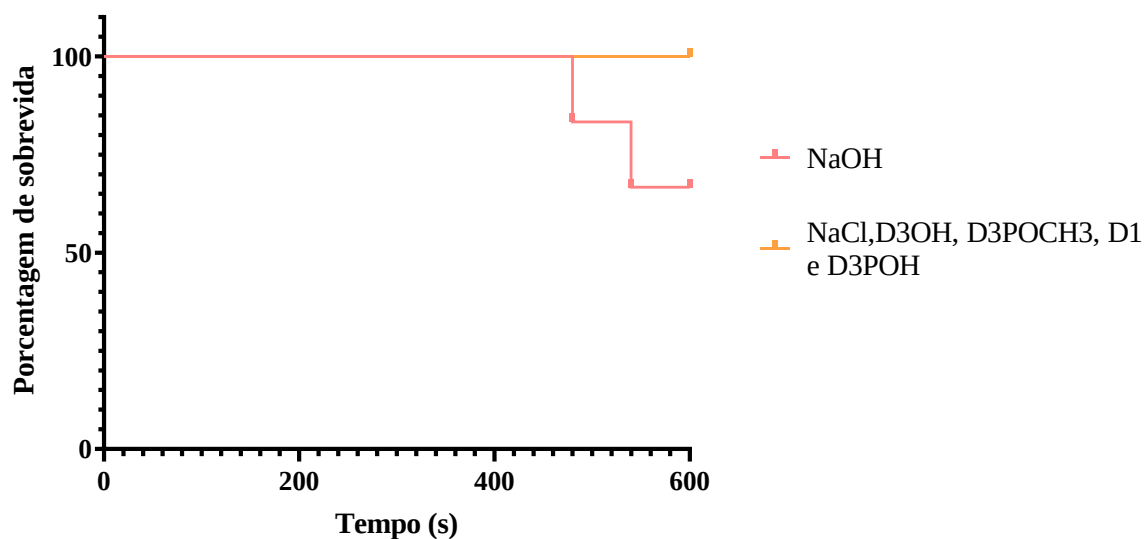


Fonte: Próprio autor.

FIGURA 12 - Resultados do ensaio de biocompatibilidade *in vitro* (in ovo) em HET-CAM e análise estatística.



Fonte: Próprio autor.

FIGURA 13 - Percentual de sobrevivência durante o experimento no tempo de 10 minutos.

Fonte: Próprio autor.

QUADRO 1 - HET-CAM Escore. (-) Sem reação, ausência de hemorragia, lise vascular e coagulação durante 300 segundos; (+) Reação moderada, hemorragia, lise vascular e coagulação discreta durante 300 segundos; (++) Reação moderada, hemorragia, lise vascular e coagulação moderada durante 300 segundos; (+++) Reação severa, hemorragia, lise vascular e coagulação severa durante 300 segundos.

HET-CAM SCORE	
NaOH	+++
DMSO 0.6%	+
D3OH	-
D3POCH3	-
D1	-
D3POH	-
5-FU	-

Fonte: Próprio autor.

5.2. Estudo de atividade antiangiogênica em CAM

A CAM é uma membrana extraembrionária que funciona como um órgão de troca gasosa entre o embrião e o ambiente. Ela possui muitos vasos sanguíneos com uma densa rede capilar e, como está situada sobre o embrião em desenvolvimento, é facilmente acessível para intervenções experimentais. O ensaio CAM tem sido tradicionalmente utilizado para testar respostas pró e antiangiogênicas a medicamentos, além de estudar muitos aspectos da angiogênese tumoral. Os derivados de chalcona possuem atividade antiangiogênica devido à sua alta afinidade de ligação ao VEGF. Esse fator proteico solúvel é o principal regulador da angiogênese fisiológica e patológica, especialmente aquela associada ao microambiente tumoral (Lemes *et al.*, 2018; Pilatova *et al.*, 2010).

Para avaliar a atividade antiangiogênica dos derivados de chalcona, o processo de desenvolvimento de novos vasos foi observado através do modelo HET-CAM. Para o desenvolvimento do estudo, uma análise morfológica foi realizada primeiramente após 48 horas da aplicação da amostra. Imagens de microscopia estereoscópica *in ovo* foram obtidas após a incubação com as diferentes amostras de D3OH, D3COPH3, D9, D1, 5-FU e NaCl 0.9%. Através da análise qualitativa das imagens (**FIGURA 14**), foi possível observar que os tratamentos com os derivados de chalcona D3OH, D3POCH3, D1 e D3OCH3 e 5-FU mostraram uma redução no número de vasos quando comparados ao grupo de controle (NaCl 0.9%), tendo o composto D1 o maior potencial antiangiogênico, apresentando a metade do número de vasos que contém no grupo controle negativo.

5.3. Comparação entre NaCl (controle negativo) e os compostos

Quando o controle negativo é comparado com os outros compostos é possível perceber alguns pontos que os diferenciam de forma que o grupo tratado com NaCl apresentou uma média de 70,67 vasos sanguíneos, enquanto o grupo tratado com D3OH teve 40,00 vasos. A diferença de 30,67 vasos foi altamente significativa ($p < 0.0001$), sugerindo que o composto D3OH tem uma forte atividade antiangiogênica em relação ao controle negativo. Em contraste com o primeiro composto testado, O NaCl apresentou 70,67 vasos, enquanto o D3POCH3 inibiu o número de vasos para 55,00, resultando em uma diferença de 15,67 vasos. Essa diferença foi significativa ($p = 0,0032$), indicando que o D3POCH3 também tem atividade antiangiogênica, embora sua eficácia seja inferior a outros compostos.

O composto D1 apresentou uma grande diferença quando comparado com o NaCl, com uma diferença de 34,83 vasos, altamente significativa ($p < 0,0001$). O composto D1 demonstrou forte atividade antiangiogênica (35,83 vasos) em relação ao controle negativo (70,67 vasos). E

possuindo uma atividade antiangiogênica similar ao grupo D1, O NaCl apresentou 70,67 vasos, enquanto o composto D3POH teve uma média de 47,50 vasos. A diferença de 23,17 vasos foi altamente significativa ($p < 0,0001$), o que mostra que o D3POH possui boa atividade antiangiogênica comparada ao controle negativo.

Quando os controles negativo e positivo são comparados, nota-se que houve uma diferença de 33,17 vasos ($p < 0,0001$) entre o NaCl (70,67 vasos) e o 5-FU (37,50 vasos). Como esperado, o controle positivo demonstrou alta eficácia antiangiogênica em comparação com o controle negativo (**FIGURA 15**).

