



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMILA DE OLIVEIRA MELO

NANOPARTÍCULAS DE PLA CONTENDO DERIVADO ESPIRO-ACRIDÍNICO
COM ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA

CAMPINA GRANDE- PB

2018

CAMILA DE OLIVEIRA MELO

**NANOPARTÍCULAS DE PLA CONTENDO DERIVADO ESPIRO-ACRIDÍNICO
COM ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Ricardo Olímpio de Moura

Co-orientador: Dr. Elquio Eleamen Oliveira

CAMPINA GRANDE- PB

2018

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

M528n Melo, Camila de Oliveira.
Nanopartículas de PLA contendo derivado espiro-acridínico com atividade anticancerígena [manuscrito] : / Camila de Oliveira Melo. - 2018.
84 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.

"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

"Coorientação: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."

1. Câncer. 2. Acridina. 3. Sistemas de liberação de fármacos.

21. ed. CDD 615.1


CAMILA DE OLIVEIRA MELO


**NANOPARTÍCULAS DE PLA CONTENDO DERIVADO ESPIRO-ACRIDÍNICO
COM ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 13/03/2018

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Elisângela Afonso de Moura Mendonça
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)


Prof.^a. Dr.^a. Ana Claudia Dantas de Medeiros
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

*Dedico a meus pais por acreditar e me incentivar a
buscar meus sonhos, a vocês todo meu amor e gratidão.*

“Algo é impossível até que alguém duvide e resolva provar o contrário”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus** que com seu amor infinito vem me ajudando a ter forças e lutar dia após dia pelos meus sonhos, por me abençoar tanto e me proteger por onde quer que eu caminhe.

Aos meus pais **José Soares** e **Monica Sueli de Melo** pelo amor incondicional e por me ajudarem tanto quando eu preciso, por serem meu ponto de equilíbrio e refúgio, a minha base e alicerce, e por aguentarem sem reclamar a saudade que sentem, a vocês todo meu amor e gratidão.

As minhas irmãs **Jaiza Melo** e **Vivian Suene**, por me apoiarem e mesmo de longe estarem sempre presente em minha vida. Amo muito vocês

A todos os familiares e amigos que sempre torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao profº Drº **Ricardo Olímpio de Moura**, pela orientação, confiança, paciência, por acreditar desde o início nesse trabalho e por vezes me fazer acreditar também. Obrigada pelo SIM que você me deu sem nenhum questionamento, por ser esse exemplo de profissional que me inspirou e pela amizade que construímos ao longo desse tempo trabalhando juntos. Obrigado é uma palavra muito vaga perto da gratidão que sinto. *“ É tão bonito quando a gente perde o brilho então a vida nos faz o favor de entregar pro coração pedaços de estrelas do céu pra outra vez nos iluminar...”*

Ao profº Drº **Elquio Eleamen Oliveira** pela coorientação, que foi uma orientação de fato, por toda paciência e disposição. Por me ajudar e melhorar minha personalidade científica e profissional, por todos os “puxões de orelha” na hora certa que foram essenciais para a minha evolução como pesquisadora e ser um amigo quando precisei. Um orientador que se importa com a qualidade do trabalho e está ao lado do aluno, orientando e ajudando quando necessário, isso é raro no meio acadêmico e eu agradeço por ter esse privilégio. Muito obrigada pela orientação e amizade.

A minha querida aluna de iniciação científica, **Marine Nascimento Lima** (minha Mari) , pela dedicação para realização desse trabalho, por não medir esforços para me ajudar, por todas as risadas compartilhadas e o cansaço de horas e mais horas de cinética. Obrigada pelo companheirismo e amizade.

A disposição e amizade da doutoranda **Silvana Cartaxo da Costa Urtiga** (minha Sil), cuja ajuda foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho. Por mesmo a distância ser parte essencial para realização dessa dissertação, por todas as conversas paralelas e compartilhamento de conhecimentos. Sua amizade foi o bem mais valioso que eu poderia receber. Meu muitíssimo obrigado!

Ao Dr. **Henrique Rodrigues Marcelino**, pela disposição em ajudar e por me receber no laboratório de sistemas dispersos (LASID-UFRN) e por toda implicância ao longo dessa dissertação. Meu muito obrigado.

Ao laboratório de biotecnologia e tecnologia farmacêutica (TECBIOFAR- UFRN) pela disposição da infraestrutura, em especial ao aluno **Emmanuel dos Santos Silva** por ser sempre prestativo e solidário, compartilhar seu vasto conhecimento comigo e como sempre falo “um dia quero ter esse conhecimento todo como você”, construímos uma relação de amizade que vai além da parceria acadêmica. *“Estranho mas já me sinto como um velho amigo seu...!”*

Ao técnico do laboratório escola de farmácia industrial & laboratório de desenvolvimento de medicamentos (LEFI-UFRN), **Ednaldo Gomes** pela disposição em fazer as minhas análises de infravermelho.

Ao aluno **Rômulo** por ceder as linhagens de células tumorais de câncer de mama humano e por toda paciência em fazer todos os cultivos quando solicitado.

A equipe do laboratório de síntese e vetorização de moléculas (LSVM) **Ana Lígia, Michele Pedrosa, Miguel Segundo, William Moura, Felipe Patrício, Rodrigo Santos** e tantos outros, em especial aos meus queridos amigos **Frederico Favaro** (Fred) e **Juliana Nunes** (Juh) que foram meus melhores amigos durante o tempo que passei aqui, por todas as risadas, todas as nossas “saídas” sempre muito divertidas. Nossa amizade vai além de distâncias, e é muito bom saber que mais valioso que o título de mestre ganhei a amizade de vocês!

A equipe do laboratório de sistemas dispersos (LASID- UFRN) pela receptividade e auxílio. Obrigada a **Kátia Lira** pelas análises térmicas e pela disposição, a **Christian Melo** pela amizade e parceria, sempre disposto a ajudar e me ouvir, tens a minha admiração como pessoa e como profissional.

A aluna **Luíse Simões** e **Bruna Braga** do laboratório de biotecnologia molecular e celular da UFPB por toda a dedicação para realização dos testes *in vitro*. Por toda a infinita PACIÊNCIA em ir para laboratório em finais de semana, compartilhar a agonia de prazos e correr comigo para que tudo saísse a tempo. Obrigado é muito pouco perto do que vocês fizeram por mim nessa dissertação. Minha eterna gratidão!

A minha amiga **Suellen Feitosa** (bruxa), cuja a ajuda e amizade foram suporte para a realização dessa dissertação. Suh eu lembro de todos os nossos “perrengues” na USP, lembro o quanto você esteve ao meu lado, me ouviu, disse as palavras certas nas horas certas e se até na UFPE eu fui te aperrear, não duvide que para onde quer que você vá receberá uma mensagem com “preciso de ajuda, bruxa”. Sua amizade é um presente de Deus em minha vida, te admiro e desejo uma carreira profissional e pessoal repleta de amor e conquistas.

Aos meus amigos de longa data **Yuri Patriota** (mago), **Vanessa Nascimento** (Van) e **Menilla Alves** (MENiiii), por me ajudarem quando precisei seja com uma carona ou por me receberem em vossas casas, eu agradeço de todo meu coração e para o que precisarem estarei à disposição de vocês meus queridos.

Eu não poderia deixar de agradecer a **Alexsandra Apolinário** (Alê) o qual tive a honra de ser aluna de iniciação científica por muito tempo e assim moldar meu perfil científico, me inspirou com o seu amor e dedicação pela pesquisa. Dizem que a gente sempre se espelha em alguém e você sempre foi a minha referência. Ainda que de longe, saibas que sempre irei te considerar como a minha “mãe científica”. Obrigada por tudo!

As minhas colegas de turma de mestrado, em especial a **Fernanda Nóbrega**, uma pessoa incrível que tivemos uma afinidade logo de cara. Minha companheira de “vamos deixar tudo para última hora”. Não sei se tive privilégio ou sorte de ter sua amizade durante esses dois anos de mestrado. Que a nossa amizade continue a crescer e que os nossos caminhos se cruzem novamente.

Ao meu grande amigo **Pablo Rayff**, pela sua solidariedade em me fazer companhia no snowland e nunca mais sair de perto de mim. Por passar horas no celular ouvindo meus

dramas e me fazer acreditar que eu era e sou capaz de realizar todos os meus sonhos. Amigo que você é especial para mim eu não preciso nem falar, te admiro muito e desejo uma carreira de muito sucesso e conquistas.

Ao **CETENE** (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - PE) pelas análises de difração de raios-X (DRX).

Ao laboratório de caracterização estrutural de materiais do departamento de engenharias de materiais (**DEMat-UFRN**) pelas análises de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica.

Ao Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba (**PPGCF-UEPB**) e o corpo docente pela oportunidade de melhorar minha qualificação profissional.

A **CAPES** pela bolsa concedida.

*“E eu só quero agradecer
Por ter vocês
Pra acompanhar minhas loucuras
Me deixar bem mais segura daquilo que eu posso ser
Se eu somente acreditar, por almoçar depois do horário
Falar mal do Bolsonaro e desenhar Luígis, Marios
Cogumelos sem parar
Por dar risada de tudo e sempre colorir meu mundo
Com as cores mais bonitas que eu já vi alguém pintar
Por me amarem com a mesma intensidade
E por serem, de verdade, a melhor família que eu pudesse ganhar...”*

(Dádiva- Ana Vilela)

RESUMO

De acordo com a organização mundial de saúde (OMS) o câncer é a segunda principal causa de mortes em todo o mundo e foi responsável por 8,8 milhões de mortes só no último ano. Embora a quimioterapia seja a terapia mais utilizada para o tratamento do câncer, sua eficácia depende da garantia da entrega do medicamento ao sitio de ação e minimização dos efeitos colaterais. Os derivados espiro-acridínico demonstraram excelente atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais de câncer de próstata e mama, entretanto sua alta lipofilicidade limita sua utilização na clínica. No presente trabalho, o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas de poli (ácido láctico)(PLA) teve como objetivo a encapsulação do composto sintetizado 3-(acridina-9-il)-N-benzilideno-2-cianoacrilohidrazida (**AMTAC-01**) para melhoria da solubilidade e possível aumento da entrega do fármaco no tecido tumoral devido ao efeito de aumento de permeação e retenção (EPR). O fármaco foi obtido através de uma metodologia já descrita na literatura e sua comprovação estrutural demonstrou que a rota sintética seguida é viável mesmo em escalas maiores do que a já relatada. As nanopartículas foram obtidas com sucesso pelas técnicas de nanoprecipitação e emulsão simples (O/A). O tamanho médio das partículas menor que 200 nm e o baixo índice de polidispersão indicam que os métodos propostos foram satisfatório para produção das nanopartículas. A eficiência de incorporação do fármaco nas nanopartículas revelou que a nanoprecipitação apresentou uma eficiência de encapsulação de 50,1 ($\pm 0,22$) e emulsificação/evaporação por meio de uma emulsão simples (O/A) eficiência de 84,5% ($\pm 0,14$) mostrando que a encapsulação do derivado nas nanopartículas é viável. O potencial zeta negativo das partículas é resultado das cadeias terminais de ácido carboxílico do polímero e são um forte indício de estabilidade do sistema. As análises de microscopia de força atômica (AFM) e microscopia de varredura (MEV) mostraram o perfil esférico e homogêneo das nanopartículas e o ensaio de liberação *in vitro* mostrou uma liberação sustentada do fármaco pelo mecanismo de difusão Fickiana. Os estudos de citotoxicidade *in vitro* em células de cordão umbilical humano (HUVEC) revelou toxicidade dependente dos componentes da formulação e concentração do fármaco nos sistemas.

Palavras-chaves: Câncer, acridina, sistemas de liberação de fármacos, PLA

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), cancer is the second leading cause of death worldwide and accounted for 8.8 million deaths in the last year alone. Although chemotherapy is the most widely used therapy for cancer treatment, its efficacy depends on ensuring the delivery of the drug to the site of action and minimizing side effects. The spiro-acridine derivatives have demonstrated excellent antiproliferative activity in prostate and breast cancer tumor cell lines, but their high lipophilicity limits their use in the clinic. In the present work, the development and characterization of poly (lactic acid) polymer nanoparticles (PLA) had the objective of encapsulating the synthesized compound 3-(acridine-9-yl) -N-benzylidene-2-cyanoacrylhydrazide (AMTAC-01) to improve solubility and possible increase of drug delivery in the tumor tissue due to the effect of increased permeation and retention (EPR). The drug was obtained through a methodology already described in the literature and its structural verification demonstrated that the synthetic route followed is feasible even at larger scales than the one already reported. The nanoparticles were successfully obtained by the techniques of nanoprecipitation and simple emulsion (O / A). The mean particle size less than 200 nm and the low polydispersity index indicate that the proposed methods were satisfactory for nanoparticle production. The efficiency of incorporation of the drug into the nanoparticles revealed that the nanoprecipitation presented an encapsulation efficiency of 50.1% (± 0.22) and emulsification / evaporation by means of a simple emulsion (O / W) efficiency of 84.5% ($\pm 0, 14$) showing that the encapsulation of the derivative in the nanoparticles is feasible. The negative zeta potential of the particles is a result of the carboxylic acid end chains of the polymer and is a strong indication of system stability. The analysis of atomic force microscopy (AFM) and scanning microscopy (SEM) showed the spherical and homogeneous profile of the nanoparticles and the *in vitro* release assay showed a sustained release of the drug by the Fickian diffusion mechanism. *In vitro* cytotoxicity studies in human umbilical cord cells (HUVEC) revealed toxicity dependent on the components of the formulation and concentration of the drug in the systems.

Key words: Cancer, acridine, drug release system, PLA

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	Espectroscopia de força atômica
AMSA	Amsacrina
AMTAC-01	3-(acridina-9-il)-N-benzilideno-2cianoacrilohidrazida
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de Raios-X
EPR	Efeito de aumento de permeação e retenção
EE	Eficiência de encapsulação
FDA	<i>Food and drugs administration</i>
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NC	Nanocápsulas
NE	Nanoesferas
O/A	Óleo em água
PEG	Polietilenoglicol
siRNA	small interfering RNA
TG	Termogravimetria
TPGS	Succinato de d- alfa tocoferol polietilenoglicol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anel acridina	21
Figura 2: Estrutura química da Amsacrina.....	22
Figura 3: Derivado espiro-acridinico 3- (acridin-9-il) -N-benzilideno-2-cianoacrilato-hidrazida (AMTAC-01).....	23
Figura 4: Representação esquemática de nanoesferas (a) e nanocápsulas (b).....	24
Figura 5: representação esquemática da obtenção de nanopartículas obtidas pelo método da emulsão simples/evaporação do solvente	25
Figura 6: Representação esquemática da obtenção de nanopartículas pelo método da nanoprecipitação	26
Figura 7: Estrutura química do poli (ácido láctico).....	27
Figura 8: Representação esquemática do efeito EPR observado em nanopartículas	31
Figura 9: Síntese AMTAC-01. Reagentes e condições: (a) CH ₃ CO ₂ H, EtOH, 45°C; (b) CH ₃ CO ₂ H, ZnCl ₂ , 230°C; (c) PCC, CH ₂ Cl ₂ 25°C; (d) EtOH, trietilamina, 60°C	35
Figura 10: Representação esquemática para teste de viabilidade MTT	43
Figura 11: Espectro de absorção na região do infravermelho do derivado AMTAC-01.....	45
Figura 12: Espectro de ressonância magnética nuclear (rmn) de ¹ H do composto AMTAC-01 (500 MHz).....	46
Figura 13: Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹³ C do AMTAC-01 (500MHz).....	46
Figura 14: Imagens de MEV-FEG das nanocápsulas de PLA (a) NC- PLA, b) NC-PLA-AMTAC-01) e nanoesferas de PLA (c) NE-PLA, d) NE-PLA-AMTAC-01)	54
Figura 15: Imagens de AFM das nanocápsulas de PLA (a) NC-PLA e (b) NE-PLA, (c) NE-PLA-AMTAC-01	55
Figura 16: Difratoogramas do PLA, AMTAC-01, NC-PLA e NC-PLA-AMTAC-01	56
Figura 17: Difratoograma do PLA, AMTAC-01, NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01	57
Figura 18: Análise de FT-IR do PLA, AMTAC-01, NC-PLA e NC-PLA-AMTAC-01.....	58
Figura 19: Análise de FT-IR do PLA, AMTAC-01, NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01	60
Figura 20: Termograma do PLA, AMTAC-01, NC-PLA e AMTAC-01, NE-PLA e AMTAC-01	61
Figura 21: Curvas de DSC do PLA, AMTAC-01, NC-PLA e NC-PLA-AMTAC-01	62
Figura 22: Curvas de DSC e DTG do (A) NC-PLA e (B) NC-PLA-AMTAC-01	63
Figura 24: Curva de liberação <i>in vitro</i> do AMTAC-01 a partir das nanocapsulas de PLA e curva do modelo matemático ajustado	64
Figura 25: Viabilidade celular HUVEC após 72 horas de exposição ao AMTAC-01	67
Figura 26: Viabilidade celular HUVEC após 72 horas de exposição a NC-PLA e NC-PLA-AMTAC-01	67
Figura 27: Viabilidade celular HUVEC após 72 horas de exposição a NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Uso de nanopartículas de PLA na encapsulação de agentes antitumorais (continua).....	28
Tabela 2: Formulações de nanoesferas de PLA obtidas pelo método da nanoprecipitação (NE-PLA-AMTAC-01 (A))	37
Tabela 3: Linhagens celulares utilizadas para os ensaios de avaliação de citotoxicidade in vitro.	42
Tabela 4: Caracterização físico-química do derivado AMTAC-01	44
Tabela 5: Dados comparativos dos espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C do composto AMTAC-01 sintetizado e valores encontrados na literatura.	47
Tabela 6: Diâmetro médio e índice de polidispersão das nanoesferas de PLA (A) a quantidade de fármaco, de polímero, concentração do tensoativo e proporção de fase orgânica: fase aquosa	49
Tabela 7: Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanocápsulas de PLA (NC-PLA e NC-PLA-AMTAC-01) variando a quantidade de fármaco.....	51
Tabela 8: Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoesferas de PLA (NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01) variando a concentração do tensoativo	52
Tabela 9: Valores de eficiência de encapsulação para o AMTAC-01 nas nanocapsulas e nanoesferas de PLA	53
Tabela 10: Modelos matemáticos utilizados para ajuste da curva de liberação do AMTAC-01 das nanocapsulas (coeficiente de correlação (R ²), constante da taxa de liberação e equação)	65
Tabela 11: Valores de IC _{50[μM]} para a o AMTAC-01 livre, NC-PLa, NC-PLA-AMTAC-01, NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01 em células HUVEC por 72 horas (ANOVA p<0,05).	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1. Câncer	19
3.2. Acridina e seus derivados	21
3.3. Nanopartículas poliméricas	24
3.3.1 Nanopartículas de PLA e suas aplicações na clínica.....	26
3.5 Efeito de aumento de permeabilidade e retenção (EPR).....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 MATERIAIS	33
4.2 MÉTODOS	35
4.2.1 Síntese do derivado spiro-acridínico AMTAC-01	35
4.2.2 Confirmação estrutural	36
4.2.2.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	37
4.2.2.2 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	37
4.2.3 Preparação das nanopartículas contendo AMTAC-01	36
4.2.3.1 Nanocápsulas de PLA contendo AMTAC-01.....	38
4.2.3.1 Nanoesferas de PLA contendo AMTAC-01.....	39
4.2.4 Caracterização físico-química das nanopartículas de PLA carregadas com AMTAC-01	39
4.2.4.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.....	40
4.2.4.2 Determinação da eficiência de encapsulação do AMTAC-01 as nanopartículas.....	40
4.2.4.3 Morfologia.....	40
4.2.4.4 Difração de raios-X.....	41
4.2.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	41
4.2.4.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise térmica (TG).....	41
4.2.4.7 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	41
4.2.5 Modelo Biológico experimental	41
4.2.5.1 Cultivo celular	41

4.2.6 Análise estatística.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Obtenção do derivado espiro-acridínico AMTAC-01.....	44
5.2 Confirmação estrutural.....	44
5.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	44
5.2.2 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	45
5.3 Caracterização físico-química das nanocápsulas e nanoesferas de PLA contendo o AMTAC-01.....	48
5.3.1 Obtenção das nanocapsulas e nanoesferas de PLA contendo AMTAC-01.....	48
5.3.2 Eficiência de encapsulação do AMTAC-01 nas nanocapsulas e nanoesferas de PLA.....	53
5.3.3 Morfologia.....	54
5.3.4 Difração de raios-X (DRX).....	56
5.3.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	58
5.3.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG/DTG).....	60
5.3.7 Estudo de liberação in vitro.....	63
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
APÊNDICE.....	81

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde mundial caracterizado como uma doença complexa de caráter multifatorial, resultando em alterações, principalmente, no DNA e RNA. O câncer de mama é um dos tumores sólidos mais comuns no mundo e está entre as principais causas de morte por câncer em mulheres (CHRISTOPOULOS; CORTHAY; KOUTSILIERIS, 2018). A taxa de sobrevivência para pacientes com câncer de mama teve um aumento nos últimos anos devido a melhoria na detecção e no tratamento com a terapia locoregional e terapia endócrina, além da quimioterapia com uso de novos fármacos molecularmente direcionáveis (POLK et al., 2018).

