

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO 3-HIDROXIFLAVONA

Autora: Raiane Silva Lemes
Orientadora: Dr.^a Cristiane de Melo Cazal

RIO VERDE – GO
Fevereiro -2017

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO 3-HIDROXIFLAVONA

Autora: Raiane Silva Lemes
Orientadora: Dr.^a Cristiane de Melo Cazal

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título em MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de Concentração Agroquímica Orgânica.

RIO VERDE – GO
Fevereiro -2017

Lemes, Raiane Silva

L551p Preparação e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo 3-hidroxi-
flavona / Raiane Silva Lemes. –Rio Verde. – 2017.

86 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano –
Câmpus Rio Verde, ano.

Orientador: (a): Doutora. Cristiane de Melo Cazal.

Bibliografia

1. Câncer. 2. 3-hidroxi-
flavona. 3. Nanopartículas. I. Título II.
Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde.

CDD: 632.96

*A Deus pois sem ele nada disso seria possível:
Aos meus pais, meus avós, meu irmão, meu namorado e toda a minha
família pelo amor, paciência e compreensão nos momentos de ausência,
enfim por tudo que significam para mim.
Com Amor,*

Dedico

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO 3-
HIDROXIFLAVONA**

Autora: Raiane Silva Lemes
Orientador: Cristiane de Melo Cazal

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2017.

Erika Crispim Resende
Prof.^a Dr.^a Erika Crispim
Resende
Avaliadora externa
IF Goiano/Iporá

Paulo Sérgio Pereira
Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira
Avaliador interno
IF Goiano/RV

Cristiane de Melo Cazal
Prof.^a Dr.^a Cristiane de Melo Cazal
Presidente da banca
IF Sudeste de Minas Gerais/Barbacena

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus pelas graças concedidas e pela força para superar todas as dificuldades.

À toda a minha família, meus pais Nilvo e Orcina, principalmente minha mãe por não permitir que eu desanimasse nos momentos difíceis, por sempre acreditar na minha capacidade, pela paciência, compreensão e conselhos.

Ao meu irmão Duane, meus sobrinhos (Anna Laura e Duane Filho), minha tia Isabel e meus avós Iracema e Joaquim pela convivência, pelo apoio em todos os momentos, pelo incentivo e por serem exemplos de determinação e dignidade.

Ao meu namorado Valdeir Borges, por toda compreensão, força, carinho, incentivo, cumplicidade, amor, noites em claro me fazendo companhia, por fazer parte da minha vida sempre me apoiando.

À minha querida orientadora Dr.^a Cristiane de Melo Cazal, pela oportunidade, confiança, paciência, por todas as vezes que se dedicou a me ajudar e nunca se recusou, pelos ensinamentos e contribuições desde meu ingresso na iniciação científica e no mestrado, por seu exemplo de profissionalismo e competência e também pela sua amizade.

Ao meu coorientador Dr. Paulo Sergio Pereira por toda contribuição, e pelo suporte da ausência física da minha orientadora quando foi necessário.

À Prof.^a Dr.^a Erika Crispim Resende, por toda disposição e colaboração ao longo desse trabalho, pela ajuda e oportunidade de aprendizagem.

À Prof.^a Dr.^a Marcia Regina Cominetti, da Universidade Federal de São Carlos, pela parceria e por disponibilizar seu tempo e me receber tão bem em seu laboratório para realizar as análises antitumorais, e toda a sua equipe do LABEN, em especial Amanda e a Cecília por toda receptividade e auxílio.

À Dr.^a Tatiane e ao Henrique do laboratório LabMic da UFG, pela grande contribuição nas análises do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Aos meus queridos amigos e alunos de iniciação científica, Fernando, Gêssica e Larissa, pela importante parceria e grande apoio e dedicação neste trabalho.

A todos os meus colegas de mestrado pelos momentos compartilhados nessa jornada, em especial Elisângela e Vanessa que não foram apenas companheiras de mestrado, e sim verdadeiras amigas, conhecer vocês sem dúvida nenhuma, foi uma das melhores coisas que aconteceu durante essa caminhada, obrigada pela amizade, companheirismo, paciência e motivação durante esses dois anos de muita vitória e dedicação.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela dedicação, empenho e conhecimentos transmitidos que fortaleceram minha formação acadêmica.

À FAPEG pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro que foi essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade de qualificação profissional e crescimento pessoal.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais uma etapa de minha vida.

A todos vocês uma única palavra: **Obrigada!**

BIOGRAFIA DO AUTOR

Raiane Silva Lemes, filha de Nilvo Antonio Miguel Lemes e Orcina Santos da Silva, natural de Iporá- Goiás nasceu em 17 de novembro de 1990. Em 2014, concluiu o curso Técnico em Química e Licenciatura em Química pelo Instituto Federal Goiano, Campus Iporá – GO. Participou do programa de iniciação científica durante dois anos e meio. Em 2015 iniciou no curso de pós-graduação em Agroquímica no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Cristiane de Melo Cazal.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES.....	x
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Câncer.....	1
1.2 - 3-Hidroxiﬂavona	4
1.3 - Nanotecnologia associada com o câncer	8
1.4 - Referências Bibliográfcas.....	11
2 - OBJETIVOS.....	19
2.1 - Objetivo Geral	19
2.2 - Objetivos Específicos	19
3 - CAPÍTULO I: Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de 3-hidroxiﬂavona em nanopartículas poliméricas.....	20
3 - CHAPTER I: Development and validation of analytical method by high efficiency liquid chromatography for quantification of 3-hydroxiﬂavone in polymeric nanoparticles	21
ABSTRACT.....	21
3.1 - INTRODUÇÃO.....	22
3.2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.2.1 – Materiais	23
3.2.2 - Equipamentos	24
3.2.3 - Parâmetros cromatográficos	24
3.2.4 - Preparação de soluções de 3-HF.....	24
3.2.5 - Validação do método.....	25
3.2.5.1 - Seletividade	25
3.2.5.2 - Linearidade	25
3.2.5.3 - Precisão.....	26
3.2.5.4 - Exatidão.....	26
3.2.5.5 - Limites de detecção e quantificação.....	26
3.2.6 - Preparo das nanopartículas poliméricas carregadas com 3-HF.....	27

3.2.6.1- Determinação da eficiência de encapsulação (EE%).....	27
3.2.6.2 - Determinação do pH, Potencial Zeta e diâmetro das partículas das formulações	28
3.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.3.1 - Desenvolvimento de métodos e otimização	29
3.3.2 - Validação do método.....	29
3.3.3 - Aplicação do método desenvolvido para a quantificação de 3 -HF em nanopartículas	34
3.5. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
4 - CAPÍTULO II: Preparação e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo 3-hidroxi-flavona.....	41
4 - CHAPTER II: Preparation and characterization of polymeric nanoparticles containing 3-hydroxyflavone.....	42
ABSTRACT.....	42
4.1 - INTRODUÇÃO.....	43
4.2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.2.1 - Materiais	45
4.2.2 - Preparo das nanopartículas poliméricas.....	45
4.2.3 - Caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas	46
4.2.3.1 - Quantificação da 3-hidroxi-flavona	46
4.2.3.2 - Determinação da eficiência de encapsulação (EE%).....	47
4.2.3.3 - Determinação do diâmetro de partícula, Potencial Zeta, e pH das nanopartículas poliméricas	47
4.2.3.4 - Avaliação morfológica das suspensões de nanopartículas	48
4.2.3.5. Estudo da degradação acelerada pela luz UV	48
4.2.3.6 - Estudos da liberação <i>in vitro</i>	48
4.2.4 - Ensaio Biológico	49
4.2.4.1 - Linhagens celulares tumorais	49
4.2.4.2 - Culturas celulares	50
4.2.4.3 - Avaliação da viabilidade celular – Método do MTT.....	50
4.2.4.4 - Indução de apoptose em células de MCF-7 após tratamento com 3-HF.....	51
4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.3.1 - Caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas	52
4.3.2 - Morfologia das nanopartículas	54
4.3.3 - Estudo da degradação acelerada pela luz UV.....	56
4.3.4 - Estudo da liberação <i>in vitro</i>	56
4.3.5 - Ensaio biológico	59
4.4 - CONCLUSÃO.....	62
AGRADECIMENTOS	63
4.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
5 - CONCLUSÃO GERAL	68

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I	
Tabela 1. Composição das formulações das nanopartículas	27
Tabela 2. Valores obtidos para verificação dos parâmetros de repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdias)	33
Tabela 3. Valores experimentais da exatidão do método	34
Tabela 4. Resultado da caracterização das nanopartículas contendo 3-HF	35
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Formulações das nanopartículas. <i>NC</i> = Nanocápsulas; <i>NS</i> = Nanoesferas; <i>3-HF</i> = 3- hidroxiflavona	46
Tabela 2. Resultados da média das nanopartículas preparadas. NS : nanoesfera; NC : nanocápsula; DP : diâmetro de partícula; PZ : potencial zeta; PDI : índice de polidispersão; EE : eficiência de encapsulação, para as diferentes formulações de nanopartículas (\pm Desvio Padrão)	52

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO	
Figura 1. Estrutura química da 3- HF (C ₁₅ H ₁₀ O ₃)	5
Figura 2. Imagem macroscópico (A) e microscópico (B) da 3- HF	6
Figura 3. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas com a 3- hidroxiflavona (Adaptado de SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).....	9
Figura 4. Fórmula estrutural do PCL	10
 CAPÍTULO I	
Figura 1. Estrutura química da 3- HF a (C ₁₅ H ₁₀ O ₃)	22
Figura 2. Cromatogramas e espectro de UV obtidos da 3-HF. A. Cromatograma da nanocápsula vazia, B. Cromatograma da nanoesfera vazia, C. Cromatograma da nanocápsula com 3-HF, D. Cromatograma da nanoesfera com 3-HF (Condições: Fase móvel constituída por ACN: H ₂ O 65: 35 (v/v) com pH ajustado para 3,0 utilizando ácido acético glacial, fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ e detecção UV a 343 nm obtido por CLAE- DAD); E. Espectro da 3-HF.....	31
Figura 3. Curva média de calibração da 3- hidroxiflavona com 7 níveis de concentrações em triplicata e gráfico de resíduos).....	32
 CAPÍTULO II	
Figura 1. Estrutura química da 3-HF (C ₁₅ H ₁₀ O ₃)	43
Figura 2. Morfologia das linhagens celulares de tumor de mama humano MCF-7 (A) e câncer de pulmão humano A549(B)	49

Figura 3. Fotomicroscopia obtidas por MEV das suspensões de: nanoesferas de 3-HF NS1 (A e B), nanocápsulas de 3-HF NC6 (C e D)..	55
Figura 4. Média da degradação da luz (\pm desvio padrão) da 3-HF livre (3-HF), nanocápsula (NC6) e nanoesfera (NS1) à base da 3-HF	56
Figura 5. Média do perfil de liberação in vitro da 3-HF a partir da dispersão de nanocápsula (NC6), seguida da sua difusão através do saco de diálise. A concentração teórica para dispersão é de 10 ug/mL 3-HF.	58
Figura 6. Média do perfil de liberação in vitro da 3-HF a partir da dispersão de nanocápsula (NS1), seguida da sua difusão através do saco de diálise. A concentração teórica para dispersão é de 10 ug/mL 3-HF.	58
Figura 7. Efeito da 3-hidroxi flavona no crescimento das linhagens celulares tumorais humanas A549 e MCF-7	60
Figura 8. Efeito da 3-hidroxi flavona nanoencapsulada na forma de nanocápsulas (NC6) e nanoesferas (NS1)	61
Figura 9. Indução de apoptose em células de MCF-7 após 48 horas de tratamento com 3-hidroxi flavona na concentração 40, 80 e 160 μ M	62

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

3-HF	3- Hidroxiflavona
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]
A549	Câncer de pulmão humano
IC₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo
Dp	Desvio padrão r
DP	Diâmetro das partículas
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Eficiência de encapsulação
EHL	Equilíbrio hidrófilo lipófilo
PDI	Índice de polidispersão
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
DMEM	Meio de cultivo
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
NC	Nanocápsulas
NS	Nanoesferas
PCL	Poli-ε-(caprolactona)
pH	Potencial hidrogeniônico
PZ	Potencial zeta
SFB	Soro fetal bovino
MCF-7	Tumor de mama

RESUMO

LEMES, RAIANE SILVA. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde – GO, fevereiro de 2017. **Preparação e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo 3-hidroxi-flavona**. Orientadora: Dr.^a Cristiane de Melo Casal. Coorientador: Dr. Paulo Sergio Pereira.

O câncer é denominado um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com enorme potencial invasivo. Mais de 60% dos medicamentos utilizados para o tratamento de câncer tem em alguma instância sua origem relacionada aos produtos naturais e de seus derivados. A 3-hidroxi-flavona (3- HF), por exemplo, é um produto natural que exibe atividade inibitória frente a algumas linhagens de células tumorais. Para melhorar a eficácia desses fármacos, o uso da técnica de nanoencapsulação vem se destacando, por apresentar várias vantagens significativas. Neste contexto, a presente proposta buscou desenvolver nanopartículas de PCL contendo 3- HF, na busca por um fármaco natural encapsulado com atividade antitumoral frente as linhagens de células tumorais humanas MCF-7 (tumor de mama humano) e A549 (tumor de pulmão humano). As nanopartículas poliméricas foram preparadas pela técnica de deposição interfacial/deslocamento do solvente utilizando o polímero PCL- Poli-ε-(caprolactona), diferentes formulações de nanocápsulas e nanoesferas foram preparadas. Para quantificar o teor 3- HF presente em nanopartículas poliméricas, foi necessário desenvolver e validar um método analítico usando cromatografia líquida de alta

eficiência (CLAE-DAD). O método demonstrou ser linear na faixa de 0,125-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($r^2 = 0,9992$). As precisões (intra e inter dia) revelaram um desvio padrão relativo abaixo de 5% e os valores de recuperação da substância ativa (3-HF) presente nas nanocápsulas variaram de 85,29% a 97,11% e nas nanoesferas a recuperação foi de 95,41% e 96,76%. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 0,036 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, o método mostrou ser eficiente e viável. Os diâmetros de partículas das nanocápsulas apresentaram valores médios entre 264,00 e 296,25nm e as nanoesferas entre 240,67 e 261,23nm, o potencial zeta das nanocápsulas ficaram entre -26,33 a -28,33mV, e das nanoesferas foram -25,73 e -27,20mV e o índice de polidispersão das nanocápsulas variaram de 0,34 a 0,59 e das nanoesferas de 0,29 e 0,33, os pHs de todas as nanopartículas ficaram próximo de 6 e as eficiências de encapsulação ficaram acima de 96%. Através da MEV (Microscopia eletrônica de varredura), foi possível visualizar a forma esférica das nanopartículas com superfície lisa e pouca rugosidade. O estudo de degradação mostrou que em 12 horas de exposição à luz, a 3- HF livre teve degradação mais rápida (49,86 %), em comparação com, a 3- HF encapsulada, que apresentou taxa de degradação de 30,43% para a nanocápsula e para a nanoesfera 31,17%, ambas apresentaram um perfil de degradação semelhante. Quanto ao estudo de liberação controlada *in vitro* em 72 horas de ensaio, verificou-se que a difusão da 3- HF nas nanocápsulas foi de 5,01% e nas nanoesferas foi de 7,33%, portanto não houve diferença significativa entre os resultados. A atividade antitumoral *in vitro* revelou que a 3- HF livre exibiu valores de IC_{50} de 118,7 e 207,3 μM para as linhagens A549 (tumor de pulmão humano) e MCF-7 (tumor de mama humano), respectivamente. Já para a 3-HF nanoencapsulada não foi possível calcular o IC_{50} , sendo observada morte celular significativa apenas nas amostras tratadas na linhagem A549.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer, 3-hidroxi flavona, Nanopartículas.

ABSTRACT

LEMES, RAIANE SILVA. Goiás Federal Institute of Education, Science and Technology –Rio Verde Campus – GO, February of 2017. **Preparation and characterization of polymeric nanoparticles containing 3-hydroxyflavone.** Adviser: Dr.^a Cristiane de Melo Cazal. Co- adviser: Dr. Paulo Sergio Pereira.

Cancer is called a set of more than 100 different types of diseases that have in common the disordered growth of abnormal cells with huge invasive potential. More than 60% of medicines used for the treatment of cancer have in some instance their origin related to natural products and their derivatives. The 3-hydroxyflavone (3-HF), for example, is a natural product which exhibits an inhibitory activity against certain tumor cell strains. To improve the efficacy of these drugs, the use of the nano encapsulation technique has been highlighted, as it has several significant advantages. In this context, the present proposal sought to develop 3-HF PCL nanoparticles in the searching for an encapsulated natural drug with antitumor activity against human tumor cell strains MCF-7 (human breast tumor) and A549 (human lung tumor). Polymeric nanoparticles were prepared by the interfacial deposition or solvent displacement technique using PCL-Poly- ϵ - (caprolactone) polymer, and different formulations of nanocapsules and nanospheres were prepared. To quantify the 3-HF content presented in polymer nanoparticles, it was necessary to develop and validate an analytical method using high performance liquid chromatography (CLAE-PAD). The method was linear in the range

of 0.125 - 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($r^2 = 0.9992$). The precision (intra- and inter-day) showed a relative standard deviation below 5% and recovery values of the active substance (3-HF) present in the nanocapsules ranged from 85.29% to 97.11% and in the nanospheres recovery was 95.41, % and 96.76%. The limits of detection (LD) and quantification (LQ) were 0.036 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 0.12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectively, the method was efficient and feasible. The particle diameters of the nanocapsules presented average values between 264.00 and 296.25 nm and the nanospheres between 240.67 and 261.23 nm, the zeta potential of the nanocapsules were between -26.33 to -28.33 mV; And the nanospheres were - 25.73 and -27.20 mV and the polydispersity index of the nanocapsules ranged from 0.34 to 0.59 and the nanospheres from 0.29 and 0.33, the pH of all nanoparticles remained 6 and the encapsulation efficiency was above 96%. Through SEM (Scanning Electron Microscopy), it was possible to visualize the spherical shape of the nanoparticles, with smooth surface and little roughness. The degradation study showed that in 12 hours of exposure to light the nanocapsule and nanosphere presented a similar degradation profile, the encapsulated 3-HF presented a degradation rate of 30.43% and 31.17%, respectively, while free 3-HF had a more rapid degradation at a rate of 49.86%. As for the in vitro controlled release study in 72 hours of the test, the diffusion of 3-HF in the nanocapsule of 5.01% and in the nanosphere was 7.33%, therefore they showed no significant difference between them. In vitro antitumor activity revealed that free 3-HF exhibited IC_{50} values of 118.7 and 207.3 μM for the A549 (human lung tumor) and MCF-7 (human breast tumor), respectively. With nano encapsulated 3-HF, it was not possible to calculate the IC_{50} , and a significant cell death was observed only in samples treated in the strain of A549

Key words: Cancer, 3-hydroxyflavone, Nanoparticles.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Câncer

A palavra câncer tem origem latina (*cancer*), significa “caranguejo” foi utilizada para fazer uma analogia, em relação as características infiltrativas das patas deste crustáceo e correlacionando ao potencial de caráter evolutivo da doença.^{1,2}

O câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas que crescem e se dividem sem respeitar os limites esperados, invadem e destroem tecidos e órgãos vizinhos, e pode se espalhar para diversas regiões do corpo, até mesmo as mais distantes, através de um processo chamado metástase.^{3,4}

O tumor ou também chamado de neoplasia, significa “novo crescimento”, que pode ser classificado como benigno ou maligno. O tumor maligno se caracteriza por apresentar uma rápida divisão e velocidade de multiplicação incontrolável das células no organismo, que tendem a ser muito agressivas.⁴

Diferentemente do tumor benigno, que é apenas uma massa localizada de células que tem semelhança ao seu tecido original, são autolimitados em seu crescimento e não invadem tecidos vizinhos, e que raramente pode constituir um risco de morte, embora alguns tumores benignos sejam capazes de evoluir para malignos.⁴

Diversos fatores podem provocar o desenvolvimento dessa doença, podendo ser externas ou internas ao organismo, ou ambas relacionadas, a maioria dos casos de câncer é causada por fatores externos, que estão associadas ao meio ambiente, hábitos, cultura ou costumes próprios de uma sociedade, alguns exemplos dos fatores de risco

externos são o tabagismo, alcoolismo, alimentação, exposição excessiva ao sol, dentre outros, esses fatores de risco ambientais de câncer atuam alterando a estrutura genética (DNA) das células, já os fatores internos referem-se as condições pré-determinadas geneticamente, hereditárias e biológicas.⁴

Sendo assim, os fatores podem ser classificados como evitáveis e não evitáveis pelos próprios indivíduos, o surgimento do câncer vai depender da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores de câncer, alguns estudos relatam que o aumento da expectativa de vida e os atuais padrões de vida adotados afetam de forma significativa o aumento da incidência do câncer no mundo.^{4,5}

Em geral o processo de desenvolvimento do câncer ocorre por três estágios denominados iniciação, promoção e progressão. No estágio de iniciação as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos que provocam modificações em um ou mais genes, mais ainda não é possível detectar clinicamente o tumor nesse estágio. No estágio de promoção, as células iniciadas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos e são transformadas em células malignas de forma lenta e gradativa. O terceiro e último estágio se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, ou seja, a doença já está instalada, e começa a surgir as primeiras manifestações clínicas da doença. Como o câncer não apresenta sintomas em sua fase inicial, apresenta dificuldade de detectá-la precocemente, pois o processo de desenvolvimento do câncer envolve múltiplas etapas, e em geral essas etapas ocorrem de forma lenta, podendo levar até anos para que uma célula cancerosa se prolifere e conseqüentemente dê origem a um tumor visível.⁴

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública a nível mundial, sendo o responsável por milhões de mortes no mundo. Estima-se que mais de 12 milhões de pessoas no mundo que são diagnosticadas todo ano e cerca de 8 milhões de pessoas morrem por ano por causa dessa doença. Se medidas efetivas não forem tomadas, esse número poderá aumentar cada vez mais de forma drástica, para o ano de 2030 a estimativa é que haverá 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de novas mortes globais,^{4,6,7} gerando imensa preocupação com o impacto que será causado por esta doença.