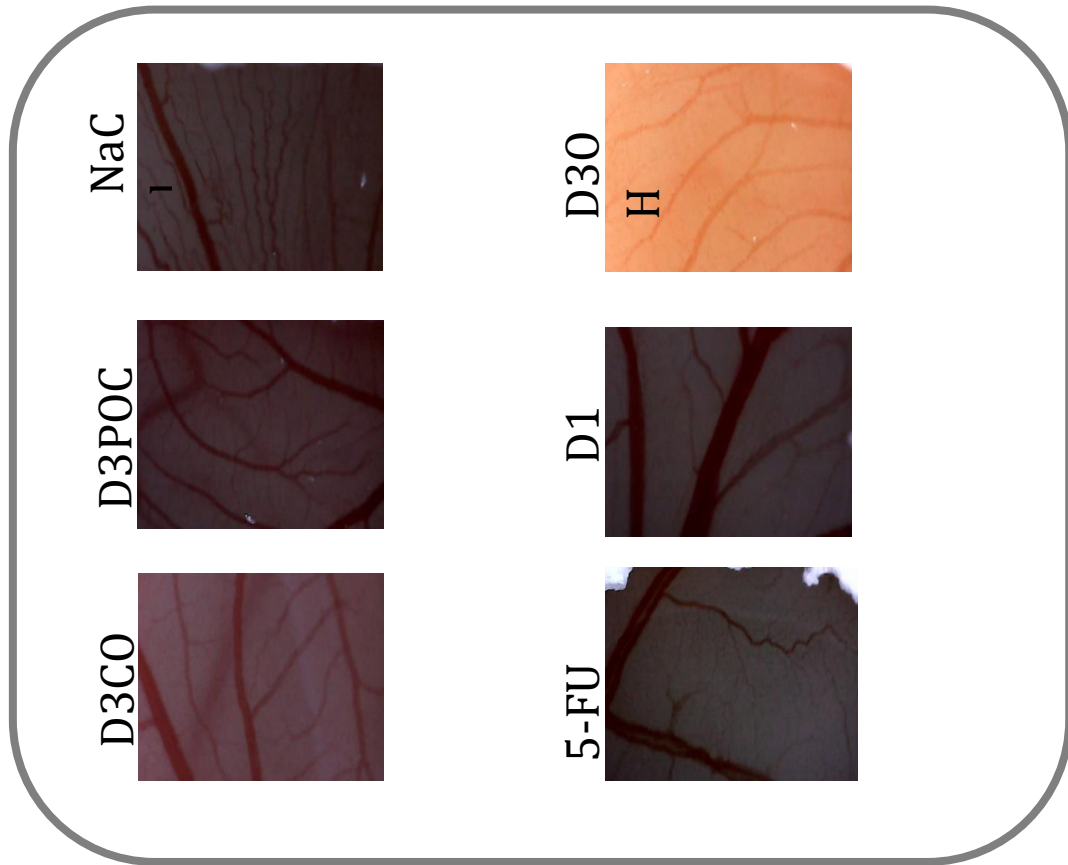
5.4. Comparação entre 5-FU (controle positivo) e os compostos

O 5-FU realizou a inibição da angiogênese para 37,50 vasos, enquanto o D3OH teve uma média de 40,00 vasos. A diferença de 2,50 vasos entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p = 0,9849$), sugerindo que D3OH possui uma atividade antiangiogênica semelhante à do controle positivo 5-FU. O composto D3POCH3 teve uma atividade de inibição para 55,00 vasos, com uma diferença de 17,50 vasos do controle positivo (37,50 vasos). Essa diferença foi significativa ($p = 0,0009$), indicando que D3POCH3 tem uma eficácia antiangiogênica menor em relação ao controle positivo 5-FU.

O D1 reduziu o número de vasos para 35,83. A diferença de 1,67 vasos não foi significativa ($p = 0,9977$), sugerindo que D1 possui uma eficácia antiangiogênica muito semelhante ao 5-FU, enquanto o D3POH apresentou 47,50 vasos, com uma diferença de 10,00 vasos. Embora o D3POH tenha apresentado um número maior de vasos em comparação ao 5-FU, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,1180$), o que indica que ambos os compostos têm eficácia semelhante.

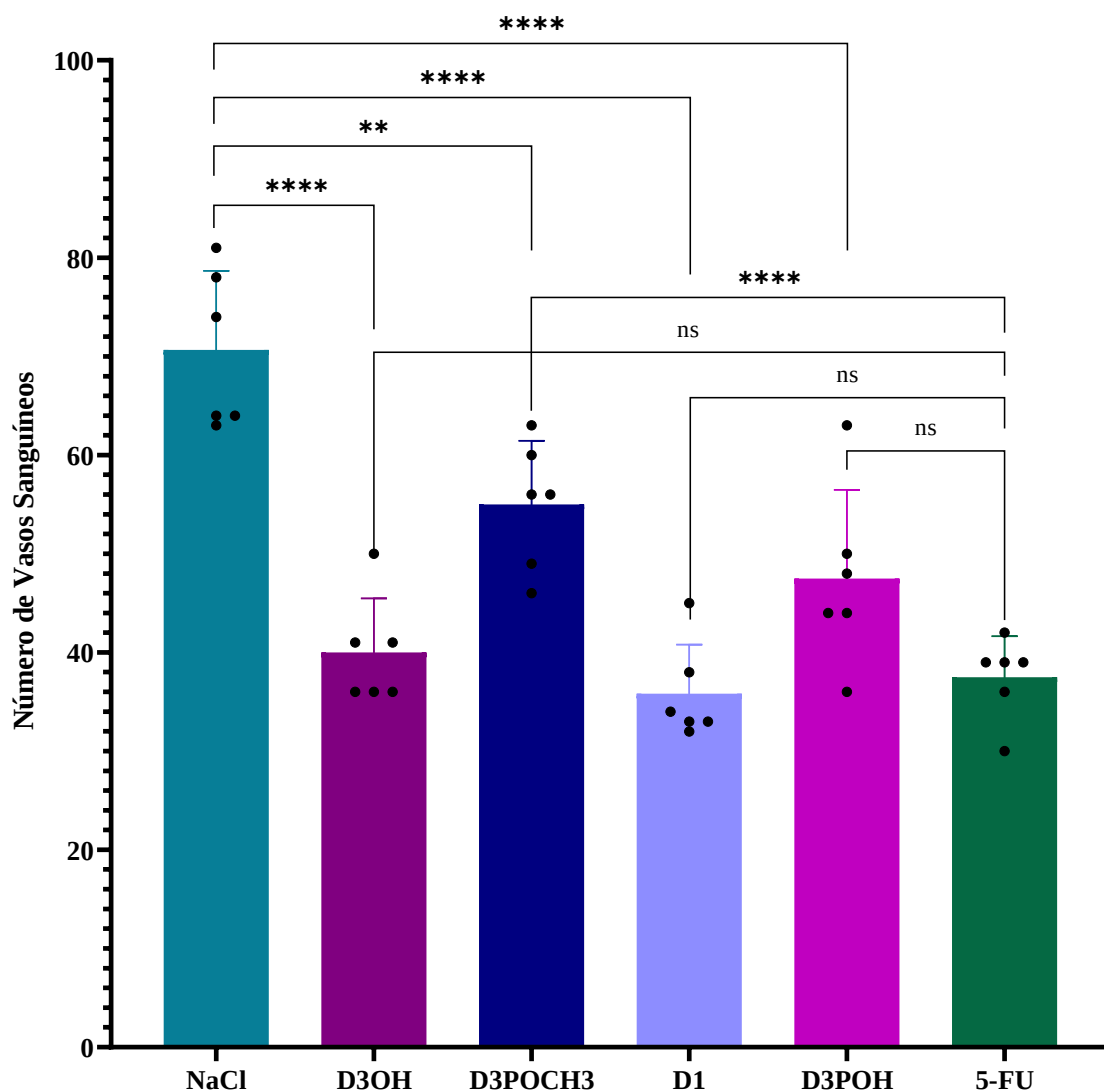
Dessa forma, todos os compostos (D3OH, D1, D3POH, e D3POCH3) demonstraram atividade antiangiogênica significativa em comparação ao controle negativo (NaCl). Em comparação com o controle positivo (5-FU), D3OH, D1, e D3POH mostraram atividade semelhante, com diferenças não significativas em termos de inibição de vasos sanguíneos. O composto D3POCH3 foi o único a apresentar uma eficácia antiangiogênica inferior ao controle positivo 5-FU, mostrando uma diferença significativa, o que sugere que sua atividade é menor do que a dos outros compostos testados. Esses resultados indicam que D3OH, D1, e D3POH são candidatos promissores para estudos futuros, com atividades antiangiogênicas comparáveis ao controle positivo 5-FU (**FIGURA 15**).