Vários grupos de pesquisa espalhados pelo mundo buscam sintetizar novas moléculas contra o câncer, nesse contexto, os compostos derivados do núcleo de acridina são amplamente estudados devido sua alta capacidade de regredir tumores (CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA; KOODZIEJCZYK, 2011). As acridinas são estruturas heterocíclicas com propriedades farmacológicas antitumoral, antiparasitária e antibacteriana. O mecanismo de ação pelo qual os derivados de acridina exercem sua atividade antitumoral ocorre pela intercalação do DNA das células alvo e/ou inibição enzimática de topoisomerase I ou II (BARROS et al., 2013).

Os derivados espiro-acridínico obtidos pelo nosso grupo de pesquisa no laboratório de síntese e caracterização de moléculas (LSVM- UEPB campus V) foram sintetizados com introdução do grupamento N-cianoacetohidrazida utilizado como espaçador da ligação entre os anéis de acridina e o grupo fenila, entre as moléculas sintetizadas o 3- (acridin-9-il) -N-benzilideno-2-cianoacriló-hidrazida (**AMTAC-01**) apresentou potente atividade de inibição de topoisomerase II α e atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais de próstata, mama e melanoma (ALMEIDA et al., 2016). Entretanto, apesar da excelente atividade antiproliferativa apresentada por esse composto, sua alta lipofilicidade e a toxicidade em células normais causa limitações para seu uso terapêutico.

A nanotecnologia desempenha um papel cada vez mais importante em nossa sociedade, desde as áreas de energia e telecomunicações, como na medicina; representando uma oportunidade para o desenvolvimento de alternativas que melhorem alguns problemas da humanidade (DI SIA, 2017). A nanotecnologia envolve o

desenvolvimento e aplicação de partículas em escala nanométrica (1×10^{-9} metros), na medicina pode ser utilizada para administração terapêutica de fármacos através de nanocarreadores o qual possuem a capacidade de entregar medicamentos em sítios alvos com o objetivo de melhorar sua eficácia e segurança terapêutica (HOYT; MASON, 2008; SAFARI; ZARNEGAR, 2014; KESHARWANI et al., 2018).

Dentro do contexto da nanotecnologia e nanocarreadores, as nanopartículas poliméricas apresentam-se como uma ferramenta que promove a entrega racional do agente encapsulado, além de melhorar a biodisponibilidade e diminuir os efeitos colaterais. Nanopartículas a base de polímeros sintéticos como o poli (ácido láctico) (PLA) apresenta segurança para serem administradas em seres humanos por serem biocompatíveis, biodegradáveis por hidrólise e atividade enzimática e apresentarem baixa imunogenicidade. Além disso, formulações contendo PLA foram aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) para aplicações múltiplas, o que torna o PLA adequado para uso clínico (TYLER et al., 2016). Nanopartículas de PLA foram frequentemente utilizadas para encapsular moléculas hidrofóbicas como o tamoxifeno (ALTMAYER et al., 2015), paclitaxel (LU et al., 2014a; DANHIER et al., 2015), docetaxel (WANG et al., 2015), ácido ursólico (ANTONIO et al., 2017), curcumina (RACHMAWATI et al., 2016) e para melhora da biodisponibilidade (HU et al., 2013; LI et al., 2013; FISCHER et al., 2014; PANDEY et al., 2014; JAIN et al., 2016; MATTOS et al., 2016).

Uma melhor resposta farmacológica pode ser alcançada na terapia anticancerígena com fármacos encapsulados em nanopartículas devido ao efeito de aumento de permeabilidade e retenção (EPR) observado em tumores sólidos. A estrutura vascular do tumor apresenta vazamentos que permitem a saída das nanopartículas por um mecanismo passivo. A ausência de drenagem linfática gera um acúmulo das partículas no tecido tumoral a longo prazo (NGOUNE et al., 2016).

Esse trabalho, portanto, propõe o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de poli (ácido láctico) contendo o derivado espiro-acridínico AMTAC-01 para o tratamento do câncer com provável acúmulo tumoral.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas) de poli (ácido láctico) contendo o derivado espiro-acridinico AMTAC-01 para o tratamento do câncer com possível acúmulo tumoral.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar e confirmar a estrutura do derivado espiro-acridinico AMTAC-01;
- ✓ Desenvolver nanopartículas de PLA contendo AMTAC-01 pelas técnicas de nanoprecipitação e emulsão simples (O/A);
- ✓ Determinar a eficiência de encapsulação frente aos métodos utilizados;
- ✓ Caracterizar a morfologia e os aspectos físico-químicos dos sistemas nanoparticulados obtidos;
- ✓ Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanocápsulas de PLA e ajuste do modelo matemático;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos sistemas em células epiteliais de cordão umbilical humano (HUVEC);

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Câncer

O câncer é um problema de saúde mundial caracterizado como uma doença complexa de caráter multifatorial, resultando em alterações, principalmente, no DNA e RNA. Segundo a organização mundial da saúde (2008) os cânceres, juntamente com o diabetes, as doenças cardiovasculares e crônicas, foram responsáveis por 40 milhões (70%) dos 56 milhões de mortes em 2015, mais de 40% das pessoas que morreram tinham menos de 70 anos. Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas.

O câncer é uma doença genética ocasionada, principalmente por alterações nas células somáticas. Os genes que estão associados ao câncer podem ser divididos em dois grupos: oncogenes e genes supressores de tumor (TGP). Os oncogenes são derivados de mutações dos genes celulares normais que controlam o crescimento e proliferação celular, esses genes são fenotipicamente dominantes por isso, uma única cópia mutada desse gene desencadeia o câncer, enquanto os TGPs são genes que inibem a proliferação celular. (BOUCK; STELLMACH; HSU, 1996; HARRINGTON, 2016; YOO et al., 2017).

No quesito terapia do câncer, os principais tratamentos são: (a) tratamento cirúrgico (GARVEY et al., 2015); (b) radioterapia (RAY; SIBSON; KILTIE, 2015; MURRAY; ROBINSON, 2016)(c) quimioterapia (ISHIMOTO et al., 2015) e (d) imunoterapia (SONG; MUSETTI; HUANG, 2017). Entretanto, ainda não se alcançou a cura completa dos tumores. Apesar de a quimioterapia ser o tratamento mais utilizado, as moléculas disponíveis não são eficazes para todos os tipos de câncer e há muitos efeitos adversos relacionados ao uso. Assim, a busca de novos agentes anticâncer continua e tem como foco tratamentos mais eficazes e com menos efeitos indesejáveis ao paciente

A proliferação de células normais são ativadas pelo fator de crescimento epidérmico (EGFR) que ligam-se a receptores de fator de crescimento epidérmico (HERs) na superfície celular ativando a dimerização, por esse processo ocorre o envio de sinais para o espaço

intracelular ativando a tirosina quinase, essa ativação leva a uma cascata de sinalizações intracelular que podem chegar até o núcleo celular e atingir o DNA, assim estimular a divisão das células ou cessar o crescimento celular (WUJCIK, 2014; BUTERA; PACCHIANA; DONADELLI, 2017). As células normais avaliam a proliferação celular através do equilíbrio entre esses sinais.

As células cancerígenas são, geralmente, menos especializadas em suas funções bioquímicas (ALMEIDA et al., 2005). Essas células possuem mais receptores de fator de crescimento em sua superfície, sintetizam e liberam fatores de crescimento que estimulam seus próprios receptores e os receptores das células vizinhas (sinalização autocrina e paracrina), além de desregular a sinalização do receptor ativando-o permanentemente (HARRINGTON, 2016). Por isso, essa proliferação celular é bem mais rápida quando comparada a via normal (PIACENTINI; MENEZES, 2012).

Ligado a esse fator, está a alta angiogênese encontrada em tumores sólidos, isto é, a formação de novas redes vasculares a partir de uma já existente, essa angiogênese é regulada por moléculas ativadoras e inibidoras como o fator de crescimento vascular (VEGF), a angiogenina, fator de necrose tumoral (TNF), entre outros (JUCZEWSKA; CHYCZEWSKI, 2006; LAN et al., 2017). O VEGF desempenha um papel central na angiogênese de tumores, é um peptídeo que estimula a proliferação e diferenciação de vasos sanguíneos e prolonga a vida útil de vasos já existente, dessa forma ajuda o crescimento de tumores (NAIKOO et al., 2017). A angiogênese é alvo de terapias anticancerígenas por inibição desse fator VEGF através de antagonistas como, anticorpos IgG, o Bevacizumab (Avastin) e o pazopanib que é dirigido para o receptor do crescimento vascular (VGFR-1)(MARKOWSKA et al., 2017).

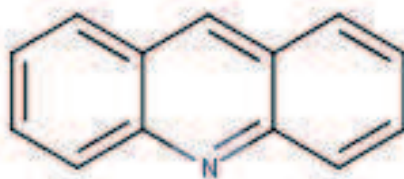
Todavia, esse crescimento acelerado de novos vasos sanguíneos forma uma rede vascular desorganizada. Os vasos possuem forma irregular, são impermeáveis e não apresentam estrutura hierarquia normal de arteríolas, capilares e vênulas, além de possuir células endoteliais e perictos defeituosos, dessa forma causa “afrouxamento” na monocamada de células endoteliais que circundam os vasos tumorais (HASHIZUME et al., 2000; BALUK; HASHIZUME; M, 2005). Os tumores danificam a estrutura de vasos linfáticos (PADERA et al., 2004) causando diminuição na depuração de fluidos intersticiais dos tumores (JANG et al., 2003).

Essas características intrínsecas dos tumores tem despertado a atenção da utilização desse arranjo desorganizado a favor da terapia anticancerígena direcionada (DANQUAH; ZHANG; MAHATO, 2011; SIEMANN, 2011; BAR; GOSS, 2012; SIEMANN; HORSMAN, 2015).

3.2. Acridina e seus derivados

Conhecida por mais de um século, a acridina (figura 1) é um composto heterocíclico aromático formado por uma piridina central e dois benzenos condensados. Pode ser encontrada em diversos produtos naturais ou sintetizada na química medicinal (SOUIBGUI et al., 2014).

Figura 1: Anel acridina



FONTE: AUTOR

Isolada pela primeira vez em 1870 por Grabe e Heinrich Caro na Alemanha, a partir de cinzas de alcatrão, só apenas em 1917 teve seu uso na farmacologia por meio de Ehrlich e Benda que descobriram as propriedades antimicrobianas do núcleo acridina (GALE; H; PETER, 2012). Diversas substâncias são sintetizadas a partir da acridina, o átomo de nitrogênio presente na estrutura da acridina é menos nucleofílico do que o nitrogênio presente na piridina, entretanto pode estar ligado a uma boa densidade eletrônica e promover uma boa nucleoficidade. As acridinas participam de muitas reações nucleofílicas, segundo CORSARO et al (2002) esse ataque ocorre no carbono 9 e pode ser seguido de uma oxidação e a posição preferencial de ataque eletrofílico ocorre no carbono 4.

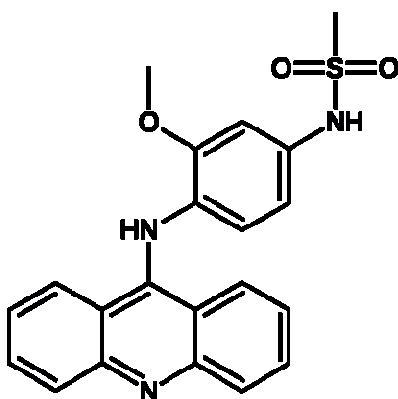
As acridinas apresentam uma grande diversidade de atividade biológica, sendo as principais atividades antimicrobiana, antimalárica e anticancerígena. Essas atividades estão diretamente relacionadas com a capacidade que as moléculas aromáticas planares possuem de intercalar o DNA entre os pares de bases adjacentes e inibir a síntese de ácido nucleico (BELMONT et al., 2007; FERGUSON; DENNY, 2007).

De maneira geral, as acridinas podem interagir com o DNA por intercalação e bloquear a replicação, a transcrição ou o reparo do DNA, além de apresentarem a capacidade de inibir as enzimas topoisomerase I e II. Esses fatores justificam o uso do grupamento acridina na síntese de novos fármacos anticancerígenos direcionáveis ao DNA (RESCIFINA et al., 2014).

O primeiro uso da acridina na clínica como agente antimicrobiano ocorreu em 1917, porém com o aparecimento das penicilinas o estudo desse núcleo para terapia contra bactérias foi deixado de lado. Entretanto, com a resistência bacteriana cada vez mais alta surgiu uma necessidade urgente de alternativas terapêuticas com novos mecanismos de ação, voltando à atenção dos estudos para os derivados de acridina (PEPTIDE et al., 2015).

A amsacrina (AMSA) (fig. 2) foi o primeiro fármaco totalmente sintético do tipo intercalador de topoisomerase II utilizado na clínica. A atividade anticâncer é ocasionada por intercalação do DNA levando a formação de um complexo DNA-Topoisomerase II causando rupturas na estrutura da dupla fita do DNA (BLASIAK et al., 2003). Porém, a amsacrina apresenta efeitos colaterais fatais, sendo o principal deles a supressão da função da medula óssea. Essa citotoxicidade pode ser associada aos produtos formados a partir da degradação da AMSA (ZEALAND; HOSPITAL, 1992) contudo mesmo nos dias atuais é um tema complexo e não elucidado.

Figura 2: Estrutura química da Amsacrina



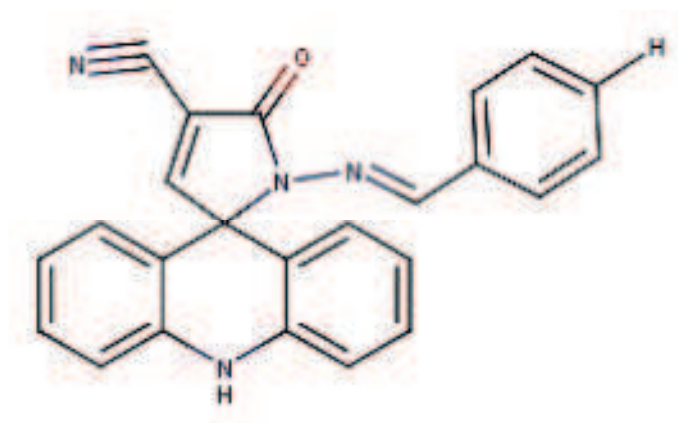
FONTE: Autor

Uma classe de derivados da acridina foi obtida por reações de espiro-ciclização, produzindo um anel de cinco ou seis membros ligados ao carbono 9 da acridina (VILKOVA; PROKAIKOVA; IMRICH, 2014). Assim, com base nesses estudos novos derivados espiro-

acridínicos foram obtidos com a introdução de um grupo ciano- N- acilhidrazona entre o grupamento acridina e o fenil, seguido de uma ciclização espontânea.

O 3- (acridin-9-il) -N-benzilideno-2-cianoacriló-hidrazida (**AMTAC-01**) (figura 3) e foi testado em linhagens de células tumorais de glioma (U251), melanoma (UACC-62), adenocarcinoma de mama (MCF-7), ovário (NCL-ADR), rins (786-O), carcinoma de pulmão de células não pequenas (NCL-H460), próstata (PC-3), cólon (HT-29), leucemia mielóide crônica (K-562) e queratinócitos humanos (HaCaT).

Figura 3: Derivado espiro-acridínico 3- (acridin-9-il) -N-benzilideno-2-cianoacriló-hidrazida (AMTAC-01)



FONTE: AUTOR

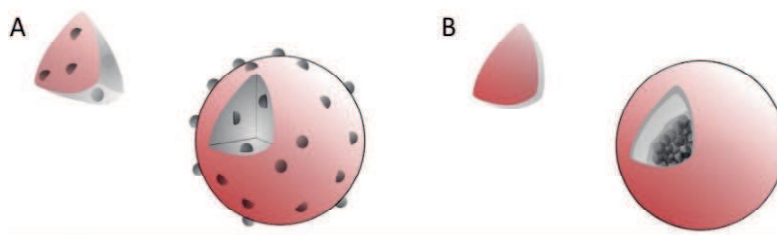
O AMTAC-01 apresentou valores de IC_{50} (concentração molar que inibe 50% do crescimento celular) menor que $7\mu\text{M}$ para quase todas as linhagens de células tumorais, com exceção da linhagem de células renais ($41,9\mu\text{M}$). O derivado foi mais ativo para linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata e mama porém, não foi ativo para leucemia mielóide crônica (ALMEIDA et al., 2016)

Esses resultados apontam para o potencial terapêutico que os derivados espiro-acridínicos apresentam em tumores sólidos, o que torna esses derivados promissores candidatos a novos fármacos anticancerígenos.

3.3. Nanopartículas poliméricas

As pesquisas sobre nanopartículas poliméricas está se expandindo rapidamente e desempenham um papel fundamental em áreas com o interesse de controle da poluição ambiental, medicamentos para biotecnologia, entre outras (RAO; GECKELER, 2011). Nanopartículas são sistemas de liberação de ativos com tamanho entre 1-100 nm (TYLER et al., 2016; EL-SAY; EL-SAWY, 2017) que são comumente divididas em dois principais tipos: nanoesferas e nanocapsulas (fig. 4). As nanocapsulas comportam-se como reservatório de fármacos, onde o ativo fica retido no núcleo aquoso ou oleoso recoberto por um invólucro polimérico, por outro lado as nanoesferas são compostas por uma matriz polimérica no qual as moléculas do fármaco permanecem presas no interior da esfera ou adsorvidas na superfície (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003; EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

Figura 4: Representação esquemática de nanoesferas (a) e nanocápsulas (b)



FONTE: EL-SAY; EL-SAWY, 2017

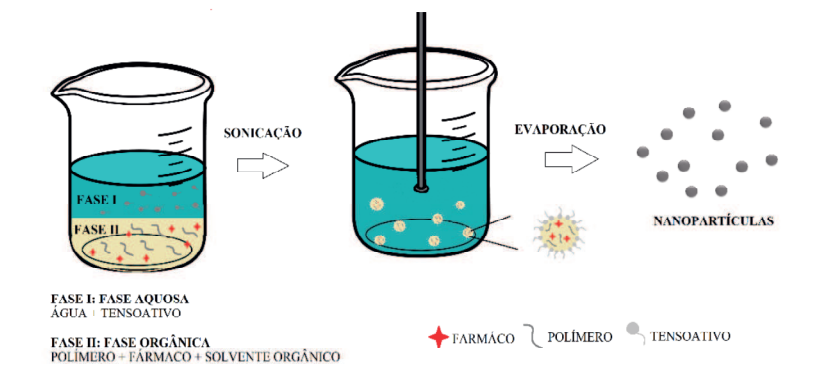
Os principais métodos de obtenção de nanopartículas poliméricas são nanoprecipitação (FESSI et al., 1989), *salting out* (ALLÉMANN et al., 1993) , emulsão simples/múltipla seguida da evaporação do solvente (ALTMAYER et al., 2015; DALMOLIN; KHALIL; MAINARDES, 2016; MAINARDES; KHALIL; GREMIAO, 2010), diálise (WANG et al., 2005) b fluido supercrítico (SARATH, PETRASH, 2014) e spray-drying (HARSHA et al., 2015).