No Brasil, o câncer é considerado a segunda doença que mais causa morte, ficando atrás apenas por doenças cardiovasculares.⁸ Para destacar a dimensão desse problema no Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) que é o órgão auxiliar do Ministério da Saúde no desenvolvimento e na coordenação das ações integradas para a

prevenção e o controle do câncer no Brasil, publicou uma estimativa para o ano de 2016-2017, que aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer.⁹

Existem quase 100 tipos de câncer que correspondem aos vários tipos de células do corpo.² Com base nas informações divulgadas pelo projeto Globocan, na região da América Latina e do Caribe, em relação aos tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão), sem considerar os tumores de pele não melanoma.¹⁰ O câncer de mama e de pulmão estão entre os mais frequentes, nas mulheres o câncer de mama possui a maior incidência e também provoca a maior mortalidade na população feminina em todo o mundo, já o câncer de pulmão é considerado um dos tipos de câncer mais agressivos, possuindo alta letalidade.⁹

A falta de controle da proliferação celular, diferenciação e morte, que invade órgãos e tecidos, são as características mais pertinentes dessa doença, que provoca muitas dificuldades no tratamento do câncer, as dificuldades mais comuns são a resistência a múltiplas drogas disponíveis atualmente no mercado farmacêutico, à falta de seletividade, toxicidade e baixa especificidade.^{11,12}

O tratamento do câncer vai depender da gravidade da doença e de acordo com o tipo de câncer, geralmente de forma geral, baseia-se na associação da ressecção cirúrgica dos tumores ao tratamento radioterápico e a quimioterapia.¹³ No entanto esse tratamento é muito agressivo ao corpo, as substâncias químicas não atuam em sítios ativo específicos, podendo destruir e inibir o desenvolvimento de células normais, gerando uma série de problemas posteriores ao tratamento, diminuindo a resistência imunológica do organismo, com isso o paciente fica mais vulnerável para sofrer algumas infecções.¹⁴⁻¹⁶

Há muitos anos, o uso de substâncias orgânicas de origem naturais é utilizadas para muitas enfermidades humanas. As fontes naturais estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias orgânicas com grande potencial terapêutico, são mais de centenas de compostos derivados de produtos naturais que já foram testados ou estão em fase de testes clínicos. Grande parte dos medicamentos atuais são derivados diretamente ou indiretamente de micro-organismos, vegetais, entre outros, que são utilizados para o tratamento de diversas doenças principalmente para tratamento do câncer e de doenças infecciosas.^{17,18}

O aumento dos investimentos da indústria farmacêutica nas últimas décadas permitiu a descoberta e o desenvolvimento de novos compostos de origem natural e

desse modo alcançando o sucesso no mercado desses medicamentos.¹⁹ Foram descobertas cerca de 1200 substâncias químicas que possuem propriedades farmacológicas, sendo que 48% desses compostos são de origens naturais.²⁰ Aproximadamente 28% dos medicamentos que estão disponíveis no mercado possuem princípios ativos isolados de produtos naturais ou semissintéticos e 24% são sintéticos mas que são baseados em estruturas de produtos naturais.¹⁸ Em relação aos fármacos antitumorais nas últimas décadas foram introduzidos cerca de 60% de medicamentos que têm sua origem de produtos naturais de plantas, microrganismos, animais ou derivados destes.²⁰

O uso de substâncias naturais trata-se de uma ferramenta atrativa para a busca de novos fármacos, que podem ser utilizados para o tratamento de diferentes patologias, os produtos naturais possuem uma vasta diversidade química, especificidade bioquímica e elevada afinidade relacionada a ligação em receptores específicos, associada a amplo potencial biológico.²¹ Podem ser utilizados diretamente ou como modelos (*lead structures*) para o desenvolvimento de novas classes de fármacos, se tornando uma importante fonte de protótipos que ainda tem muito a ser explorada.²²

Ao longo dos anos vários agentes quimioterapêuticos foram descobertos e desenvolvidos para o tratamento do câncer, sendo isolados a partir de fontes naturais como vimblastina e vincristina (extraída a partir de *Catharrantus roseus*), etoposido e teniposide (extraído de *Podophylun peltatum* L.) e paclitaxel (extraiu-se a partir de *Taxus brevifolia*) que são medicamentos importantes introduzidos na terapia do câncer.²³ Assim a procura se torna cada vez constante e as linhas de pesquisa continuam a se expandir para encontrar novos compostos fitoquímicos anticancerígenos e antitumorais mais eficazes e com baixa toxicidade.^{24,25}

1.2 - 3-Hidroxiavona

Os flavonoides (compostos polifenólicos) representam o maior grupo de metabólito secundário, que têm se destacado por apresentar diversas atividades biológicas, tais como antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, anticarcinogênica, vasodilatadora, efeitos estrogênicos, hepatoprotetora e estimulante imunológico dentre outras, e assim contribuído significativamente com a medicina.²⁶⁻²⁸

Diversos autores destacam os flavonoides como inibidores de câncer por apresentar atividades antioxidantes, controlar a proliferação celular, a inativação dos

carcinógenos e modular enzimas do metabolismo carcinogênico, a indução da inibição do ciclo celular e apoptose, a reversão da resistência a fármacos múltiplos, ou uma combinação destas atividades.^{23,29,30}

Estudos epidemiológicos indicaram que consumo diário de flavonoides por meio de alimentos assegura a redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares, por apresentar atividade antioxidante.³¹ Knekt e colaboradores (2002)³² encontraram relação inversa entre o consumo de flavonoides e o menor risco de incidência de câncer pulmão, próstata e mama.

Essas propriedades dos flavonoides que lhe competem podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar radicais livres, (as quais estão relacionados à presença de grupos hidroxila na estrutura dos flavonoides). Os flavonoides podem atuar em vários níveis do processo cancerígeno, como por exemplo, na prevenção da mutação dos genes, inibindo a carcinogênese química (geração de radicais livres endógenos, radiação ultravioleta e raios-X) e biológica (bactéria *Helicobacter pylori* causadora da úlcera estomacal, e associada ao desenvolvimento de câncer no estômago e alguns vírus).³³

Um flavonoide que vem se destacando por apresentar diversas funções biológicas é a 3-hidroxi-2-fenilcromen-4-ona (3- HF), ou de acordo com a nomenclatura da IUPAC: 3-hidroxi-2-fenilcromen-4-ona (Figura 1). A sua estrutura química possui apenas um grupo hidroxila localizada na posição 3 no anel C, apresenta fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_3$, na qual é composta por grupos ceto, enol, éter e um grupo fenil.³⁴

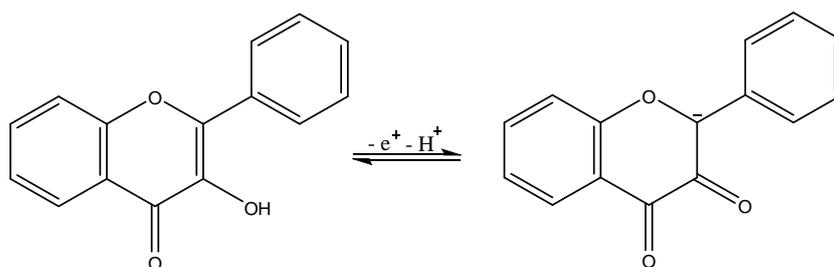


Figura 1. Estrutura química da 3- HF ($C_{15}H_{10}O_3$)

Entre as principais propriedades químicas gerais dessa substância, pode-se destacar a coloração amarelada (Figura 2A), cristais em formato de agulhas (Figura 2B), massa molar de 238,23g/mol e ponto de fusão 171-172 ° C. É uma molécula hidrofóbica, com pouca solubilidade em água (28,9 mg.L⁻¹, a 25 ° C),^{35,36} que limita a sua aplicação clínica.

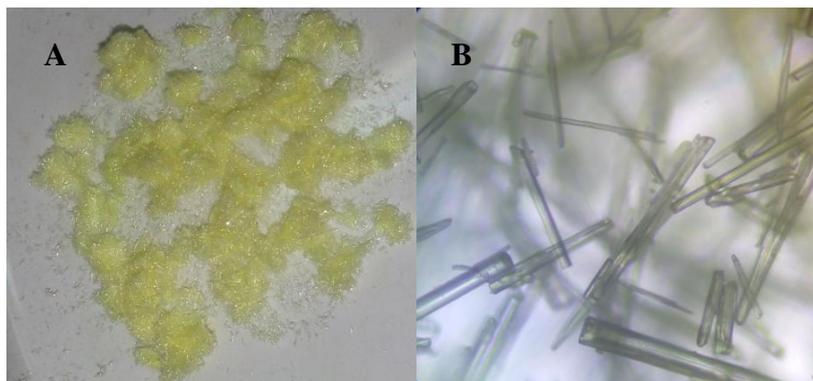


Figura 2. Imagem macroscópico (A) e microscópico (B) da 3- HF. (Lente objetiva de 40x). (Fonte própria).

A 3- HF é a molécula mais simples e comum da subclasse dos flavonoides (flavonóis). Os flavonóis são conhecidos por serem os mais reativos, principalmente pela presença do grupo 3-OH livre.³⁷ De acordo com Calabrò e colaboradores (2004) a fotoestabilidade da 3-HF em solução foi investigada sob exposição forçada a radiação UV-A. De acordo com os resultados, após 11 minutos de irradiação foi possível detectar por CLAE a presença de nove produtos originados da fotodegradação, demonstrando grande instabilidade perante a luz.³⁸ Em outro trabalho verificaram que a fotoestabilidade de 3-HF em solução também era afetada pela polaridade dos solventes utilizados, por diferentes valores de pH e por diferentes comprimentos de onda de irradiação.³⁹

Outro estudo avaliou o efeito supressor dessa substância sobre a citotoxicidade do hidroperóxido de ácido linoleico (LOOH) em relação às células PC12 de feocromocitoma de rato, os resultados mostraram que a 3-HF foi eficaz contra o estresse oxidativo e que a ingestão adequada dos flavonoides pode ser benéfica para células sob condições de estresse oxidativo.⁴⁰

Alguns estudos demonstraram que a 3- HF apresenta uma característica específica em que pode ser utilizada como agente quelante por se ligar a íons metálicos, A presença do grupo 3-hidroxila permite a formação do complexo envolvendo o grupo funcional carbonila.⁴¹ Também pode ser utilizada para o tratamento de algumas doenças como diabetes utilizando o complexo de 3-HF-zinco⁴² e da tuberculose com o uso do complexo de 3-HF- cobre.⁴³ Além disso, a 3- HF também apresentou atividade inibitória *in vitro* contra doenças negligenciadas, tais como doença de Chagas e a leishmaniose, apresentando IC₅₀ de 2,94 e 3,30 μM respectivamente, em comparação com a miltefosina (IC₅₀ 2,72 μM) que é a droga padrão usada em ensaios biológicos.⁴⁴

Outra atividade biológica no qual a 3-HF também se destacou foi sua ação antitumoral.⁴⁵ Por ser extremamente antioxidante, modula a via de sinalização de uma ampla variedade de processos, incluindo o crescimento celular, diferenciação e sobrevivência celular.⁴⁶⁻⁴⁸

De acordo com Lang e colaboradores (2010)⁴⁹ a 3-HF demonstrou ser um inibidor potente da proteína Aurora B, que apresentou o IC₅₀ de 1,071 µM, no qual diminuiu e inibiu o nível de fosforilação de histona H3 mitótico, e induziu a inibição da proliferação em diferentes linhas celulares de câncer, apresentando os seguintes valores de IC₅₀: 7,2 µM em A375 (melanoma Humano), 14,2 µM em MCF-7 (tumor de mama), 19,1µM em H1299- carcinoma de células não pequenas do pulmão, 30,9 µM em SK-OV-3- carcinoma do ovário, 39,2µM em SK-Hep1 - adenocarcinoma do fígado, 39,4 µM em SW620- carcinoma do cólon entre outros.

Lin e colaboradores (2007)⁵⁰ mostraram que a 3-hidroxi-flavona exibe atividade inibitória sobre a E2 (17 β- estradiol) / IGF-I (Fator de crescimento Semelhante à Insulina) e na proliferação de células MCF-7 (tumor de mama). De acordo com Cazal e colaboradores (2013)²³ esta substância inibiu o crescimento de MCF-7 (tumor de mama), NCI-H460 (câncer de células não pequenas de pulmão) e A375-C5- melanoma, apresentando GI₅₀ (concentração mínima que inibe 50% da proliferação celular) menor que 8,30 µM, além disso, induziu cerca de 30% de morte celular por apoptose.

Ademais, a 3-HF foi a mais eficaz comparado com outros flavonoides na redução significativa da viabilidade das células A549 (câncer de pulmão) e K562-S (leucemia) e nenhum efeito citotóxico foi observado nos grupos de células normais (HaCaT e MDCK). Posteriormente verificou-se que a 3-HF em combinação com mesilato de imatinibe resultou na morte celular significativa por apoptose em células de leucemia, apresentando IC₅₀ em células K562-S (191,9µM) e K562-R (234,3 µM) com a combinação de 3-HF com mesilato de imatinibe, esse valor foi reduzido para 2,1 µM e 28,9 µM respectivamente, a 3-HF sozinha resultou em apoptose mínima (menos de 10%) e no tratamento com a combinação a percentagem de células em apoptose foi aumentada para 35-40%, mostrando o efeito sinérgico do fármaco.⁵¹

A alta potência e baixa toxicidade da 3- HF, torna uma alternativa viável para drogas terapêuticas convencionais. No entanto, em certas ocasiões as aplicações são muitas vezes limitadas pela baixa solubilidade em água, portanto há grande interesse na utilização de nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos, os quais são

capazes de assegurar o aumento da hidrossolubilidade, e conseqüentemente, melhorar a biodisponibilidade destes fármacos lipossolúveis.⁵²

Por apresentar diversas atividades biológicas, alguns autores sugerem mais estudos com essa substância, é necessário compreender a ação terapêutica de 3-HF sobre a base molecular, exigindo o conhecimento do seu modo de interação com outros alvos biológicos, especialmente o DNA e proteínas,⁵³⁻⁵⁵ que permite explorar as características estruturais e funcionais das biomacromoléculas para decifrar seus processos biofísicos.⁴⁸

1.3 - Nanotecnologia associada com o câncer

Após alguns anos de estudos, tem-se percebido que apenas o desenvolvimento de novos fármacos não é suficiente para assegurar o progresso da terapia medicamentosa, também é necessário buscar novas alternativas para melhorar a eficácia do tratamento de doenças neoplásicas avançadas, e investigar estratégias capazes de superar os efeitos secundários de toxicidade e efeitos adversos desses medicamentos.⁵⁶

A nanotecnologia é uma técnica inovadora e promissora que oferece várias vantagens para o tratamento de muitas doenças, inclusive do câncer, que apresenta diversas dificuldades de tratamento, entre elas pode se destacar a resistência que algumas células tumorais têm ao efeito citotóxico de alguns quimioterápicos.^{57,58}

A eficiência do tratamento de câncer possui algumas limitações por vários fatores peculiares, tais como a pobre absorção de alguns fármacos em células cancerosas, desintoxicação e eliminação eficiente dos fármacos, além disso, existe a falta de seletividade muito grande dos fármacos anticancerígenos em relação ao local afetado pelo tumor, não preservando as células normais de suas ações devastadoras, e assim provocam efeitos secundários graves aos pacientes que utilizam esses medicamentos, conseqüentemente resultando baixa eficiência do tratamento.⁵⁹ A maioria das drogas anticâncer tem baixa solubilidade em água, rápido metabolismo e eliminação, baixa seletividade do tumor e efeitos secundários para os tecidos saudáveis e a incapacidade para atravessar barreiras celulares, limitando assim o seu uso clínico.^{56,60,61}

Diante dessas dificuldades se torna perceptível a necessidade de identificar, avaliar e desenvolver novos e mais eficientes fármacos para o tratamento do câncer. Por isso durante a última década, tem aumentado o interesse no uso da nanotecnologia para

a terapia do câncer, podendo trazer avanços significativos proporcionando uma solução mais eficiente e menos prejudicial por superar as limitações encontradas em quimioterapia convencional.⁶² A aplicação de sistemas de liberação controlada em fármacos tem a finalidade de melhorar o transporte e as propriedades dos fármacos quimioterápicos.⁶³ Além disso, é fundamental não só encontrar o alvo adequado no tumor mas também buscar fármacos que tratem com sucesso esta doença, mas também é necessário determinar a forma de transportar o fármaco.⁶⁴

A associação da nanotecnologia com o desenvolvimento de novos fármacos fornece várias vantagens como a liberação controlada dos princípios ativos encapsulados. Em tal forma o fármaco é gradualmente liberado ao contrário de algumas formulações convencionais, ademais promove o aumento da solubilidade do quimioterápico, é possível melhorar a biodisponibilidade, tempo de metabolização, a proteção da degradação prematura e interação com o ambiente biológico de sua inativação antes de chegar ao seu local de ação, facilitando a penetração intracelular almejando a distribuição mais seletiva, aumentando a especificidade, tolerabilidade, reduzindo os gastos do paciente, diminui a necessidade de altas doses e o número de uso e os riscos de toxicidade, e assim aumentando o índice terapêutico desses medicamentos e reduzindo os efeitos colaterais indesejáveis.⁶⁵⁻⁶⁷

As nanopartículas podem ser classificadas em dois sistemas diferentes: nanoesferas e nanocápsulas.⁶⁸⁻⁷⁰ As nanocápsulas – NC (Figura 3) são constituídas por uma parede polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, em que o composto ativo fica confinado numa cavidade rodeada por uma membrana polimérica, já as nanoesferas – NE não contêm o núcleo oleoso em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica, em que a substância é dispersa por todo o polímero, na sua superfície, no seu interior ou dissolvido na matriz, como mostrado na Figura 3.^{68,71-74}

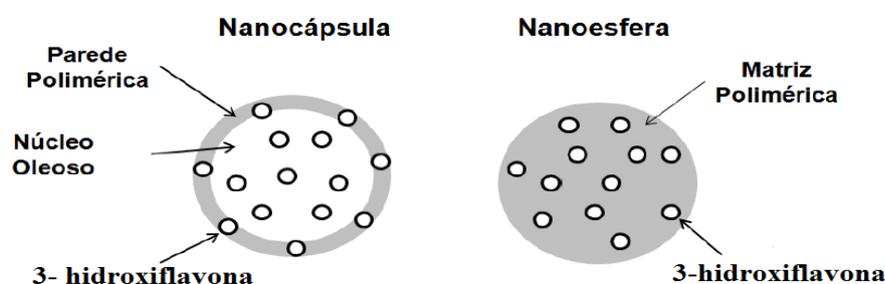


Figura 3. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas com a 3-hidroxi-flavona (Adaptado de SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).⁶⁸

As nanopartículas poliméricas são sistemas que apresentam diâmetro inferior a 1µm, que promovem a liberação controlada do princípio ativo em velocidade e condições específicas.⁷⁵ As nanopartículas poliméricas são frequentemente empregadas nas pesquisas, quando comparadas com outros sistemas coloidais apresentam maior estabilidade em fluidos biológicos e ao armazenamento, além da matéria-prima ser de fácil obtenção.⁷⁶

As nanopartículas podem ser preparadas a partir de polímeros de origem sintética ou natural.⁷⁷ Entre os principais polímeros sintéticos que podem ser utilizados na preparação de nanopartículas, pode-se citar o polímero Poli-ε-caprolactona (PCL). É um poliéster alifático (Figura 4) que possui baixo ponto de fusão (cerca de 60 °C) se caracteriza por ser um polímero biocompatível e biodegradável. Que apresenta simplicidade na preparação de nanopartículas, alta eficiência de encapsulação, dispersão de moléculas pouco polares em meio aquoso e elevada estabilidade das dispersões coloidais.^{61,78}

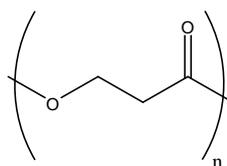


Figura 4. Fórmula estrutural do PCL

O PCL é amplamente utilizado em aplicações de administração de fármacos, apresenta boas propriedades físicas, no ponto de vista econômico é relativamente barato, além de não causar reação inflamatória nem tóxica, é estável, degrada-se de acordo com o processo em que está sendo utilizado, se degrada muito lentamente *in vitro* na ausência de enzimas e também *in vivo*, também é bastante permeável e facilmente excretado pelo organismo.^{79,80}

Em um estudo o PCL foi testado de forma isolada para verificar a sua ação nas na linhagem celular MCF-7, as células ficaram intactas permanecendo completamente viáveis, assegurando que o polímero não induziu qualquer citotoxicidade.⁸¹ Dentre estes, sistemas coloidais poliméricos têm recebido considerável atenção particularmente àqueles preparados com polímeros que não apresentam atividade biológica e são facilmente degradados *in vivo*.⁸²

Entre as técnicas mais utilizadas para o preparo de nanopartículas poliméricas, a partir de polímeros pré-formados pode-se destacar o método de nanoprecipitação ou

também chamado de deposição interfacial/deslocamento do solvente. É considerada uma das técnicas mais simples, econômica, reprodutível e rápida.^{83, 84}

Independente do método utilizado para a obtenção das nanopartículas é de extrema importância caracterizar as nanopartículas poliméricas, para ter o conhecimento do comportamento do sistema em interesse. Os parâmetros físico-químicos que normalmente são avaliados durante os estudos de estabilidade são o diâmetro de partícula, o potencial zeta, a eficiência de encapsulação do fármaco, degradação acelerada, avaliação morfológica, avaliação da toxicidade em cultura de células, avaliação da interação entre fármaco e polímero e determinação da cinética de liberação do fármaco em função do tempo (liberação *in vitro*).⁸⁴

E esses conjuntos de informações obtidas pela caracterização das nanopartículas são muito relevantes, para compreender a proposição de modelos que descrevem a organização das nanopartículas em nível molecular que depende da composição qualitativa e quantitativa de formulações.⁶⁸

Considerando as propriedades terapêuticas da 3- hidroxiflavona e as diversas vantagens proporcionadas pelas nanopartículas poliméricas, torna-se uma alternativa viável a combinação dessa técnica com os produtos naturais na tentativa de encontrar fármaco mais específicos e com menos efeitos colaterais para o tratamento do câncer, contribuindo de forma significativa no tratamento do câncer para as linhagens A549 (tumor de pulmão humano) e MCF-7 (tumor de mama humano).