FIGURA 14 - Imagens *in ovo* obtidas 48 horas após a aplicação do controle negativo NaCl 0.9%, D3OH, D3POCH₃, D1, D3POH e controle positivo 5-FU.



Fonte: Próprio autor.

FIGURA 15 - Análise quantitativa do número de vasos na membrana corioalantóica do embrião de galinha após 48 horas de tratamento.



Fonte: Próprio autor.

5.5. Relação Estrutura-Atividade dos compostos

A modificação estrutural de compostos bioativos é uma estratégia promissora para aprimorar sua interação com alvos biológicos específicos. A análise detalhada das relações estrutura-atividade desses compostos é essencial para entender como pequenas mudanças na arquitetura molecular podem impactar sua eficácia e seletividade. Essa abordagem é fundamental para o design racional de novas moléculas, viabilizando o desenvolvimento de candidatos terapêuticos mais eficazes e direcionados, capazes de atender a necessidades clínicas ainda não supridas.

O composto D3OH possui um grupo ácido borônico ($-B(OH)_2$) ligado a um anel aromático em uma posição *para* em relação ao grupo carbonílico. Em termos de atividade, demonstrou uma capacidade antiangiogênica semelhante ao 5-fluorouracil (5-FU), com uma diferença de apenas 2,5 vasos, que não foi estatisticamente significativa ($p = 0,9849$). Estruturalmente, a posição *para* do ácido borônico em relação ao grupo carbonílico favorece interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, potencializando a afinidade do composto com alvos biológicos envolvidos na angiogênese. Esse arranjo espacial pode justificar sua eficácia inibitória, comparável ao 5-FU, em termos de redução do número de vasos.

O composto D1 também apresenta um grupo ácido borônico ligado a um anel aromático, mas possui uma estrutura menos funcionalizada quando comparado aos demais compostos. Apesar dessa simplicidade estrutural, o D1 exibiu uma atividade antiangiogênica semelhante ao 5-FU, com uma diferença de apenas 1,67 vasos, igualmente não estatisticamente significativa ($p = 0,9977$). Essa simplicidade pode ser vantajosa, uma vez que a ausência de grupos volumosos proporciona maior flexibilidade molecular, favorecendo a interação com proteínas envolvidas no processo angiogênico. Assim, o D1 demonstra que mesmo compostos estruturalmente mais simples podem apresentar uma forte atividade inibitória, semelhante ao controle positivo.

O composto D3POH apresenta o grupo ácido borônico em uma posição *meta* em relação ao grupo carbonílico, diferenciando-se do D3OH, que possui a posição *para*. A atividade do D3POH também foi similar à do 5-FU, com uma diferença de 10 vasos, que não foi estatisticamente significativa ($p = 0,1180$). A mudança na posição do ácido borônico pode impactar a orientação e as interações do composto com alvos biológicos, como proteínas ou receptores angiogênicos. Apesar de sua atividade ser ligeiramente menor em relação ao D3OH, o D3POH manteve uma forte capacidade inibitória, indicando que características como a formação de ligações de hidrogênio continuam sendo relevantes, mesmo com alterações no arranjo espacial.

Por fim, o composto D3POCH₃ se destaca por apresentar um grupo metoxila ($-OCH_3$) no anel aromático em vez de uma hidroxila, além do grupo ácido borônico. Esse foi o único composto que exibiu uma atividade significativamente inferior ao 5-FU, com uma diferença de 17,5 vasos ($p = 0,0009$), embora ainda tenha sido superior ao controle negativo NaCl. A substituição da hidroxila pelo grupo metoxila é provavelmente a principal razão para essa menor eficácia. O grupo metoxila, sendo menos polar, reduz a capacidade de formar ligações de hidrogênio com proteínas relacionadas à angiogênese. Além disso, aumenta a lipofilicidade

da molécula, o que pode impactar negativamente sua solubilidade e biodisponibilidade, contribuindo para a redução da eficácia observada.

Esses resultados destacam a importância da posição e da natureza dos substituintes nos compostos com grupos ácidos borônicos para otimizar sua atividade antiangiogênica, com implicações relevantes para o planejamento de novos inibidores.

5.6. Estudo da atividade anti-inflamatória em CAM

Com base na análise qualitativa das imagens capturadas, os compostos testados exibiram respostas distintas no modelo *in ovo* (**FIGURA 16**). O SDS e o D3OH induziram sinais evidentes de inflamação, caracterizados pelo aumento da vascularização e pela presença de vasos inflamados ou congestionados. Em contrapartida, a dexametasona e o composto D1 demonstraram efeitos anti-inflamatórios, com redução visível na densidade e congestão vascular, indicando uma modulação eficaz da resposta inflamatória.

Apesar dessas observações qualitativas, a ausência de um delineamento experimental mais rigoroso limitou a padronização dos resultados, dificultando uma análise precisa e comparativa. Na literatura, destaca-se a importância de métodos padronizados no uso do modelo *in ovo*, considerando parâmetros como a concentração dos compostos, o tempo de exposição e critérios objetivos de avaliação para reduzir variabilidades nos resultados. A falta de padronização pode introduzir inconsistências, tornando os dados menos reprodutíveis e comprometendo sua interpretação.

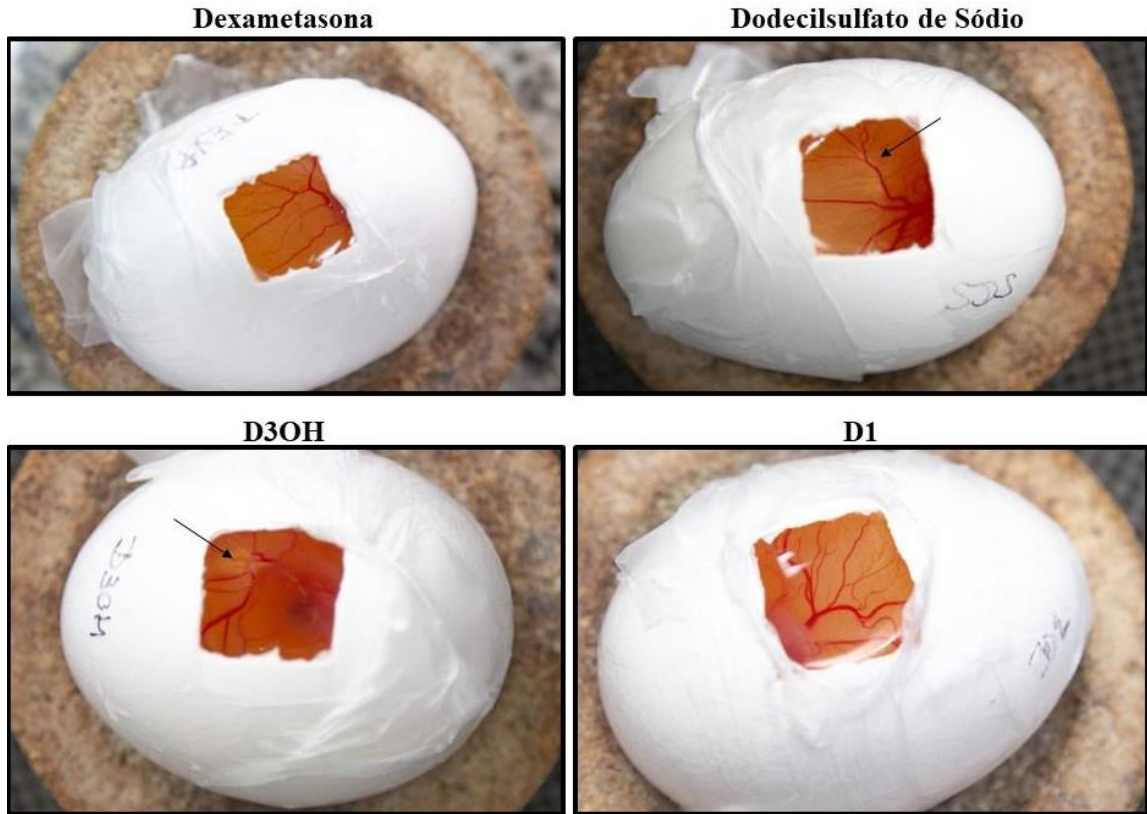
Os sinais inflamatórios observados no SDS, um conhecido agente irritante, estão alinhados com seu uso como padrão positivo para indução de inflamação no modelo CAM, conforme relatado na literatura. Para o D3OH, os efeitos inflamatórios podem estar relacionados a características estruturais específicas que favorecem interações com biomoléculas da membrana CAM, mas mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Por outro lado, os efeitos anti-inflamatórios da dexametasona, um anti-inflamatório bem estabelecido, e do D1 destacam a eficácia desses compostos na inibição da resposta inflamatória. A redução visível na vascularização observada no D1 sugere que ele possui um perfil promissor, que merece investigação adicional para compreender melhor seu mecanismo de ação e confirmar seu potencial anti-inflamatório.