A escolha dos métodos de obtenção das nanopartículas baseia-se nas características físico-químicas do fármaco (MARTÍNEZ RIVAS et al., 2017), a nanoprecipitação e *salting-out* é recomendada para encapsulação de fármacos lipofílicos (SOUTO et al., 2012; MILADI et al., 2015) e quando deseja-se tamanho de partícula menor que 500 nm com distribuição de tamanho estreita, assim como o método da emulsificação-evaporação do solvente por meio de uma emulsão simples (O/A) é recomendado para fármacos com essa característica também,

pelo fato do fármaco ter afinidade pela natureza orgânica da fase interna da emulsão (BUDHIAN; SIEGEL; WINEY, 2007). A técnica de spray-drying pode ser aplicada quando objetiva-se superar a instabilidade de formulações aquosas de nanocápsulas e nanoesferas (GUTERRES; BECK; POHLMANN, 2009).

O método da emulsificação por meio de uma emulsão simples (figura 5) envolve a dissolução do polímero em um solvente orgânico (diclorometano ou clorofórmio, entretanto, tem se dado mais atenção ao acetato de etila por ser menos tóxico) essa solução orgânica é então emulsionada em uma fase aquosa contendo um agente tensoativo através de sonicação (ultra-sonografia de alta velocidade), produzindo assim as nanogotículas que após evaporação do solvente (em pressão atmosférica ou sob pressão reduzida) é formada a suspensão de nanopartículas (NAGAVARMA et al., 2012; CRUCHO; BARROS, 2017).

Figura 5: representação esquemática da obtenção de nanopartículas obtidas pelo método da emulsão simples/evaporação do solvente

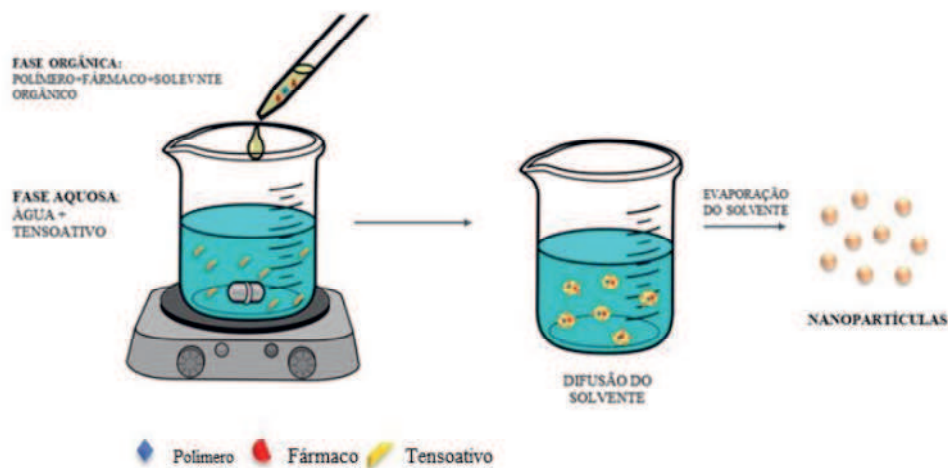


FONTE: AUTOR

A nanoprecipitação foi descrita por FESSI et al. (1989) (figura 6) (MARTÍNEZ RIVAS et al., 2017). Neste método, uma solução orgânica contendo o solvente orgânico e o polímero é gotejada em uma outra fase aquosa contendo água e um ou mais agentes tensoativo, essa mistura binária excede o limite de saturação do polímero, que com a rápida difusão do solvente na fase aquosa resulta na diminuição da tensão interfacial entre os dois líquidos e aumenta a área superficial levando a formação de nanogotículas do solvente orgânico, assim, após a difusão completa do solvente, o polímero precipita na forma de nanopartículas (RAO; GECKELER, 2011; LEPELTIER; BOURGAUX; COUVREUR, 2014). Esse método é extensamente utilizado para obtenção de nanoesferas, porém nanocápsulas podem ser obtidas com adição de uma pequena quantidade de óleo, como por

exemplo, o miglyol (triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico) na fase orgânica (CRUCHO; BARROS, 2017).

Figura 6: Representação esquemática da obtenção de nanopartículas pelo método da nanoprecipitação



FONTE: AUTOR

Entre as vantagens do uso de nanopartículas poliméricas, destacam-se a eficácia e biodisponibilidade, com notável aprisionamento quando administradas por via intravenosa e oral. As nanopartículas podem conferir estabilidade ao ativo encapsulado e maior tempo de meia vida ($t_{1/2}$), além de transportar ativos com concentração específica (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

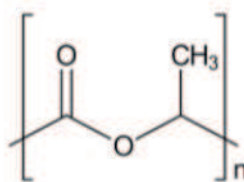
3.3.1 Nanopartículas de PLA e suas aplicações na clínica

Os polímeros utilizados para produção de nanopartículas projetadas para entrega de ativos *in vivo* devem cumprir alguns requisitos para uso. O principal deles é ser biodegradável ou ser eliminado do corpo em curto intervalo de tempo, além de apresentar características não tóxicas e não imunogênicas (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

Assim, as nanopartículas produzidas a partir do poli (ácido láctico) (PLA) um polímero sintético, biodegradável e biocompatível é um campo promissor, que além de atenderem as necessidades exigidas, apresentam uma boa compatibilidade e são de fácil obtenção (MEUNIER; GOUPIL; LIENARD, 2017).

O PLA é um polímero sintético, alifático da classe dos poliésteres (fig. 7) sendo um poliéster do ácido láctico ou 2-hidroxiopropionico.

Figura 7: Estrutura química do poli (ácido láctico)



FONTE: AUTOR

O ácido láctico é obtido da fermentação do amido de plantas como milho, cana-de-açúcar, beterraba e batatas (RAMOT et al., 2016; SAINI; ARORA; KUMAR, 2016; TYLER et al., 2016). A rápida degradação do PLA e seus copolímeros em ácido láctico e glicólico pode causar aumento do risco de toxicidade ácida local, entretanto a acidez dos seus produtos de degradação está na faixa de pH 4-5 que, geralmente, são rapidamente neutralizados pelos fluidos corporais, além disso o ácido láctico resultante é incorporado ao ciclo do ácido tricarboxílico e eliminado do corpo na forma de dióxido de carbono e água (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996; RAMOT et al., 2016).

As nanopartículas de PLA foram propostas para melhorar a biodisponibilidade, principalmente de fármacos administrados pela via oral que são poucos solúveis em água, além de mostrarem-se como uma via de prolongar a eficácia de genes, proteger contra degradação enzimática do ativo encapsulado e apresentar vias de administração alternativa para alguns fármacos (como via intravenosa, via pulmonar e etc) (LEE; YUN; PARK, 2016).

Nanopartículas de PLA foram bastante reportadas na literatura para encapsulação de diversos agentes terapêuticos com diferentes classes terapêuticas, entre elas a classe dos antitumorais (tabela 1) com fármacos hidrofóbicos e estudos em modelos de câncer *in vitro* e *in vivo* (TYLER et al., 2016).

A quimioterapia atual não possui especificidade para terapia apenas no local onde está localizado o tumor, causando efeitos colaterais severos em tecidos normais. As nanopartículas conseguem acumular-se no tecido tumoral e superar as limitações da quimioterapia convencional como, biodistribuição indesejável, resistência de alguns fármacos e efeitos colaterais graves (PRABHU, R. H., PATRAVALE, V. B., & JOSHI, 2015).

Tabela 1:Uso de nanopartículas de PLA na encapsulação de agentes antitumorais (continua)

Composição das nanopartículas	Ativo	Problema/ melhora com uso das NPs	Referência
PLA/ Quitosana	Docetaxel	Baixa solubilidade em água / melhora da solubilidade, não uso de tensoativo tóxico (Tween 80®) e entrega prolongada do fármaco.	WANG, W. et al., 2015;
PLA			MUSUMECI et al., 2006
PLA-TPGS		Superar a resistência a múltiplos medicamentos na quimioterapia do câncer de mama resistente ao docetaxel.	TANG et al., 2015
PLA	Curcumina	Baixa solubilidade, baixa absorção e metabolismo rápido resultando em baixa biodisponibilidade / liberação sustentada	RACHMAWA TI et al., 2016
PLA	Temozolamida	Meia vida curta, necessitando de doses repetidas para o ativo chegar ao cérebro / meia vida prolongada e maior concentração da droga em células de glioma C6	JAIN et al., 2013
PLA	KP 1019 (Rutênio III)	Baixa estabilidade em solução aquosa, especialmente em pH fisiológico / primeira descrição de um sistema estável para rutênio (II) e atividade citotóxica melhorada	FISCHER et al., 2014
PLA	Tamoxifeno	Alta toxicidade podendo causar necrose hepática, anemia hemolítica, leucopenia e outros / diminuição da hemólise e ação citotóxica prolongada	ALTMAYER et al., 2015

Tabela 1: Uso de nanopartículas de PLA na encapsulação de agentes antitumorais (continuação)

PLA	Quercetina	Liberação sustentada do ativo e ação citotóxica prolongada quando comparada ao fármaco livre	PANDEY et al., 2015
PLA/ GMA (metacrilato de glicidila)	Rodamina	Rápida fagocitose das nanopartículas/ menor captação das partículas por macrófagos com tamanho menor que 200 nm	LI, F. et al., 2013
PLA	Ácido ursólico	Problemas biofarmacêuticos e farmacocinéticos devido a baixa solubilidade / aumento da atividade citotóxica e liberação sustentada do fármaco	ANTÔNIO et al., 2017
PLA-PEG	Paclitaxel	Melhora da eficácia terapêutica do paclitaxel carregados em nanopartículas PLA-PEG funcionadas com peptídeo tLyp-1	HU et al., 2013
PLA-TPGS		Baixo índice terapêutico e solubilidade em água/ direcionamento efetivo das NPs carregadas.	
PLA	5-Fluoruaçil	Baixa biodisponibilidade e severo efeito de primeira passagem no fígado/ Melhora dos parâmetros farmacocinéticos	MATTOS et al., 2016
PLA-PEG	siRNA-CDK1	Terapia efetiva para o câncer de mama triplo-negativo	LIU et al., 2014
PLA- <i>b</i> -PEG	Doxorubicina e erlotinibe	Terapia efetiva para o câncer de mama triplo-negativo com liberação lenta dos dois ativos encapsulados.	ZHOU et al., 2017

Tabela 1: Uso de nanopartículas de PLA na encapsulação de agentes antitumorais (última)

PLA- <i>b</i> -PEG	Bortezomibe	Fármaco hidrofóbico e instável / aumento da meia- vida de circulação do fármaco e acúmulo no tecido tumoral.	SHEN et al., 2015
<i>m</i> PEG- <i>b</i> -PLA	Curcumina e bortezomibe	Fármacos poucos solúveis com efeito sinérgico que quando complexados são sensíveis ao pH / NPs carregadas foram absorvidas pelas células tumorais de câncer de mama e o ativo liberado na massa tumoral.	MEDEL et al., 2017b

FONTE: Próprio autor

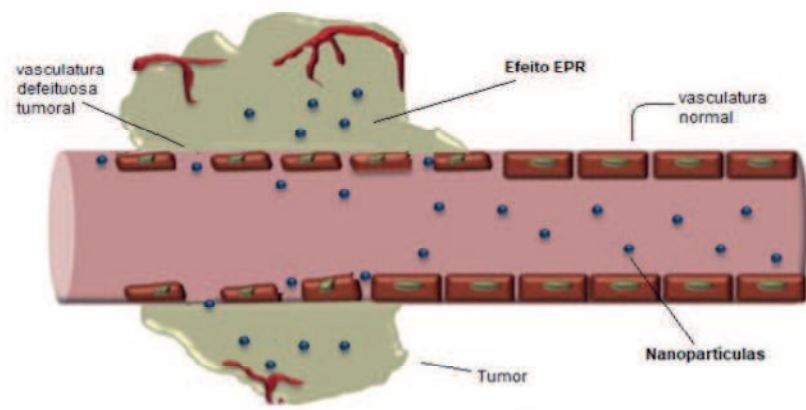
Nanopartículas de PLA também foram estudadas como veículo para entrega de agentes antidiabetes (BARWAL et al., 2013) anti-inflamatórios hidrofóbicos (ESSA; RABANEL; HILDGEN, 2010), a betametasona encapsulada em nanopartículas de PLA e PLA-PEG obteve resultados que sugerem uma forte interação das nanopartículas em modelos *in vivo* com acumulação na lesão, internalização em macrófagos e liberação gradual da betametosa nas células, indicando que essa formulação pode ser usada na clínica para tratamento de lesões inflamatórias (ISHIHARA et al., 2010).

Agentes antioxidantes como vanilina, disseneleto de difenila (PhSe) e aureusidina (derivado natural da aurona) foram encapsuladas em nanopartículas de PLA (ROUSSAKI et al., 2014; DALMOLIN; KHALIL; MAINARDES, 2016; ANTUNES et al., 2017a) a encapsulação da aureusidina superou a baixa solubilidade do composto em água e a sensibilidade a luz, tornando possível o aproveitamento das propriedades biológicas desse composto. Assim, as nanopartículas de PLA são consideradas promissoras para encapsulação de agentes que possuem limitações como baixa solubilidade, bem como para entrega desse ativo em locais alvo

3.4. Efeito de aumento de permeabilidade e retenção (EPR)

Recentes avanços na nanomedicina tem permitido o desenvolvimento de sistemas de tratamentos melhorados frente às terapias tradicionais. O efeito de aumento de permeabilidade e retenção do inglês *enhanced permeability and retention* (EPR) é considerado o “portão real” na entrega de medicamentos contra o câncer. Esse efeito baseia-se na característica anatômica que a vasculatura tumoral apresenta, a estrutura dos vasos sanguíneos dos tumores é patologicamente desorganizada e apresentam “espaços” que permitem o extravasamento de partículas com tamanho ajustado que podem se acumular no tecido tumoral pela falta de drenagem linfática (figura 8). Esse fenômeno serviu como base para o desenvolvimento da terapia cancerígena macromolecular (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011; DANHIER, 2016; NGOUNE et al., 2016).

Figura 8: Representação esquemática do efeito EPR observado em nanopartículas



FONTE: ADAPTADO DE HICKEY et al., 2015

Esse efeito foi descrito pela primeira vez por MAEDA et al. (1986) onde analisaram o conjugado do anticancerígeno neocarzinostatina (NCS) com um copolímero de estireno e ácido maléico (SMA), essa conjugação foi denominada de SMANCS e ao administrar em ratos portadores de câncer perceberam uma maior acumulação do conjugado no tecido tumoral quando comparado a molécula livre. Além de melhorar o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e não apresentar imunogenicidade (MAEDA et al., 1984).

Mesmo após trinta anos da descoberta desse efeito, esse tema ainda é um assunto complexo. De fato, vários fatores influenciam o efeito EPR, entre eles o peso molecular da molécula maior que 40 kDa (MAEDA et al., 1994) contudo, apenas esse fator não é suficiente para que o efeito EPR ocorra. Muitos estudos relataram que os principais fatores que afetam a eficácia do sistema EPR, são: (1) características intrínsecas dos vasos sanguíneos tumorais, (2) tipo, tamanho e a localização do tumor e (3) características do portador do tumor (gênero, idade e a composição corporal) (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011; PRABHAKAR et al., 2013; NATFJI et al., 2017).

O efeito EPR pode expandir o tratamento de cânceres com difícil tratamento como é o caso de tumores no cérebro, cujo o tratamento necessita ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE). KOUKOURAKIS et al. (2000) analisaram a acumulação intratumoral de Caelyx® (doxorubicina encapsulado em lipossomas) radiomarcado em pacientes portadores de tumores cerebrais metastáticos e glioblastoma. O acúmulo de Caelyx® radiomarcado foi de 13 a 19 vezes maior nos glioblastomas e 7 a 13 vezes maior nas lesões metastáticas do cérebro, em comparação com o cérebro normal.

Além disso, o efeito EPR pode ser visto não só em tumores sólidos, esse efeito foi observado em doenças arteriais periféricas pelo resultado da isquemia muscular (falta de fornecimento de sangue) e neovascularização que levou a uma retenção de nanopartículas nos tecidos isquêmicos. ENGLAND et al. (2016) analisaram o direcionamento de nanopartículas peguilladas de óxido de grafeno reduzido marcadas com nanopartículas de ferro-CU (Cu-RGO-IONP-PEG). Através de imagens de tomografia por emissão de pósitrons (PET) e imagens de Doppler mostrou que as nanopartículas acumulavam-se no membro posterior isquêmico através do efeito EPR e que era reduzido à medida que a perfusão se normalizava.

O efeito EPR marca um avanço na nanomedicina anticancerígena alvo, porém a uma generalização injustificada dos resultados obtidos em estudos *in vivo* com animais com modelos humanos, está causando uma progressão lenta desse campo das pesquisas. Ainda há muitos desafios a serem enfrentados (biodistribuição das moléculas, heterogenicidade dos tumores, taxa de liberação, internalização celular lenta, entre outros) são alguns dos fatores que devem ser estudados para que se possa obter sucesso na terapia alvo (GREISH, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Substâncias e reagentes

- Poli (D,L ácido láctico) (PLA) Mw- 20 000 Da – **Sigma Alderich (USA)**
- Álcool polivinílico (PVA) Mw – 23 000 Da - **Sigma Alderich (USA)**
- Poloxamer 188 (Pluronic F-68 ®) - **Sigma Alderich (USA)**
- Triglicerídeos do ácido cáprico/ caprílico (Miglyol 812 ®)
- Lecitina de soja (Lipoid® S-100)
- Acetona – **Merck (Brasil)**
- Diclorometano - (**Sigma Chemical Co., USA**)
- Acetonitrila grau HPLC – **Baker (USA)**
- 2- benzaldeído cianoacetohidrazida - **Sigma-Aldrich (USA)**
- Trietilamina - **Sigma-Aldrich (Alemanha)**

Equipamentos analíticos

- Aparelho de sonicação – High intensity ultrasonic (**modelo 75041, BIOBLOCK SCIENTIFIC ILLKIRCH, France**)
- Evaporador rotatório (**modelo R-215- BUCHII**)
- Balança analítica (**modelo AUW220D- SHIMADZU**)
- Espectrofotômetro (**modelo SP-2000 UV, Spectrum**)
- Espectrofotômetro de FTIR (**modelo IRPrestige-21, SHIMADZU -Japão**)
- Difractômetro de raios-X (**modelo D8- Advance, Bruker**)
- Zetasizer (**modelo Nano-ZS- Malvern Instruments, UK**)
- Analisador térmico simultâneo (**modelo STA 449F3 – Júpiter – NETZSCH**)
- Microscópio de força atômica (**modelo SPM- 9700 – SHIMADZU – Japão**)
- Microscópio eletrônico de varredura (**modelo MEV-FEG Auriga 40 – ZEISS**)
- Metalizador (**SCD- 005 sputter coater – BAL-TEC**)
- Ultracentrífuga (**modelo CP 80β - HITACHI**)

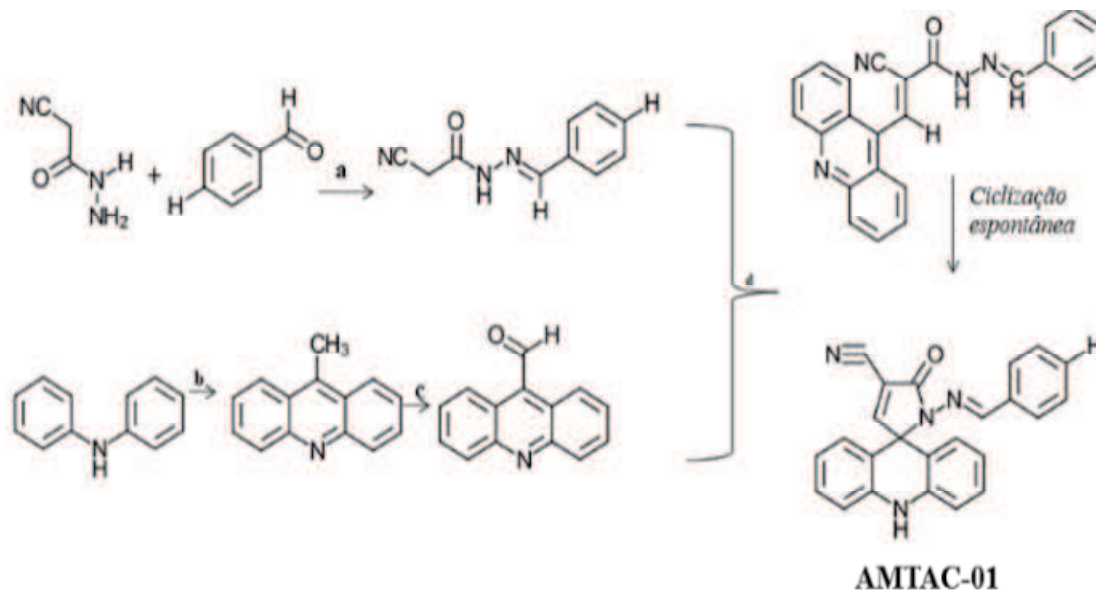
- Liofilizador de bancada (**modelo Alpha 1-2 plus, CHRIST- USA**)
- Espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear RMN (**BRUKER avance spectrometer AC-500**)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Síntese do derivado spiro-acridínico AMTAC-01

A síntese do fármaco ocorre por via paralela e depois convergente (figura 9), seguindo à metodologia descrita por ALMEIDA et al., (2016). Foi então preparada uma solução equimolar de 2-cianoacetohidrazida e benzaldeído, a essa solução foi adicionado a 10 mL de etanol puro e em seguida adicionado 20 gotas de ácido acético (gota a gota) sob agitação e em temperatura ambiente. Logo após esse período o precipitado foi filtrado e lavado com etanol puro, assim obteve-se o primeiro intermediário: 2-benzilideno-2-cianoacetohidrazida. O composto 9-carboxi-acrinaldeído foi preparado conforme TSUGE et al., 1963. Os intermediários 2-benzilideno-2-cianoacetohidrazida e 9-carboxi-acrinaldeído foram então condensados em meio etanólico e básico, utilizando a trietilamina como catalisador, a reação foi deixada sob refluxo por 6 horas a 60°C. O precipitado final foi lavado com uma mistura de etanol e água e etanol a 10%.