1.4 - Referências Bibliográficas

1 - Fernandes Júnior, H. J.; Em *Introdução ao estudo das neoplasias*. In: Bacarat, F. F.; Fernandes Júnior, H. J.; Silva, M. J. (Orgs.). *Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar*, São Paulo: Roca, 2000, p. 5-10.

2 - Almeida, V. L.; Leitão, A.; Reina, L. D. C. B.; Montanari, A.; Donnici, C. L.; *Quim. Nova* **2005**, 28, 118.

3 - World Cancer Report. 2014: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> , acessada em Dezembro 2016.

- 4 - Inca- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, *Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil*, Coordenação de Prevenção e Vigilância, INCA **2014**, Rio de Janeiro.
- 5 - David, A. R.; Zimmerman, M. R.; *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 728.
- 6- Allen, T. M.; Cullis, P.R.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 36.
- 7 - Iyer, A.K.; Greish, K.; Fang, J.; Maeda, H. ; *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 812.
- 8 - Guerra, M. R.; Gallo, C. V. M.; Mendonça, G. A. S. ; *Rev. Bras. Cancerol.* **2005**, *51*, 227.
- 9 - Inca- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, *Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil*, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância, INCA **2015**, Rio de Janeiro.
- 10 - Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F.; *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, 359.
- 11 - Mesquita, M. L.; Araújo, R.M.; Bezerra, D. P.; Braz Filho, R.; Paulab, J. E.;Silveira, E. R.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Lotufoc, L. V. C.; Espindola, L.S.; *Science Direct Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 623.
- 12 - Rawat, D. S.; Singh, R.;; *Anti-Cancer Agents-Med. Chem.* **2013**, *13*, 1551.
- 13 - Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; Alves, A. P. N. N., Madeira, S. V. F.; Pessoa, C.; Moraes, M. E. A.; Moraes, M. O.; *Rev. Virtual Quim* **2010**, *2*, 48.
- 14 - Lejeune, M.; Sariban, E.; Cantinieaux, B.; Ferster, A.; Devalck, C.; Fondu, P.; *Pediatr Res* **1996**, *39*, 835.
- 15 - Rahman, Z.; Esparza-Guerra, L.; Yap, H. Y.; Frascini, G.; Bodey, G.; Hortobagyi, G.; *Cancer* **1997**, *79*, 1150.

16 - Mendonça, M. A. O.; Cunha, F. Q.; Murta, E. F. C.; Tavares-Murta, B. M.; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *57*, 663.

17 - Harvey, A. L.; *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 894.

18 - Brandão, H. N.; David, J. P.; Couto, R. D.; Nascimento, J. A. P.; David, J. M.; *Quim. Nova.* **2010**, *33*, 1359.

19 - Dimasi, J. A.; Grabowski, H. G.; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 209.

20 - Newman, D. J.; Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461.

21 - Molinari, G.; *Adv Exp Med Biol.* **2009**, *655*, 13.

22 - Veiga, T.A.M.; Gonzáles-Vázquez, R. Oiano Neto, J.; Da Silva, M. F.G.F.; King-Díaz, B.; Lotina-Hennessen, B.; *Arch. Biochem. Biophys* **2007**, *465*, 38.

23 - Casal, C. M.; Choosang, K.; Severino, V.G.P.; Fernandes, J.B.; Silva, M.F.G.F.; Vieira, P.C.; Nascimento, M.S.J.; Almeida, G.M.; Vasconcelos, M.H.; Pakkong, P.; Pinto, M.M.M.; *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 1582.

24 - Aslani, A.; Smith, R. C.; Allen, B. J.; Pavlakis, N.; Levi, J.; *Cancer* **2000**, *88*, 796.

25 - Attoub, B.; Hassan, A. H.; Vanhoecke, B.; Iratni, R.; Takahashi, T.; Gaben, A., Bracke, M.; Awad, S.; John, A.; Kamalboor, A. H.; Sultan, M. A. A.; Arafat, K.; Gespach, C.; Petroianu, G.; *Eur. J. Pharmacol* **2011**, *651*, 18.

26 - Havsteen, B. H.; *Pharmacol. Ther.* **2002**, *96*, 67.

27 - Machado, H.; Nagem, T. J.; Peters, V. M.; Fonseca, C. S.; Oliveira, T. T.; *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução* **2008**, *27*, 33.

- 28 - Mellou, F.; Lazari, D.; Skaltsa, H.; Tselepis, A. D.; Kolisis, F. N.; Stamatis, H.; *J. Biotechnol* **2005**, 116, 295.
- 29 - Kanadaswami, C.; Lee, L.T.; Lee, P. P.; Hwang, J. J.; Ke, F. C.; Huang, Y. T.; Lee, M. T.; *In Vivo* **2005**, 19, 895.
- 30 - Wang, S.; Zhang, J.; Chen, M.; Wang, Y.; *Expert Opin. Drug Delivery* **2013**, 10, 1411.
- 31 - Wang, S.; Huang, K.; *J. Chromatogr. A* **2004**, 1032, 179.
- 32 - Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Järvinen, R.; Rissanen, H.; Heliövaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T.; Aromaa, A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, 76, 560.
- 33 - López-Lázaro, M.; *Curr. Med. Chem.* **2002**, 2, 691.
- 34 - Araújo, A. S.; *Dissertação de Mestrado*, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Brasil, 2008.
- 35 - Pubchem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11349#section=Melting-Point>, acessada em Novembro 2016.
- 36- EPA: <http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episutedl.htm>, acessada em Novembro 2016.
- 37 - Christoff, M.; Toscano, V. G.; Baader, W. J.; *J. Photochem.* **1996**, 101, 11.
- 38 - Calabrò, M. L.; Tommasini, S.; Raneri, D.; Donato, P.; Ficarra, P.; Ficarra, R.; *J. Chromatogr. B* **2004**, 800, 245.
- 39 - Tommasini, S.; Calabrò, M. L.; Donato, P.; Raneri, D.; Guglielmo, G.; Ficarra, P.; Ficarra R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 35, 389.

- 40 - Sasaki, N.; Toda, T.; Kaneko, T.; Baba, N.; Matsuo, M.; *Biol. Pharm. Bull* **2002**, *25*, 1093.
- 41 - Dangleterre, L.; Cornard, J. P.; Lapouge, C.; *Polyhedron* **2008**, *27*, 1581.
- 42 - Vijayaraghavan, K.; Iyyam Pillai, S.; Subramanian, S. P.; *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *680*, 122.
- 43 - Joseph, J.; Nagashri, K.; Janaki, G. B.; *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *49*, 151.
- 44 - Tasdemir, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Yardley, V.; Schmidt, T. J.; Tosun, F.; Ruedi, P.; *Antimicrob. Agents Chemother* **2006**, *50*, 1352.
- 45 - Dornas, W. C.; Oliveira, T. T. D.; Rodrigues-Das-Dores, R. G.; Santos, A. F. D.; Nagem, T. J.; *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **2007**, *28*, 241.
- 46 - Johnsonand, G.L.; Lapadat, R.; *Science* **2002**, *298*, 1911.
- 47 - Lee, E.R.; Kang, Y.J.; Kim, H.J.; Choi, H. Y.; Kang, G. H.; Kim, J.H.; Kim, B. W.; Jeong, H. S.; Park, Y. S.; Cho, S. G. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *104*, 259.
- 48 - Xu, B.; Yang, G.; Ge, S.; Yin, T.; Hu, M.; Gao, S.; *J. Pharmaceut. Biomed* **2013**, *85*, 245.
- 49 - Lang Q, Zhang H, Li J, Xie F, Zhang Y, Wan B, Yu, L.; *Mol Biol Rep* **2010**; *37*, 1577.
- 50 - Lin, H.; Xingyue. E.; Lee, P. L.; Elisa, S.; Zhenyu, X.; Yu ,L.; Wen, X.; Lars, Z.; Jill, M.; Dana, R.; Aimee , L. J.;Peter, S. L.; Caifu, C.; Scott, W. L.; Michele, A. C.; Gregory, J. H.; *Journal of Science* **2007**, *447*, 1130.
- 51 - Kim, J.H.; Song, M. G.H. ; Kang, E.R.; Lee, H.Y. ;Choi, C. ;Lee, Y.; Kim, B.N.; Koo, S.G. C.; *Leuk. Res.* **2012**, *36*, 1157.

- 52 - Banerjee, A.; Sengupta, P. K.; *Chem. Phys. Lett.* **2006**, 424, 379.
- 53 - Shyamala, T.; Mishra, A. K.; *Photochem. Photobiol.* **2004**, 80, 309.
- 54 - Guharay, J.; Chaudhuri, R.; Chakrabarti, A.; Sengupta, P. K.; *Spectrochim. Acta, parte A* **1997**, 53, 457.
- 55 - Chaudhuri, S.; Banerjee, A.; Basu, K.; Sengupta, B.; Sengupta, P. K.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, 41, 42.
- 56 - Mehnert, W.; Mäder, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 47, 165.
- 57 - Gao, Z.; Zhang, L.; Sun, Y. *J. Controlled Release.* **2012**, 162 , 45.
- 58 - Cunha, C. R. A.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2014.
- 59 - Yurgel, V.; Collares, T.; Seixas, F.; *Braz J Med Biol Res.* **2013**, 46, 486.
- 60 - Ji, S. R.; Liu, C.; Zhang, B.; Yang, F.; Xu, J.; Long, J.; Jin, C.; Fu, D. L.; Ni, Q, X, Yu, X.; *J. Biochim Biophys Acta.* **2010**; 1806, 29.
- 61 - Cazo, N. A.; Pereira-Filho, E. R.; Silva, M F. G. F.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Puhl, A. C.; Polikarpov, I.; Forim, M. R.; *Orbital: Electron. J. Chem.* **2012**, 4, 1585.
- 62 - Gu, F. X.; Karnik, R.; Wang, A. Z. , Alexis, F.; Levy-Nissenbaum, E.; Hong, S.; Langer, R. S.; Farokhzad, O. C.; *Nanotoday* **2007**, 2, 14.
- 63 - Lapenda, T. L. S.; Morais, W. A.; Almeida, F. J. F.; Ferraz, M. S.; Lira, M. C. B.; Santos, N. P. S.; Maciel, M. A. M.; Santos-Mgalhães, N. S.; *J. Biomed. Nanotechnol.* **2012**, 9, 499.
- 64 - Danhier, F.; Feron, O.; Pr at, V.; *J. Controlled Release* **2010**, 148, 135.

- 65 - Teixeira, M.; Alonso, M. J.; Pinto, M. M.M; Barbosa, C. M.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 59, 491.
- 66 - Blanco, E.; Hsiao, A.; Mann, A.P.; Landry, M.G.; Meric-Bernstam, F.; Ferrari, M.; *Cancer Sci.* **2011**; 102, 1247.
- 67 - Venditto, V.J.; Szoka, F.C.J.; *Adv Drug Deliv Rev.* **2013**, 65, 80.
- 68 - Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R.; *Quim. Nova* **2003**, 26, 726.
- 69 - Anton, N.; Benoit, J. P.; Saulnier, P.; *J. Controlled Release* **2008**, 128, 185.
- 70 - Lino, R.C.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2012.
- 71 - Vauthler-Holtzschere, C.; Benabbou, S.; Spenlehauer, G.; Veillard, M.; Couvreur, S. T. P.; *Pharm Sciences* **1991**, 1, 109.
- 72 - Allémann, E.; Gurny, R.; Doekler, E.; *Eur J Pharm Biopharm.* **1993**;39, 173.
- 73 - Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Ammoury, N. Benita, S.; *Int. J. Pharm.* **1989**, 55, R1-R4.
- 74 - Severino, P., Santana, M. H.; Malmonge, S.M.; Souto, E.B.; *Polímeros* **2011**, 21, 361;
- 75 - Souza, P. S.; Lobo, F. A.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F.; *Quim. Nova* **2012**, 35, 132.
- 76 - Domingues, G. S.; Guterres, S. S.; *Quim. Nova* **2008**, 31: 1966.
- 77 - Akagi, T.; Baba, M.; Akashi, M.; *Polymer.* **2007**, 48, 6729.
- 78 - Rosa, D. S.; Penteadó, D. F.; Calil, M. R.; *Rev. Ciênc. Tecn.* **2000**, 15, 75.

79 - Ponsart, S.; Coudane, J.; Vert, M.; *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 275.

80 - Nair, L.S.; Laurencin, C.T.; *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 762.

81 - Chawla, J. S.; Amiji, M. M.; *Int. J. Pharm* **2002**, *249*, 127.

82 - Lima, M. L.; Albuquerque, C. N.; *Rev. Bras. Farm.* **2012**, *93*, 493.

83 - Vauthier, C., Bouchemal, K.; *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 1025.

84 - Lassale, V.; Ferreira, M. L.; *Journal Macromolecular Bioscience* **2007**. , *7*, 767

85 - Soares, M. V.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal Do Rio De Janeiro, Brasil, 2014.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Os objetivos gerais deste trabalho foram preparar e caracterizar nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona (PCL) contendo 3-HF e avaliar a ação antitumoral *in vitro* da 3-HF livre e encapsulada frente as linhagens A549 (tumor de pulmão humano) e MCF-7 (tumor de mama humano).

2.2 - Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar o método cromatográfico por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) para determinar a quantidade de 3- HF em nanopartículas;
- Preparar e caracterizar as suspensões coloidais de nanopartículas contendo 3-HF;
- Realizar estudos de liberação controlada da 3-HF e verificar o efeito fotoprotetor do nanossistema sobre a 3-HF contida nas nanopartículas;
- Investigar o IC₅₀ (concentração que inibe 50% da proliferação celular) da 3-HF livre e nanoencapsulada nas linhagens celulares tumorais humanas A549 (tumor de pulmão humano) e MCF-7 (tumor de mama humano).

3 - CAPÍTULO I: Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de 3-hidroxi flavona em nanopartículas poliméricas

(Normas de acordo com a revista Química Nova)

RESUMO

A 3-hidroxi flavona é um flavonoide natural que apresenta várias atividades biológicas, uma em destaque é sua atividade antitumoral frente a algumas linhagens de células cancerígenas. A nanotecnologia pode ser um recurso propício para auxiliar os benefícios desse composto e minimizar seus efeitos colaterais. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) para quantificar o teor 3-hidroxi flavona presente em nanopartículas poliméricas biodegradáveis. O método demonstrou ser linear na faixa de 0,125 -10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r = 0,9993$). As precisões (intra e inter dia) revelaram um desvio padrão relativo abaixo de 5% e os valores de recuperação da substância ativa presente nas nanocápsulas variaram de 107,91% a 115,63% e nas nanoesferas a recuperação variou de 108,89% a 115,48%. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 0,036 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. A metodologia analítica desenvolvida foi seletiva, reprodutível, linear, exata e precisa. O método mostrou ser eficiente e viável para aplicação na análise quantitativa de 3-hidroxi flavona presente em nanopartículas poliméricas.

Palavras-chave: Validação. 3-hidroxi flavona. CLAE. Nanopartículas.

3 - CHAPTER I: Development and validation of analytical method by high efficiency liquid chromatography for quantification of 3-hydroxyflavone in polymeric nanoparticles

(Standards in accordance with the Química Nova magazine)

ABSTRACT

3-hydroxyflavone is a natural flavonoid that shows several biological activities including its anti-tumor activity against some cancer cell lines. Nanotechnology can be a valuable resource to aid the benefits of this flavonoid and to minimize its side effects. In this context, the main goal of this work was to develop and to validate a specific analytical method using CLAE-PAD for the quantification of 3-hydroxyflavone in biodegradable polymeric nanoparticles. The method was linear in the range of 0.125-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (r 0.9993). The precision (intra- and inter-day) revealed a relative standard deviation below 5% and recovery values of the active substance present in the nanocapsules ranged from 107.91% to 115.63% and in the nanospheres recovery varied from 108.89% to 115.48%. The limits of detection (LD) and quantification (LQ) were 0.036 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.12 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The analytical methodology developed here was selective, specific, linear, accurate and precise. Moreover, the method showed to be efficient and feasible for application in the quantitative analysis of 3-hydroxyflavone present in biodegradable polymeric nanoparticles.

Key words: Flavonoid, nanospheres, nanocapsules, validation analytical method.

3.1 - INTRODUÇÃO

A 3-hidroxi flavona (3-HF), ou de acordo com a nomenclatura da IUPAC: 3-hidroxi-2-fenilchromen-4-ona é um composto químico com fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_3$ que possui apenas um grupo hidroxila na sua estrutura (Figura 1). Apresenta massa molar de $238,23 \text{ g.mol}^{-1}$, pertence à classe dos flavonoides, tem atraído bastante interesse pelo seu papel na defesa da atividade antioxidante celular e extracelular, além disto oferece inúmeras propriedades benéficas na saúde humana, como o tratamento diversas doença, incluindo o câncer.¹⁻⁷

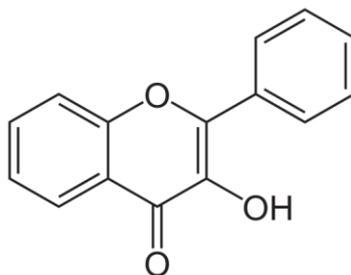


Figura 1. Estrutura química da 3-Hidroxi flavona ($C_{15}H_{10}O_3$)

A 3-HF possui várias funções biológicas e, por ser extremamente antioxidante, modula a via de sinalização de uma ampla variedade de processos, incluindo o crescimento celular, diferenciação e sobrevivência celular.⁸ Lin e colaboradores⁹ mostraram que a 3-HF exibiu uma atividade inibitória sobre E2 (17- β -estradiol)/ IGF-I (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina) na proliferação de células MCF-7. Em outro trabalho, a 3-HF inibiu o crescimento de adenocarcinoma de mama (MCF-7), câncer de células não pequena de pulmão (NCI-H460) e melanoma (A375-C5), apresentando GI_{50} (inibição 50% do crescimento celular) menor que $8,30 \mu\text{M}$, além disso, induziu cerca de 30% de morte celular por apoptose.⁴

Ademais, a 3-HF foi a mais eficaz comparado com outros flavonoides na redução significativa da viabilidade das células de cancro do pulmão (A549), bem como leucemia (K562-S) e nenhum efeito citotóxico foi observado nos grupos de células normais (HaCaT e MDCK), posteriormente verificou-se que a 3-HF em combinação com mesilato de imatini resultou na morte celular significativa por apoptose em células de leucemia, apresentou IC_{50} de células K562-S ($191,9 \mu\text{M}$) e K562-R ($234,3 \mu\text{M}$) com a combinação de 3-HF com mesilato de imatini, esse valor foi reduzido para $2,1 \mu\text{M}$ e $28,9 \mu\text{M}$ respectivamente, a 3-HF sozinha resultou em apoptose mínima (menos de

10%). No entanto, no tratamento com a combinação a percentagem de células em apoptose foi aumentada para 35-40%, mostrando o efeito sinérgico do fármaco.¹⁰

A nanotecnologia pode ser utilizada como um recurso para ampliar a atividade antitumoral de princípios ativos que possuem esta propriedade uma vez que a encapsulação pode promover a liberação controlada, pode reduzir a necessidade de altas doses e o número de administrações do fármaco por dia. Além destas vantagens, as nanopartículas podem proteger os compostos encapsulados contra a inativação antes de chegarem ao seu local de ação e assim aumentar a penetração intracelular e consequentemente melhorar a atividade farmacológica.¹¹⁻¹⁴

O termo nanopartículas é o nome geral usado tanto para sistemas do tipo nanocápsulas quanto para as nanoesferas. A diferença ocorre pela composição e organização estrutural.¹⁵ Nas nanocápsulas (NC) o composto ativo está confinado dentro de uma cavidade (geralmente um núcleo oleoso) rodeada por uma membrana polimérica. Nas nanoesferas (NS) apresentam uma matriz polimérica na qual a substância ativa fica dispersa. Diferente das nanocápsulas, as nanoesferas não apresentam o núcleo oleoso.¹⁶⁻¹⁸

Em relação aos polímeros que podem ser utilizados na produção de nanopartículas, pode-se citar o polímero Poli- ϵ -caprolactona (PCL). O PCL é um polímero biocompatível e biodegradável que apresenta simplicidade na preparação de nanopartículas, alta eficiência de encapsulação, dispersão de moléculas pouco polares em meio aquoso e elevada estabilidade das dispersões coloidais.^{15,19,20}

Para explorar os benefícios esperados da nanotecnologia, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico simples, rápido e preciso para a quantificação de 3-HF presente em nanopartículas poliméricas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um detector de fotodiodos (DAD).