Esses resultados qualitativos ressaltam a necessidade de maior rigor experimental, com análises quantitativas detalhadas e replicações consistentes, para validar e aprofundar as

observações realizadas no modelo *in ovo*. Isso permitirá explorar de forma mais robusta o potencial dos compostos testados.

FIGURA 16 - Resultados do ensaio anti-inflamatório em CAM.



Fonte: Próprio autor.

6. CONCLUSÃO

O ensaio de biocompatibilidade *in vitro (in ovo)* em HET-CAM demonstrou que os derivados de chalconas D3OH, D3COPH3, D3COH e D1 são seguros, e não apresentam toxicidade aguda com ausência total de lise vascular, hemorragia e coagulação durante 300 segundos. O ensaio antiangioênico mostrou que os D3OH e D1 foram capazes de inibir a formação de vasos similar ao controle 5-FU. Assim, os derivados D3OH e D1 foram selecionados para o ensaio de atividade anti-inflamatória em modelo *in vitro (in ovo)* de HET-CAM.

7. PERSPECTIVAS

Será realizada a padronização e posterior avaliação anti-inflamatória dos derivados de chalcona D3OH e D9 em modelo *in vitro (in ovo)* de HET-CAM.

REFERÊNCIAS

- ACHANTA, G. *et al.* A boronic-chalcone derivative exhibits potent anticancer activity through inhibition of the proteasome. *Molecular Pharmacology*, v. 70, n. 1, p. 426–433, jul. 2006.
- AKBARIAN, M.; BERTASSONI, L. E.; TAYEBI, L. Biological aspects in controlling angiogenesis: current progress. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, v. 79, n. 7, 1 jul. 2022.
- FRANÇA. *Arrêté du 29 novembre 1996 relatif aux méthodes officielles d'analyse nécessaires aux contrôles des produits cosmétiques*. *Journal officiel de la République française*, Paris, 10 déc. 1996. Disponível em: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000369360>. Acesso em: 24 jan. 2025.
- ARTMED360. *Fundo de olho na medicina do século XXI*. [S. l.]: Artmed360, [2024]. Disponível em: <https://www.artmed360.com.br/curso/fundo-de-olho-na-seculo-xxi>. Acesso em: 14 out. 2024.
- ASAI, R.; BRESSAN, M.; MIKAWA, T. Avians as a model system of vascular development. *methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 2206, p. 103–127, 2021.
- BATISTA-DUHARTE, A. *et al.* The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane. *International Journal of Toxicology*, v. 35, n. 6, p. 627–633, 13 nov. 2016.
- BONNEAU, N. *et al.* An overview of current alternative models in the context of ocular surface toxicity. *Journal of applied toxicology : JAT*, v. 42, n. 5, p. 718–737, 1 maio 2022.
- BÜRGERMEISTER, J. *et al.* LaPSvS1, a (1→3)-β-galactan sulfate and its effect on angiogenesis in vivo and in vitro. *Carbohydrate Research*, v. 337, n. 16, p. 1459–1466, 9 set. 2002.
- BURTON, F. G.; TULLETT, S. G. Respiration of avian embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, v. 82, n. 4, p. 735–744, 1 jan. 1985. Acesso em: 12 out. 2024.
- CARNEIRO, S. B. *et al.* Piper aduncum essential oil rich in dillapiole: development of hydrogel-thickened nanoemulsion and nanostructured lipid carrier intended for skin delivery. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 11, p. 2525, 1 nov. 2022.
- CARVALHO, S. G. *et al.* Chitosan surface modification modulates the mucoadhesive, permeation and anti-angiogenic properties of gellan gum/bevacizumab nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 263, p. 130272, abr. 2024.
- SANTOS, P. T. dos. *Embrião de galinha*. 10 jul. 2013. 1 fotografia. Disponível em: <https://www.casadasciencias.org/imagem/7167>. Acesso em: 14 out. 2024.
- CAZEDEY, E. C. L. *et al.* Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, n. 4, p. 759–766, out. 2009.

CHUNG, A. S.; FERRARA, N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 27, p. 563–584, 2011.

CORTI, E.; VOGELAAR, E. *The oldest hatcheries are still in use*. *Aviculture Europe*, v. 12, n. 3, 2012. Disponível em: <http://www.aviculture-europe.nl/nummers/12e03a08.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2025.

D'ALBA, L.; SHAWKEY, M. D. Mechanisms of antimicrobial defense in avian eggs. *Journal of Ornithology*, v. 156, p. 399–408, 1 dez. 2015.

VIERA, L. M. de A. L. *et al.* Comparison of the different protocols of the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) by evaluating the eye irritation potential of surfactants. *Toxicology in Vitro*, v. 78, p. 105255, fev. 2022a.

VIERA, L. M. de A. L. *et al.* Comparison of the different protocols of the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) by evaluating the eye irritation potential of surfactants. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, v. 78, 1 fev. 2022b.

DELGADO, I. F. *et al.* *ATLAS DO MÉTODO HET-CAM: Protocolo ilustrado aplicado à avaliação de toxicidade ocular*. [S.l.: s.n.], 2023.

DEROUICHE, M. T. T.; ABDENNOUR, S. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, v. 45, n. Pt 3, p. 393–396, 1 dez. 2017.

DHALIWAL, J. S. *et al.* Pharmacotherapeutics applications and chemistry of chalcone derivatives. *Molecules*, v. 27, n. 20, p. 7062, 19 out. 2022.

DIAZ, D. B. *et al.* Synthesis of aminoboronic acid derivatives from amines and amphoteric boryl carbonyl compounds. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 55, n. 41, p. 12659–12663, 4 out. 2016.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, n. 3, p. 223–229, jul. 2015.

DUFFY, A. M.; BOUCHIER-HAYES, D. J.; HARMEY, J. H. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its role in non-endothelial cells: autocrine signalling by VEGF. 2013. .

ELKANZI, N. A. A. *et al.* Synthesis of chalcones derivatives and their biological activities: a review. *ACS omega*, v. 7, n. 32, p. 27769–27786, 16 ago. 2022.

EPPLÉ, A.; GILL, T. S.; NIBBIO, B. The avian allantois: a depot for stress-released catecholamines. *General and comparative endocrinology*, v. 85, n. 3, p. 462–476, 1992.

FAMEMA. *Aprendendo embriologia*. Faculdade de Medicina de Marília, 2024. Disponível em: <https://www.famema.br/ensino/embriologia/index.php>. Acesso em: 24 jan. 2025.