Figura 9: Síntese AMTAC-01. Reagentes e condições: (a) CH₃CO₂H, EtOH, 45°C; (b) CH₃CO₂H, ZnCl₂, 230°C; (c) PCC, CH₂Cl₂ 25°C; (d) EtOH, trietilamina, 60°C



Após a síntese o fármaco foi caracterizado quanto aos seus aspectos físico-químicos e técnicas de espectroscopia para confirmação da estrutura.

4.2.2 Confirmação estrutural

4.2.2.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para verificação das faixas de absorção correspondente aos grupos funcionais presentes no derivado, a amostra foi analisada pela técnica de refletância total atenuada (ATR) na faixa espectral de 4000 a 700 cm^{-1} .

4.2.2.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e RMN ^{13}C foram obtidos em Espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear RMN (BRUKER avance spectrometer AC-500) operando com frequência de 500 MHz para RMN ^1H e 125 MHz para RMN ^{13}C . O tratamento dos dados foi feito em software MestReC 4.8.6.0.

4.2.3 Preparação das nanopartículas contendo AMTAC-01

4.2.3.1 Nanoesferas de PLA contendo AMTAC-01 obtidas pelo método da nanoprecipitação

As nanoesferas de PLA foram obtidas pelo método da nanoprecipitação descrito por FESSI et al., (1989).

Inicialmente foram variados os componentes da formulação como descrito na tabela 2.

Tabela 2: Formulações de nanoesferas de PLA obtidas pelo método da nanoprecipitação (NE-PLA-AMTAC-01 (A))

	Quantidade de polímero (mg)	Quantidade de fármaco (mg)	Concentração do tensoativo Pluronic F-68 (%)	Proporção fase orgânica:fase aquosa
NE-PLA-AMTAC-01 (A1)	20	10	0,05	1:2
NE-PLA-AMTAC-01 (A2)	20	5	0,05	1:2
NE-PLA-AMTAC-01 (A3)	20	2	0,05	1:2
NE-PLA-AMTAC-01 (A4)	20	2	0,25	1:2
NE-PLA-AMTAC-01 (A5)	20	2	0,5	1:2
NE-PLA-AMTAC-01 (A6)	50	2	0,5	1:4
NE-PLA-AMTAC-01 (A7)	50	5	1	1:4
NE-PLA-AMTAC-01 (A8)	50	2	1	1:4

Para esse método uma solução orgânica contendo o polímero e o fármaco foram solubilizados em 10 mL de acetona que em seguida foram gotejados em uma solução aquosa com diferentes concentrações do tensoativo e diferentes proporções de fase orgânica, como mostrado na tabela 1. O solvente orgânico foi removido a vácuo usando rotaevaporador. Após remoção do solvente orgânico as nanoesferas foram armazenadas em geladeira (6°C).

As NE-PLA (A) brancas foram preparadas conforme a metodologia descrita, porém, sem adição do AMTAC-01.

4.2.3.2 Nanocápsulas de PLA contendo AMTAC-01 obtidas pelo método da nanoprecipitação

As nanocapsulas de PLA foram obtidas pelo método da nanoprecipitação descrito por FESSI et al., (1989). Inicialmente foram pesados 50 mg de PLA e este foi dissolvido em 10 mL de acetona juntamente com a lecitina de soja (lipoid®) e uma mistura de triglicérides do ácido capríco caprílico (Mygliol 812 ®) e diferentes quantidades do fármaco foram empregadas (5; 3; 3,5 e 2 mg) afim de obter um sistema com tamanho médio reduzido e maior quantidade do AMTAC-01 incorporado. Essa solução foi gotejada em 40 mL de uma solução aquosa contendo pluronic F-68 1% (p/v) sob agitação constante. O solvente orgânico foi removido a vácuo usando rotaevaporador. Após remoção do solvente orgânico as nanocapsulas foram liofilizadas por 24 horas e armazenadas em temperatura ambiente até posterior uso.

As nanocápsulas brancas foram preparadas conforme a metodologia descrita, porém, sem adição do AMTAC-01.

4.2.3.3 Nanoesferas de PLA contendo AMTAC-01 obtidas pelo método da emulsão simples (O/A)

As nanoesferas de PLA foram obtidas pelo método da emulsificação/evaporação do solvente, conforme relatado anteriormente (DALMOLIN; KHALIL; MAINARDES, 2016). Por essa técnica, 50 mg de PLA foram dissolvidos em 1 mL de diclorometano juntamente com 2 mg de AMTAC-01. Essa solução contendo a fase orgânica da emulsão foi rapidamente vertida numa solução aquosa contendo PVA 2% ou 1%(p/v) e emulsionada por sonicação durante 3 minutos, resultando na emulsão O/A, durante todo o processo de sonicação foi utilizado banho de gelo para evitar o aquecimento provocado pelo processo, evitando dessa maneira, a evaporação antecipada do solvente. Em seguida, a fase orgânica foi removida por evaporação a vácuo a 37°C por 20 minutos. Após remoção do solvente orgânico as nanoesferas foram liofilizadas por 24 horas e armazenadas em temperatura ambiente, até posterior uso.

As nanoesferas brancas foram preparadas conforme a metodologia descrita, porém, sem adição do AMTAC-01.

4.2.4 Caracterização físico-química das nanopartículas de PLA carregadas com AMTAC-01

4.2.4.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

A determinação do tamanho das partículas, índice de polidispersão e distribuição foram obtidas em equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern) pela técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS). Antes da medição, as partículas foram diluídas em água deionizada (1:1000 v/v). A análise foi realizada em triplicata com ângulo de dispersão de 173° a 25°C e 10 corridas por minutos. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão (\pm). O potencial zeta das partículas foi avaliado a partir da mobilidade eletroforética sob um campo elétrico. As amostras foram diluídas em com KCL 0,1 mM e adicionadas em células eletroforéticas onde um potencial de \pm 150 mV. Todas as medições foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados em média e desvio padrão (\pm).

4.2.4.2 Determinação da eficiência de encapsulação de AMTAC-01 em nanopartículas de PLA

A quantidade de AMTAC-01 incorporado as nanopartículas foi determinado pelo método indireto. A suspensão de nanopartículas foi submetida à ultracentrifugação utilizando tubos de centrifugação (VIVASPIN® 500, sartorius) 40 000 rpm por 40 minutos. O sobrenadante foi coletado, diluído adequadamente em acetonitrila, filtrado em filtro com tamanho de poro 0.45 μ m e analisado em espectrofotômetro em 268 nm (modelo do espectro). A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada em triplicata e calculada pela equação (1):

$$EE (\%) = \frac{Q_{\text{inicial}} - Q_{\text{final}}}{Q_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (1)$$

Onde, Q_{inicial} é a quantidade inicial de AMTAC-01 adicionada a formulação e Q_{final} é a quantidade do fármaco não encapsulado presente no sobrenadante depois da ultracentrifugação. Foi realizada uma varredura espectral para verificação do comprimento de onda do fármaco para posteriores quantificações (apêndice I).

4.2.4.3 Morfologia

A morfologia das nanoesferas e nanocápsulas foram verificadas por microscopia eletrônica de varredura em equipamento MEV – FEG (Zeiss) com voltagem de aceleração de

5 kV e aumento de 10-30 KX. Inicialmente as partículas foram metalizadas com ouro. A microscopia de força atômica foi realizada em equipamento SPM-9700 – Shimadzu (Japão) operando na região atrativa do modo não-contato do *cantilever*, com varredura de 10-2 μm , frequência de ressonância 100 kHz e força constante de 8 N/m .

4.2.4.4 Difração de raios-X (DRX)

O estado físico do AMTAC-01, do PLA e das nanocapsulas e nanoesferas brancas e contendo AMTAC-01 foram analisadas em difratômetro de raios-X (D8 advanced, Bruker) usando radiação de CuK α ($\lambda= 0,15418$ nm, com tubos de voltagem 40 Kv e corrente de tubo 20 mA). As amostras foram analisadas com ângulo de varredura ao longo de 2θ variando de 5° a 70° , com velocidade de $2^\circ/\text{min}$.

4.2.4.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Espectros de FT-IR foram obtidos em espectrofotômetro (modelo IRPrestige-21, SHIMADZU -Japão) pela técnica de refletância total atenuada (ATR) na faixa espectral de 4000 a 700 cm^{-1} . Foram analisados o fármaco e o polímero isolados e as nanocapsulas e nanoesferas brancas e contendo o AMTAC-01.

4.2.4.6 Calorimetria Exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG)

As propriedades térmicas do PLA, AMTAC-01, NE-PLA, NE-PLA-AMTAC-01, NC-PLA e NC-PLA-AMTAC-01 foram analisadas em equipamento (Analisador térmico simultâneo NETZSCH STA modelo 449 F3- JUPITER) com medidas simultâneas de DSC e TG, com razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, com intervalo de temperatura de 40 a 500°C em atmosfera de gás nitrogênio com fluxo de $100\text{mL}/\text{min}$.

4.2.4.7 Estudo de liberação *in vitro*

O perfil de liberação *in vitro* do AMTAC-01 a partir das nanocapsulas de PLA foram analisados através do ensaio com membrana de diálise. Inicialmente 10 mL de cada suspensão foi adicionado em saco de diálise, as extremidades foram vedadas e depois colocada em meio de diálise (tampão fosfato de sódio pH 7.4, 50 mM) mantido a 37°C com agitação magnética de 100 rpm. Em intervalos de tempo predeterminados (1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 e 72 horas) foram

coletados 1 mL do meio para análise, sendo o volume retirado adicionado em seguida. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a leitura feita em comprimento de onda 268 nm. A partir dos resultados calculados, foi plotada a curva de percentagem de liberação cumulativa de AMTAC-01 (média) versus tempo (minutos). Foi avaliado o perfil de liberação do AMTAC-01 das partículas através da utilização de modelos matemáticos, seguindo modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Weibull e Hixson-Crowell, com o principal objetivo de caracterizar o processo de liberação do AMTAC-01 através das nanocápsulas.

4.2.5 Modelo Biológico experimental

4.2.5.1 Cultivo celular

Foram utilizadas, para o presente estudo não cancerígenas (**tabela 3**). A linhagem foi obtida através do Instituto Nacional do Câncer (INCA) no Rio de Janeiro. Os cultivos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

As células foram mantidas em incubadora (modelo HF212, Ultrafase) com 5% de CO₂ a 37°C, e foram cultivadas em frascos de cultivo celular contendo meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL).

O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. As células aderentes requisitaram do uso da solução de tripsina/EDTA, com a finalidade de soltá-las do frasco de cultivo ao atingirem confluência de 80%. Após passado esse período, essa solução era bloqueada com o meio de cultivo, e então as células eram centrifugadas (centrífuga HERMLE Labortechnik GmbH) a 500 g por 5 minutos. As linhagens não aderentes foram passadas diretamente para tubos de 15 mL e centrifugadas.

O crescimento celular foi acompanhado por meio da utilização de microscópio óptico invertido (Medilux) e a viabilidade celular inferida por meio da contagem de células em câmara de Neubauer, utilizando o reagente Azul de Tripán (4%, SIGMA). Esse reagente consegue penetrar apenas células com a membrana danificada, deixando-as com uma coloração azulada, de forma que as mesmas podem ser identificadas e contadas como

inviáveis. Desta forma, quando a amostra possuía 90% de células viáveis, os experimentos eram realizados (STROBER, 2015).

Foi utilizado o seguinte cálculo de contagem de viabilidade celular:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{\text{número de células viáveis} \times 100}{\text{número de células totais}} \quad (2)$$

Tabela 3: Linhagens celulares utilizadas para os ensaios de avaliação de citotoxicidade in vitro.

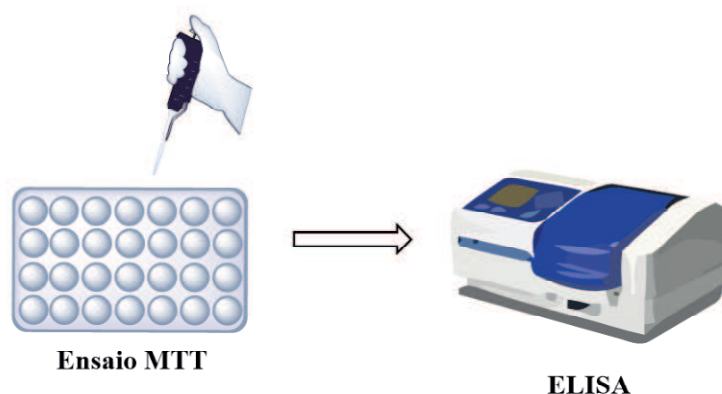
Linhagem	Histologia	Origem	Tipo de Cultura
HUVEC	Não cancerígena. Célula endotelial de veia de cordão umbilical humano	Humana	Aderente

4.2.5.2 Ensaio de citotoxicidade in vitro – Ensaio MTT

Essa técnica consiste na inferência da citotoxicidade do composto estudado na viabilidade celular, por meio da redução do MTT, composto hidrossolúvel de coloração amarela, em cristais de formazan, composto não solúvel em água de coloração púrpura, por células viáveis devido ao metabolismo intracelular indireto feito pelo subproduto, NADH e NADPH, de enzimas mitocondriais e lisossomais. Assim, considera-se a intensidade de absorbância lida pelo ELISA diretamente proporcional a quantidade de células viáveis em cada poço após o tratamento com a substância em estudo (MOSMANN, 1983; RISS et al., 2013).

Para o ensaio, utilizou-se microplacas de 96 poços, como ilustrado na figura 10 . As células epiteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) foram plaqueadas com densidade a 3×10^5 células/mL contendo 200 μ l do meio de cultura e incubada por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período o meio foi removido e as células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas com AMTAC-01 livre, NC-PLA, NE-PLA, NC-PLA-AMTAC-01e NE-PLA-AMTAC-01.

Figura 10: Representação esquemática para teste de viabilidade MTT



FONTE: Autor

Após esse período os poços foram lavados com solução salina (PBS) e então foi adicionado 10 μ L de MTT (amresco, 5mg/1mL de PBS) (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]) por 3 horas e meia de incubação á 37°C e 5% de CO₂. Após esse intervalo, foi adicionado 100 μ L da solução de SDS/HCl (10 g de SDS, Amresco, 100 mL de HCl 0,01N, Fisher). As placas foram então deixadas “overnight” em agitador de placas, protegidas da luz, tendo, por fim, sua intensidade de absorbância mensurada por espectrofotometria do tipo ELISA (leitor ELISA Elx800, Biotek Instruments) com o filtro de 570nm. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada substancia e os resultados expressos pela média \pm D.P. A viabilidade celular foi calculada usando a equação (2) e a concentração inibitória máxima (IC₅₀) foi determinada para cada composto testado.

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ C.V}}{\text{n}^\circ \text{ C.T}} \times 100 \quad (3)$$

Onde, C.V expressa o número de células viáveis e C.T expressa o número de células totais.

4.2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando software prima 6.0. Os dados da atividade citotóxica foram analisados por análise de variância one-way e teste de comparação múltipla de Tukey. Considerou-se $p < 0,05$ para indicar uma diferença significativa entre os grupos experimentais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do derivado espiro-acridínico AMTAC-01

Através da rota sintética proposta por ALMEIDA et al., (2016) foi obtido o derivado espiro-acridínico AMTAC-01 e como visto na tabela 4 com rendimento acima de 80%, indicando que a rota sintética tem boa viabilidade e fácil metodologia de purificação.

Tabela 4: Caracterização físico-química do derivado AMTAC-01

<i>Composto</i>	<i>Aparência</i>	<i>PM(g/mol)</i>	<i>Rend (%)</i>	<i>LogP</i>	<i>FM</i>	<i>PF(°C)</i>
AMTAC-01	Pó amarelo	376,41	87	5,11	C ₂₄ H ₂₁ N ₄ O	234,02

Rend: rendimento; PM: peso molecular; LogP: coeficiente de partição; FM: fórmula molecular; PF: ponto de fusão

Quanto ao logP o composto apresenta-se com caráter mais lipofílico devido ao alto valor teórico calculado (5,11) o que pode estar relacionado a hidrofobicidade do núcleo acridínico. A rota sintética é reprodutível para síntese do AMTAC-01 mesmo em escalas de produção superior a um grama com bom rendimento, aceitável grau de pureza (96%) e fácil purificação, o que torna a síntese interessante para produção em grande escala.

5.2 Confirmação estrutural

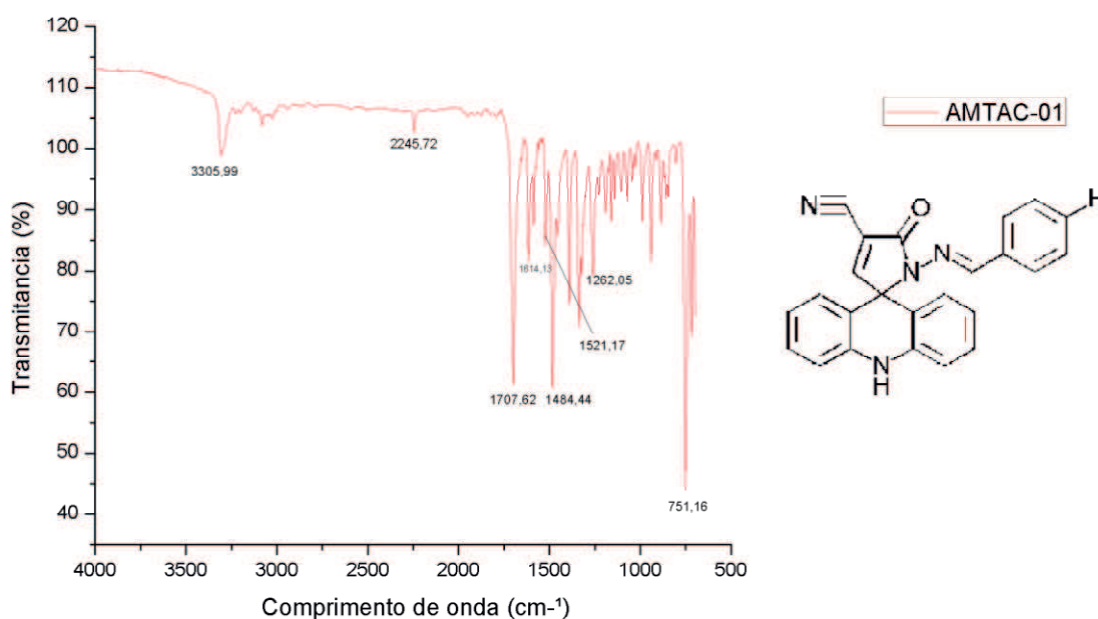
A determinação estrutural é uma parte importante na química orgânica, após ser sintetizada a molécula deve ser elucidada para confirmação de sua estrutura química. Foram realizadas espectroscopias na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para obtenção dos espectros de absorção das bandas dos grupos funcionais e de ligações presentes nas moléculas e ressonância magnética de ¹H e ¹³C que juntas permitem determinar a fórmula molecular e estrutural da substância.