3.2 - MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 – Materiais

A 3-HF ($C_{15}H_{10}O_3$, lote:063K3710V, 98% de pureza), o polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL) de peso ponderal médio 45.000, monoestearato de sorbitano-60 (Span[®] 60), polissorbato 80 (Tween[®] 80) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis,

EUA). O miristato de isopropila e solventes grau CLAE (Acetonitrila – J.T.Baker) foram obtidos da empresa Gynlab (Goiânia-GO). Água ultrapura (18 Ω) foi obtida por osmose reversa em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.2.2 - Equipamentos

Utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), Shimadzu[®] SCL-10Avp, equipado com bomba - LC- 20AT, degaseificador - DGU-20, auto-injetor - SIL-20A, forno - CTO-20A, detector - SPD-M20A e interface CBM-20A, detector arranjo de diodo (DAD).

3.2.3 - Parâmetros cromatográficos

A análise cromatográfica foi realizada por eluição isocrática (1,0 mL min⁻¹), coluna cromatográfica C₁₈ (Shim Pack VP-ODS 150 x 4,6 mm; 5,0 μ m - Shimadzu[®]) com pré-coluna acoplada (C₁₈ 10 mm x 4,6 mm, 5,0 μ m - Shimadzu[®]). A composição da fase móvel foi acetonitrila-água 65:35 (v/v) com pH ajustado para 3,0 utilizando ácido acético glacial. A fase móvel foi filtrada a vácuo em sistema de filtração (Millipore[®]) utilizando membrana de PTFE (Politetrafluoroetileno-Millipore[®]) de 0,45 μ m. A temperatura da coluna foi mantida em 40 °C, o volume de injeção foi de 10 μ L e o comprimento de onda de detecção selecionado foi de 343 nm. O tempo de corrida cromatográfica foi de 8 minutos.

3.2.4 - Preparação de soluções de 3-HF

A solução-mãe foi preparada usando um padrão de 3-HF (1000 μ g mL⁻¹) de alto teor de pureza. O diluente utilizado foi acetonitrila (J.T.Baker) grau CLAE. As soluções para construção das curvas de calibração foram preparadas diluindo a solução-mãe em acetonitrila (0,125; 0,250; 0,500; 1,00; 2,50; 5,00 e 10,0 μ g mL⁻¹), essas concentrações foram escolhidas, por estar na faixa de concentrações que já foram testadas e apresentaram efetiva ação antitumoral. Diluições semelhantes foram feitas para investigar a precisão (10,0 μ g mL⁻¹), a exatidão do método (0,125; 1,00 e 10,0 μ g mL⁻¹), o limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (0,0625; 0,125; 0,250;

0,500; 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a partir da solução-mãe padrão. Todas as soluções foram preparadas em triplicata.

3.2.5 - Validação do método

A validação do método analítico foi realizada de acordo com os critérios propostos pela resolução da ANVISA RE n° 899, de 29/5/2003 e pela ICH (*International Conference on Harmonization*) de 06/11/1996.^{21,22} Os parâmetros avaliados no desenvolvimento deste trabalho foram: seletividade, linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

3.2.5.1 - Seletividade

A seletividade do método cromatográfico foi avaliada em relação ao potencial de interferência dos excipientes das nanopartículas. Para este propósito, os cromatogramas de amostras de nanopartículas carregadas com o composto ativo foram comparados com amostras das nanopartículas preparadas sem 3-HF (isto é, nanopartículas vazias). Vale ressaltar que as amostras brancas foram preparadas da mesma forma que as suspensões de nanocápsulas contendo 3-HF, porém sem a adição da substância analisada.

3.2.5.2 - Linearidade

A linearidade foi determinada através da construção de três curvas de calibração, em que foram preparadas sete soluções (0,125; 0,250; 0,500; 1,00; 2,50; 5,00 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) analisadas em 3 dias diferentes e com leituras em triplicata. As curvas de calibração foram construídas plotando-se as médias das áreas dos picos (eixo y) versus as concentrações do padrão (eixo x). Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através de análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados usando o software ASSISTAT disponível de forma gratuita (ASSISTAT Versão 7.7 pt (2017) - Homepage <http://www.assistat.com>).

3.2.5.3 - Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis, repetibilidade (intradia), tendo dois analistas diferentes e precisão intermediária (interdias) em 3 dias consecutivos nas concentrações de 1,00 µg mL⁻¹ com seis réplicas. As soluções foram analisadas através do cálculo dos desvios de leituras entre as injeções.

3.2.5.4 - Exatidão

A exatidão do método foi avaliada nas concentrações de 3-HF em: 0,125 µg mL⁻¹; 1,00 µg mL⁻¹ e 10,0 µg mL⁻¹ em triplicata. As amostras para avaliação exatidão foram preparadas da seguinte forma: soluções do padrão de 3-HF foram adicionadas às formulações de nanoesferas e nanocápsulas vazias. A extração da substância ativa foi feita utilizando acetonitrila. A exatidão foi determinada através do cálculo de porcentagem de recuperação da 3-HF por meio da comparação entre a concentração média determinada experimentalmente por análise cromatográfica e a concentração teórica correspondente do padrão adicionado nas formulações.

3.2.5.5 - Limites de detecção e quantificação

O Limite de Detecção (LD) representa a menor concentração presente na amostra que pode ser detectada, enquanto o limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração que pode ser determinada quantitativamente com aceitável precisão e exatidão.²⁴ Para a determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram construídas três curvas utilizando as seguintes concentrações: 0,0625 µg mL⁻¹; 0,125 µg mL⁻¹; 0,250 µg mL⁻¹; 0,500 µg mL⁻¹ e 1,00 µg mL⁻¹. Os limites LD e LQ foram obtidos através do DP (desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas de calibração) e da IC (média dos coeficientes angulares das respectivas curvas) obtidos para o padrão de 3-HF calculados pelas seguintes equações de acordo com ICH (1996):²²

$$LQ = \frac{DP}{IC} \times 10; \quad LD = \frac{DP}{IC} \times 3$$

3.2.6 - Preparo das nanopartículas poliméricas carregadas com 3-HF

As nanopartículas contendo 3-HF foram preparadas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado.²⁵ Foi preparada uma fase orgânica contendo o biopolímero (PCL (poli- ϵ -(caprolactona)), a 3-hidroxi flavona, o Span 60 (tensoativo de baixo EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo)), o miristato de isodecila (somente para nanocápsulas) e acetona. Em seguida esta fase foi vertida, sob agitação constante, sobre uma fase aquosa contendo Tween 80 (tensoativo de elevado EHL) e a água, mantendo-se a agitação magnética (Biomexer – 78HW-1) durante 8 minutos. Na sequência, o solvente orgânico e parte da água foram removidos com o auxílio de um evaporador rotativo (Tecnal– TE-211) a 40°C ajustando-se o volume final da formulação para 10,0 mL. A Tabela 1 apresenta as diferentes formulações preparadas. Estas formulações foram avaliadas quanto: a) a capacidade máxima de carga de 3-HF suportada pelas nanopartículas; b) à eficiência de encapsulação do fármaco nas formulações e, c) estabilidade das nanopartículas.

Tabela 1. Composição das formulações das nanopartículas

Formulações	Fase Orgânica (FO)					Fase Aquosa (FA)	
	PCL (mg)	Miristato de isodecila (mg)	Span [®] 60 (mg)	3-HF (mg)	Acetona (mL)	Tween [®] 80 (mg)	Água (mL)
NC1	50,0	150	100	10,0	10,0	100	20,0
NC2	50,0	300	100	10,0	10,0	100	20,0
NC3	50,0	500	100	10,0	10,0	100	20,0
NS1	50,0	-	100	10,0	10,0	100	20,0
NS2	150	-	100	10,0	10,0	100	20,0

NC= Nanocápsulas; NS= Nanoesferas; 3-HF= 3- hidroxi flavona.

3.2.6.1- Determinação da eficiência de encapsulação (EE%)

Para quantificar a eficiência de incorporação de 3-HF nas nanopartículas poliméricas baseou-se na técnica de filtração-centrifugação. Tubos com filtros de acetato de celulose com poros de 0,22 μ m (Spin-X, Corning R) foram utilizados em centrífuga Eppendorf R Mod. 8210R. Um volume de 500 μ L da formulação de nanopartículas contendo o ativo (3-HF) foi adicionado ao tubo spin e centrifugado por 40 minutos a 20°C e 6000 rpm. Neste procedimento as nanopartículas ficaram retidas pela membrana, enquanto o meio de dispersão, ou seja, a fase aquosa, foi filtrada. Os ultrafiltrados das formulações de nanoesferas e nanocápsulas (400 μ L) foram diluídos

em 200 µL de acetonitrila ultrapura e em seguida foram analisados em triplicata no cromatógrafo líquido de alta eficiência para a determinação da concentração de 3-HF livre (não encapsulada) na dispersão aquosa.

Já o conteúdo total de 3-HF (livre + encapsulado) presente nas formulações de nanoesferas e nanocápsulas foi preparado diluindo-se 20,0 µL das amostras em 2,00 mL de acetonitrila. Antes das injeções no cromatógrafo, todas as amostras foram filtradas através de seringa contendo um filtro de acetato de celulose de 0,20 µm de tamanho de poro (431,219, Corning Inc.). As análises foram realizadas em triplicata.

A eficiência de encapsulação (EE%), em porcentagem, foi determinada pela diferença entre a quantidade de 3-HF total e a quantidade de 3-HF livre através da seguinte equação:

$$EE\% = \frac{(B - A)}{B} * 100$$

Em que: A é a concentração de 3-HF no ultrafiltrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e B é a concentração total de 3-HF na suspensão ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

3.2.6.2 - Determinação do pH, Potencial Zeta e diâmetro das partículas das formulações

Os valores de pH foram determinados diretamente nas suspensões através do pHmetro (Qualxtron Mod. 8010) calibrado por soluções tampão pH 4,00 e pH 7,00.

O potencial zeta (PZ) das formulações foi determinado a partir de diluição das amostras em água destilada em concentração final de 5 % (v/v). As amostras foram analisadas em triplicata em *Zeta Potencial Analyzer* (Brookhaven Instruments Corporation®).

A distribuição do diâmetro médio das nanopartículas em suspensão foi determinada em equipamento denominado Diâmetro BI-FOQELS (*Fiber Optic Quase Elastic Light Scattering*) da Brookhaven Instruments Corporation®. As medições foram realizadas à temperatura ambiente, 1mL da formulação de nanopartículas foi diluído em 9,0 mL de água destilada.

3.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 - Desenvolvimento de métodos e otimização

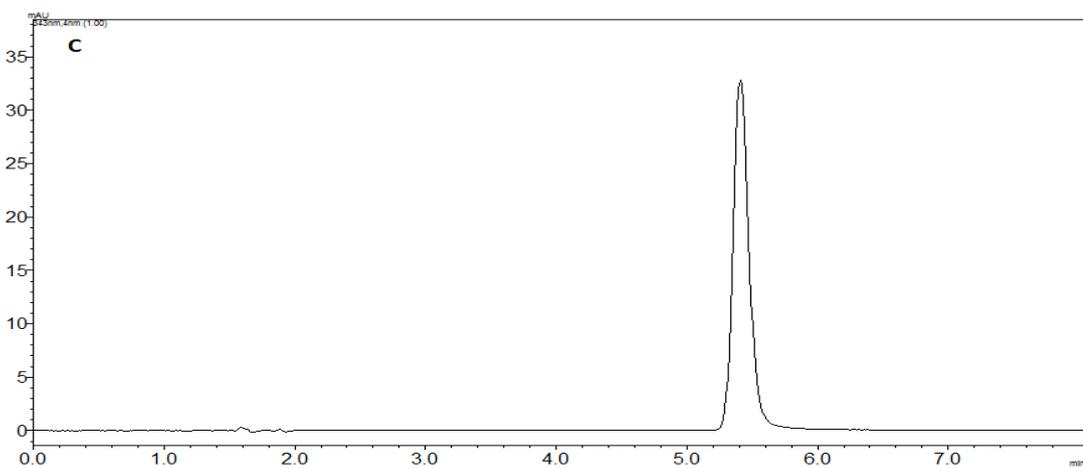
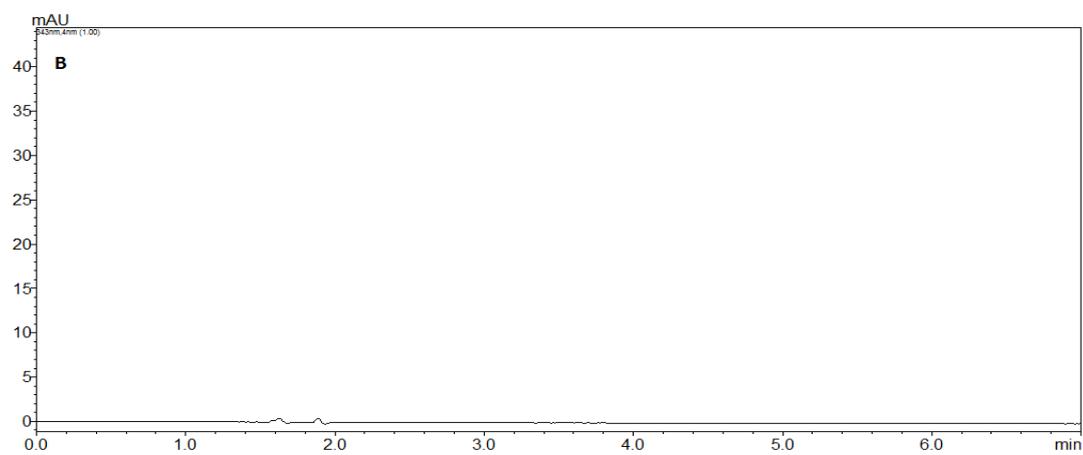
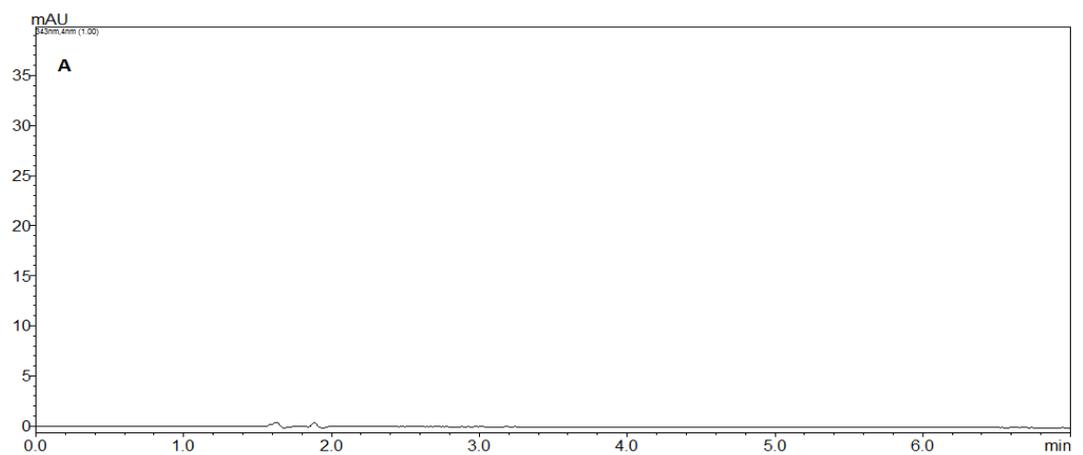
Antes da etapa de validação, vários métodos foram testados e otimizados com relação a vários parâmetros cromatográficos, tais como: composição, proporção e pH de fase móvel; simetria do pico cromatográfico; taxa de fluxo de fase móvel; máxima absorção da 3-HF. Assim, para otimização da composição da fase móvel, água e acetonitrila foram testadas em várias proporções, sendo que a fase móvel escolhida para validação do método foi ACN: H₂O, na proporção de 65:35 (v/v) com pH 3,00 ajustado com ácido acético glacial e fluxo de 1,00 mL min⁻¹ no qual apresentou melhor simetria de pico para 3-HF.

A 3-HF foi quantificada no CLAE-DAD de acordo absorbância máxima verificada através de varreduras previamente realizadas entre os comprimentos de onda variando de 220 a 400 nm. Os resultados das varreduras indicaram os comprimentos de onda de máximas de absorções ($\lambda_{\text{máx}}$) em: 242 nm, 307 nm e 343 nm. O comprimento de onda escolhido foi o de 343 nm por ser o mais seletivo à detecção do princípio ativo. O tempo da corrida cromatográfica necessário para análises da 3-HF foi de 8 minutos e o tempo de retenção da 3-HF foi de aproximadamente 5 minutos.

3.3.2 - Validação do método

Seletividade

Nestas condições o tempo total necessário para análises foi de 8 minutos, o pico apresentou assimetria igual a 1,248, o tempo de retenção da 3-HF foi de 5 minutos com números de pratos teóricos acima de 9.000 (Figura 2).



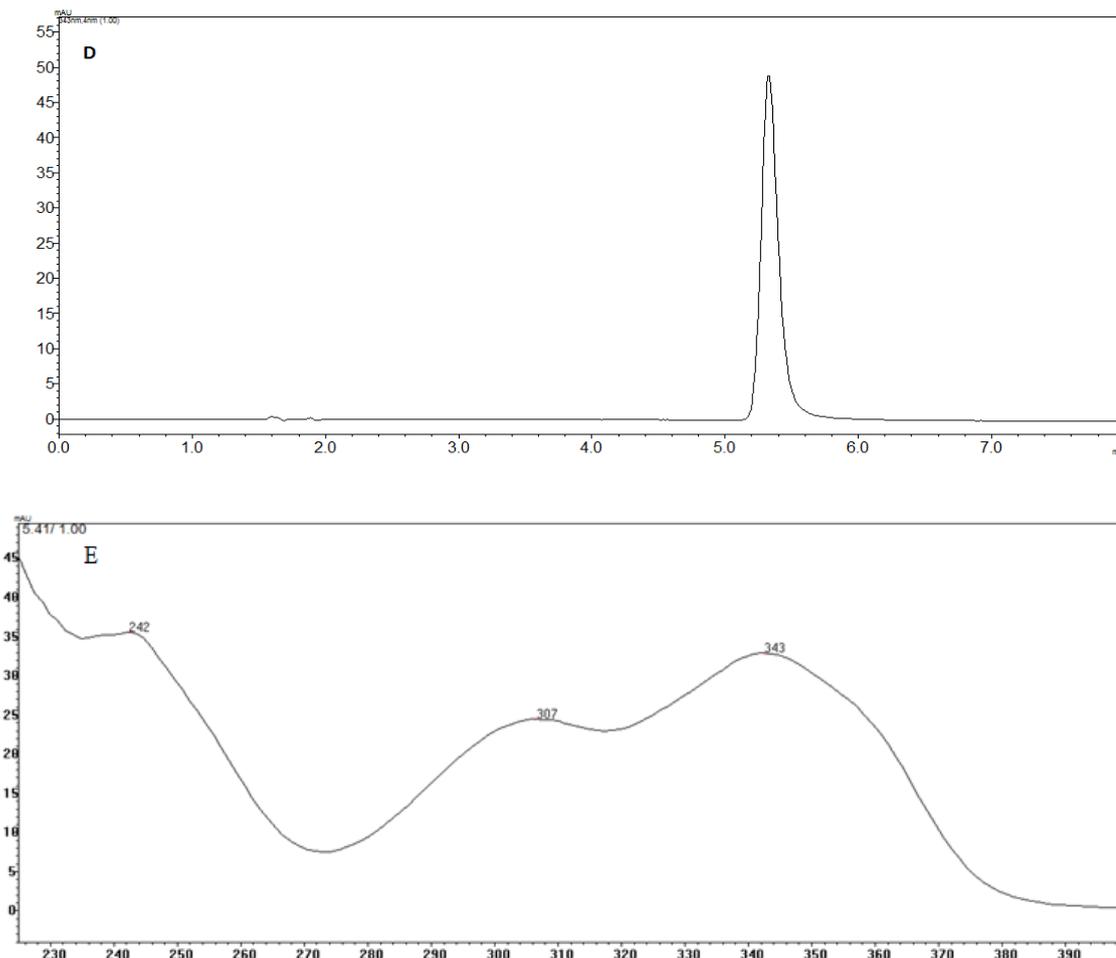


Figura 2. Cromatogramas e espectro de UV obtidos da 3-HF. A. Cromatograma da nanocápsula vazia, B. Cromatograma da nanoesfera vazia, C. Cromatograma da nanocápsula com 3-HF, D. Cromatograma da nanoesfera com 3-HF (Condições: Fase móvel constituída por ACN: H₂O 65: 35 (v/v) com pH ajustado para 3,0 utilizando ácido acético glacial, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e detecção UV a 343 nm obtido por CLAE-DAD); E. Espectro da 3-HF.