FISCHER, I.; MILTON, C.; WALLACE, H. Toxicity testing is evolving! *Toxicology Research*, v. 9, n. 2, p. 67, 2020.

GADELHA, A. I. B. B. *et al.* Os anexos embrionários de aves: revisão de literatura. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 2, p. e54310212498, 28 fev. 2021a.

GADELHA, A. I. B. B. *et al.* Os anexos embrionários de aves: revisão de literatura. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 2, p. e54310212498, 28 fev. 2021b.

GHALEHBANDI, S. *et al.* The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *European Journal of Pharmacology*, v. 949, p. 175586, 15 jun. 2023.

GILBERT, S. Ecological developmental biology: developmental biology meets the real world. *Developmental Biology*, 1 jan. 2001.

GRIFFIOEN, A. W.; DUDLEY, A. C. The rising impact of angiogenesis research. *Angiogenesis*, v. 25, n. 4, p. 435, 1 nov. 2022.

GROFF, P. M. *et al.* Importância da temperatura e umidade e os efeitos da luminosidade durante a incubação de ovos férteis de galinhas. *Revista eletrônica de Veterinária*, v. 18, 2017.

HAYASHI, K. *et al.* Two-stage bottom-up tiered approach combining several alternatives for identification of eye irritation potential of chemicals including insoluble or volatile substances. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, v. 26, n. 7, p. 1199–1208, out. 2012.

HERR, T. *et al.* Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Meio-Norte Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Considerações técnicas sobre a incubação de ovos de galinhas. . [S.l: s.n.], 2019.

HINCKE, M. T. *et al.* Dynamics of structural barriers and innate immune components during incubation of the avian egg: critical interplay between autonomous embryonic development and maternal anticipation. *Journal of innate immunity*, v. 11, n. 2, p. 111–124, 1 mar. 2019.

HUANG, H. J. *et al.* Current strategies in assessment of nanotoxicity: alternatives to in vivo animal testing. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 8, 2 abr. 2021.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. *ICCVAM Test Method Evaluation Report: current validation status of in vitro test methods proposed for identifying eye injury hazard potential of chemicals and products*. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, 2010.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. *ICCVAM Test Method Evaluation Report: current validation status of in vitro test methods proposed for identifying eye injury hazard potential of chemicals and products* (Volume 2). National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, 2010.

JACKSON, J. R. *et al.* The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB Journal*, v. 11, n. 5, p. 439-446, 1997.

JACOB, J. P.; MILES, R. D.; MATHER, F. BEN. *Egg quality 1*. [S.l: s.n.], 2000.

JAFFREDO, T.; YVERNOGEOU, L. How the avian model has pioneered the field of hematopoietic development. *Experimental hematology*, v. 42, n. 8, p. 661–668, 2014.

KADAM, M. M. *et al.* Prospects of in ovo feeding and nutrient supplementation for poultry: the science and commercial applications--a review. *Journal of the science of food and agriculture*, v. 93, n. 15, p. 3654–3661, dez. 2013.

KARAMYSHEVA, A. F. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, v. 73, n. 7, p. 751-762, 3 ago. 2008.

KARTHIKEYAN, C. *et al.* Advances in chalcones with anticancer activities. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, v. 10, n. 1, p. 97–115, 16 dez. 2014.

KRENN, L.; PAPER, D. H. Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, v. 16, n. 12, p. 1083–1088, dez. 2009.

LE NOBLE, F. *et al.* Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development (Cambridge, England)*, v. 131, n. 2, p. 361–375, jan. 2004.

LEARY, S.; JOHNSON, C. L. *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition*. Members of the panel on euthanasia, AVMA Staff Consultants. 2020. Disponível em: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2025.

LECOUTER, J. *et al.* Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science (New York, N.Y.)*, v. 299, n. 5608, p. 890–893, 7 fev. 2003.

LEE, H. J.; HONG, Y. J.; KIM, M. Angiogenesis in chronic inflammatory skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 12035, v. 22, n. 21, p. 12035, 7 nov. 2021.

LEMES, S. R. *et al.* Optical properties and antiangiogenic activity of a chalcone derivate. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, v. 204, p. 685–695, 5 nov. 2018.

LOPES, Juliana Romano. *Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de derivados de ácidos borônicos como inibidores da protease principal de SARS-CoV-2*. 2024. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2024.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 23, n. 2, p. 287–291, 1985.

LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. *Food and Chemical Toxicology*, v. 24, n. 6–7, p. 495–496, 1 jun. 1986.

- MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Anti-cancer chalcones: structural and molecular target perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 98, p. 69–114, jun. 2015.
- MAINA, J. N. Structure and function of the shell and the chorioallantoic membrane of the avian egg: Embryonic respiration. *The Biology of the Avian Respiratory System: Evolution, Development, Structure and Function*, p. 219–247, 28 abr. 2017.
- MARCHESAN, M. *et al.* Investigation of the antiinflammatory activity of liquid extracts of *Plantago lanceolata* L. *Phytotherapy Research*, 1998.
- MASON, I. The avian embryo. An overview. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 97, p. 215–220, 1999.
- MICHALKOVA, R. *et al.* Molecular mechanisms of antiproliferative effects of natural chalcones. *Cancers*, v. 13, n. 11, p. 2730, 31 maio 2021.
- MONTEIRO, Paula Araujo. *Histologia e embriologia comparada*. Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S.A., 2017. 200 p. ISBN 978-85-522-0024-6.
- MOREAU, T. *et al.* Antimicrobial Proteins and Peptides in Avian Eggshell: Structural Diversity and Potential Roles in Biomineralization. *Frontiers in immunology*, v. 13, 27 jul. 2022.
- MOREIRA, J. *et al.* Chalcones as promising antitumor agents by targeting the p53 pathway: an overview and new insights in drug-likeness. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 26, n. 12, 19 jun. 2021.
- MORTOLA, J. P. Gas exchange in avian embryos and hatchlings. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, v. 153, n. 4, p. 359–377, 2009.
- MOSSMAN, H. W. *Vertebrate fetal membranes: comparative ontogeny and morphology, evolution, phylogenetic significance, basic functions, research opportunities*. New Brunswick: Rutgers University Press, 1987.
- MUELLER, C. A.; BURGGREN, W. W.; TAZAWA, H. The physiology of the avian embryo. In: STURKIE, P. D. (Ed.). *Sturkie's avian physiology*. 9. ed. New York: Springer, 2015. p. 529-542.
- MUSSAGY, C. U. *et al.* Emerging role of bio-based solvents mixtures to increase the solubility and recovery of carotenoids from processed carrot wastes for potential skin care application. *Industrial Crops and Products*, v. 205, p. 117436, 1 dez. 2023.
- OKAMOTO, M. *et al.* FcRY is a key molecule controlling maternal blood IgY transfer to yolks during egg development in avian species. *Frontiers in Immunology*, v. 15, 2024.
- OUYANG, Y. *et al.* Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. *Biomolecules*, v. 11, n. 6, 16 jun. 2021.

ÖZTÜRK, A. A. *et al.* Diclofenac sodium loaded PLGA nanoparticles for inflammatory diseases with high anti-inflammatory properties at low dose: Formulation, characterization and in vivo HET-CAM analysis. *Microvascular research*, v. 130, 1 jul. 2020.

ÖZTÜRK, A. A.; KIYAN, H. T. Treatment of oxidative stress-induced pain and inflammation with dexketoprofen trometamol loaded different molecular weight chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and anti-inflammatory activity by using in vivo HET-CAM assay. *Microvascular research*, v. 128, 1 mar. 2020.

PILATOVA, M. *et al.* In vitro antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, v. 24, n. 5, p. 1347–1355, ago. 2010.

RAMMOHAN, A. *et al.* Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review. *Environmental Chemistry Letters*, v. 18, n. 2, p. 433–458, 6 mar. 2020.