5.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho do derivado (fig. 11) apresentou pico em 3305 cm⁻¹ sugestivo de estiramento N-H de amina secundária. Em 2245 cm⁻¹ ocorre o estiramento de nitrila (-C≡N) com intensidade média. O estiramento sugestivo de C=O de amidas ocorre em 1707 cm⁻¹. Em 1614 cm⁻¹ e 1521 cm⁻¹ ocorre os estiramento de C=N de

imina e o dobramento de amina secundária, respectivamente. Em 1484 cm^{-1} ocorre o estiramento sugestivo de ligação $\text{C}=\text{C}$ de anel aromático. O pico em 1262 cm^{-1} caracteriza o estiramento $\text{C}-\text{N}$ de aromáticos. O pico em 751 cm^{-1} refere-se à deformação angular fora do plano de $\text{C}-\text{H}$ presente no anel aromático.

Figura 11: Espectro de absorção na região do infravermelho do derivado AMTAC-01

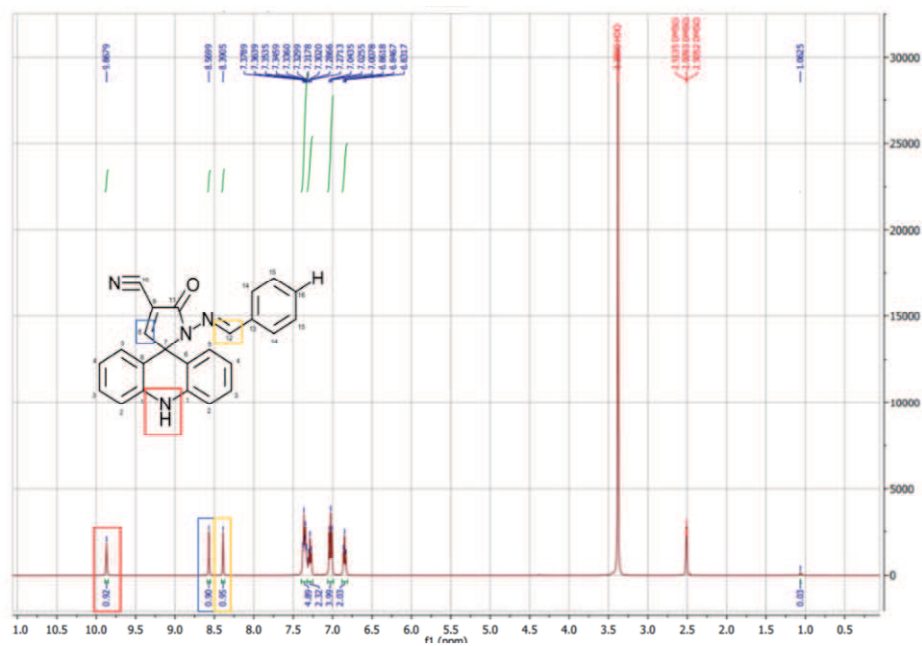


Dessa forma, todos os picos encontrados estão em concordância com os picos encontrados no trabalho de ALMEIDA et al., 2016, confirmando que com a síntese seguida é viável a molécula proposta.

5.2.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

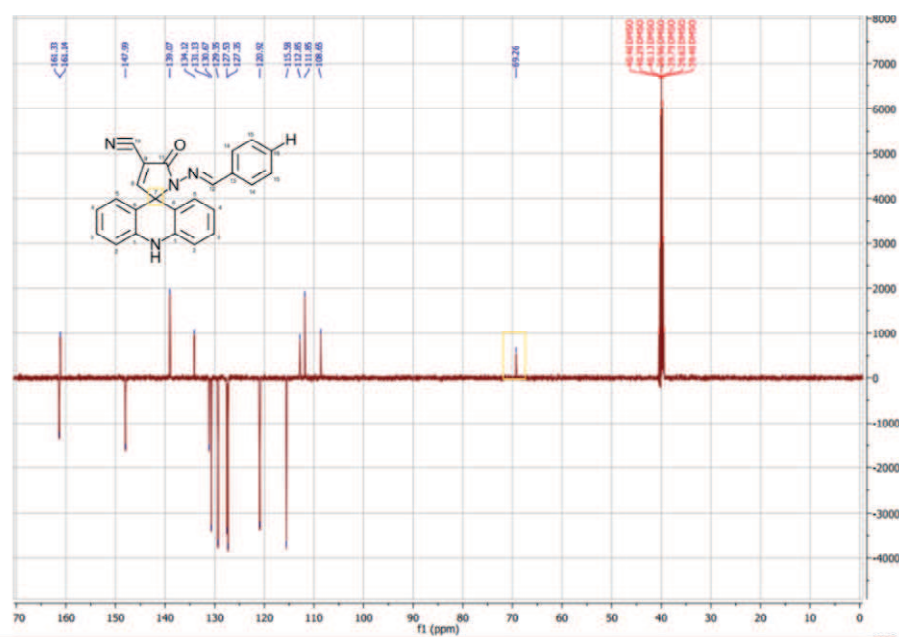
Como pode ser observado no espectro de ressonância magnética nuclear de H^1 do AMTAC-01 (fig. 12), a análise apresentou um singleto com deslocamento de 9.86 ppm sugestivo para grupamento $\text{N}-\text{H}$, os singletos subsequente se apresentaram nos sinais em 8,56 e 8,39 ppm, sugestivos para os grupamentos vinílico e imínico, respectivamente. Os outros deslocamentos são referentes aos hidrogênios do anel aromático e do anel acridínico.

Figura 12: Espectro de ressonância magnética nuclear (rmn) de ^1H do composto AMTAC-01 (500 MHz)



No espectro de RMN de ^{13}C (fig. 13) foram visualizados os 16 sinais correspondentes aos carbonos (primários e terciários; secundários e quaternário) característicos do AMTAC-01. A confirmação da ciclização espontânea da molécula foi confirmada com o aparecimento do sinal em δ 69.16 sugestivo da presença do carbono quaternário na posição 7, corroborando com o resultado encontrado por ALMEIDA et al., 2016.

Figura 13: Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C do AMTAC-01 (500MHz)



A análise dos dados espectroscópicos de FT-IR e RMN ^1H e ^{13}C comparado aos dados descritos na literatura por ALMEIDA et al., (2015) (tabela 5), permitem confirmar que o composto sintetizado se trata do derivado espiro-acridínico AMTAC-01.

Tabela 5: Dados comparativos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto AMTAC-01 sintetizado e valores encontrados na literatura.

Atribuições	AMTAC-01 (sintetizado)		AMTAC-01 (ALMEIDA et al., 2016)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	139,07	-	139,11	-
2	127,53	7,00	127,50	7,00
3	130,67	7,27	130,63	7,26
4	120,92	6,83	120,89	6,82
5	115,58	7,02	115,44	7,02
6	111,85	-	111,81	-
7	69,26	-	60,24	-
8	161,33	8,56	161,30	8,54
9	112,85	-	112,81	-
10	108,65	-	108,60	-
11	161,33	-	161,30	-
12	147,99	8,39	148,05	8,38
13	134,12	-	134,05	-
14	127,35	7,36	127,30	7,36
15	131,13	7,35	131,08	7,35
16	127,53	7,33	129,33	7,33
17	-	9,86	-	9,82

A partir dos dados apresentados podemos concluir que o fármaco sintetizado é o mesmo reportado na literatura de ALMEIDA et al., (2016) e está adequado para os próximos estudos.

5.3 Caracterização físico-química das nanocápsulas e nanoesferas de PLA contendo o AMTAC-01

Diversos trabalhos na literatura tem sido dedicado ao estudo dos efeitos do processo de preparação das nanopartículas como, solvente, tensoativo e a composição das partículas alteram o tamanho e a liberação do fármaco (CHORNY et al., 2002; BUDHIAN; SIEGEL; WINEY, 2007; ABDEL HALIM; SALAH, 2014). Além disso, observou-se que a hidrofobicidade e miscibilidade do fármaco nas nanopartículas são parâmetros fundamentais que determinam a acumulação e o destino da quimioterapia *in vivo* (JÄGER et al., 2018). Portanto, avaliar os parâmetros físico-químicos é essencial para entender as interações entre o fármaco e o polímero que podem afetar as características finais das nanopartículas finais.

5.3.1 Obtenção das nanocapsulas e nanoesferas de PLA contendo AMTAC-01

As nanoesferas de PLA obtidas pelo método da nanoprecipitação (NE-PLA-AMTAC-01 (A)) estão apresentadas na tabela 6.

O método da nanoprecipitação também chamado de método da deposição interfacial, é um método rápido e direto quando comparado a outros métodos que necessitam da formação de uma emulsão. Em condições apropriadas, o processo de formações das partículas ocorre instantaneamente graças ao “efeito Ouzo” um processo de formação de partículas sem a necessidade de um agente tensoativo. Quando uma solução contendo um soluto hidrofóbico ou óleo é adicionada rapidamente na região metaestável, também chamada de “região Ouzo (região entre o limite de solubilidade e solubilidade do soluto) de um diagrama de fases ternário (composto por polímero, soluto e água), o limite de solubilidade termodinâmica do soluto é alcançado e o sistema evolui para nucleação de partículas de soluto, que sofre crescimento pelo amadurecimento de Ostwald e precipitam, quando o soluto hidrofóbico é um polímero, forma as nanopartículas poliméricas (BECK-BROICHSITTER et al., 2010; LEPELTIER; BOURGAUX; COUVREUR, 2014).

Tabela 6: Diâmetro médio e índice de polidispersão das nanoesferas de PLA (A) a quantidade de fármaco, de polímero, concentração do tensoativo e proporção de fase orgânica: fase aquosa

	Quantidade de polímero (mg)*	Quantidade de fármaco (mg)	Concentração do tensoativo Pluronic F-68 (%)*	Proporção fase orgânica:fase aquosa*	Diâmetro médio (nm)*	P.D.I
NE-PLA- AMTAC-01 (A1)	20	10	0,05	1:2	P.A	
NE-PLA- AMTAC-01 (A2)	20	5	0,05	1:2	P.A	
NE-PLA- AMTAC-01 (A3)	20	2	0,05	1:2	P.A	
NE-PLA- AMTAC-01 (A4)	20	2	0,25	1:2	303,4 (±1,23)	0,435 (±0,02)
NE-PLA- AMTAC-01 (A5)	20	2	0,5	1:2	253,8 (±0,96)	0,279 (±0,01)
NE-PLA- AMTAC-01 (A6)	50	2	0,5	1:4	303,4 (±1,85)	0,435 (±0,02)
NE-PLA- AMTAC-01 (A7)	50	5	1	1:4	259,2 (±1,03)	0,325 (±0,02)
NE-PLA- AMTAC-01 (A8)	50	2	1	1:4	185,3 (±0,87)	0,110 (±0,01)

P.A= Presença de agregados / *P<0,05

Dessa forma, encontrar uma formulação com baixa concentração do tensoativo e uma proporção adequada de fase orgânica:fase aquosa é ideal para produção de nanopartículas pelo método da nanoprecipitação (BECK-BROICHSITTER, 2016). Por isso, diferentes

concentrações do tensoativo e proporções de fase orgânica:fase aquosa foram testadas e os resultados estão apresentados na tabela 5.

Uma baixa concentração do Pluronic F-68® não foi suficiente para produzir partículas com tamanho inferior a 200 nm. No trabalho de MAZZARINO et al., (2012) uma baixa concentração do pluronic F-68® (0,1%) levou a formação de agregados, sugerindo que baixas concentrações do tensoativo não são adequadas para estabilizar as nanopartículas.

O tamanho menor das nanopartículas alcançado com uma maior proporção da razão fase orgânica: fase aquosa é esperado conforme encontrado em outros trabalhos (BRADI et al., 2017; MAHORANA; MOHANTY; NEGY, 2010; MILADI et al., 2015) isso ocorre porque um volume alto na fase aquosa leva a uma difusão e nucleação mais rápida do solvente orgânico para a água, formando partículas menores. Em alguns casos, a difusão do solvente na fase aquosa torna-se tão rápida que o polímero precipita antes mesmo de se aglomerar em partículas (BUDHIAN; SIEGEL; WINEY, 2007).

Apesar da NE-PLA-AMTAC-01 (A8) apresentar o tamanho almejado e baixo índice de polidispersão, após 7 dias de preparação a formulação apresentava agregados no fundo do recipiente, sugerindo instabilidade da formulação, para resolver esse problema, foi feito o estudo com as nanocápsulas que será discutido a seguir.

As nanocapsulas de PLA contendo o derivado espiro-acridinico AMTAC-01 foram obtidas com sucesso pelo método da nanoprecipitação descrito por FESSI et al., (1989) e as nanoesferas pelo método da emulsão simples (O/A). Na tabela 7 e 8, estão descritas as principais características das partículas com e sem o AMTAC-01.

Tabela 7: Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanocápsulas de PLA (NC-PLA e NC-

	Quantidade de AMTAC-01 (mg)*	Diâmetro médio (nm)*	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
NC- PLA	-	208,4 (±0,17)**	0,129 (±0,05)	- 16,9 (±0,002)
NC-PLA-AMTAC-01(1)	5	223,8 (±0,55)	0,248 (±0,03)	N.R
NC-PLA- AMTAC-01(2)	3	253,9 (±1,42)	0,279 (±0,02)	N.R
NC-PLA- AMTAC-01(3)	2,5	185,2 (±1,85)	0,143 (±0,01)	N.R
NC-PLA- AMTAC-01(4)	2	183,8 (±0,95)	0,130 (±0,01)	-17,6 (±0,003)

PLA-AMTAC-01) variando a quantidade de fármaco

ANOVA: *P< 0,05 ; ** P>0,05; N.R: Não realizado

O tamanho das nanopartículas e o seu índice de polidispersão (PDI) são fatores chaves que influenciam diretamente o comportamento biofarmacêutico das partículas contendo ativos em uma ampla variedade de aplicações terapêuticas (YOUSHA; ALI; LAMPRECHT, 2017). A distribuição de tamanho geralmente é determinada pelo seu índice de polidispersão que revela a uniformidade dos tamanhos das nanopartículas. Para sistemas com tamanho homogêneo, recomenda-se que o valor de PDI deve estar entre 0,01 e 0,4, acima de 0,4 já é considerado polidisperso, respectivamente (BHATTACHARJEE, 2016b)

Ao analisarmos os tamanhos das nanocapsulas de PLA após adição do fármaco, podemos verificar que o AMTAC-01 em baixas quantidades (2,5 e 2 mg) diminui acentuadamente o tamanho das nanopartículas assim como o PDI. Resultado semelhante foi encontrado na pesquisa de BUDHAIN et al., (2005) o qual analisaram a influência da proporção fármaco:polímero na distribuição de tamanho de nanopartículas de PLGA contendo o fármaco hidrofóbico haloperidol. Os autores observaram que o aumento da concentração do fármaco em relação a uma concentração fixa do polímero, ocorreu uma distribuição bimodal do tamanho das partículas.

A tabela 8 apresenta os tamanhos médios das nanoesferas de PLA contendo o AMTAC-01 em função da concentração do tensoativo utilizado.

Tabela 8: Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoesferas de PLA (NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01) variando a concentração do tensoativo

	Quantidade de AMTAC-01 (mg)*	Concentração do PVA (%)*	Diâmetro médio (nm)*	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
NE-PLA	-	2	278,2 ($\pm 3,42$)	0,133 ($\pm 0,01$)	-12,2 ($\pm 0,001$)
NE-PLA-AMTAC-01(1)	5	1	P.A	-	-
NE-PLA-AMTAC-01(2)	2	1	227,8 ($\pm 2,30$)	0,104 ($\pm 0,01$)	N..R
NE-PLA-AMTAC-01(3)	2	2	165,4 ($\pm 1,71$)	0,101 ($\pm 0,01$)	-29,2 ($\pm 0,006$)

ANOVA: *P< 0,05 ; N.R: Não realizado; P.A: presença de agregados

As nanoesferas apresentaram um tamanho menor após a adição do AMTAC-01 em menor quantidade e aumento da concentração do tensoativo (PVA). A alta concentração de PVA nas nanoesferas (2% p/v) levou a formação de partículas menores devido a maior disponibilidade de moléculas do tensoativo, o que estabilizou de maneira mais eficiente a interface polímero/água formando gotículas menores na emulsão (WACHSMANN; LAMPRECHT, 2015).

O potencial zeta apresentou-se negativo nas nanoesferas e nanocapsulas de PLA devido a presença de grupos carboxílicos terminais do polímero e dos agentes estabilizadores não-iônico (HUERTAS, FESSI, ELAISSARE et al., 2010; BHATTACHARJEE, 2016). A presença do derivado espiro-acridinico diminuiu o potencial zeta das nanopartículas nos dois métodos, esse efeito pode ser explicado pela maior interação das cadeias hidrofóbicas do polímero com o fármaco, além disso a adição da lecitina, um fosfolípideo aniônico pode ter contribuído para o valor negativo do potencial zeta das nanocápsulas (CHUACHAROEN; SABLIOV, 2016). O potencial zeta é uma análise importante para entender a superfície e prever a estabilidade do sistema a longo prazo. Esses valores indicam estabilidade da suspensão de nanopartículas (BHATTACHARJEE, 2016a).

As NC-PLA-AMTAC-01 contendo 2mg do AMTAC-01 e as nanoesferas contendo 2% de PVA (p/v) apresentaram tamanho médio de 183,8 nm e 165,4nm, respectivamente,

considerados adequados para a liberação direcionada do fármaco na terapia do câncer, pois, atende ao requisito para transporte na corrente sanguínea e partículas com tamanho entre 20-200 nm conseguem atravessar os poros endoteliais e se acumular no tecido tumoral devido o efeito EPR (MAEDA; BHARATE; DARUWALLA, 2009; ALTMAYER et al., 2015; DANHIER et al., 2015). Por essas características foram escolhidas para estudos posteriores.

5.3.2 Eficiência de encapsulação do AMTAC-01 nas nanocapsulas e nanoesferas de PLA

A eficiência de encapsulação foi determinada indiretamente pela leitura do sobrenadante obtido após ultracentrifugação das nanopartículas. Os resultados encontram-se na tabela 9.