Linearidade

As curvas de calibração foram obtidas através da regressão linear em função das áreas dos picos cromatográficos relativas às concentrações que variaram de 0,125 a 10,0 µg mL⁻¹. A curva de calibração média apresentou equação da reta igual a $y = 38609x - 2330,9$ (em que y é a área do pico e x é a concentração da 3-HF) e coeficiente de correlação (R) de 0,9993 indicando forte correlação linear entre as concentrações da 3-HF e as áreas dos picos (Figura 3). O gráfico de resíduos também está apresentado na Figura 3 e, de acordo com os resultados, não foram observados valores discrepantes.

Foi realizado um teste F para se verificar a significância e a linearidade da regressão. O valor do F tabelado (F-crítico) foi de 4,46 (ao nível de 1%) e 2,85 (ao nível de 5%) e o F calculado foi de 50.002. Tais valores confirmam a existência de relação linear entre as variáveis e a inclinação da reta de regressão não é nula, ou seja, não houve desvio da linearidade na faixa de trabalho avaliada. O valor p-intercepto foi de 0,1108 e o valor p-inclinação foi 7,188E-29. Os erros padrão dos interceptos (a) e (b) foram 1393,6 e 320,2, respectivamente. Todos os dados apresentados são demonstrativos da linearidade do método analítico.

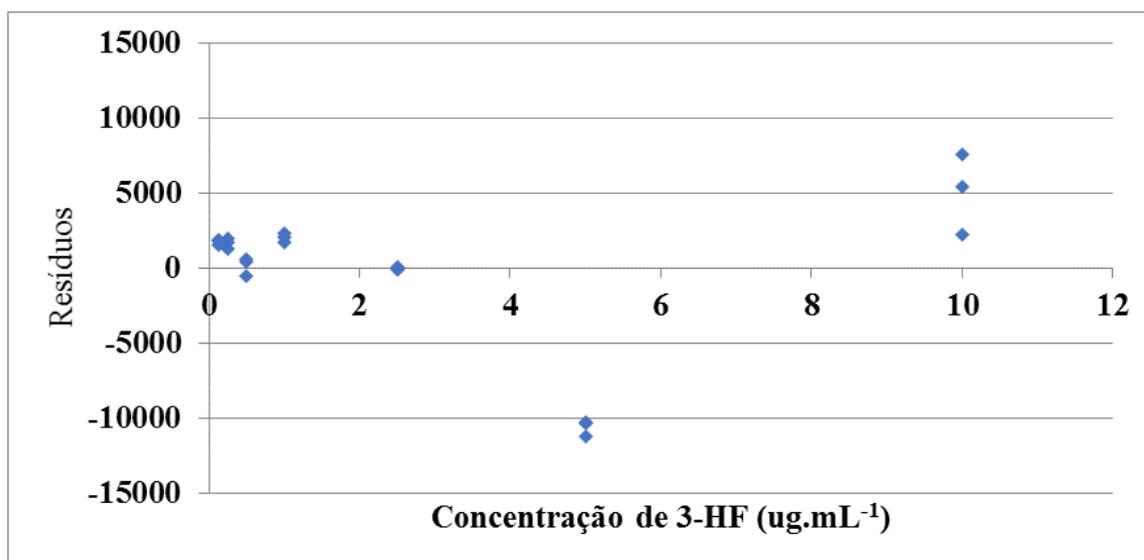
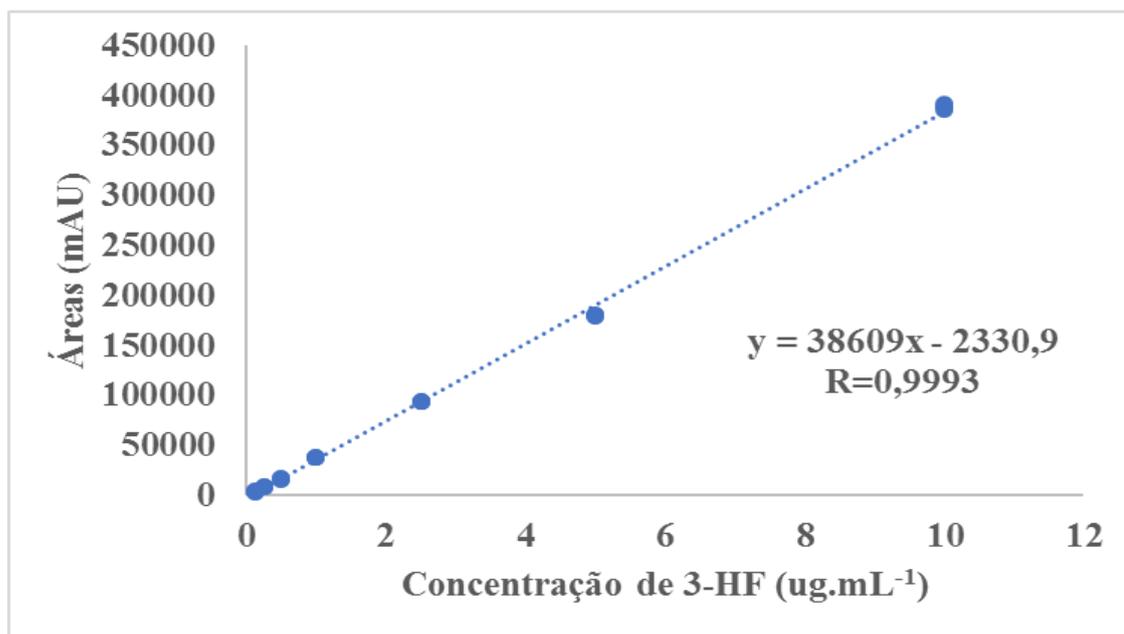


Figura 3. Curva média de calibração da 3- hidroxiflavona com 7 níveis de concentrações em triplicata e gráfico de resíduos.

Precisão

A precisão do método foi investigada pela repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados obtidos para a verificação da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdias) do método analítico estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores obtidos para verificação dos parâmetros de repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdias)

Injeção (Concentração=1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão intradia	Precisão intradia	Precisão interdia
	Concentração encontrada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	1,20	0,86	1,20
2	1,10	0,87	1,10
3	1,10	0,93	1,10
4	1,20	0,94	1,20
5	1,20	0,94	1,20
6	1,20	0,94	1,20
Média	1,20	0,91	1,20
DP	0,040	0,03	0,040
DPR (CV%)	3,67	3,69	3,10

DP= Desvio Padrão; DPR= Desvio Padrão Relativo; CV% = Coeficiente de Variação. N=6.

Os resultados obtidos na avaliação da precisão (intradia) indicaram valores de DPRs (%) de 3,67% e 3,69%, já na precisão intermediária (interdia) o valor de DPR (%) foi de 3,10%. Esses valores ficaram abaixo do limite máximo de 5,00 % recomendado pela ANVISA (RE 899/2003)²¹, o que demonstra conformidade com os parâmetros estabelecidos para a validação de métodos cromatográficos, demonstrando que o método possui precisão e repetibilidade adequadas.

Exatidão

Os valores descritos na Tabela 3 foram satisfatórios, pois todas as percentagens de recuperação variaram de 107,91% a 115,63% para as nanocápsulas e de 108,89% a 115,48%, para as nanoesferas, demonstrando conformidade em relação aos limites estabelecidos pela Anvisa²¹, na Resolução nº 899 de 2003, que são de 80,0 – 120%.

Tabela 3. Valores experimentais da exatidão do método

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nanocápsulas (NC)		Nanoesfera(NE)	
	Rec (%)	DPR (%)	Rec (%)	DPR (%)
0,125	115,6	2,70	108,9	2,92
1,00	107,9	0,95	115,5	0,49
10,0	110,6	0,07	111,3	0,03

Rec (%)= Porcentagem de Recuperação da 3-HF; DPR(%)= valores de desvio padrão relativo das medidas.

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

A sensibilidade do método para detectar e quantificar uma amostra de 3- HF, foi definida através do desvio padrão e da inclinação das curvas de calibração, apresentando o LD $0,036\mu\text{g mL}^{-1}$ e o LQ $0,12\mu\text{g mL}^{-1}$. O limite de quantificação é igual o primeiro ponto da curva de calibração próximo a $0,13\mu\text{g mL}^{-1}$, esse valor é menor que o valor citado por Calabrò e colaboradores (2004)²⁶ que relataram limites de detecção $1,45\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando um método de eluição por gradiente.

3.3.3 - Aplicação do método desenvolvido para a quantificação de 3 -HF em nanopartículas

O método foi validado e aplicado para a quantificação de 3-HF presente nas nanopartículas para a determinação de eficiência encapsulação (EE%). Foram preparadas diferentes formulações. As nanocápsulas (NC1, NC2 e NC3) e as nanoesferas (NS1 e NS2) apresentaram um sistema homogêneo, sem formação de precipitado e nem sobra de 3-HF. Nestas formulações foram determinadas a eficiência de encapsulação (EE%), o diâmetro de partícula (Dp); o potencial zeta (PZ) e o índice de polidispersão (PDI). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultado da caracterização das nanopartículas contendo 3-HF

Formulações	*EE%	Dp (nm)	PZ (mV)	PDI
NC 1	99,02	264,00	-26,93	0,34
NC 2	98,84	328,33	-28,27	0,59
NC 3	96,41	430,80	-26,33	0,57
NS 1	99,13	240,67	-25,73	0,33
NS 2	99,26	261,23	-27,20	0,29

NS: nanoesfera; NC: nanocápsula; Dp: diâmetro de partícula; PZ: potencial zeta; PDI: índice de polidispersão; EE: eficiência de encapsulação.* n=3.

A eficiência de encapsulação (EE%) da 3-HF nas nanopartículas variou de 96,41% a 99,26%. O valor médio do pH para todas essas formulações foi de 6,00. Quanto maior o potencial zeta, maior a estabilidade das partículas, estas carregadas repelem entre si, superando a tendência de agregação. Nanopartículas com um potencial zeta entre +10,00 e -10,00 mV são consideradas aproximadamente neutras, por outro lado, nanopartículas com potenciais zeta mais elevados que 30 ou menor do que -30mV são considerados muito estável no meio de dispersão. As formulações apresentaram potenciais zeta próximos a - 26 mV, valor que é apropriado para manter uma boa estabilidade das formulações sem agregação e precipitação uma vez que ocorre repulsão eletrostática das partículas que é resultante da densidade de carga da superfície.^{27,28}

Para as nanopartículas poliméricas de PCL contendo hidrocortisona, Cazo e colaboradores (2012) encontraram valores médios do potencial zeta em torno de -19,3 para as nanoesferas e -31,2 mV para nanocápsulas¹⁵. Conforme descrito por Kulkamp *et al.* (2009), o potencial zeta negativo está relacionado aos componentes da interface das partículas, ao polímero PCL- poli(ϵ -caprolactona) e especialmente ao polissorbato 80 (Tween 80), decorrente de suas características estruturais.²⁹

De acordo com Schaffazick, e colaboradores (2003)³⁰ as nanopartículas mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentaram diâmetros médios entre 100 e 300 nm. No caso das nanocápsulas, um fator que influencia o diâmetro das partículas é a natureza do óleo utilizado como núcleo. No presente trabalho as nanocápsulas apresentaram diâmetro médio maior, em torno de 341 nm, já as nanoesferas apresentaram um diâmetro próximo a 250 nm. Conforme encontrado na literatura, Cazo e colaboradores (2012)¹⁵ obtiveram para as nanopartículas carregadas com hidrocortisona um diâmetro médio de 109,2 nm para as nanoesferas e, para as

nanocápsulas um valor médio de 236,5 nm. As nanopartículas contendo xantiletina como princípio ativo apresentaram nanocápsulas com diâmetros médios entre 261 e 295 nm e as nanoesferas próximos a 201 nm.³¹

Essa diferença do diâmetro médio nas NC e nas NS, certamente é pela presença do fator óleo (miristato de isodecila) presente nas NC e ausente nas NS. Nota-se que nas nanocápsulas à medida que aumenta a quantidade de óleo na formulação (miristato de isodecila), aumenta o diâmetro de partícula. Já nas nanoesferas o diâmetro de partícula aumenta de acordo com o aumento de PCL.

O índice de polidispersão (PDI) fornece informações sobre a homogeneidade dos tamanhos das nanopartículas em suspensão. Os valores de PDI podem variar de 0 a 1, de acordo com a literatura. Valor de polidispersão abaixo de 0,3 representa um sistema monodisperso, ou seja, homogêneo na distribuição das nanopartículas²⁹. Os valores de PDI das amostras analisadas apresentaram, na maioria das formulações, valores próximos a 0,3 indicando formação de sistemas monodispersos, com exceção das nanocápsulas NC2 e NC3, que apresentaram valores em torno de 0,5 que indicam neste caso, maior heterogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão.^{29,32}

De modo geral a caracterização das nanoesferas de PCL contendo a 3-HF apresentou um perfil semelhante às nanocápsulas, não apresentando diferenças significativas entre os parâmetros analisados. Entretanto a formulação NS1 é a mais adequada, uma vez que se utilizou menor quantidade de PCL e não foi utilizado miristato de isodecila.

A incorporação da 3-HF em sistemas de veículo polimérico além de proporcionar a liberação controlada do princípio ativo encapsulado e proteger da degradação prematura e da interação com o ambiente biológico, aumentando assim a especificidade, tolerabilidade e o índice terapêutico, é capaz também da possibilidade da redução da toxicidade e minimizar os efeitos colaterais³³⁻³⁵.

3.4 – CONCLUSÃO

O método analítico foi validado segundo ANVISA (2003) e ICH (1996), atendeu às exigências analíticas, cumprindo os requisitos para ser considerado um método confiável e viável, mostrando ser simples, rápido, específico, linear, preciso e

sensível, e que pode ser facilmente aplicado para quantificação de 3-hidroxi-flavona em nanopartículas poliméricas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (Capes); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IF Goiano) e o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais (IF Sudeste MG) pelo apoio financeiro.

3.5. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - Dornas, W. C.; Oliveira, T. T. D.; Rodrigues-Das-Dores, R. G.; Santos, A. F. D.; Nagem, T. J.; *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **2009**, 28, 241.

2 - Lang Q, Zhang H, Li J, Xie F, Zhang Y, Wan B, Yu, L.; *Mol Biol Rep* **2010**; 37, 1577.

3 - Brusselmans, K.; Vrolix, R.; Verhoeven, G.; Swinnen, J.V.; *J. Biolog. Chem*, **2005**, 280, 5636.

4 - Cazal, C. M.; Choosang, K.; Severino, V.G.P.; Fernandes, J.B.; Silva, M.F.G.F.; Vieira, P.C.; Nascimento, M.S.J.; Almeida, G.M.; Vasconcelos, M.H.; Pakkong, P.; Pinto, M.M.M. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2013**, 13, 1582.

5 - Lu, K. H.; Chen, P. N.; Hsieh, Y. H.; Lin, C. Y.; Cheng, F. Y.; Chiu, P. C.; Chu, S. C.; Hsieh, Y. S.; *Food Chem Toxicol.* **2016**; 97, 177.

6 - Dell'Anna, M. M.; Censi, V.; Carrozzini, B.; Caliandro, R.; Denora, N.; Franco, M.; Veclani, D.; Melchior, A.; Tolazzi, M.; Mastroilli, P.; *J. Inorg. Biochem.* **2016**, 16, 346.

- 7 - Voicescu, M.; Ionescu, S.; Nistor, C. L.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2017**, *170*, 1.
- 8 - Xu, B.; Yang, G.; Ge, S.; Yin, T.; Hu, M.; Gao, S.; *J. Pharmaceut. Biomed* **2013**, *85*, 245.
- 9 - Lin, H.; Xingyue, E.; Lee, P. L.; Elisa, S.; Zhenyu, X.; Yu, L.; Wen, X.; Lars, Z.; Jill, M.; Dana, R.; Aimee, L. J.; Peter, S. L.; Caifu, C.; Scott, W. L.; Michele, A. C.; Gregory, J. H.; *Journal of Science* **2007**, *447*, 1130.
- 10 - Kim, J.H.; Song, M. G.H. ; Kang, E.R.; Lee, H.Y. ;Choi, C. ;Lee, Y. ;Kim, B.N. ;Koo, S.G. Cho, *Leuk. Res.* **2012**, *36*, 1157.
- 11 -Teixeira, M.; Alonso, M. J.; Pinto, M. M.M; Barbosa, C. M.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *59*, 491.
- 12 - Barrios, J. G.; Farias, G. D.; Roggia, I.; Peixoto, S. C.; Pons, F. R.; Bruschi, Márcia, Raffin, R. P.; Alves, M. P.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1464. 13.
- 13 - Aljuffalia, I. A.; Fang, C.-L.; Chend, C. H.; Fange, J. Y.; *Current Pharmaceutical Design* **2016**, *22*, 4219.
- 14 - Elzoghbya, A.O.; Abd-Elwakila, M. M.; Abd-Elsalama, K.; Elsayeda, M. T.; Hashema, Y.; Mohameda, O. *Current Pharmaceutical Design* **2016**, *22*, 3305.
- 15 - Cazo, N. A.; Pereira-Filho, E. R.; Silva, M F. G. F.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Puhl, A. C.; Polikarpov, I.; Forim, M. R.; *Orbital: Electron. J. Chem.* **2012**, *4*, 1585.
- 16 -Alonso, MJ Em *sistemas de micropartículas para a administração de proteínas e vacinas*, Cohen, S. ;Bernstain, H., eds. ; Marcel Dekker: New York, 1996.
- 17 - Couvreur, P. ; Dubernet, C. ; Puisieux, F. ; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1995** , *41*, 2.
- 18 - Reis, C. P.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F.; *Nanotechnol. Biol. Med.* **2006**; *2*, 53.

- 19 - Leite, E.A;Grabe-Guimarães, A .; Guimarães, HN; Lins Machado-Coelho, GL; Barratt, G .; Mosqueira, VCF; *Life Sci.* **2007**, *80* , 1327.
- 20 - Liu, J .; Xu, G .; Liu, C .; Zhang, D .; Wang, S .; Deng, Z .; Lou, W .; Xu, H .; Bai, Q .; Ma, J .; *Carbohyd.Polym.* **2012** , *90* , 16.
- 21 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA; RE nº 899 de 29/05/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, *Ministério da Saúde* **2003**, Brasil.
- 22 - ICH STEERING COMMITTEE et al. ICH Q2B Validation of Analytical Procedures: methodology. *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*, International Commission on Harmonisation, London (CPMP/ICH/281/95). **1996**.
- 23 - Silva, F. A. S.; Azevedo, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res* **2016.11**, 3733.
- 24 - Ribani, M.; Bottoli, C. B.; Collins, C.; Jardim, I. C.; Melo, L.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
- 25 - Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Ammoury, N. Benita, S.; *Int. J. Pharm.* **1989**, 55.
- 26 - Calabrò, M. L.; Tommasini,S. ; Raneri, D. ; Donato, P. ; Ficarra, P.; Ficarra, R. ; *J. Chromatogr. B* **2004**, *800*, 245.
- 27 - Wu, L.; Zhang, J.; Watanabe, W.; *Adv Drug Deliv Rev.* **2011**; *63*, 456.
- 28 - Clogston, J. D.; Patri, A. K.; *Zeta Potential Measurement*. In.: McNeil SE, editor.Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. New York: Humana Press. 2011, 63,70.
- 29 - Kulkamp, I.; Paese, K; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R.; *Quím. Nova* **2009**, *32*, 2078.

30 - Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 726.

31 - Cazal, C. M.; Forim, M. R.; Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C.; Fernandes, J.B.; *Quim. Nova* **2014**, *37*, 1145.

32 - Souza, P. M.; Lobo, S. F.A.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F.; *Quím. Nova* **2012**, *35*, 132.

33 - Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E.; *J. Controlled Release* **2001**, *70*, 1.

34 - Bernardi, A.; Zilberstein, A. C.; Jäger, E.; Campos, M. M.; Morrone, F. B.; Calixto, J. B.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Battastini, A. M.; *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 1104.

35 - Huang, J.; Li, Y.; Orza, A.; Lu, Q.; Guo, P.; Wang, L.; Yang, L.; Mao, H.; *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 3818.

4 - CAPÍTULO II: Preparação e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo 3-hidroxiavona

(Normas de acordo com a revista Química Nova)

RESUMO

A 3-hidroxiavona (3-HF) possui atividade inibitória frente a algumas linhagens de células cancerígenas. A aplicação da nanotecnologia na área da oncologia pode proporcionar várias vantagens. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo 3-HF utilizando o polímero poli-ε-caprolactona (PCL). As nanocápsulas e as nanoesferas apresentaram diâmetros médios de partículas entre 284,51 e 250,95nm respectivamente, o potencial zeta das nanocápsulas ficou em média -27,17mV e as nanoesferas-26,46mV, os pHs das formulações ficaram próximos a 6 e a eficiência de encapsulação ficou acima de 96%. Durante 12 horas verificou-se que as nanopartículas ofereceram proteção contra a degradação da 3-HF uma vez que a 3-HF livre apresentou degradação mais acelerada (49,86%) comparada com a 3-HF presente nas nanocápsulas (30,43%) e nas nanoesferas (31,17%). A liberação *in vitro* da 3-HF das nanopartículas ocorreu de forma lenta e gradativa, com aproximadamente 7,33% na nanoesfera e 5,01% na nanocápsula durante 72 horas. A atividade antitumoral *in vitro* revelou que a 3-HF livre exibiu valores de IC₅₀ de 118,7 e 207,3 μM para as linhagens A549 (tumor de pulmão humano) e MCF-7 (tumor de mama humano) respectivamente, enquanto a 3-HF nanoencapsulada embora não tenha sido possível calcular o IC₅₀, observou-se morte celular significativa nas amostras tratadas na linhagem A549.