REBELLO, J. de M. *Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas*. 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2005.

RIBATTI, D. *et al.* Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. An immunohistochemical and ultrastructural study. *European journal of haematology*, v. 56, n. 1–2, p. 45–53, 1996.

RIBATTI, DOMENICO. Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model. *Methods in Molecular Biology*, v. 843, p. 47–57, 2012. Acesso em: 13 out. 2024.

RIBATTI, DOMENICO. The CAM assay in the study of the metastatic process. *Experimental Cell Research*, v. 400, n. 2, p. 112510, mar. 2021.

RIBATTI, DOMENICO. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, v. 70, p. 97–101, 1 jun. 2017.

RIBATTI, DOMENICO. The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of angiogenesis and metastasis: The CAM assay in the study of angiogenesis and metastasis. *The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis: The CAM assay in the study of angiogenesis and metastasis*, p. 1–124, 2010.

RIVERO, M. N. *et al.* Comparison between HET-CAM protocols and a product use clinical study for eye irritation evaluation of personal care products including cosmetics according to their surfactant composition. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 153, p. 112229, 1 jul. 2021.

SAN, M. *et al.* Líquido amniótico, atividade física e imersão em água na gestação. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, v. 5, n. 4, p. 403–410, dez. 2005.

SANDNER, G. *et al.* Alternative model organisms for toxicological fingerprinting of relevant parameters in food and nutrition. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 62, n. 22, p. 5965–5982, 2022.

GILBERT, Scott F. *et al.* *Biologia do desenvolvimento*. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

SCOTTÁ, B. A. *et al.* Nutrição pré e pós-eclosão em aves. *Pubvet*, v. 8, n. 08, 3 set. 2015.

SHARPE, R. The Draize test--motivations for change. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 23, n. 2, p. 139–143, 1985.

SILVA, T. F. DA *et al.* Embryotoxicity of yangambin isolated from *Ocotea duckei* vattimogil in gallus gallus domesticus embryos. *Pharmacognosy Research*, v. 13, n. 3, p. 135–139, 18 out. 2021.

SÓ BIOLOGIA. *As evidências da evolução*. [S. l.]: Só Biologia, c2024. Disponível em: <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Evolucao/evolucao11.php>. Acesso em: 14 out. 2024.

SPIELMANN, H. HET-CAM test. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 43, p. 199–204, 1995.

SPIELMANN, H. *et al.* Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany. *Toxicology in Vitro*, v. 5, n. 5–6, p. 539–542, 1 jan. 1991.

STADELMAN, William J.; COTTERILL, Owen J. *Egg science and technology*. 4. ed, 1995. ISBN 1-56022-855-5.

STARCK, J. M. Morphology of the avian yolk sac. *Journal of morphology*, v. 282, n. 7, p. 959–972, 1 jul. 2021.

STARCK, J. M.; STEWART, J. R.; BLACKBURN, D. G. Phylogeny and evolutionary history of the amniote egg. *Journal of morphology*, v. 282, n. 7, p. 1080–1122, 1 jul. 2021.

TAHERGORABI, Z.; KHAZAEI, M. A review on angiogenesis and its assays. *Iranian journal of basic medical sciences*, v. 15, n. 6, p. 1110–26, nov. 2012.

ADAIR, Thomas H.; MONTANI, Jean-Pierre. *Angiogenesis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. *The developing human: clinically oriented embryology*. [S. l.]: Elsevier India, 2012. Disponível em: <https://shop.elsevier.com/books/the-developing-human-clinically-oriented-embryology-9e/moore/978-81-312-3505-8>. Acesso em: 13 out. 2024.

UEMURA, A. *et al.* VEGFR1 signaling in retinal angiogenesis and microinflammation. *Progress in retinal and eye research*, v. 84, 1 set. 2021.

ULMER-FRANCO, A. M. *et al.* Hatching egg and newly hatched chick yolk sac total IgY content at 3 broiler breeder flock ages. *Poultry Science*, v. 91, n. 3, p. 758–764, 1 mar. 2012.

VAN DER WAGT, I. *et al.* A review on yolk sac utilization in poultry. *Poultry science*, v. 99, n. 4, p. 2162–2175, 1 abr. 2020.

- VAN NORMAN, G. A. Limitations of animal studies for predicting toxicity in clinical trials: part 2: potential alternatives to the use of animals in preclinical trials. *JACC: Basic to Translational Science*, v. 5, n. 4, p. 387, 1 abr. 2020.
- VANDERLEY, C. S. B. S.; SANTANA, I. C. H. *Histologia e embriologia animal comparada*. 2019. Disponível em: <http://educapes.capes.gov.br/handle/capes/431617>. Acesso em: 24 jan. 2025.
- VARGAS, A. *et al.* The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, v. 59, n. 11, p. 1162–1176, 30 set. 2007.
- VERGARA, M. N.; CANTO-SOLER, M. V. Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. *Neural Development*, v. 7, n. 1, p. 1–19, 27 jun. 2012.
- VICTORELLI, F. D. *et al.* Chick embryo chorioallantoic membrane as a suitable in vivo model to evaluate drug delivery systems for cancer treatment: A review. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, v. 153, p. 273–284, 1 ago. 2020.
- VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. The chorioallantoic membrane test as a model to predict the potential human eye irritation induced by commonly used laboratory solvents. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, v. 20, n. 6, p. 1066–1070, set. 2006.
- VOICULESCU, O. Movements of chick gastrulation. *Current topics in developmental biology*, v. 136, p. 409–428, 1 jan. 2020.
- WANG, J. X.; WHITE, M. D. Mechanical forces in avian embryo development. *Seminars in cell & developmental biology*, v. 120, p. 133–146, 1 dez. 2021.
- WINTER, G. *et al.* Multi-Modal PET and MR Imaging in the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Model for initial in vivo testing of target-specific radioligands. *Cancers*, v. 12, n. 5, 1 maio 2020.
- WOLPERT, L. Much more from the chicken's egg than breakfast - A wonderful model system. *Mechanisms of Development*, v. 121, n. 9, p. 1015–1017, set. 2004.
- YAMAGATA, M. Towards Tabula Gallus. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 2, 1 jan. 2022.
- YAMAMOTO, Y. *et al.* Random migration of induced pluripotent stem cell-derived human gastrulation-stage mesendoderm. *PLOS ONE*, v. 13, n. 9, p. e0201960, 1 set. 2018.
- YANG, J.; YAN, J.; LIU, B. Targeting VEGF/VEGFR to modulate antitumor immunity. *Frontiers in immunology*, v. 9, 3 maio 2018.
- YOO, S. Y.; KWON, S. M. Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators of inflammation*, 2013.

ZHUANG, C. *et al.* Chalcone: A privileged structure in medicinal chemistry. *Chemical Reviews*, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 28 jun. 2017.

ANEXO B. Chitosan surface modification modulates the mucoadhesive, permeation and anti-angiogenic properties of gellan gum/bevacizumab nanoparticles.