Tabela 9: Valores de eficiência de encapsulação para o AMTAC-01 nas nanocapsulas e nanoesferas de PLA

Formulação	Média (%)±DP
NC-PLA-AMTAC-01	50,1 (±0,22)
NE-PLA-AMTAC-01	84,5 (±0,14)

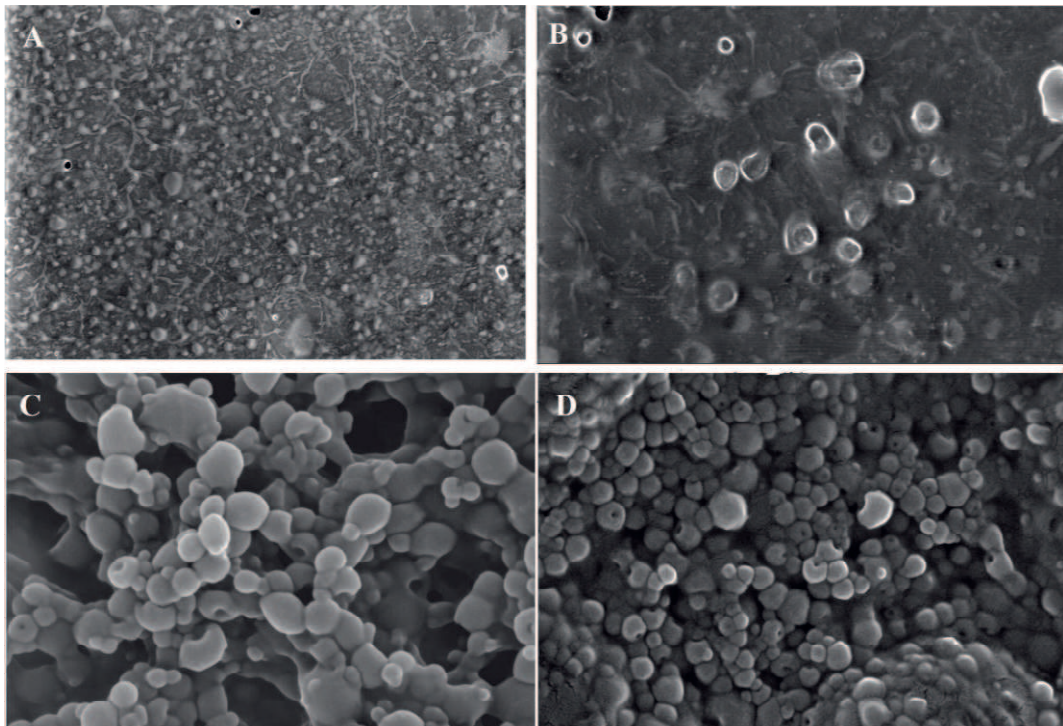
O método da emulsão simples (O/A) obteve taxa de encapsulação maior (90,5%) que por nanoprecipitação (77%). Diversos trabalhos correlacionam o método de obtenção das nanopartículas ligado a eficiência de encapsulação do fármaco (HALIM, SALH et al., 2014; MORA-HUERTAS et al., 2012). Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de CHEOW e HADINOTO (2010) onde analisaram o efeito das modificações dos métodos de preparação das nanopartículas de PLGA frente a eficiência de encapsulação de levofloxacina, um antibiótico hidrofóbico, o método da nanoprecipitação resultou em uma menor eficiência de encapsulação (65%) quando comparado ao método da emulsão simples (90%).

A alta eficiência de encapsulação pelo método da nanoprecipitação pode ser atribuída a adição da lecitina. Numa abordagem semelhante ZHANG et al (2008) atribuíram o aumento da eficiência de encapsulação a adição do fosfolípido anfifílico pois, ajuda no ancoramento do fármaco hidrofóbico a superfície das nanopartículas, visto que o fármaco interage com a cauda hidrofóbica da lecitina que está ligada a superfície das nanopartículas, ocasionando um aumento na eficiência de encapsulação.

5.3.3 Morfologia

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar o tamanho e morfologia das nanocapsulas e nanoesferas de PLA contendo o AMTAC-01. Essa técnica mostrou-se adequada apenas para verificação da morfologia das nanoesferas de PLA (fig.14 C e D), nas figuras A e B estão as micrografias das nanocapsulas com e sem fármaco, onde podemos notar formas definidas das partículas porém, com a presença de formas fibrilares. Isso pode ter ocorrido devido a sensibilidade das nanocapsulas ao feixe de elétrons incidente, mesmo esse operando em baixa voltagem (5kV).

Figura 14: Imagens de MEV-FEG das nanocápsulas de PLA (a) NC- PLA, b) NC-PLA-AMTAC-01) e nanoesferas de PLA (c) NE-PLA, d) NE-PLA-AMTAC-01)

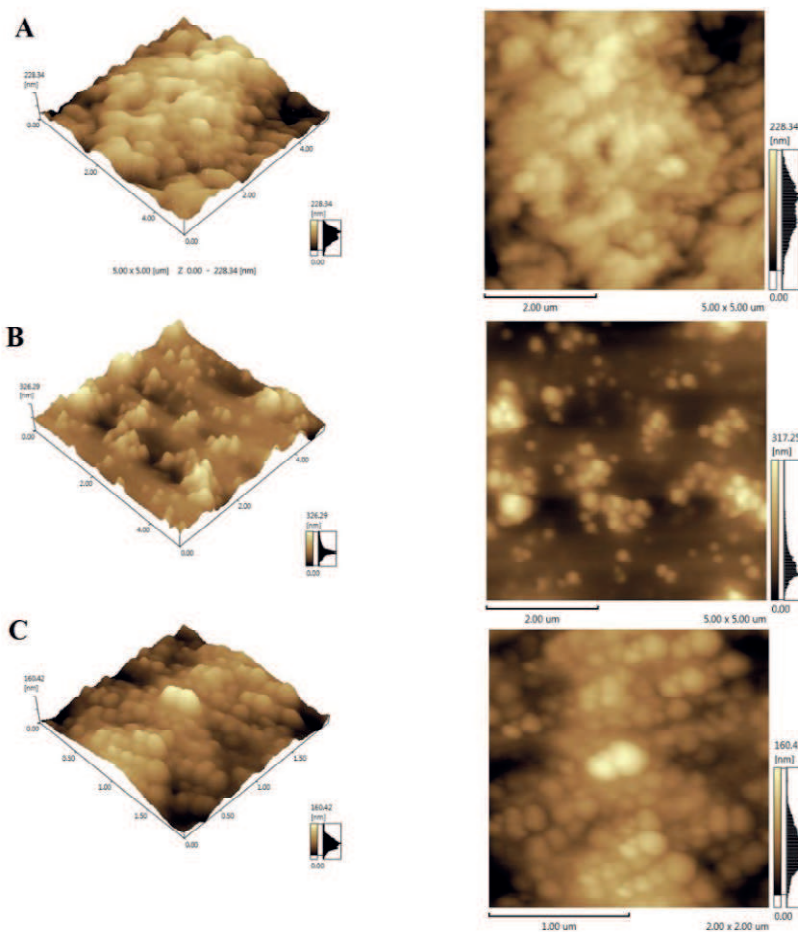


As nanoesferas de PLA (fig. 14 C) apresentaram forma praticamente esférica, com tamanho inferior a 200 nm e características morfológicas macias. O primeiro parâmetro crítico a ser analisado em sistemas nanoestruturados é a forma real das partículas. As nanopartículas são classificadas em duas categorias básicas gerais, “*hard*” (duro) ou “*soft*” (macia). As nanopartículas *hard* referem-se aos sistemas cuja superfície exterior é a única superfície disponível para disposição do ativo encapsulado e este fato pode ser alcançado através da adsorção ou fixação (covalente ou eletrostática) do ativo a superfície das

nanopartículas, como exemplo temos as nanopartículas de ouro e de prata . Enquanto que as nanopartículas *soft* possuem um núcleo central que servem como reservatório para a adsorção do ativo, exemplo, lipossomas e micelas (SANGTANI et al., 2017).

A forma e tamanho da partícula também foi confirmado com imagens do AFM, entretanto as nanocápsulas contendo o AMTAC-01 não obtiveram boa resolução por essa técnica. Esse fato pode estar relacionado a técnica de secagem ineficiente para essa amostra, porém, foi possível visualizar as nanocápsulas sem fármaco (fig. 15A).

Figura 15: Imagens de AFM das nanocápsulas de PLA (a) NC-PLA e (b) NE-PLA, (c) NE-PLA-AMTAC-01

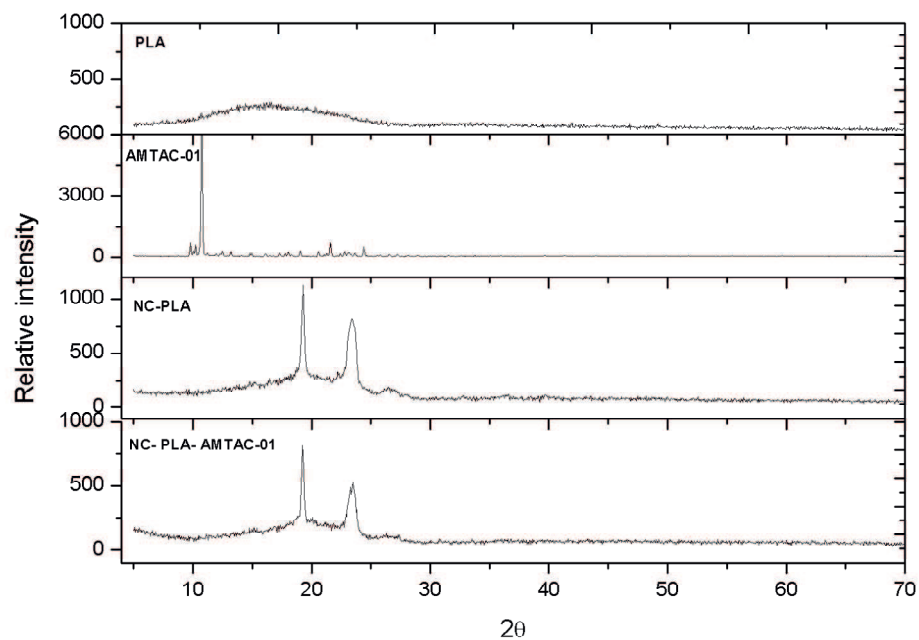


Correlacionado os tamanhos médios obtidos pela técnica DLS com os obtidos por AFM, podemos confirmar os tamanhos das nanocapsulas com diferença de ≈ 20 nm (fig. 15A), para as nanoesferas sem fármaco (fig. 15B) a diferença foi de ≈ 40 nm, e para as nanoesferas contendo AMTAC-01 (fig. 15C) essa diferença foi de apenas 5 nm. Dessa forma, podemos considerar que os tamanhos das nanocapsulas e nanoesferas são dependentes tanto da constituição da formulação como da escolha da técnica de obtenção (BUDHIAN; SIEGEL; WINEY, 2007).

5.3.4 Difração de raios-X (DRX)

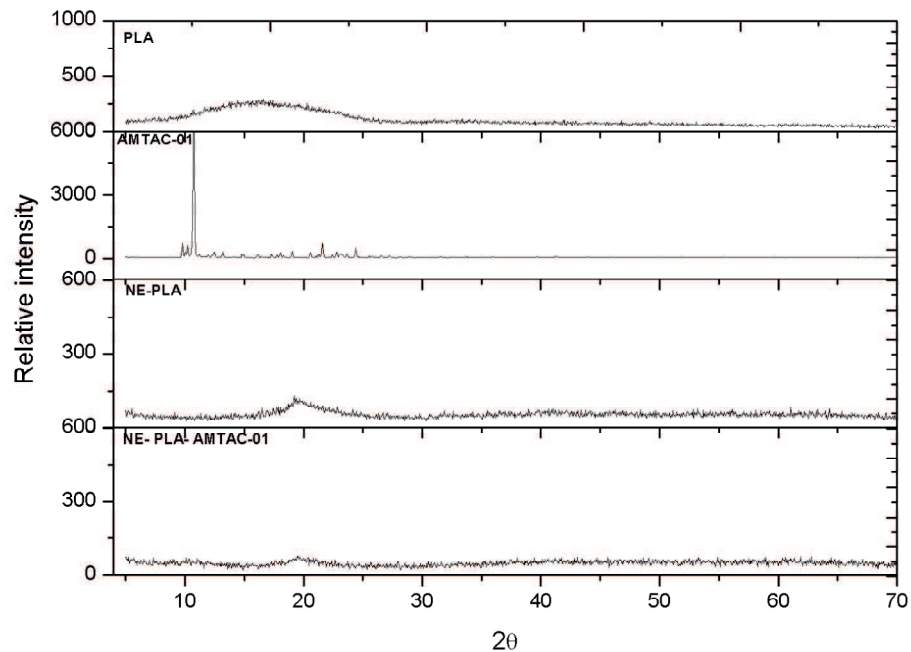
O perfil de DRX do PLA, AMTAC-01, NC-PLA, NC-PLA-AMTAC-01, NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01 (fig. 16). O DRX do PLA apresentou halo largo entre 10° e 25° característico do estado amorfo do polímero (REIS et al., 2017). O difratograma do AMTAC-01 apresentou picos intensos em aproximadamente 9° , 10° , 21° e $24,4^\circ$ característicos do estado cristalino do fármaco. O perfil de DRX das nanocápsulas contendo o AMTAC-01 apresentou picos em 19° e 23° que podem estar associados a presença do pluronic aderido à superfície das nanocapsulas devido a uma maior disposição de grupos carboxílicos do polímero (TAVARES et al., 2017).

Figura 16: Difratogramas do PLA, AMTAC-01, NC-PLA e NC-PLA-AMTAC-01



Já o difratograma das nanoesferas contendo o AMTAC-01 (fig. 17) apresentou um perfil amorfo indicando que o fármaco está disperso molecularmente na matriz polimérica ou no estado amorfo (ANTONIO et al., 2017; DALMOLIN; KHALIL; MAINARDES, 2016).

Figura 17: Difratograma do PLA, AMTAC-01, NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01



A técnica de difração de raios-X apresentam um bom potencial para a análise de materiais nanoestruturado, devido a largura e a forma das reflexões fornecerem informações sobre as subestruturas da amostra analisada (tamanho dos cristais, microdeformação de uma rede, etc) (DOROFEEV et al., 2012).

Uma das aplicações das nanopartículas poliméricas em sistemas de entrega de fármacos é a melhora da solubilidade de compostos poucos solúveis em água. As nanopartículas amorfas apresentam como vantagem mecanismos sinérgicos de aumento da taxa de dissolução e aumento da taxa de solubilidade (JOG; BURGESS, 2017).

O aumento na taxa de solubilidade pode ser associado ao seu alto estado energético (maior energia livre de Gibbs) o que, conseqüentemente, ocasiona uma instabilidade desses sistemas no estado amorfo que tendem a cristalizar para um polimorfo estável do fármaco, que teoricamente possui menor solubilidade. Entretanto, como esse fenômeno é dependente de vários fatores (temperatura de armazenamento, teor de umidade, entre outros) uma abordagem que estabiliza esse efeito é o uso de polímeros com alta transição vítrea (t_g) (HANCOCK; PARKS., 2000). O PLA possui temperatura de transição vítrea alta ($t_g = 68^\circ\text{C}$),

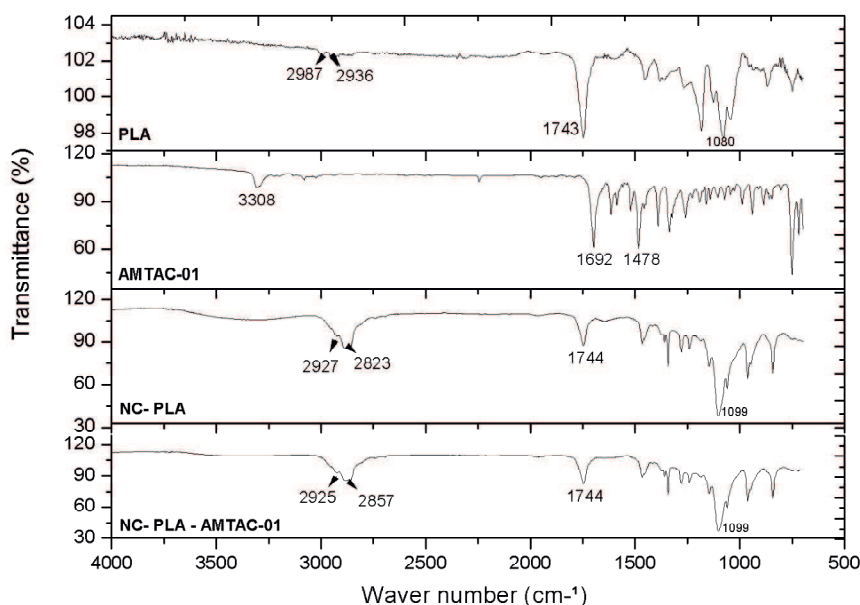
assim deduzimos que as nanocapsulas e nanoesferas de PLA contendo AMTAC-01 possuem estabilidade do seu estado amorfo e aumento da solubilidade do derivado.

5.3.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

O estudo de espectroscopia na região do infravermelho é importante, pois nos dá indicio de possíveis interações entre os componentes da formulação com formação de novas ligações químicas, não observada nos componentes isolados.

A figura 18 apresenta os espectros de FT-IR dos compostos isolados, PLA, AMTAC-01, NC-PLA, NC-PLA-AMTAC-01, NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01. O espectro de FT-IR do PLA foi observado picos entre 2987 e 2936 cm^{-1} que foi atribuído a vibrações de CH de carbono sp^3 de hidrocarbonetos presentes na estrutura do polímero (ANTUNES et al., 2017; DI MARTINO; SEDLARIK, 2014), em 1743 cm^{-1} temos o pico característico de estiramento C=O de ésteres alifáticos (KUMARI et al., 2010) e em 1080 cm^{-1} temos o pico sugestivo de ligação C-O-C de éster, respectivamente.

Figura 18: Análise de FT-IR do PLA, AMTAC-01, NC-PLA e NC-PLA-AMTAC-01



Analisando o espectro do derivado foi possível observar as bandas de absorções características do AMTAC-01 como descrito na literatura (ALMEIDA et al., 2016) a presença de um pico de 3308 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento NH de amida secundária, em

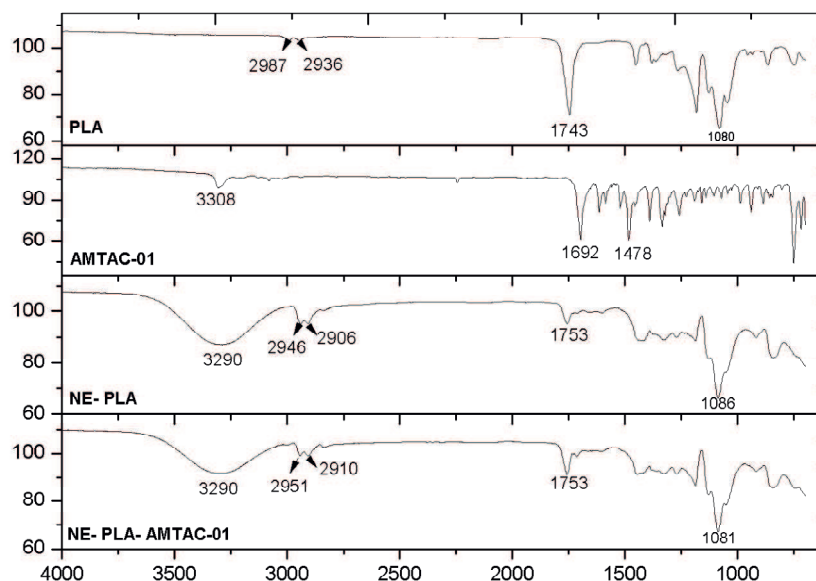
1692 cm^{-1} observa-se o pico correspondente ao estiramento C=O presente na estrutura do fármaco e em 1478 cm^{-1} o pico característico de absorção de estiramento C=C de anel aromático, respectivamente.

O espectro da NC-PLA-AMTAC-01 apresentou picos característicos do polímero e picos do óleo utilizado na formulação (Miglyol® 812) na região de 3000 a 2600 cm^{-1} . Butstraen e Salaün (2014) atribuíram a presença de absorções em 2927 e 2823 cm^{-1} a picos de vibração do estiramento C-H de cadeia alifática simétrica e assimétrica presentes no miglyol, o pico sugestivo de grupamento C=O de éster de triglicéride e do polímero aparece sobreposto em 1744 cm^{-1} . Já os picos referentes ao estiramento C-O e C-O-C do polímero e do óleo aparecem sobrepostos em 1099 cm^{-1} , simultaneamente.

Enquanto que o espectro da NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01 (fig. 19) não apresentaram diferenças significativas entre si, a nanoesfera com o fármaco apresentou picos de absorção em 3290 cm^{-1} atribuído a deformação axial O-H de álcool proveniente do tensoativo (álcool polivinílico) e em 2951 cm^{-1} e 2910 cm^{-1} encontra-se os picos sugestivos de estiramento CH de carbono $\beta\beta$, podendo ser do PLA ou do PVA. O pico em 1753 cm^{-1} é sugestivo de ligação C=O de éster do polímero e em 1081 cm^{-1} temos um pico característico de ligação C-O sobreposta do tensoativo e do polímero (CHANDRAN et al., 2016).