Palavras-chave: Câncer. Nanopartículas. Flavonoides.

4 - CHAPTER II: Preparation and characterization of polymeric nanoparticles containing 3-hydroxyflavone

(Standards in accordance with the Química Nova magazine)

ABSTRACT

3-hydroxyflavone (3-HF) has inhibitory activity against some cancer cell lines. The application of nanotechnology in the area of oncology can provide several advantages. In this sense the aim of this work was to prepare and characterize polymeric nanoparticles containing 3-HF using poly- ϵ -caprolactone polymer (PCL). Nanocapsules and nanospheres presented average values diameters particle between 284.51 and 250.95nm respectively, the zeta potential of the nanocapsules presented average values of -27.17mV and nanospheres of -26.46mV, the formulations pHs were close to 6 and the encapsulation efficiency was above 96%. For 12 hours the nanoparticles were found to provide protection against degradation of 3-HF since free 3-HF showed a more rapid degradation (49.86%) compared to 3-HF present in the nanocapsules (30.43%) and nanospheres (31.17%). In vitro release of 3-HF from the nanoparticles occurred slowly and gradually, with approximately 7.33% in the nanosphere and 5.01% in the nanocapsule for 72 hours. In vitro antitumor activity revealed that free 3-HF exhibited IC₅₀ values of 118.7 and 207.3 μ M for the A549 (human lung tumor) and MCF-7 (human breast tumor), respectively. With nano encapsulated 3-HF, it was not possible to calculate the IC₅₀, and a significant cell death was observed only in samples treated in the strain of A549.

Key words: Cancer. Nanoparticles. Flavonoids .

4.1 - INTRODUÇÃO

Os flavonoides se destacam por apresentarem ampla propriedades farmacêuticas, incluindo potentes drogas terapêuticas que são eficazes contra doenças mediadas por radicais livres.¹ A 3-hidroxi-flavona (3-HF) é uma estrutura básica importante para o grupo dos flavonoides, pertence a subclasse do flavonol (Figura 1), e é bastante reativa principalmente pela presença do grupo 3-OH livre.²

A 3-HF apresenta diversas atividades biológicas por ser antioxidante³, alguns grupos de pesquisa investigaram a 3- HF como um agente antitumoral e indutor de apoptose, em diferentes linhagens tumorais, modula as vias de sinalização de ampla variedade de processos, incluindo o crescimento celular, diferenciação e sobrevivência celular.⁴⁻⁷ Outra característica importante da 3-HF é a defesa antioxidante extracelular contra espécies reativas de oxigênio (ROS),⁸ com isso apresenta propriedades benéficas na saúde humana, incluindo atividade antitumoral.⁹ Além de ser um inibidor potente do dano peroxidativo das membranas celulares, apresentando atividade significativa antioxidante e eliminadora de radicais neste sistema de membrana.¹

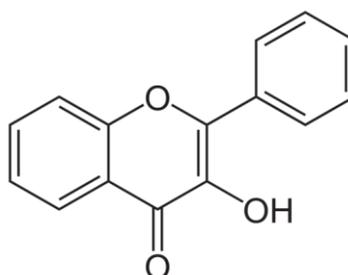


Figura 1. Estrutura química da 3- HF ($C_{15}H_{10}O_3$)

De acordo Cassetta, a 3-HF inibiu a enzima esteroideogênica 17 β -HSDcl (17 β -hidroxiesteroides desidrogenases) – dependente do NADPH do fungo filamentoso *Cochliobolus lunatus* (0.338 e 0.151 μ M), que modulam a potência biológica dos androgênios e dos estrogênios nos mamíferos.¹⁰ Em outro estudo, a 3-HF inibiu a proliferação induzida por fator de crescimento epidérmico EGF (IC₅₀ = 68,7 μ M), acompanhado por bloqueio a fosforilação da tirosina EGFR- receptor do fator de crescimento epidérmico, a ativação de MAPK- proteínas quinases ativadas por mitogénio e PGE₂ - prostaglandina E₂. Isso indica que a 3-HF pode ter potencial para prevenir a ocorrência de formação de câncer.¹¹

Lin e colaboradores (2007)¹² relataram que a 3-HF exibiu uma atividade inibitória sobre a E2 (17 B- estradiol)/ IGF-I (Fator de crescimento Semelhante à Insulina) e na proliferação de células MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Lang e colaboradores (2010)¹³ testaram a ação antitumoral da 3-HF frente várias linhagens, tais como A375-melanoma humano ($IC_{50} = 7,2 \mu M$), MCF-7- tumor de mama ($IC_{50} = 14,2 \mu M$), H1299- carcinoma de células não-pequenas do pulmão de células ($IC_{50} = 19,1 \mu M$), Hela- célula imortal ($IC_{50} = 23,4 \mu M$), SK-OV-3- carcinoma do ovário ($IC_{50} = 30,9 \mu M$), SK-Hep1 - adenocarcinoma do fígado ($IC_{50} = 39,2 \mu M$) e SW620- carcinoma do cólon ($IC_{50} = 39,4 \mu M$) entre outras.

Em outro trabalho, a 3-HF se destacou por reduzir significativamente a viabilidade das células de cancro do pulmão (A549) e nenhum efeito citotóxico foi observado nos grupos de células normais (HaCaT e MDCK). Além disso, estes autores verificaram que o mesilato de imatinibe potencializava significativamente a ação antiproliferativa da 3-HF em células de leucemia K562-S e K562-R, ademais isso também afetou a indução de apoptose sendo que a 3-HF sozinha apresentou apoptose mínima (menos de 10%) e com a combinação a percentagem de células em apoptose foi aumentada para 35-40%.¹⁴

Cazal e colaboradores (2013)¹⁵ avaliaram a 3- HF frente as linhagens tumorais MCF-7 (tumor de mama), NCI-H460 (câncer de células não pequena de pulmão), A375-C5- melanoma, que apresentou IC_{50} menor que $8,30 \mu M$, além disso, induziu cerca de 30% de morte celular por apoptose.

Apesar de todos estes relatos, a aplicação da 3-HF é limitada, ela é uma molécula hidrofóbica, praticamente insolúvel em água ($28,9 \text{ mg.L}^{-1}$, a 25°C),^{16,17} além de apresentar instabilidade perante a luz¹⁸. Uma alternativa é a encapsulação da 3-HF, utilizando nanopartículas poliméricas como sistemas de liberação do fármaco, que são capazes de assegurar o aumento da hidrossolubilidade, e consequentemente, melhorar a biodisponibilidade destes fármacos lipossolúveis.¹⁹

Ademais, a nanotecnologia pode ser utilizada como recurso para ampliar a atividade antitumoral de princípios ativos uma vez que a encapsulação pode promover a liberação controlada, reduzindo a necessidade de altas doses e o número de administrações do fármaco por dia, diminuindo a toxicidade e minimizando os efeitos colaterais, além de promover o aumento da solubilidade, e proteger os princípios ativos encapsulados contra a inativação antes de chegarem ao seu local de ação e assim aumentar a penetração intracelular e consequentemente melhora sua atividade

farmacológica.²⁰⁻²² No entanto, até o momento não há relatos na literatura referentes a encapsulação de 3-HF em nanopartículas poliméricas. Considerando este aspecto, o objetivo deste estudo foi preparar e caracterizar nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona (PCL) contendo 3-HF no intuito de aumentar a sua solubilidade em água e sua estabilidade perante a luz, visando melhorar sua atividade terapêutica. Além disso, avaliou-se a atividade antiproliferativa da 3-HF livre e nanoencapsulada nas linhagens celulares tumorais humanas A549 (tumor de pulmão humano) e MCF-7 (tumor de mama humano).

4.2 - MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 - Materiais

A 3-HF ($C_{15}H_{10}O_3$, lote: 063K3710V, 98% de pureza), o polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL) de peso ponderal médio de 45.000, monoestearato de sorbitano-60 (Span[®]60), polissorbato 80 (Tween[®]80) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O miristato de isopropila e solvente grau CLAE (Acetonitrila – J.T.Baker) foram obtidos da empresa Gynlab (Goiânia-GO). Água ultrapura (18 Ω) foi obtida por osmose reversa em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

4.2.2 - Preparo das nanopartículas poliméricas

As nanopartículas contendo 3-HF foram preparadas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado.²³ Em resumo preparou uma fase orgânica contendo o polímero PCL (poli- ϵ -(caprolactona), a 3- HF , Span 60 (tensoativo de baixo EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo)), acetona e miristato de isodecila (usado somente para nanocápsulas (NC)) que é composta por invólucro polimérico organizado ao redor de um núcleo oleoso, e com a ausência do óleo miristato de isodecila forma as nanoesferas (NS) em que a substância é dispersa em toda a matriz de polímero.²³

Em seguida esta fase foi vertida, sob agitação constante, sobre a fase aquosa contendo Tween 80 (tensoativo de elevado EHL) e a água, mantendo-se a agitação magnética durante 10 minutos. Na sequência, o solvente orgânico e parte da água foram removidos com o auxílio de um evaporador rotativo a 40 °C ajustando para o volume

final de 10 mL. A Tabela 1 apresenta as diferentes formulações preparadas (em triplicata). Estas formulações foram avaliadas quanto: a) a capacidade máxima de carga de 3-HF suportada pelas nanopartículas; b) à eficiência de encapsulação do fármaco nas formulações e, c) estabilidade das nanopartículas. Os aspectos variantes foram o princípio ativo (3- HF), PCL e miristato de isodecila (somente para as nanocápsulas).

Tabela 1. Formulações das nanopartículas. *NC*= Nanocápsulas; *NS*= Nanoesferas; *3-HF*= 3- hidroxiflavona

Formulações	Fase Orgânica (FO)					Fase Aquosa (FA)	
	PCL (mg)	Miristato (mg)	Span 60 (mg)	3-HF (mg)	Acetona (mL)	Tween 80 (mg)	Água (mL)
NC1	50	500	100	10	10	100	50
NC2	50	500	100	20	10	100	20
NC3	50	500	100	30	10	100	20
NC4	50	500	50	10	10	50	20
NC5	50	300	100	10	10	100	20
NC6	50	150	100	10	10	100	20
NC7	50	500	100	10	10	100	20
NC8	150	500	100	10	10	100	20
NC9	150	500	100	20	10	100	20
NC10	150	500	100	30	10	100	20
NS1	50	-	100	10	10	100	20
NS2	150	-	100	10	10	100	20

4.2.3 - Caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas

4.2.3.1 - Quantificação da 3-hidroxiflavona

A 3-HF presente nas nanopartículas foi quantificada por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Shimadzu[®] SCL- 10Avp, equipado com bomba - LC- 20AT, degaseificador - DGU-20, auto-injetor - SIL-20A, forno - CTO-20A, detector - SPD-M20A , interface CBM-20A, detector arranjo de diodo (DAD) e coluna cromatográfica C₁₈ (Shim Pack VP-ODS 150 x 4,6 mm; 5,0 µm - Shimadzu[®]) com pré-coluna acoplada (ODS 10 mm x 4,6 mm, 5,0 µm - Shimadzu[®]).

A análise cromatográfica foi realizada por eluição isocrática (1,0 mL.min⁻¹), a composição da fase móvel foi acetonitrila-água 65:35 (v/v) com pH ajustado para 3,0 utilizando ácido acético glacial. A fase móvel foi filtrada a vácuo em sistema de filtração (Millipore[®]) utilizando-se membrana de PTFE (Politetrafluoroetileno-Millipore[®]) de 0,45 µm. A temperatura da coluna foi mantida em 40°C, o volume de

injeção foi de 10 µL e o comprimento de onda de detecção selecionado foi de 343 nm. O tempo de corrida cromatográfica foi de 8,0 minutos.

4.2.3.2 - Determinação da eficiência de encapsulação (EE%)

A eficiência de encapsulação (EE%) baseou-se na técnica de filtração-centrifugação. Utilizando tubos com filtros de acetato de celulose com poros de 0,22µm *fÊm* (Spin-X, Corning R) em centrifuga Eppendorf R Mod. 8210R. Um volume de 0,5 mL da suspensão coloidal foi adicionado ao tubo *spin* e centrifugado a 8.000 rpm por 40 min a 20°C. Neste procedimento, as nanopartículas ficaram retidas pela membrana, enquanto o meio de dispersão, a fase aquosa, foi filtrada e analisada por CLAE, para a determinação do total de substância não encapsulada.

O conteúdo total de 3- HF nas nanoesferas e nanocápsulas foi quantificado, diluindo-se 20 µL das amostras em 2 mL de acetonitrila e em seguidas injetadas no CLAE em triplicata.

A eficiência de encapsulação (EE%), em porcentagem, foi determinada pela diferença entre a quantidade de substância total e a quantidade de substância livre através do uso da Equação 1:

$$EE\% = \frac{(B - A)}{B} * 100$$

Em que: A é da 3- HF no ultrafiltrado (µg.mL⁻¹) e B é a concentração total na suspensão (µg.mL⁻¹).

4.2.3.3 - Determinação do diâmetro de partícula, Potencial Zeta, e pH das nanopartículas poliméricas

A técnica de espalhamento dinâmico de luz foi utilizada para determinação do tamanho médio das partículas (diâmetro hidrodinâmico) e o índice de polidispersibilidade (PdI). A distribuição do diâmetro médio das nanopartículas em suspensão foi determinada em equipameto denominado Diâmetro BI-FOQELS (*Fiber Optic Quase Elastic Light Scattering*) da Brookhaven Instruments Corporation®.

O potencial zeta (PZ) das formulações foi determinado a partir de diluição das amostras em água destilada em concentração final de 5 % (v/v). As amostras foram

analisadas em triplicata em *Zeta Potencial Analyzer* (Brookhaven Instruments Corporation[®]).

Os valores de pH foram determinados diretamente nas suspensões através do pHmetro (Qualxtron Mod. 8010) calibrado com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0.

4.2.3.4 - Avaliação morfológica das suspensões de nanopartículas

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), da Universidade Federal de Goiás (UFG). As amostras foram diluídas em água destilada a 5% (v/v). Foram adicionados 30µL da suspensão coloidal diretamente em lâmina de vidro utilizada para a observação das amostras através microscopia eletrônica de varredura. Posteriormente as amostras foram secas e metalizadas com ouro e submetidas à análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging.

4.2.3.5. Estudo da degradação acelerada pela luz UV

Os estudos de degradação acelerada pela luz UV da 3-HF livre e nanoencapsulada foram realizados em uma câmara de envelhecimento acelerado por ultravioleta construída com conjunto de quatro lâmpadas especiais (Philipps 40 cm, 15 W, quartzo) que simulam a radiação no espectro do UV-A e UV-B com comprimentos de onda entre 400-320 e 320-280 nm, respectivamente.

O sistema foi mantido em temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) e as amostras da 3-HF livre e nanoencapsuladas (1 mL por *vial*) foram colocadas em uma placa petri e submetidas a câmara e em intervalos de tempo previamente estabelecidos (0,0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 9 e 12 horas) as amostras eram retiradas e analisadas no CLAE-DAD. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.3.6 - Estudos da liberação *in vitro*

O estudo do perfil de liberação da 3-HF livre e das nanopartículas foi realizado através da técnica de diálise inversa.²⁴ Foi adicionado o volume 2 mL da suspensão das

nanopartículas em 198 mL de água ultrapura, concentração $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nessa suspensão, foram adicionados 10 sacos de diálise (membrana de celulose MM 12000D, Sigma-Adrich Química, Sintra, Portugal) contendo 1,0 mL de água ultrapura. O sistema foi mantido sob agitação magnética em banho termostatzado a temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$). Em intervalos de tempo previamente estabelecidos (0,0; 0,5; 1; 2; 3; 6; 12; 24; 48 e 72 horas) retirou-se um saco de diálise do meio de liberação e posteriormente foi realizada a quantificação da 3-HF liberada, por CLAE-DAD. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.4 - Ensaio Biológico

4.2.4.1 - Linhagens celulares tumorais

Os ensaios foram realizados no departamento de Gerontologia no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) na Universidade Federal de São Carlos, SP-Brasil, sob supervisão da Professora Dr^a. Marcia Regina Cominetti. Foram utilizadas duas linhagens celulares tumorais humanas (Figura 2), representativas de dois diferentes tipos de tumores:

- MCF-7 (tumor de mama humano);
- A549 (tumor de pulmão humano)

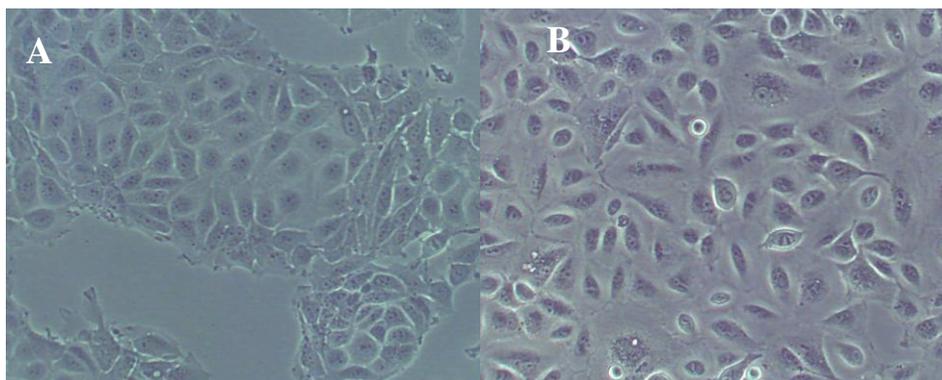


Figura 2. Morfologia das linhagens celulares de tumor de mama humano MCF-7 (A) e câncer de pulmão humano A549 (B). (Lente objetiva de 30x)

4.2.4.2 - Culturas celulares

As células da linhagem MCF-7 (tumor de mama humano) foram cultivadas em meio de cultivo RPMI-1640 (Vitrocell), com bicarbonato de sódio, glutamina, 1% antibiótico penicilina e estreptomicina e antimicótico acrescidos de soro fetal bovino (SBF) (10%). Já o meio utilizado para as células da linhagem A549 (tumor de pulmão humano) foi o meio de cultivo DMEM (Lonza), com 1.0 g.L^{-1} glicose, L-glutamina 584 mg.L^{-1} , 10% soro fetal bovino e 1% penicilina e estreptomicina. As culturas celulares foram mantidas a 37°C e com 5% de CO_2 .

As células foram mantidas em crescimento exponencial tendo-se para tal subcultura por tripsinização. A tripsinização consiste no destacamento das células em monocamada por ação de tripsina. Após a remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com 5 mL de PBS e em seguida adicionados 2 mL de tripsina e incubadas em estufa a 37°C por 5 minutos. A ação tripsina foi interrompida pela adição de meio de cultura através dos inibidores presentes no SBF. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram então ressuspendidas em 5 mL de meio de cultura e transferidas para o novo frasco de cultura ou utilizadas para o ensaio de proliferação celular. As manipulações das culturas celulares foram realizadas em câmara de fluxo laminar vertical.

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o corante de exclusão, azul de tripano. Após tripsinização, em todas as suspensões celulares, foi determinado o número total de células viáveis, para tal foram adicionados $10 \mu\text{l}$ de suspensão celular a $10 \mu\text{l}$ de azul de tripano e procedida a contagem no aparelho Automated Cell Counter (BioRad).

4.2.4.3 - Avaliação da viabilidade celular – Método do MTT

As diferentes linhagens celulares foram preparadas na concentração de 1×10^4 células/ $100 \mu\text{l}$ em meio apropriado, plaqueadas em placas de 96 poços estéreis (Corning), foram incubadas pelo período de 24 horas a 37°C e 5% CO_2 para estabilização.

Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado dos poços e diferentes concentrações dos compostos foram adicionadas em meio contendo SBF. Foram

testadas 8 concentrações diferentes para cada amostra NS1, NC6 e 3-HF livre (80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 0,62 e 0,15 μ M), as quais foram preparadas por diluição seriada em meio de cultura 100 μ l/poço. Nas células controles não tratadas, foi adicionado apenas o meio de cultura. Também foi realizado um controle com nanopartículas vazias. Os ensaios foram realizados em triplicata.

As células foram incubadas por 48 horas após o tratamento e a medida da proliferação celular para cada amostra NS1, NC6 e 3-HF livre foi realizada em comparação aos poços sem tratamento, somente com o meio de cultura. Após o tempo de incubação, o meio de cultura de cada poço foi retirado e uma solução contendo MTT (1mg.mL⁻¹) em 30% de PBS e 70% de meio de cultura foi adicionada (100 μ l/poço). As placas foram então mantidas durante 4h a 37°C e em seguida, foi removida a solução de MTT e adicionados 100 μ L de DMSO. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de placa de ELISA, Labtech LT- 4000 Microplate Reader, em comprimento de onda de 540nm.

4.2.4.4 - Indução de apoptose em células de MCF-7 após tratamento com 3-HF

O ensaio de apoptose foi realizado utilizando o kit PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences). As células de MCF-7 foram plaqueadas (1×10^5) em placas de 12 poços e incubadas por 24 horas. Em seguida foi realizado o tratamento da 3-HF nas concentrações de 40, 80 e 160 μ M por 48 horas, exceto no controle negativo. Após a incubação a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 5min a 4°C, lavada com PBS e ressuspendida em 200 μ L de tampão de ligação, proveniente do kit. As células foram então incubadas com 7-amino-actinomicina (7AAD) e Anexina V-PE por 15 minutos ao abrigo da luz e após o tempo de incubação foi removido o sobrenadante e adicionado aos poços 300 μ L tampão de ligação. As células foram então removidas dos poços com auxílio de um *scraper* e transferidas para os tubos de citometria. As amostras foram analisadas no citômetro (BD Accuri C6) e a fluorescência quantificada através do *software* CSampler.