International Journal of Biological Macromolecules 263 (2024) 130272



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac



Chitosan surface modification modulates the mucoadhesive, permeation and anti-angiogenic properties of gellan gum/bevacizumab nanoparticles

Suzana Gonçalves Carvalho^{*}, Felipe Falcão Haddad, Aline Martins dos Santos, Cauê Benito Scarim, Leonardo Miziara Barboza Ferreira, Andréia Bagliotti Meneguim, Marlus Chorilli, Maria Palmira Daflon Gremião^{*}

Department of Drugs and Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), 14800-903 Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Gellan gum
Chitosan
Angiogenesis
Bevacizumab
Antibody
Polymeric nanoparticle

ABSTRACT

Bevacizumab (BVZ) was the first monoclonal antibody approved by the FDA and has shown an essential advance in the antitumor therapy of colorectal cancer (CRC), however, the systemic action of BVZ administered intravenously can trigger several adverse effects. The working hypothesis of the study was to promote the modulation of the mucoadhesion properties and permeability of the BVZ through the formation of nanoparticles (NPs) with gellan gum (GG) with subsequent surface modification with chitosan (CS). NPs comprising BVZ and GG were synthesized through polyelectrolyte complexation, yielding spherical nanosized particles with an average diameter of 264.0 ± 2.75 nm and 314.0 ± 0.01 nm, polydispersity index of 0.182 ± 0.01 e 0.288 ± 0.01 , and encapsulation efficiency of 29.36 ± 0.67 e 60.35 ± 0.27 mV, for NPs without (NP BVZ) and with surface modification (NP BVZ + CS). The results showed a good ability of nanoparticles with surface modification to modulate the NPs biological properties.

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC), also called bowel cancer, is the third leading cause of cancer-related deaths worldwide, causing about 700,000 deaths per year [1–3].

The conventional therapeutic resource for the treatment of cancer is intravenous therapy. Nonetheless, the non-selectivity or lack of specificity of antineoplastic agents, along with their distribution to healthy tissues and organs, necessitates high-dose administration. This can lead to severe adverse effects and toxicity [4,5]. Among the antineoplastic agents used in CRC treatment, bevacizumab (BVZ) stands out as a first-line drug [6].

BVZ is a monoclonal antibody (mAb) of the G1 immunoglobulin (IgG1) type, produced by recombinant DNA biotechnology and available on the market in solution for intravenous infusion (Avastin®). BVZ has anti-angiogenic activity due to its high binding affinity to vascular endothelial growth factor (VEGF). This soluble protein factor is the main regulator of physiological and pathological angiogenesis, particularly within the tumor microenvironment. The systemic action of BVZ when administered intravenously can trigger several adverse effects, including

hypertension, impaired wound healing, hemorrhage, heart failure, gastrointestinal perforation, and proteinuria [7].

The use of polymeric nanoparticles (NPs) as drug carriers has several advantages, such as vectorization and favoring drug accumulation at the site of action or absorption due to its reduced size, compartmentalization of the drug in a restricted environment, and modulation capacity [8,9].

The application of polysaccharides in the development of polymeric nanoparticles has several advantages, such as low cost, biocompatibility, biodegradability, non-toxicity, cellular interaction, chemical interaction/modification, safety, and drug delivery [8–10]. The release of these systems can be modulated through the supramolecular interactions of the particles with the biological interface, aiming to achieve specific behavior [11,12].

Gellan gum (GG) is an anionic exopolysaccharide obtained through fermentation of the microorganism *Sphingomonas elodea*. It has been explored in the design of systems used in the gastrointestinal tract (GIT), as it has an important mucoadhesive property, in addition to forming strong structural networks in the presence of multivalent cations [13–16].

^{*} Corresponding authors.

E-mail addresses: suzana.g.carvalho@unesp.br (S.G. Carvalho), caue.scarim@unesp.br (C.B. Scarim), andrea.meneguim@unesp.br (A.B. Meneguim), marlus.chorilli@unesp.br (M. Chorilli), palmira.gremiao@unesp.br (M.P.D. Gremião).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130272>

Received 20 September 2023; Received in revised form 11 February 2024; Accepted 15 February 2024

Available online 17 February 2024

0141-8130/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO C. Characterization and in vitro cytotoxicity of piperine-loaded nanoemulsion in breast cancer cells.

Industrial Crops & Products 205 (2023) 117436



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop



Emerging role of bio-based solvents mixtures to increase the solubility and recovery of carotenoids from processed carrot wastes for potential skin care application

Cassamo U. Mussagy^{a,*}, Ariane Oshiro^{b,1}, Fabiane O. Farias^c, Felipe F. Haddad^d, Jean L. dos Santos^d, Cauê B. Scarim^d, Rondinelli D. Herculanio^{e,f}, Adalberto Pessoa Jr.^g, Valeria C. Santos-Ebinuma^b

^a Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agronómicas y de los Alimentos, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Quillota 2260000, Chile

^b São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Department of Engineering Bioprocesses and Biotechnology, Araraquara 14800-903, SP, Brazil

^c Department of Chemical Engineering, Polytechnique Center, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^d São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Department of Drugs and Medicines, Araraquara, SP, Brazil

^e Bioengineering & Biomaterials Group, São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, SP, Brazil

^f Terasaki Institute for Biomedical Innovation (TIBI), 11507 W Olympic Blvd, Los Angeles, CA 90064, USA

^g Department of Pharmaceutical-Biochemical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Carrot
Waste
Carotenoids
Bio-based solvents
Antioxidant
Cosmetic
HET-CAM assay

ABSTRACT

Carotenoids are abundant in food waste and offer various health benefits. In response to the growing demand for sustainable technologies, this study aims to establish an efficient recovery protocol for carotenoids (β -carotene and α -carotene) from carrot waste using eco-friendly solvents. The effectiveness of 2-methyltetrahydrofuran (2-MeTHF), limonene (Lim), and cyclopentyl methyl ether (CPME) in extracting carotenoids is compared with ethyl acetate (EtOAc), a conventional green solvent commonly used to replace hexane and petroleum ether. The solubility behavior was evaluated using experimental and *in silico* approaches, along with assessing the hydro-tropic effect, thermal stability, and antioxidant properties. Furthermore, the irritability of the recovered carotenoids has been investigated concerning potential skin care applications. The highest recovery yields of β -carotene ($72.21 \pm 6.21 \mu\text{g/g}$) and α -carotene ($56.11 \pm 4.83 \mu\text{g/g}$) were achieved using an EtOAc:2-MeTHF mixture, resulting in an increase of approximately $25 \mu\text{g/g}$ compared to the control (EtOAc). The EtOAc:2-MeTHF mixture indicated that approximately 37% of the carotenoids were degraded after 336 h with a D_{value} of 677 h. CAMs treated with the recovered carotenoids showed no visible response during the 300-second period, with all SI values at 0.7. The recovered carotenoids demonstrated positive biological activities and biocompatibility for use on human skin as an anti-aging agent. These results indicate that the carotenoids obtained from carrot waste have the potential for further application in the cosmetic industry.

1. Introduction

Fruit and vegetable waste contribute to 40–50% of total solid waste generated, making it a major concern in the global food waste problem with significant economic, environmental, and social impacts (Al-Tamimi et al., 2023; Hoehn et al., 2023). Approximately one-third of global food production is lost or wasted during processing or supply chain operations, resulting in an annual wastage of 1.3 billion tons,

where fruits and vegetables constitute the most substantial proportion of this waste (Roy et al., 2023; Zilia et al., 2023). Carrots are a well-known source of antioxidants, including plant-based carotenoids such as β -carotene and α -carotene, which are known to provide several health benefits (Honda, 2023; Kaur et al., 2022). In fact, the trend of processed carrots has exhibited an upward trajectory. According to the latest data, the 2021 production value of carrots in the U.S. for both fresh and processing markets was estimated to be around \$831.5 million

* Corresponding author.

E-mail address: cassamo.mussagy@pucv.cl (C.U. Mussagy).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117436>

Received 19 April 2023; Received in revised form 29 July 2023; Accepted 3 September 2023

Available online 7 September 2023

0926-6690/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO D. Characterization and in vitro cytotoxicity of piperine-loaded nanoemulsion in breast cancer cells.