Os picos característicos do fármaco não apareceram nas NC-PLA-AMTAC-01 e NE-PLA-AMTAC-01 provavelmente devido à sua baixa quantidade presente no sistema. A partir desses resultados pode-se admitir que o processo de nanoencapsulação do derivado não favorece nenhum tipo de interação que descaracterize o polímero ou o fármaco utilizado.

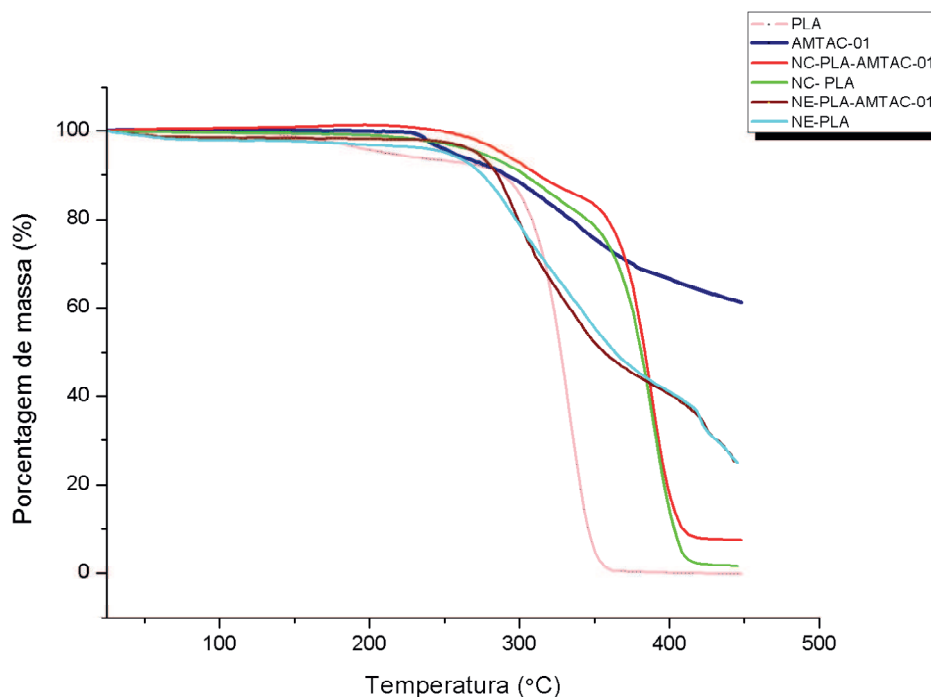
Figura 19: Análise de FT-IR do PLA, AMTAC-01, NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01



A supressão das bandas do fármaco também foi relatada no estudo de ALTMAYER et al., (2016), onde a proporção de citrato de tamoxifeno para o PLA foi de 1:10, proporção menor do que a observada nesse trabalho (1:25). Assim, a supressão das bandas do fármaco está ligada a menor proporção do AMTAC-01 em relação ao PLA na formulação. REIS et al., (2017) trabalhando com nanopartículas de PLA para o carregamento de disseleneto de difenila (PhSe) com atividade antioxidante, relatou que as bandas características do fármaco não foram visíveis no espectro de FT-IR porque estavam mascaradas na matriz polimérica devido a proporção PLA:PhSe nas nanopartículas.

5.3.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG/DTG)

As análises de DSC e TG foram realizadas para avaliação do grau de cristalinidade, bem como analisar as possíveis interações ou incompatibilidades entre as nanocapsulas e nanoesferas de PLA e o fármaco aprisionado (SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2002; ANTUNES et al., 2017b). No estudo de termogravimetria (fig. 20) observa-se um comparativo das diferentes perdas de massa apresentada por cada amostra.

Figura 20: Termograma do PLA, AMTAC-01, NC-PLA e AMTAC-01, NE-PLA e AMTAC-01

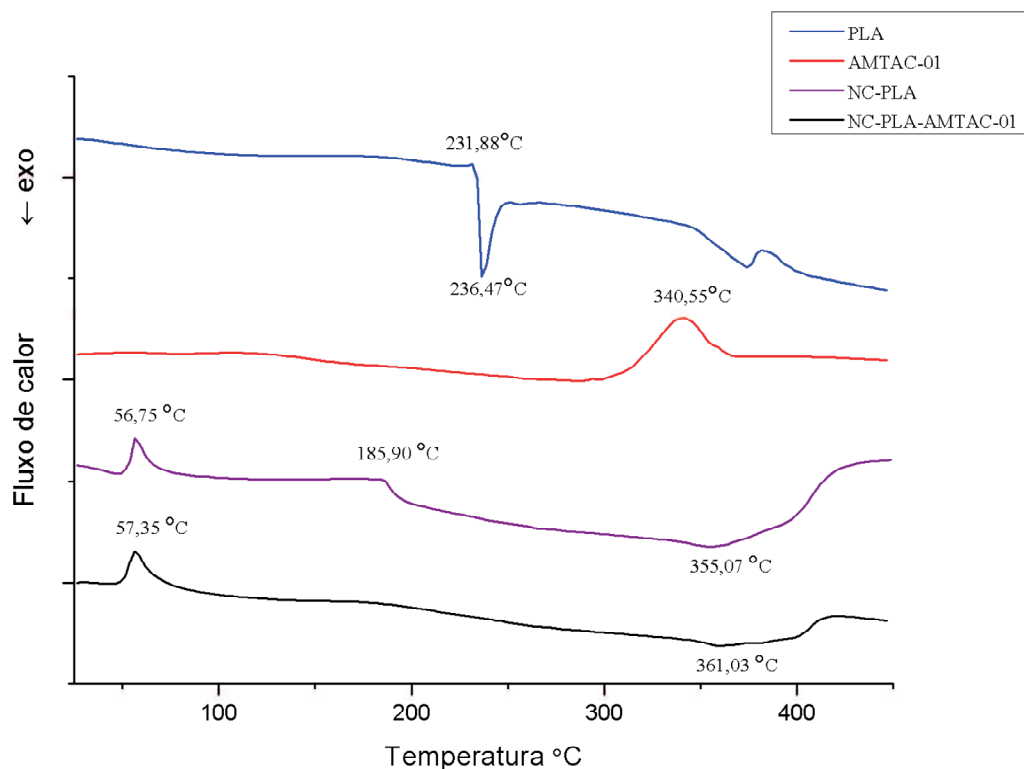
Analisando o termograma do AMTAC-01 podemos observar que a degradação do fármaco ocorre em duas etapas, a primeira ocorre entre 224-265 °C e a segunda em de 268°C-400 °C com perda de 68,84% da amostra. Na curva termogravimétrica do PLA foi observado na faixa de 300-350 °C o processo de decomposição térmica do polímero em um único evento de forma definida, apresentando perda de massa de 89,3 %. As curvas da NC-PLA-AMTAC-01 apresentou um discreto aumento na temperatura de perda de massa (deslocamento para direita) quando comparada a curva de perda de massa da NC-PLA, esse fato pode estar relacionado a uma maior estabilidade térmica do fármaco aprisionado as nanopartículas, necessitando assim de maior energia (temperatura) para que a degradação ocorra. As NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01 apresentaram resultados semelhante porém, com menores temperaturas de degradação.

Os polímeros poliéster exibem variação no seu comportamento térmico, variando conforme o número de repetições de unidades de metilenos, bem como com as diferentes unidades de monômeros constituintes (KARAVELIDIS et al., 2010). A curva de DSC do polímero e fármaco isolado, e as nanocapsulas com e sem fármaco estão ilustradas na figura 21. A curva de DSC do PLA evidenciou um pico endotérmico em 340,55°C ($\Delta H = -419,9$ J/g) indicando o ponto de fusão do polímero. A curva de DSC do AMTAC-01 apresenta o ponto de fusão do fármaco em 231,88°C ($\Delta H = 230,3$ J/g) seguido de um pico exotérmico em

236,47°C ($\Delta H = -45,83$ J/g) indicando a cristalização do fármaco e o pico em 381,6°C ($\Delta H = -64,44$ J/g) com perda de massa de 80,82% indicando a sua decomposição.

Em relação as nanocápsulas de PLA foi possível um pico endotérmico referente a temperatura de transição vítrea em 56,75°C podendo ser do óleo miglyol 812[®] e em, aproximadamente 182°C temos o início da decomposição da amostra. Por outro lado a curva de DSC da NC-PLA-AMTAC-0 apresentou um deslocamento do pico endotérmico de relaxamento da transição vítrea do polímero para 57,35°C e um evento exotérmico largo a partir de 361,5°C ($\Delta H = 7,61$ J/g) com perda de massa de 78,29 % indicando a decomposição da amostra.

Figura 21: Curvas de DSC do PLA, AMTAC-01, NC-PLA e NC-PLA-AMTAC-01

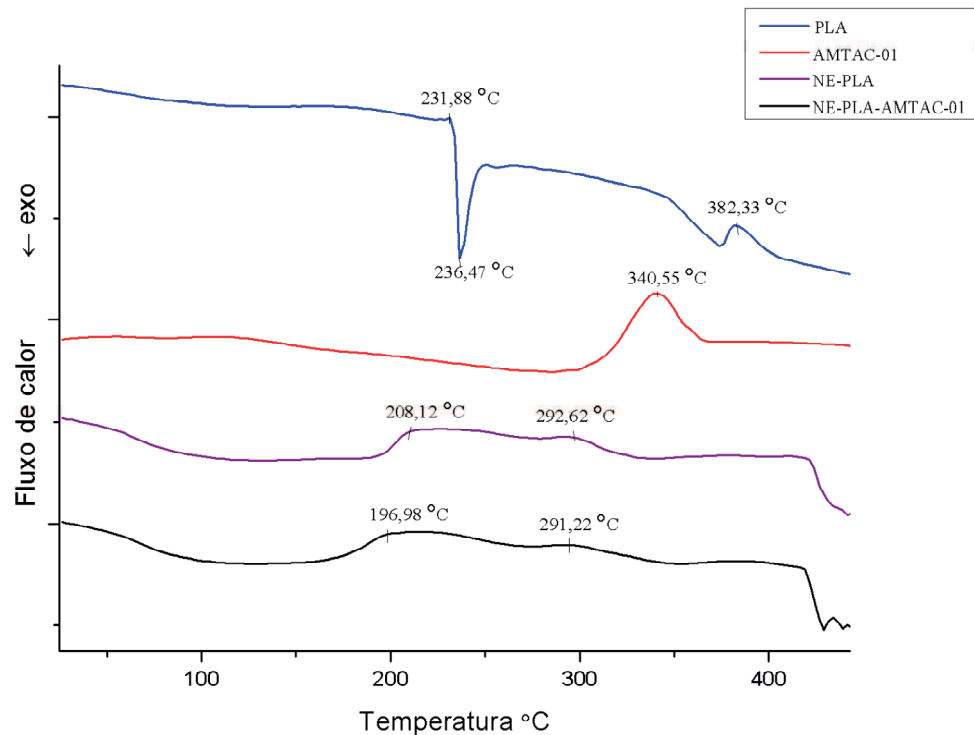


O deslocamento dos valores de entalpia para valores mais altos reforçam a hipótese de encapsulação do AMTAC-01 assim como a supressão do pico de fusão do fármaco nas nanocapsulas de PLA contendo o fármaco.

A curva de DSC da NE-PLA (fig 22) apresentou um evento endotérmico largo com dois picos discretos em 208,12 °c e 292,62°C referente a eventos de decomposição da amostra.

A NE-PLA-AMTAC-01 apresentou um evento endotérmico largo na mesma faixa de temperatura das nanoesferas brancas porém, com deslocamento das temperatura para valores mais baixos, provavelmente, devido interações das cadeias poliméricas com o fármaco.

Figura 22: Curvas de DSC e DTG do (A) NC-PLA e (B) NC-PLA-AMTAC-01

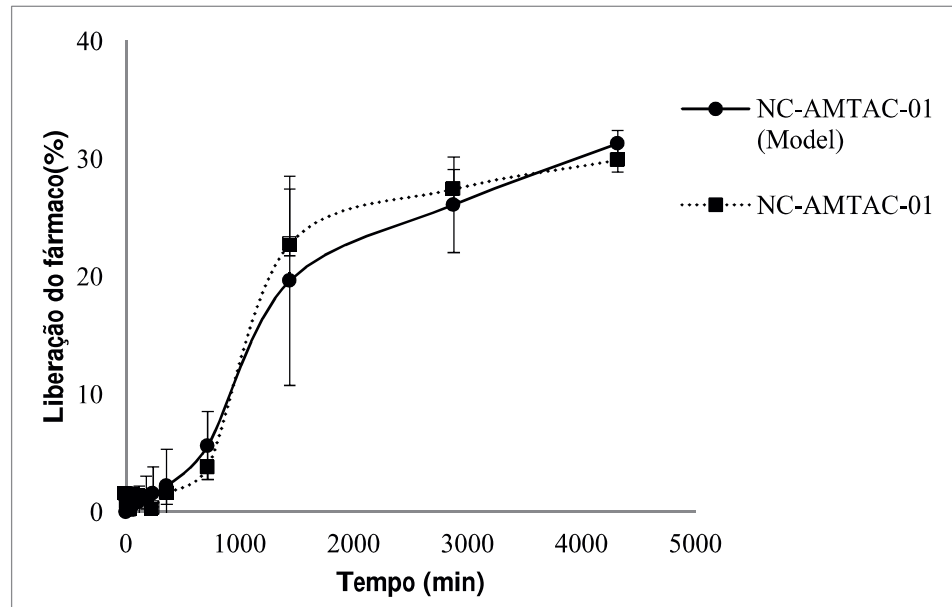


Cabe enfatizar que em sistemas nanoestruturados é esperada uma interação entre o fármaco e o sistema, uma vez que demonstra que o fármaco encontra-se aprisionado ou ligado a superfície das nanopartículas (SARTORI, 2007).

5.3.7 Estudo de liberação in vitro

A liberação do AMTAC-01 a partir das nanocapsulas e nanoesferas de PLA foi analisada em tampão fosfato de sódio pH 7,4 á 37°C simulando a temperatura corpórea. A figura 24 mostra o perfil da curva de liberação cumulativa do fármaco versus o tempo.

Figura 23: Curva de liberação *in vitro* do AMTAC-01 a partir das nanocapsulas de PLA e curva do modelo matemático ajustado



Podemos observar uma liberação lenta do AMTAC-01 nas primeiras 12 horas (720 min). Após 24 horas (1140 min) a liberação ocorre de maneira mais expressiva ($\approx 26\%$) e em seguida manteve uma liberação sustentada até 72 horas (4320 min), com liberação de 30% do fármaco utilizado na formulação, respectivamente. Zambaux et al., (1999) estudaram o efeito do peso molecular do poli (ácido láctico) na cinética de liberação da proteína C. As nanopartículas obtidas a partir de PLA com maior peso molecular demonstraram valores de degradação menores e, conseqüentemente, uma liberação mais lenta do ativo.

Uma das vantagens de aprisionar o fármaco em uma cavidade central como as nanocapsulas é que o feito de explosão inicial “*burst*” é evitado, assim ocorre um menor contato do fármaco com o local de administração, reduzindo irritação ou toxicidade local que alguns fármacos apresentam, além de proteger o fármaco da degradação tanto durante o armazenamento como quanto após a administração (COURVREUR et al., 2002).

Os dados de liberação das formulações foram modelados usando o suplemento do Excel® (Microsoft, Santa Rosa, CA, EUA), seguido dos principais modelos matemáticos de dissolução (tabela 9). O coeficiente de determinação ajustado (R^2) e o desvio padrão do quadrado médio (MSE) foram utilizados para escolher o melhor modelo que se ajusta os dados. O R^2 foi utilizado para comparar o ajuste dos modelos teóricos aos dados experimentais, quanto mais próximo de 1 for o R^2 , melhor será o ajuste do modelo para os

dados. Já o MSE avalia a diferença entre os valores observados experimentalmente e aqueles ajustados pelo modelo. Quanto menor o MSE, melhor será o ajuste dos dados experimentais ao modelo. Assim, o modelo que melhor descreva os dados experimentais será o que apresentar o maior R^2 e o menor MSE (ZANG et al., 2010).

Tabela 10: Modelos matemáticos utilizados para ajuste da curva de liberação do AMTAC-01 das nanocapsulas (coeficiente de correlação (R^2), constante da taxa de liberação e equação)

Formulação	Modelo matemático	Equação	R^2	MSE*	Constantes
NC- PLA-AMTAC-01	Weibull	$F = F_{max} * \{1 - \text{Exp}[-((t - T_i)^\beta) / \alpha]\}$	0,93	2,87	$\alpha = 19657.67$ $\beta = 1.28$
	Quadrático	$F = k_1 * (t - T_{lag})^{0.5} + k_2 * (t - T_{lag})$	0,93	2,82	$K_1 = -1.8 \times 10^{-8}$ $K_2 = 1.5 \times 10^{-4}$
	Peppas-Sahlin	$F = k_1 * (t - T_{lag})^m + k_2 * (t - T_{lag})^{2 * m}$	0,95	2,04	$K_1 = 6.44$ $K_2 = -0.07$
	Baker-Lonsdale	$F/100 = k_{BL} * (t - T_{lag})^{2/3} - F/100$	0,95	2,44	$k_{BL} = 6.0 \times 10^{-6}$
	Hopfenberg	$F = 100 * \{1 - [1 - k_{HB} * (t - T_{lag})]^n\}$	0,89	3,60	$k_{HB} = 2.8 \times 10^{-7}$
	Ordem zero	$F = k_0 * (t - T_{lag})$	0,88	3,81	$k_0 = 7.9 \times 10^{-3}$
	Primeira ordem	$F = 100 * \{1 - \text{Exp}[-k_1 * (t - T_{lag})]\}$	0,90	3,45	$k_1 = 9.7 \times 10^{-5}$
	Higuchi	$F = k_H * (t - T_{lag})^{0.5}$	0,94	2,60	$k_H = 5.5 \times 10^{-1}$
	Korsmeyer-Peppas	$F = k_{KP} * (t - T_{lag})^n$	0,96	1,98	$k_{KP} = 0.007$ $n = 0,43$
	Hixson-Crowell	$F = 100 * \{1 - [1 - k_{HC} * (t - T_{lag})]^3\}$	0,89	3,56	$K_{HC} = 3 \times 10^{-5}$

*MSE - Desvio padrão do quadrado médio

Segundo os critérios adotados para escolha do modelo a ser empregado, o modelo de Korsmeyer-Peppas foi o melhor ajustado a curva de liberação ($R^2=0,96$). Quando a equação desse modelo é transformada em logaritmo, se torna $\ln M/M = \ln K + n \ln t$ e a inclinação n pode ser determinada pelo gráfico do logaritmo da taxa de liberação em função do logaritmo do tempo (MELO et al., 2010). Os valores desse expoente n indicam o mecanismo de

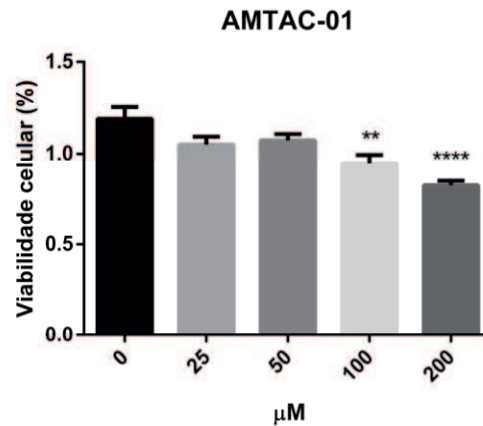
liberação do fármaco a partir das nanopartículas. Valores de $n > 0,43$ indicam que a difusão é Fickiana, se o valor for $0,85 > n > 0,43$ então o mecanismo de liberação é não Fickiano (PANDEY et al., 2015). O valor de $n=0,43$ encontrado na liberação do AMTAC-01 a partir das nanocápsulas de PLA sugerem um mecanismo de liberação por difusão Fickiana. No trabalho de ALMEIDA et al., (2015) a atividade antiproliferativa *in vitro* do AMTAC-01 foi avaliada em linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) obteve um IC_{50} de $2.09 \mu M$ e TGI de $59.40 \mu M$. Baseando-se nos valores encontrados na cinética de liberação do AMTAC-01 a partir das nanocápsulas de PLA, após 48 horas $\sim 22\%$ do fármaco foi liberado no meio, o que equivale em concentração molar a $92,71 \mu M$, concentração superior ao testado no trabalho citado. Assim, podemos deduzir que a atividade antiproliferativa *in vitro* futura desse trabalho poderá alcançar resultados superiores ao já relatado, uma vez que a intensidade do efeito farmacológico é, em partes, diretamente proporcional a concentração do fármaco no local de ação desejado (DURÁN, MATTOSO, MORAIS., 2006).