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 - Caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas

As nanocápsulas (NC5, NC6 e NC7) e as nanoesferas (NS1 e NS2), foram as que apresentaram um sistema homogêneo, sem formação de precipitado ou sobra de 3-HF, com aspecto leitoso e branco. De acordo com os resultados obtidos demonstram que o nível máximo que as nanopartículas suportam é 10 mg de 3- HF. Essas formulações que apresentaram melhores resultados foram caracterizadas analisando os seguintes parâmetros: diâmetro de partículas (DP), potencial zeta (PZ), índice de polidispersão (PDI), pH, eficiência de encapsulação (EE%) e recuperação. Esses resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados da média das nanopartículas preparadas. **NS:** nanoesfera; **NC:** nanocápsula; **DP:** diâmetro de partícula; **PZ:** potencial zeta; **PDI:** índice de polidispersão; **EE:** eficiência de encapsulação, para as diferentes formulações de nanopartículas (\pm Dp- Desvio Padrão)

Amostra	DP (nm) \pm Dp	PDI \pm Dp	PZ (mV) \pm Dp	pH \pm Dp	EE% \pm Dp	Recuperação% \pm Dp
NC 5	293,30 \pm 105,29	0,59 \pm 0,13	-28,27 \pm 2,77	6,45 \pm 0,14	98,84 \pm 0,45	85,29 \pm 8,94
NC 6	264,00 \pm 19,96	0,34 \pm 0,02	-26,93 \pm 2,60	6,54 \pm 0,15	99,02 \pm 0,24	97,11 \pm 5,90
NC 7	296,25 \pm 25,95	0,57 \pm 0,14	-26,33 \pm 2,10	6,73 \pm 0,00	96,41 \pm 0,14	89,32 \pm 7,93
NS 1	240,67 \pm 26,47	0,33 \pm 0,02	-25,73 \pm 3,36	6,14 \pm 0,28	99,13 \pm 0,34	95,41 \pm 1,13
NS 2	261,23 \pm 6,85	0,29 \pm 0,08	-27,20 \pm 5,49	6,09 \pm 0,55	99,26 \pm 0,33	96,76 \pm 0,72

De acordo com Schaffazick, e colaboradores (2003) ²⁵ as nanopartículas mesmo quando preparadas utilizando diferentes métodos, normalmente os diâmetros médios ficam em entre 100 e 300 nm, no caso das nanocápsulas, um aspecto que influencia o diâmetro das partículas, é a natureza do óleo utilizado como núcleo. Assim os diâmetros médios obtidos neste trabalho das nanopartículas poliméricas através do método de nanoprecipitação, foram menores que 300 nm, no qual estão em concordância com os dados relatados na literatura.

No presente trabalho as nanocápsulas apresentaram diâmetro médio maior das formulações preparadas em torno de 280 nm, já as nanoesferas apresentando o diâmetro médio em torno de 250 nm. Essa diferença do diâmetro das nanopartículas, certamente é pela presença do óleo (miristato de isodecila), presente nas nanocápsulas e ausente nas nanoesferas.

Valores semelhantes do diâmetro de partículas foram reportados por Cruz e colaboradores (2006)²⁶ obtiveram diâmetros de partícula para nanocápsulas carregada com ésteres etílicos indometacina (IndOEt-NC) foi 279 nm, para nanocápsulas com indometacina (IndOH-NC) 297 nm e para as nanocápsulas vazias 288 nm. Cazo e colaboradores (2012)²⁷ verificaram que para as nanopartículas carregadas com hidrocortisona o diâmetro médio foi de 109,2 nm para as nanoesferas e 236,5 nm para as nanocápsulas. As nanopartículas contendo xantiletina como princípio ativo apresentaram diâmetros médios de 283,25 nm e 201 nm para nanocápsulas e nanoesferas, respectivamente.²⁸

O índice de polidispersão representa a homogeneidade da distribuição de tamanho das nanopartículas. Em geral as nanopartículas poliméricas apresentam distribuição unimodal e um baixo índice de polidispersão²⁹, os valores do PDI nesse trabalho ficaram entre 0,29 e 0,59, de acordo com a literatura valores de polidispersão abaixo de 0.3 significa que é um sistema monodisperso³⁰, a maioria das nanopartículas apresentaram valores abaixo a 0.3 com exceção as nanocápsulas NC5 e NC7, que apresentaram valores em torno de 0,5. De acordo com Souza e colaboradores (2012)³¹ valores altos de índice de polidispersão indicam heterogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão

O potencial zeta é uma das principais característica das nanopartículas, pois reflete o potencial de superfície das partículas, fornece informações acerca das mudanças na interface com o meio dispersante.²⁵ Através do potencial zeta é possível avaliar a estabilidade das nanopartículas, quanto maior o potencial zeta, maior será a estabilidade das partículas, indicando que as interações repulsivas entre as partículas são maiores, superando a tendência de agregação³² e também está relacionado com sua relação com a resposta biológica do fármaco associado.²⁵

Nanopartículas com potencial zeta entre +10 e -10 mV são consideradas aproximadamente neutras, por outro lado, nanopartículas com potencial zeta mais elevados que 30 ou menor que -30mV são considerados como sendo muito estáveis no meio de dispersão.^{33,34} Todas as formulações apresentaram o potencial zeta valores próximos de -25 mV, indicando que estas apresentam adequada estabilidade.

Esses valores negativos são devido aos componentes da interface das partículas, o polímero PCL- poli(ϵ -caprolactona) e especialmente polissorbato 80 (Tween 80), decorrente de suas características estruturais.³⁰ O potencial zeta depende de vários fatores, mas os principais são a natureza química do polímero, do estabilizador

e do pH do meio.³⁵ CAZO e colaboradores (2012)²⁷ obtiveram os seguintes resultados na determinação do potencial zeta de nanopartículas poliméricas de PCL contendo hidrocortisona, apresentaram valores médios de $-19,3$ para as nanoesferas e $-31,2$ mV para nanocápsulas.

A medição do pH nas suspensões nanopartículas é um parâmetro importante, que gera informações relevantes sobre a estabilidade, a alteração do pH pode estar relacionada com a degradação do polímero ou de algum outro componente da formulação.²⁵ O valor do pH de todas essas formulações selecionadas ficou próximo a 6. A eficiência de encapsulação (EE%) da 3-HF nas nanocápsulas e nanoesferas ficou em média entre 98,07 e 99,20%, respectivamente. Quanto à capacidade de encapsulação da 3-HF as formulações que apresentaram maior eficiência de encapsulação foram a NC6 cerca de 99,02% (nanocápsula) e a NS2 cerca de 99,26% (nanoesfera).

Pelos resultados de caracterização das formulações de nanoesferas, não houve diferenças significativas com relação à variação do PCL. De modo geral a caracterização das nanoesferas de PCL contendo a 3-HF apresentaram perfil semelhante às nanocápsulas, não apresentando diferenças significativas entre os parâmetros analisados.

Diante destes resultados, para estudo de morfologia, liberação controlada, estudo de degradação e ensaio biológicos, utilizou-se as formulações NS1 (nanoesfera) e a NC6 (nanocápsula), uma vez que se utilizou menor quantidade de PCL e miristato de isodecila, sendo mais viável econômica e ambientalmente. Além de terem apresentado bons resultados nos parâmetros de caracterização e boa eficiência de encapsulação combinada com maior estabilidade do sistema.

4.3.2 - Morfologia das nanopartículas

A avaliação morfológica foi realizada no intuito de verificar a homogeneidade das suspensões coloidais e a morfologia das nanopartículas obtidas. Na Figura 3 é possível evidenciar a presença de nanopartículas esféricas.

As formulações NC6 nanocápsulas e a NS1 nanoesferas da 3-HF, apresentaram diâmetro médio de 264 e 240 nm, respectivamente, que pôde ser confirmado através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Quanto à morfologia das nanocápsulas e nanoesferas foi observada a forma esférica, com superfície lisa e pouca rugosidade.

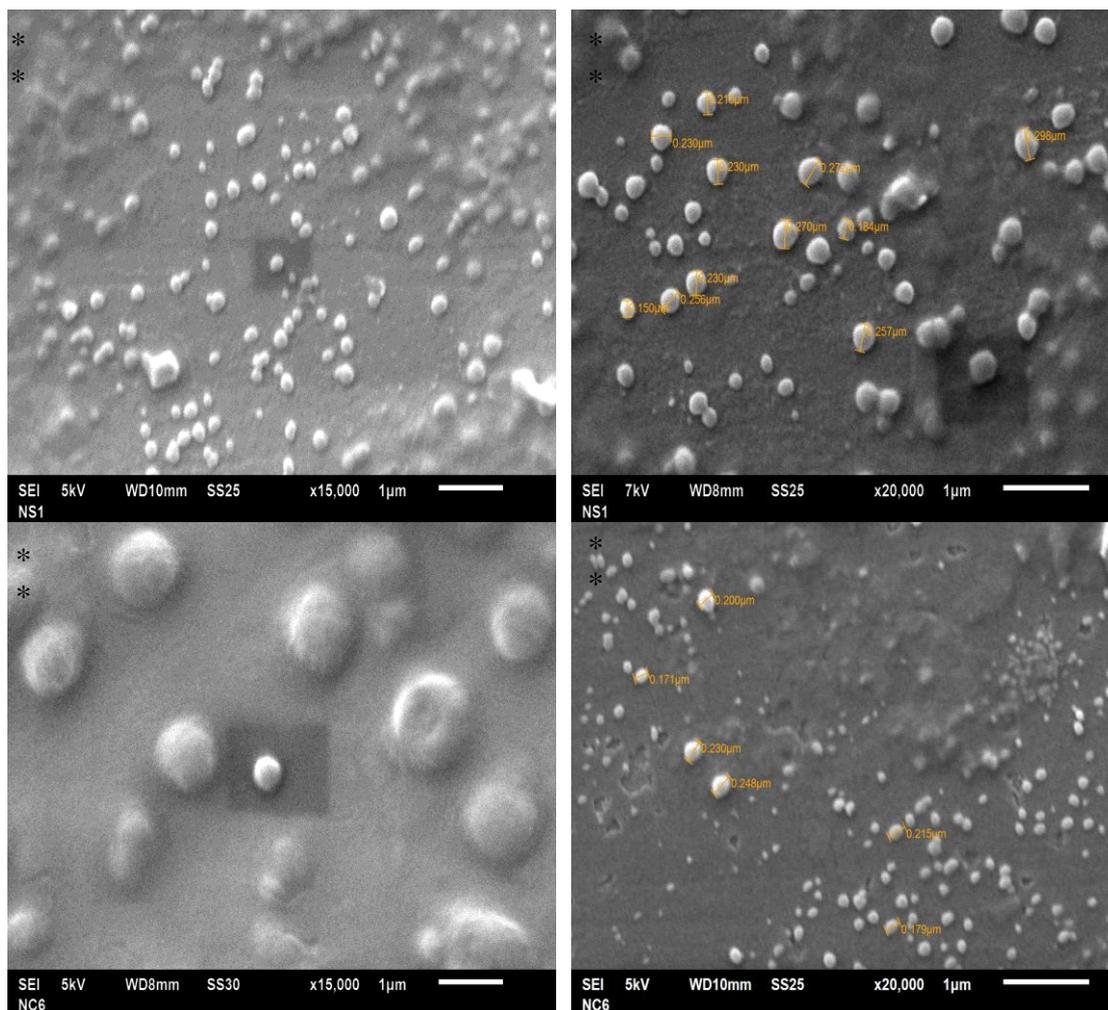


Figura 3. Fotomicroscopia obtidas por MEV das suspensões de: nanoesferas de 3-HF NS1 (A e B), nanocápsulas de 3-HF NC6 (C e D)

Utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), que é uma técnica capaz de produzir imagens de alta ampliação de até 300.000 vezes, com excelente resolução, Abreu e colaboradores (2014)³⁶ comparam as nanopartículas contendo nisina e as nanopartículas sem a presença de nisina, utilizando o polímero PCL. Eles observaram que as nanopartículas contendo nisina apresentaram um formato mais regular de forma esférica. Galindo-Rodriguez e colaboradores (2004)³⁷ também utilizaram essa técnica para verificar a morfologia e superfície de nanopartículas, confirmaram o tamanho e forma das mesmas, que foram preparadas pelo método de nanoprecipitação.

4.3.3 - Estudo da degradação acelerada pela luz UV

A Figura 4 apresenta o perfil de degradação da 3-HF livre e nanoencapsulada. Observa-se que os nanoencapsulados apresentaram perfil de degradação semelhante, já a 3-HF livre demonstrou degradação muito mais acelerada comparada com as nanocápsula e nanoesfera.

De acordo com o observado, em 12 horas de exposição à luz, a da 3-H livre sofreu uma degradação de 49,86 %, enquanto a 3-HF presentes nas nanoesferas degradaram 31,17% e nas nanocápsulas 30,43% neste mesmo intervalo de tempo, demonstrando a importância da encapsulação da 3-HF para proteção contra possível degradação.

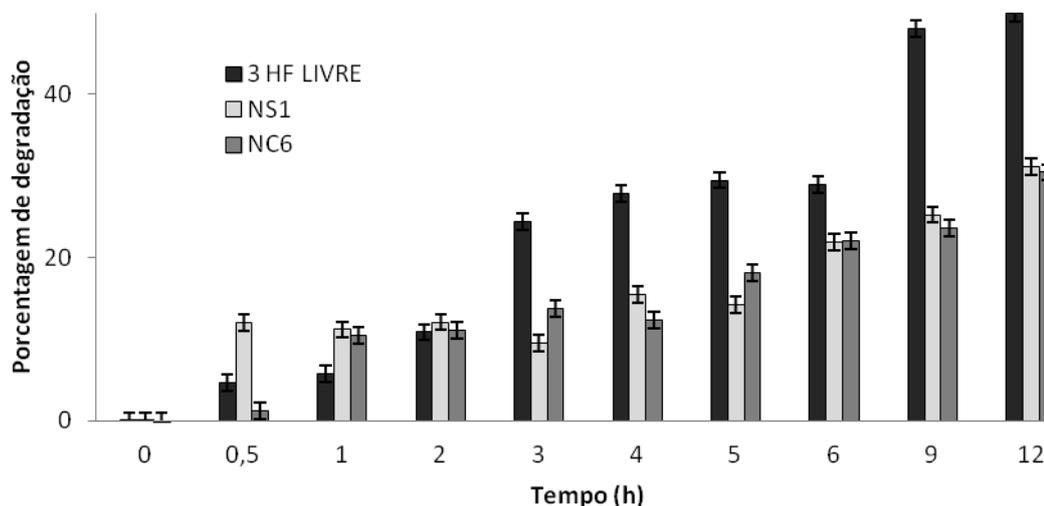


Figura 4. Média da degradação da luz (\pm desvio padrão) da 3-HF livre (3-HF), nanocápsula (NC6) e nanoesfera (NS1) à base da 3-HF

4.3.4 - Estudo da liberação *in vitro*

Os perfis de liberação dos fármacos a partir de nanopartículas dependem da natureza do sistema de liberação. Alguns fatores podem influenciar a liberação de fármacos em sistemas nanoparticulados, dentre eles a desorção do fármaco adsorvido na superfície polimérica, a difusão do fármaco pela matriz polimérica, a cristalinidade do fármaco, a erosão do polímero e os processos de erosão e difusão combinados.^{34,38}

O estudo do perfil de liberação da 3-HF a partir das nanopartículas foi realizado através da técnica de diálise inversa. Apenas 3-HF passa através dos poros da membrana enquanto as nanopartículas não, permitindo a difusão 3-HF liberada. Os

resultados foram expressos em termos da percentagem de liberação, as nanopartículas à base de 3- HF apresentaram liberação lenta e gradativa. Ao fim de 72 horas de ensaio, verificou-se a difusão da 3- HF nas nanocápsulas 5,01% (Figura 5) e nas nanoesferas de 7,33% (Figura 6). Os perfis de libertação das nanoesferas e das nanocápsulas foram semelhantes e não mostraram diferença significativa e também pôde-se observar que a liberação não apresentou o “efeito *burst*”, que é uma liberação inicial de grande quantidade do fármaco associado à fração do fármaco que se encontra adsorvido na superfície da partícula.³⁸

Pimentel (2010)³⁹ obteve um perfil de liberação semelhante ao encontrado no presente estudo a quantidade de progesterona liberada das nanopartículas de Poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) PHBV3/ PCL, ficou em média de 8,30% durante 48 horas de experimento.

De acordo com a Abreu e colaboradores (2016)⁴⁰ nanopartículas poliméricas de PCL possuem como uma de suas principais características, uma liberação bastante lenta dos princípios ativos nelas incorporadas, chegando a liberar até por dias o ativo. Utilizando esse mesmo sistema estudaram o perfil de libertação *in vitro* de nanopartícula contendo nisina. A liberação foi lenta e constante durante 621 h (20%), após 16 h, apenas 2,6% da nisina foram libertados e após 114 h (aproximadamente 5 dias) quase 7%.

Soares e colaboradores (2011),⁴¹ desenvolveram nanopartículas de PCL com Zinco (II) ftalocianina (ZnPc) e observaram liberação cerca de 10% ZnPc da encapsulada após 48 h, uma característica que se destacou no perfil de liberação foi a ausência do “efeito *burst*”, no qual ocorreu liberação mais lenta e sustentada do fármaco, nesse caso podem ser indicativos que a ZnPc estava homogeneamente dispersa na matriz polimérica da nanopartícula e que o processo predominante na liberação seja a difusão e não a dessorção do fármaco, o perfil de liberação *in vitro* avalia a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo, e para isso é necessário que as condições *in vitro* devem simular ao máximo as condições *in vivo*.

A utilização da água como meio receptor no ensaio de liberação *in vitro*, foi em função de assimilar as condições biológicas, mas devido a 3- HF ser pouco solúvel em água apenas 28,9 mg / L, a 25 °C,² ocorreu baixa liberação. Além do que, a degradação do PCL no meio aquoso é bem lenta pela hidrofobicidade e à cristalinidade da matriz polimérica.^{42,43}

A liberação gradual do princípio ativo possui várias vantagens como: proteção do princípio ativo, melhora biodisponibilidade e menor toxicidade, e redução da necessidade de altas doses.²⁰⁻²²

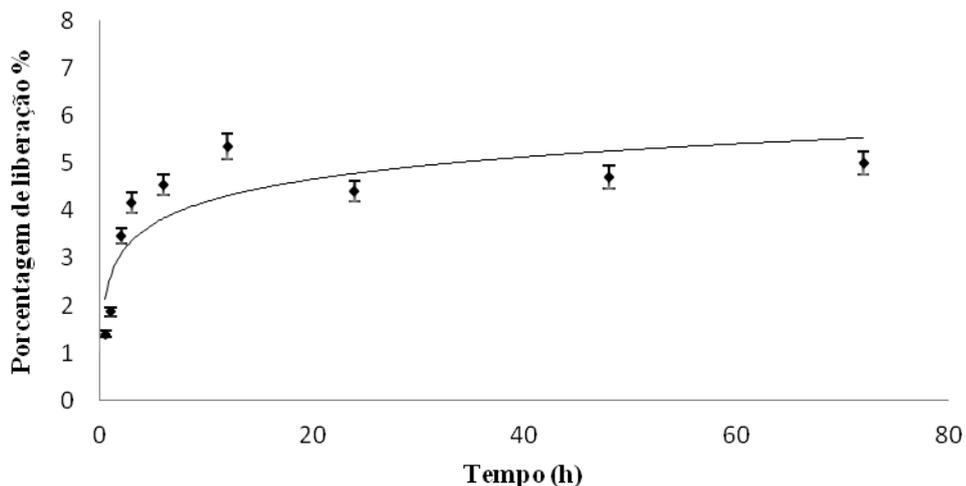


Figura 5. Média do perfil de liberação in vitro da 3-HF a partir da dispersão de nanocápsula (NC6), seguida da sua difusão através do saco de diálise. A concentração teórica para dispersão é de 10 ug.mL^{-1} de 3-HF

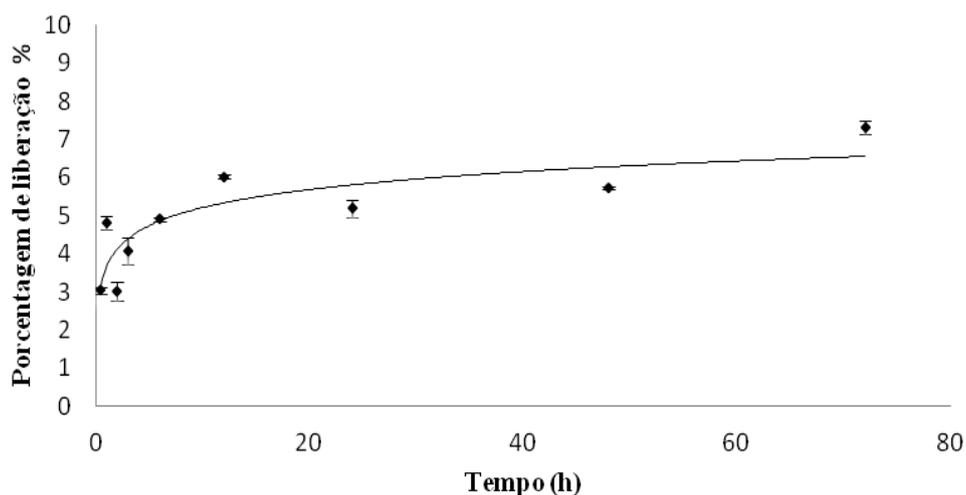


Figura 6. Média do perfil de liberação in vitro da 3-HF a partir da dispersão de nanocápsula (NS1), seguida da sua difusão através do saco de diálise. A concentração teórica para dispersão é de 10 ug.mL^{-1} de 3-HF

4.3.5 - Ensaio biológico

O efeito citotóxico da 3-HF livre e na sua forma nanoencapsulada (nanocápsula e nanoesfera) foi avaliado em duas linhagens celulares tumorais humanas, MCF-7 (tumor de mama humano) e A549 (tumor de pulmão humano) (Figura 7), através do uso do reagente MTT [*brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio*].