Chemical Papers (2024) 78:2577–2587
<https://doi.org/10.1007/s11696-023-03262-9>

ORIGINAL PAPER



Characterization and in vitro cytotoxicity of piperine-loaded nanoemulsion in breast cancer cells

Leticia C. Vitor¹ · Leonardo D. Di Filippo¹ · Jonatas L. Duarte¹ · Lorrane D. Brito¹ · Marcela T. Luiz¹ · Jessyca A. P. Dutra¹ · Rafael M. Sábio¹ · Felipe F. Haddad¹ · Cauê B. Scarim¹ · Paulo Inacio da Costa¹ · Marlus Chorilli¹

Received: 13 September 2023 / Accepted: 3 December 2023 / Published online: 30 December 2023
 © The Author(s), under exclusive license to the Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences 2023

Abstract

Piperine is an alkaloid of natural origin with potent anti-cancer activity. However, due to its physicochemical characteristics, piperine's biological performance is limited, with low bioavailability resulting from high lipophilicity and low water solubility. To improve its cytotoxic activity in 4T1 and MCF7 breast cancer cell lines, we developed and characterized piperine-loaded nanoemulsions (Pip-NE). The nanoemulsions were obtained by spontaneous emulsification followed by sonication and were characterized regarding their size by dynamic light scattering techniques and their zeta potential by electrophoretic mobility. Pip-NE showed an average hydrodynamic diameter of 102 nm, polydispersity index of 0.2, and zeta potential of −31.8 mV. Compared to piperine in solution, Pip-NE showed sustained in-vitro release, preserving the cytotoxic activity of piperine. The formulations presented no irritancy potential in the Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane assay. Additionally, the nanoemulsification increased the piperine cytotoxicity against both breast cancer cell lines, as evidenced by the IC₅₀ values. Overall, this study contributes to understanding the potential of drug delivery nanosystems as a novel strategy to optimize the delivery and enhance the cytotoxic properties of lipophilic drugs such as piperine in breast cancer cell lines.

Keywords Drug delivery systems · Colloidal stability · Lipid nanocarrier · *Piper nigrum*

Introduction

Breast cancer is the most prevalent cancer in women worldwide, presenting a heterogeneous profile at molecular level (Harbeck et al. 2019). In 2020, breast cancer surpassed lung cancer in new cases worldwide, with over 2.2 million cases reported (IARC 2020). In most patients (50–75%), the most common type of breast cancer is invasive ductal carcinoma. Following that, a smaller percentage (5–15%) of patients are diagnosed with invasive lobular carcinoma. The remaining patients include a mixture of ductal/lobular carcinomas and other less common histological types (Waks and Winer 2019).

Breast cancer treatment options include local approaches such as partial or complete mastectomy of one or both breasts, associated with adjuvant radiation and

chemotherapy. However, the effectiveness of current pharmacological treatments like paclitaxel and tamoxifen is limited. These drugs exhibit low selectivity toward cancer cells, causing high toxicity due to systemic biodistribution and the development of progressive resistance (Shi et al. 2020). Specifically, paclitaxel, the most frequently prescribed drug for breast cancer, faces limitations due to its low solubility, narrow therapeutic index, and severe adverse effects, making it difficult for patients to adhere to the treatment (Abu Samaan et al. 2019).

Nanotechnology has held promising potential in the treatment of cancer due to possibility to reduce systemic toxicity and, consequently, minimize adverse effects on the patient (Ghanbariasad et al. 2023; Karimi-Maleh et al. 2023). Nano-systems have greater selectivity to tumor cells, by passive and active targeting mechanisms that increased therapeutic effect, and sustained release properties, which corroborates to reduce the necessary drug dose, due to increased contact area with biological tissues (Alves et al. 2021; Chaturvedi et al. 2019; Luiz et al. 2022; Zanesco-Fontes et al. 2021). Nanostructured systems also can positively impact the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs,

✉ Marlus Chorilli
marlus.chorilli@unesp.br

¹ School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, Sao Paulo 14800903, Brazil

ANEXO E. Eco-sustainable biorefinery to the management of winery waste by integrating sequential ready-to-use pigments and bioenergy through advanced multi-step kinetic slow pyrolysis.

Industrial Crops & Products 221 (2024) 119380



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop



Eco-sustainable biorefinery to the management of winery waste by integrating sequential ready-to-use pigments and bioenergy through advanced multi-step kinetic slow pyrolysis

Cassamo U. Mussagy^{a,*,1}, Leonardo M. de Souza Mesquita^b, Mauricio A. Rostagno^b, Felipe F. Haddad^c, Jean L. dos Santos^c, Cauê B. Scarim^c, Rondinelli D. Herculano^d, Jérémy Valette^e, Diakaridia Sangaré^{a,1}

^a Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agronómicas y de los Alimentos, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Quillota 2260000, Chile

^b Multidisciplinary Laboratory of Food and Health (LabMAS), School of Applied Sciences (FCA), University of Campinas (UNICAMP), Rua Pedro Zaccaria 1300, Limeira, SP 13484-350, Brazil

^c São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Department of Drugs and Medicines, Araraquara, SP, Brazil

^d Terasaki Institute for Biomedical Innovation (TIBI), 11507 W Olympic Blvd, Los Angeles, CA 90064, USA

^e CIRAD, UPR BioWoEB, 73 rue Jean-François Breton, Montpellier F-34398, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Biorefinery
Grape
Carménère
Residues
Pigments
Pyrolysis

ABSTRACT

This study aimed to design a sequential biorefinery from wine-making by-products for the obtaining value-added products, focusing on extracting natural pigments and the evaluation of bioenergy produced by remaining biomass from Carménère Grape Residues (CGR) through slow pyrolysis. To achieve these goals, solid-liquid extraction of pigments from CGR was performed using a reusable bio-based solvent. Concurrently, these pigments' antioxidant activity and toxicity were evaluated in embryo cells, exploring their potential applications in the cosmetic industry. Secondly, it focused on applying the residual colorless biomass derived from the initial extraction process. This involved the evaluation of kinetic triplet: apparent activation energy, pre-exponential factor, and reaction model. From these parameters, the thermodynamic properties (ΔH , ΔG , and ΔS) were estimated. The results from the first step revealed the recovery of 18.21 mg/g_{CGR} of total anthocyanin that exhibited robust antioxidant capabilities and compatibility with biological systems, indicating potential applications in the cosmetic industry. The pyrolysis of residual colorless biomass revealed a complex chemical structure with multiple stages of decomposition. The kinetic parameters, including activation energy and pre-exponential factor, indicated better energy yield than other biomass, highlighting the potential for bioenergy production. The difference between activation energy and standard enthalpy of the reaction was less than 5.72 kJ/mol, indicating a favorable exothermic reaction and the feasibility of the energetic process. This study provides insights into the dual benefits of utilizing CGR for pigments recovering and bioenergy, contributing to sustainable practices towards a circular economy model.

1. Introduction

Ban Ki-Moon's renowned quote, "There is no Plan B for action as there is no Planet B", highlighting the urgent need for collective action to combat climate change (United Nations, 2014). This was particularly significant as it preceded the United Nations Climate Summit, where the Sustainable Development Goals (SDGs) were introduced, including the 2030 agenda for SD, which comprises 17 goals aimed at ensuring

healthy lives, promoting well-being, providing affordable and reliable energy, encouraging sustainable consumption and production patterns, and addressing climate change, among others (United Nation, 2015). The issue of climate change has become a critical challenge of our time, prompting new concerns such as industrial environmental hazards, health impacts, and the sustainability of industrialized products (Korkmaz et al., 2023). In response to these challenges, there is a growing transition from a linear towards a circular economy model, driven by the

* Corresponding author.

E-mail address: cassamo.mussagy@pucv.cl (C.U. Mussagy).

¹ These authors contributed equally to this work

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119380>

Received 5 June 2024; Received in revised form 30 July 2024; Accepted 3 August 2024

Available online 8 August 2024

0926-6690/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.