A Figura 7 mostra o efeito da 3-HF no crescimento das linhagens celulares de tumor de pulmão humano (A549) e tumor de mama humano (MCF-7). No presente trabalho a 3-HF exibiu valores de IC₅₀ (concentração de composto que causa 50% de inibição do crescimento celular) de 118,7 e 207,3 µM para as linhagens A549 e MCF-7, respectivamente. Todavia, esse mesmo composto em outro trabalho inibiu o crescimento de tumor de mama humano (MCF-7), câncer de células não pequena de pulmão (NCI-H460) e melanoma (A375-C5), apresentando GI₅₀ (inibição 50% do crescimento celular) menor que 8,30 µM, além disso, induziu cerca de 30% de morte celular por apoptose.¹⁵

A 3-HF induziu a inibição da proliferação em diferentes linhas celulares de câncer, apresentando os seguintes valores de IC₅₀ como A375- melanoma humano (7,2 µM), MCF-7- tumor de mama humano (14,2 µM), H1299- carcinoma de células não pequenas do pulmão de células (19,1µM), Hela- célula imortal (23,4µM), SK-OV-3- carcinoma do ovário (30,9), SK-Hep1 - adenocarcinoma do fígado (39,2µM), SW620- carcinoma do cólon (39,4), entre outros.¹³

Exibiu também uma atividade inibitória sobre E2 (17-β-estradiol)/ IGF-I (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina) na proliferação de células MCF-7,¹² tumor de pulmão humano (A549), bem como leucemia (K562-S) e nenhum efeito citotóxico foi observado nos grupos de células normais (HaCaT e MDCK).¹⁴

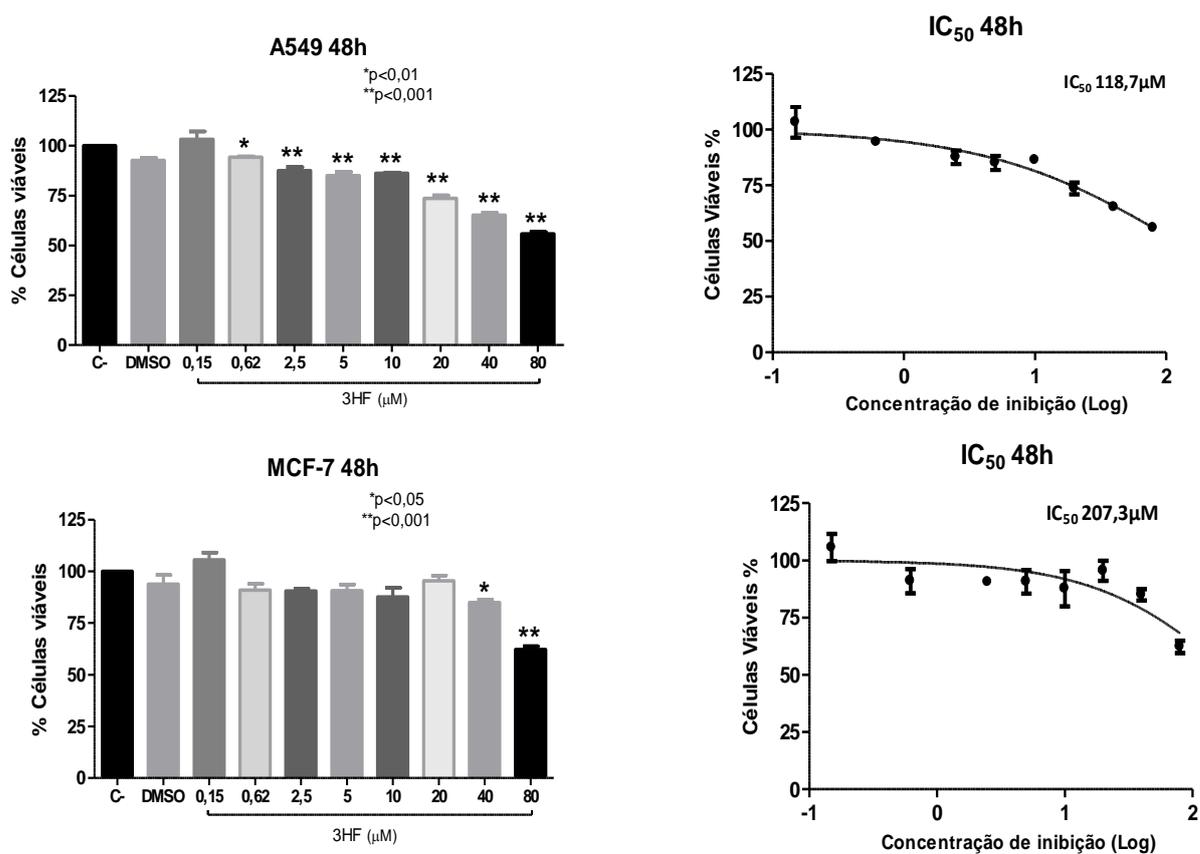


Figura 7. Efeito da 3- HF no crescimento das linhagens celulares tumorais humanas A549 e MCF-7

A Figura 8 traz os resultados do efeito da 3-HF nanoencapsulada na forma de nanocápsulas (NC6) e nanoesferas (NS1). Embora não tenha sido possível calcular IC₅₀, foi possível observar a morte celular significativa nas amostras tratadas com NC6 e NS1 apenas na linhagem A549.

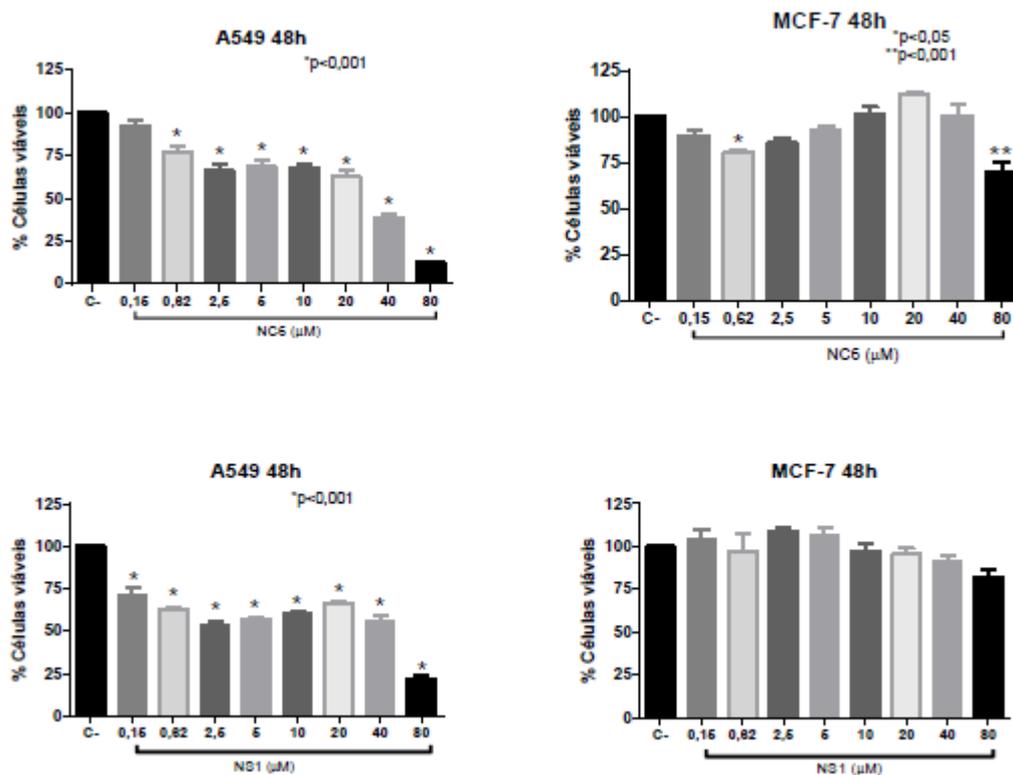


Figura 8: Efeito da 3-HF nanoencapsulada na forma de nanocápsulas (NC6) e nanoesferas (NS1)

A Figura 9 mostra a indução de apoptose em células de MCF-7 após 48 horas de tratamento com 3- HF na concentração 40, 80 e 160 μM. Os resultados indicam que não há aumento expressivo da taxa total de apoptose, chegando a apenas 19,3% de indução no tratamento com 160 μM de 3- HF. Entretanto, há relatos na literatura que a 3-HF na concentração de 8,3 μM induziu cerca de 30% de morte celular por apoptose, em células de NCI-H460.¹⁵

Alguns pesquisadores também encontraram esse fraco efeito citotóxico desse composto sobre algumas linhagens celulares como Caco-2 (Linhagem celular humana do cancro de cólon) e HT-29 (adenocarcinoma do cólon) exibindo IC₅₀ de 65,8 μM e 58,6 μM, respectivamente.⁴⁴ Também não afetou a síntese de lipídeos nas células tumorais LNCaP (câncer de próstata) e MDA-MB-231.⁴⁵

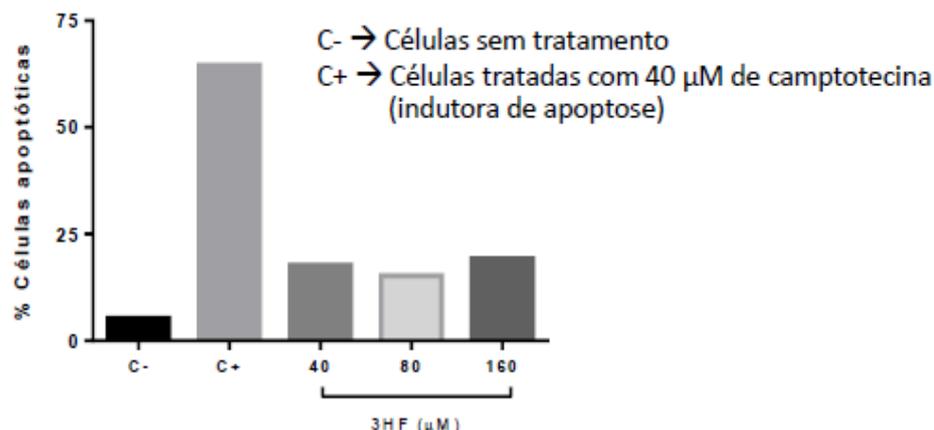


Figura 9: Indução de apoptose em células de MCF-7 após 48 horas de tratamento com 3- HF na concentração 40, 80 e 160 µM

Mesmo que a substância encapsulada não aumente a sua atividade, o uso das nanopartículas ainda é justificado, estas oferecem outras vantagens uma vez que a encapsulação pode promover a liberação controlada, com isso reduz a necessidade de altas doses ou múltiplas administrações do fármaco por dia, com diminuição da toxicidade e de efeitos indesejáveis no organismo, além de aumentar a solubilidade e proteger o princípio ativo contra degradações e ainda aumentar a penetração intracelular e consequentemente melhora sua eficácia na atividade farmacológica.²⁰⁻²²

4.4 - CONCLUSÃO

O método de nanoprecipitação utilizando o polímero pré-formado pela técnica de deposição interfacial mostrou-se eficiente para o preparo das nanocápsulas e nanoesferas contendo 3- HF. Foi possível obter formulações com elevada eficiência de encapsulação acima de 96%.

O estudo de degradação pela luz demonstrou o efeito fotoprotetor das nanopartículas para a 3-HF. Além disso, a encapsulação proporcionou o aumento na solubilidade, proteção do princípio ativo e liberação controlada sugerindo assim maior estabilidade da 3-HF.

A atividade antitumoral *in vitro* revelou que a 3-HF livre exibiu valores de IC₅₀ para MCF-7 (tumor de mama humano) maiores que encontrados na literatura, enquanto a 3-HF nanoencapsulada embora não tenha sido possível calcular o IC₅₀, observou-se a morte celular significativa nas amostras tratadas na linhagem A549.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES). À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (Campus Rio Verde e Iporá) e Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais-Campus Barbacena, pelo apoio.

4.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – Chaudhuri, S.; Basu, K.; Sengupta, B.; Banerjee, A.; Sengupta, P. K.; *Luminescence* **2008**, *23*, 397.
- 2 – Christoff, M.; Toscano, V. G.; Baader, W. J. J. *Photochem.* **1996**, *101*, 11.
- 3 - Voicescu, M.; Ionescu, S.; Nistor, C. L.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2017**, *170*, 1.
- 4 - Xu, B.; Yang, G.; Ge, S.; Yin, T.; Hu, M.; Gao, S.; *J. Pharmaceut. Biomed* **2013**, *85*, 245.
- 5 – Ibrahim, A.; Sobeh, M.; Ismail, A.; Alaa, A.; Shaa, H. S.; Sobh, M.; Badria, F.; *Molecular and Clinical Oncology*: **2014**, *2*, 581.
- 6 – Dell'Anna, M. M. Censi, V.; Carrozzini, B.; Caliandro, R.; Denora, N.; Franco, M.; Veclani, D.; Melchior, A.; Tolazzi, M.; Mastroilli, P.; *Journal of Inorganic Biochemistry* **2016**, *163*, 346.
- 7– Lu, K. H.; Chen, P. N.; Hsieh, Y. H.; Lin, C. Y.; Cheng, F. Y.; Chiu, P. C.; Chu, S. C.; Hsieh, Y. S.; *Food Chem Toxicol.* **2016**; *97*, 177.
- 8 – Uhm, S. J.; Gupta, M. K.; Chandra, Z. D.; Lim, K. T.; Yang, J. H.; Lee, H. T.; *Reprod. Toxicol.* **2011**, *31*, 231.

9 – Sakagami, H.; Jiang, Y.; Kusama, K.; Atsumi, T.; Ueha, T.; Toguchi, M.; Iwakura I.; Satoh, K.; Fukai, T.; Nomura, T. *Anticancer Res.* **2000**, *20*, 271.

10 – Cassetta, A.; Stojan, J.; Krastanova, I.; Kristan, K.; Švegelj, M. B.; Lamba, D.; Rižner T.; L.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *1*.

11 – Shen, S. C.; Ko, C. H.; Hsu, K. C.; Chen, Y. C.; *Int. J. Cancer* **2004**: *108*, 502.

12 – Lin, H.; Xingyue, E.; Lee, P. L.; Elisa, S.; Zhenyu, X.; Yu, L.; Wen, X.; Lars, Z.; Jill, M.; Dana, R.; Aimee, L. J.; Peter, S. L.; Caifu, C.; Scott, W. L.; Michele, A. C.; Gregory, J. H.; *Journal of Science* **2007**, *447*, 1130.

13 – Lang Q, Zhang H, Li J, Xie F, Zhang Y, Wan B, Yu, L.; *Mol Biol Rep* **2010**; *37*, 1577.

14 – Kim, J.H.; Song, M. G.H. ; Kang, E.R.; Lee, H.Y. ;Choi, C. ;Lee, Y. ;Kim, B.N. ;Koo, S.G. Cho, *Leuk. Res.* **2012**, *36*, 1157.

15 – Cazal, C. M.; Choosang, K.; Severino, V.G.P.; Fernandes, J.B.; Silva, M.F.G.F.; Vieira, P.C.; Nascimento, M.S.J.; Almeida, G.M.; Vasconcelos, M.H.; Pakkong, P.; Pinto, M.M.M. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 1582.

16 – Pubchem Disponível em :<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11349#section=Melting-Point>, acessada em Novembro 2016.

17 – Epa Disponível em: <http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedl.htm>, acessada em Novembro 2016.

18 – Calabrò, M. L.; Tommasini, S.; Raneri, D.; Donato, P.; Ficarra, P.; Ficarra, R. *J. Chromatogr. B* **2004**, *800*, 245.

19 – Banerjee, A.; Sengupta, P. K. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *424*, 379.

- 20 – Teixeira, M.; Alonso, M. J.; Pinto, M. M.M; Barbosa, C. M.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *59*, 491.
- 21 – Barrios, J. G.; Farias, G. D.; Roggia, I.; Peixoto, S. C.; Pons, F. R.; Bruschi, Márcia, Raffin, R. P.; Alves, M. P.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1464.
- 22 - Venditto, V.J.; Szoka, F.C.J.; *Adv Drug Deliv Rev.* **2013**, *65*, 80.
- 23 - Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Ammoury, N. Benita, S.; *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*. R1-R4.
- 24 - Magenheimer, B.; Benita, S.; *Pharma Sciences* **1991**, *1*., 221.
- 25 – Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 726.
- 26 – Cruz, L.; Soares, L. U.; Costa, T. D.; Graziela, M.; Silveira, N. P.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; *Int. J. Pharm.* **2006**, *313*, 198.
- 27 – Cazo, N. A.; Pereira-Filho, E. R.; Silva, M F. G. F.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Puhl, A. C.; Polikarpov, I.; Forim, M. R.; *Orbital: Electron. J. Chem.* **2012**, *4*, 1585.
- 28 – Cazal, C. M.; Forim, M. R.; Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C.; Fernandes, J.B.; *Quim. Nova* **2014**, *37*, 1145.
- 29 – Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J.; *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 530.
- 30 – Kulkamp, I.; Paese, K; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R.; *Quím. Nova* **2009**, *32*, 2078.
- 31 – Souza, P. M.; Lobo, S. F.A.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F.; *Quím. Nova* **2012**, *35*, 132.

- 32 – Instrutec: Disponível em: [//www.instrutec.com.br/represen/bic/teoriazeta.html](http://www.instrutec.com.br/represen/bic/teoriazeta.html), acessada em Janeiro 2017.
- 33 – Clogston, J. D.; Patri, A. K.; *Zeta Potential Measurement*. In.: McNeil SE, editor. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*. New York: Humana Press. **2011**. 63,70.
- 34 – Wu, Y.; Li, M. J.; Gao, H. X.; *J. Polym. Res.* **2009**, *16*, 11.
- 35 – Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A.; *Int. J. Pharm.* **2009**, *385*, 113.
- 36 – Abreu, L. C. L.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2014.
- 37 – Galindo-Rodriguez, S.; Allemann, E.; Fessi, H.; Doelker, E.; *Pharm. Res.* **2004**., *21*, 1428.
- 38 – Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E.; *J. Controlled Release*, **2001**, *70*, 1.
- 39 – Pimentel, J. R. V.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2010.
- 40 – Abreu, L.C. L.; Todaro, V.; Sathler, P. C.; Silva, L. C. R. P.; Carmo, F. A.; Costa, C. M.; Toma, H. K.; Castro, H. C.; Rodrigues, C. R.; Sousa, V. P.; Cabral, L. M.; *AAPS PharmSciTech* **2016**, *17*, 1421.
- 41 – Soares, M. V.; Oliveira, M. R.; Santos, E. P.; Gitirana, L. B.; Barbosa, G. M.; Quaresma, C. H.; Ricci-Júnior, E.; *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 227.
- 42 – Sinha, V.R.; Bansal, K.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Trehan,. *Int. J. Pharm.* **2004**, *278*, 1.
- 43 – Chawla, J. S.; Amiji, M. M.; *Int. J. Pharm* **2002**, *249*, 127.

44 – Kuntz, S.; Wenzel, U.; Daniel, H.; *Eur. J. Nutr.* **1999**, 38, 133.

45 – Brusselmans, K.; Vrolix,R.; Verhoeven,G.; Swinnen, J.V.; *J. Biolog. Chem*, **2005**, 280, 5636.

5 - CONCLUSÃO GERAL

O método analítico foi validado segundo ANVISA (2003) e *ICH* (1996), atendeu às exigências analíticas, cumprindo os requisitos para ser considerado um método confiável e viável, mostrando ser simples, rápido, específico, linear, preciso e sensível, método foi eficiente para análises de quantificação da 3-hidroxi-flavona por cromatografia líquida de alta eficiência, e assim foi possível ser aplicado com sucesso para a determinação da eficiência de encapsulação de 3-hidroxi-flavona em nanopartículas poliméricas.

O método de nanoprecipitação utilizando o polímero pré-formado PCL pela técnica de deposição interfacial mostrou-se eficiente para o preparo das nanocápsulas e nanoesferas contendo 3-HF, obtendo formulações com eficiência de encapsulação acima de 96%.

Pela técnica da microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível visualizar a morfologia das nanocápsulas e nanoesferas, observando uma forma esférica, com superfície lisa e pouca rugosidade.

Através do estudo de degradação acelerado pela luz UV, foi possível demonstrar o efeito fotoprotetor das nanopartículas para a 3-HF. Além disso, a encapsulação proporcionou aumento na solubilidade, proteção do princípio ativo e liberação controlada sugerindo assim maior estabilidade da 3-HF.

Os ensaios biológicos mostraram que atividade antitumoral *in vitro* da 3-HF livre exibiu valores de IC_{50} para MCF-7 (tumor de mama humano) maiores que encontrados na literatura, enquanto a 3-HF nanoencapsulada embora não tenha sido possível calcular o IC_{50} , observou-se a morte celular significativa nas amostras tratadas na linhagem A549.