5.3.8 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

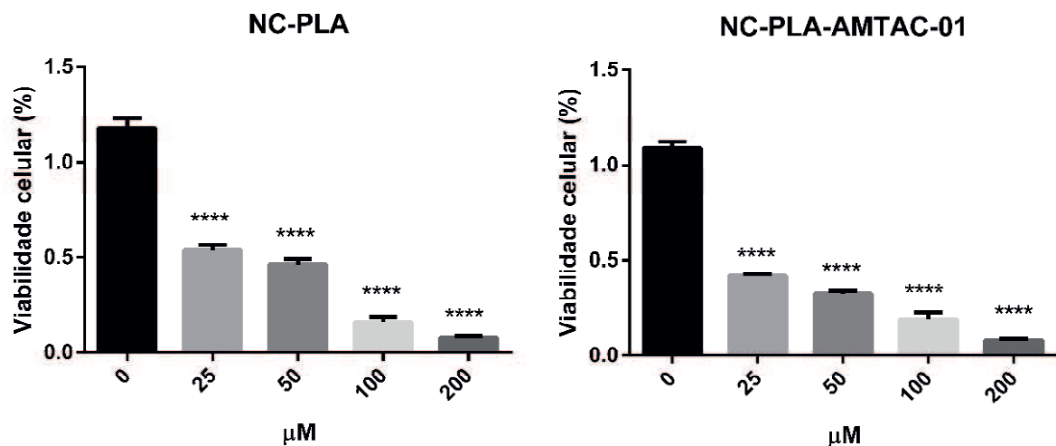
O resultado para avaliação da citotoxicidade do AMTAC-01 livre e dos sistemas brancos e encapsulados (NC-PLA/ NC-PLA-AMTAC-01/ NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01) estão apresentados na tabela 11. Os dados foram expressos em μM , pela média dos valores de $CI_{50} \pm$ desvio padrão (DP) de três experimentos em triplicata e foram obtidos utilizando curva de regressão não-linear.

Tabela 11: Valores de $IC_{50[\mu M]}$ para a o AMTAC-01 livre, NC-PLa, NC-PLA-AMTAC-01, NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01 em células HUVEC por 72 horas (ANOVA $p < 0,05$).

	AMTAC-01*	NC-PLA*	NC-PLA-AMTAC-01*	NE-PLA*	NE-PLA-AMTAC-01*
HUVEC	>200	24,50 ($\pm 3,81$)	15,61 ($\pm 3,65$)	>200	43,50 ($\pm 3,22$)

Figura 24: Viabilidade celular HUVEC após 72 horas de exposição ao AMTAC-01

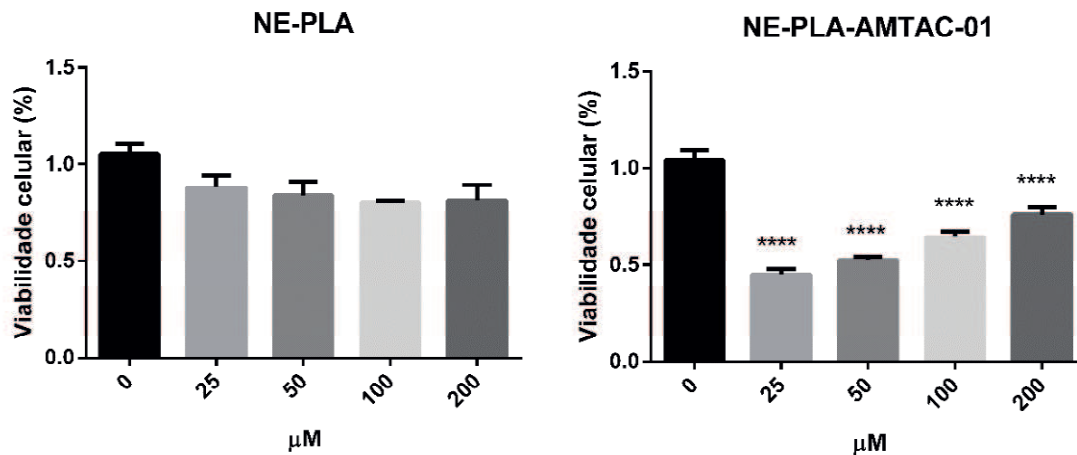
Podemos notar que a citotoxicidade do AMTAC-01 (fig. 25) foi dependente da concentração com notável redução em concentrações mais elevadas.

Figura 25: Viabilidade celular HUVEC após 72 horas de exposição a NC-PLA e NC-PLA-AMTAC-01

As nanocápsulas de PLA com e sem o AMTAC-01 (fig. 26) apresentaram redução significativa da viabilidade celular após 72 horas de exposição as células HUVEC. Esse resultado por ser explicado pela toxicidade do tensoativo pluronic. Foi relatado que os pluronic inibem diretamente as bombas de efluxo de fármacos e a glicoproteína P por incorporação nas membranas celulares e translocação nas células, influenciando a respiração celular, a síntese de ATP, transdução de sinais apoptótico e expressão gênica (MOHAMED et al., 2017; GAO et al., 2012). No trabalho de GAO et al., (2015) ao testar nanopartículas de PLGA contendo o sorafenibe, um agente antio-angiogênese utilizado no tratamento de hepatocarcinomas altamente vascularizados, revestidas com lipídeos CXCR4 em linhagens de células HUVEC. Os autores mostraram que as nanopartículas direcionadas com o lipídeos

conseguiram exercer o efeito citotóxico do fármaco em células de hepatocarcinoma e efeito anti-angiogênese em células HUVEC.

Figura 26: Viabilidade celular HUVEC após 72 horas de exposição a NE-PLA e NE-PLA-AMTAC-01



A viabilidade celular das HUVEC na presença das NE-PLA teve uma redução menos expressiva quando comparada a redução da viabilidade na presença da NE-PLA-AMTAC-01 (fig. 76). Isso pode ser explicado devido a biocompatibilidade do PLA (TYLER et al., 2016), enquanto que na presença do AMTAC-01 essa viabilidade sofre mudanças do seu perfil tóxico. A toxicidade das nanoesferas encapsuladas foi dependente da concentração em ordem contrária, quanto menor a concentração maior a toxicidade.

No trabalho de WANG e HO et al., (2010) foram desenvolvidas nanocápsulas de PLA com uma combinação de fármacos anticancerígeno (paclitaxel) e um agente de inibição de neovascularização (combrestatina A4) para o tratamento eficaz do câncer. Os autores mostraram que o tamanho pequeno das nanocápsulas (68 nm) foi eficiente para absorção das nanocapsulas pelas células 20 minutos após a incubação. O efeito da inibição da proliferação analisado em linhagens de células HUVEC foi observada já nas primeiras 24 horas.

Como já comentando em sessões anteriores, em tumores sólidos temos uma rápida proliferação celular e uma rápida angiogênese. Apesar da atividade anticancerígena já apresentada pelo AMTAC-01 conforme relatada no trabalho de ALMEIDA et al., (2016) ainda não sabemos se o derivado apresenta atividade anti-angiogênese. Embora tenha sido observada uma citotoxicidade *in vitro* apenas para as formulações encapsuladas quando comparada ao fármaco livre, as nanopartículas podem ter melhorado a entrega do fármaco ao

interior das células por mecanismos de endocitose, assim uma concentração maior do ativo no interior das células pode ter ocasionado uma maior inibição do crescimento celular das células com alta neovascularização HUVEC (BAREFORD, SWAAN., 2007).

Contudo, testes *in vitro* em outras linhagens de células normais são necessários, assim como testes *in vivo* para investigar os efeitos da exposição prolongadas das nanoesferas e nanocápsulas de PLA contendo AMTAC-01.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados e discutidos permitem afirmar que o derivado espiro-acridínico apresenta rota sintética de fácil obtenção com boa reprodutibilidade. A encapsulação do AMTAC-01 em nanoesferas e nanocapsulas de PLA permitiu conferir ao fármaco uma solubilidade aparente em meio aquoso, essencial para sua aplicação terapêutica.

Os métodos de obtenção e otimização empregados (nanoprecipitação e emulsão simples) foram satisfatórios, produzindo partículas com tamanho menor que 200 nm, distribuição estreita de tamanho e alta eficiência de encapsulação. As análises do estado físico das partículas (DRX, FT-IR e DSC/TG) revelaram que o derivado não interage com o polímero formando novas ligações e que o fármaco encontra-se disperso molecularmente na matriz polimérica ou aderido à superfície. Os ensaios de liberação *in vitro* indicaram que as nanocápsulas são capazes de prolongar a liberação do fármaco através de uma difusão Fickiana.

O ensaio de citotoxicidade das nanoesferas e nanocápsulas de PLA contendo o AMTAC-01 foram analisados em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) mostrando toxicidade dependente da dose, e maior toxicidade quando comparada ao fármaco livre. Esse resultado pode ser explicado por mecanismo de endocitose mais elevado para os sistemas nanoparticulados.

Desse modo a consolidar a obtenção das nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas) contendo o derivado espiro-acridínico com atividade anticancerígena, experimentos em linhagens de células de câncer de mama humano (MDA MB-231) estão em andamento.

7. REFERÊNCIAS

ABDEL HALIM, S. A.; SALAH, S. Development of nanoparticulate formulations for ocular delivery of prednisolone acetate: Preparation and characterization. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 24, n. 2, p. 159–165, 2014.

ALMEIDA, S. M. V. de; LAFAYETTE, E. A.; SILVA, W. L.; LIMA SERAFIM, V. de; MENEZES, T. M.; NEVES, J. L.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. de; MOURA, R. O. de; BELTRÃO, E. I. C.; CARVALHO JÚNIOR, L. B. de; LIMA, M. do C. A. de. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 467–475, 2016.

ALMEIDA, V. L. De; LEITÃO, A.; BARRETT, C.; ALBERTO, C.; LUIS, C. CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO Vera Lúcia de Almeida, Andrei Leitão, Luisa del Carmen Barrett Reina, Carlos Alberto Montanari e Claudio Luis Donnici*. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

ALTMeyer, C.; KARAM, T. K.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Tamoxifen-loaded poly(L-lactide) nanoparticles: development, characterization and in vitro evaluation of cytotoxicity. **Materials Science & Engineering C**, v. 60, p. 135–142, 2015.

ANTONIO, E.; ANTUNES, O. D. R. J.; DE ARAUJO, I. S.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Poly(lactic acid) nanoparticles loaded with ursolic acid: Characterization and in vitro evaluation of radical scavenging activity and cytotoxicity. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 71, p. 156–166, 2017.

ANTÔNIO, E.; ANTUNES, O. dos R.; DE ARAÚJO, I. S.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Poly(lactic acid) nanoparticles loaded with ursolic acid: Characterization and in vitro evaluation of radical scavenging activity and cytotoxicity. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 156–166, 2017.

ANTUNES, R.; ANTÔNIO, E.; MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M. Preparation , physicochemical characterization and antioxidant activity of diphenyl diselenide-loaded poly (lactic acid) nanoparticles. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 39, p. 176–185, 2017a.

ANTUNES, R.; ANTÔNIO, E.; MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology Preparation , physicochemical characterization and antioxidant activity of diphenyl diselenide-loaded poly (lactic acid) nanoparticles. v. 39, p.

176–185, 2017.

ATHANASIOU, K. A.; NIEDERAUER, G. G.; AGRAWAL, C. M. Biocompatibility and Clinical Applications of Polylactic Acid / Polyglycolic Acid Copolymers. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, 1996.

BALUK, P.; HASHIZUME, H.; M, D. M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 15, n. 1, p. 102–111, 2005.

BAR, J.; GOSS, G. D. Tumor vasculature as a therapeutic target in non-small cell lung cancer. **J Thorac Oncol**, v. 7, n. 3, p. 609–620, 2012.

BARROS, F. W. A.; BEZERRA, D. P.; FERREIRA, P. M. P.; CAVALCANTI, B. C.; SILVA, T. G.; PITTA, M. G. R.; DE LIMA, M. D. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. D. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; GUECHEVA, T. N.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, n. 1, p. 37–46, 2013.

BARWAL, I.; SOOD, A.; SHARMA, M.; SINGH, B.; YADAV, S. C. Development of stevioside Pluronic-F-68 copolymer based PLA-nanoparticles as an antidiabetic nanomedicine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 510–516, 2013.

BECK-BROICHSITTER, M. Stability-limit “Ouzo region” boundaries for poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 1, p. 262–266, 2016.

BECK-BROICHSITTER, M.; RYTTING, E.; LEBHARDT, T.; WANG, X.; KISSEL, T. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the “ouzo region” upon drug loading. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 244–253, 2010.

BELMONT, P.; BOSSON, J.; GODET, T.; TIANO, M. Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 139–169, 2007.

BHATTACHARJEE, S. Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not ? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BLASIAK, J.; GLOC, E.; DRZEWOSKI, J.; WOZNIAK, K.; ZADROZNY, M.; SKÓRSKI,

T.; PERTYNSKI, T. Free radical scavengers can differentially modulate the genotoxicity of amsacrine in normal and cancer cells. **Mutation research**, v. 535, n. 1, p. 25–34, fev. 2003.

BOUCK, N.; STELLMACH, V.; HSU, S. C. How Tumors Become Angiogenic. **Advances in Cancer Research**, v. 69, p. 135–174, 1996.

BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n. 2, p. 367–375, 2007.

BUTERA, G.; PACCHIANA, R.; DONADELLI, M. Autocrine mechanisms of cancer chemoresistance. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, p. 1-23, 2017.

CHOLEWIŃSKI, G.; DZIERZBICKA, K.; KOODZIEJCZYK, A. M. Natural and synthetic acridines / acridones as antitumor agents : their biological activities and methods of synthesis. **Pharmacological Reports**, p. 7–12, 2011.

CHORNY, M.; FISHBEIN, I.; DANENBERG, H. D.; GOLOMB, G. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: Effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. **Journal of Controlled Release**, v. 83, n. 3, p. 389–400, 2002.

CHRISTOPOULOS, P. F.; CORTHAY, A.; KOUTSILIERIS, M. Aiming for the Insulin-like Growth Factor-1 system in breast cancer therapeutics. **Cancer Treatment Reviews**. v.3, p. 79-95, 2018.

CHUACHAROEN, T.; SABLIOV, C. M. Stability and controlled release of lutein loaded in zein nanoparticles with and without lecithin and pluronic F127 surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 503, p. 11–18, 2016.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering C**, v.3, p. 771-784, 2017.

DALMOLIN, L. F.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Delivery of vanillin by poly (lactic-acid) nanoparticles : Development , characterization and in vitro evaluation of antioxidant activity. **Materials Science and Engineering C**, v. 62, p. 1–8, 2016.

DANHIER, F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine?. **Journal of Controlled Release**, v.244, p. 108-121, 2016.

DANHIER, F.; DANHIER, P.; DE SAEDELEER, C. J.; FRUYTIER, A. C.; SCHLEICH, N.; RIEUX, A. des; SONVEAUX, P.; GALLEZ, B.; PRÉAT, V. Paclitaxel-loaded micelles enhance transvascular permeability and retention of nanomedicines in tumors. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, n. 2, p. 399–407, 2015.

DANQUAH, M. K.; ZHANG, X. A.; MAHATO, R. I. Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2 v.63, n.8, p.623-639, 2011.

DI SIA, P. Nanotechnology Among Innovation, Health and Risks. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 237, p. 1076–1080, 2017.

DOROFEEV, G. A.; STRELETSKII, A. N.; POVSTUGAR, I. V.; PROTASOV, A. V.; ELSUKOV, E. P. Determination of nanoparticle sizes by X-ray diffraction. **Colloid Journal**, v. 74, n. 6, p. 675–685, 2012.

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

ENGLAND, C. G.; IM, H. J.; FENG, L.; CHEN, F.; GRAVES, S. A.; HERNANDEZ, R.; ORBAY, H.; XU, C.; CHO, S. Y.; NICKLES, R. J.; LIU, Z.; LEE, D. S.; CAI, W. Re-assessing the enhanced permeability and retention effect in peripheral arterial disease using radiolabeled long circulating nanoparticles. **Biomaterials**, v. 100, p. 101–109, 2016.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P. Effect of aqueous solubility of grafted moiety on the physicochemical properties of poly(d,l-lactide) (PLA) based nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, n. 1–2, p. 263–273, 2010.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 136–151, 2011.

FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.623, n. 1-2, p. 14-23, 2007.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.

FISCHER, B.; HEFFETER, P.; KRYEZIU, K.; GILLE, L.; MEIER, S. M.; BERGER, W.; KOWOL, C. R.; KEPPLER, B. K. Poly(lactic acid) nanoparticles of the lead anticancer ruthenium compound KP1019 and its surfactant-mediated activation. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 43, n. 3, p. 1096–104, 2014.

GALE, P. A. C.; H; PETER, R. Acridine: A versatile heterocyclic nucleus. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 69, n. 1, p. 3–9, 2012.

GARVEY, E. M.; SENIOR, D. A.; POCKAJ, B. A.; WASIF, N.; DUECK, A. C.; MCCULLOUGH, A. E.; OCAL, I. T.; GRAY, R. J. Rates of residual disease with close but negative margins in breast cancer surgery. **Breast**, v. 24, n. 4, p. 413–417, 2015.

GREISH, K. Enhanced permeability and retention effect for selective targeting of anticancer nanomedicine: Are we there yet? **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 9, n. 2, p. e161–e166, 1 jun. 2012.

GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, a R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, n. 1A, p. 205–209, 2009.

HARRINGTON, kevin J. The Biology of Cancer. p. 1–169, 2016.

HARSHA, S. N.; ALDHUBIAB, B. E.; NAIR, A. B.; ALHAIDER, I. A.; ATTIMARAD, M.; VENUGOPALA, K. N.; SRINIVASAN, S.; GANGADHAR, N.; ASIF, A. H. Nanoparticle formulation by Büchi b-90 nano spray dryer for oral mucoadhesion. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 273–282, 2015.

HASHIZUME, H.; BALUK, P.; MORIKAWA, S.; MCLEAN, J. W.; THURSTON, G.; ROBERGE, S.; JAIN, R. K.; MCDONALD, D. M. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 4, p. 1363–1380, 2000.

HICKEY, J. W.; SANTOS, J. L.; WILLIFORD, J. M.; MAO, H. Q. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 535–547, 2015.

HOYT, V. W.; MASON, E. Nanotechnology. Emerging health issues. **Journal of Chemical Health and Safety**, v. 15, n. 2, p. 10–15, 2008.

HU, Q.; GAO, X.; GU, G.; KANG, T.; TU, Y.; LIU, Z.; SONG, Q.; YAO, L.; PANG, Z.;

JIANG, X.; CHEN, H.; CHEN, J. Glioma therapy using tumor homing and penetrating peptide-functionalized PEG-PLA nanoparticles loaded with paclitaxel. **Biomaterials**, v. 34, n. 22, p. 5640–5650, 2013.

ISHIHARA, T.; TAKAHASHI, M.; HIGAKI, M.; MIZUSHIMA, Y.; MIZUSHIMA, T. Preparation and characterization of a nanoparticulate formulation composed of PEG-PLA and PLA as anti-inflammatory agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 170–175, 2010.

ISHIMOTO, O.; SUGAWARA, S.; INOUE, A.; MAEMONDO, M.; NUKIWA, T. Weekly irinotecan combined with carboplatin for patients with small-cell lung cancer: A phase I study. **Respiratory Investigation**, v. 53, n. 4, p. 156–160, 2015.

JÄGER, A.; JÄGER, E.; GIACOMELLI, F. C.; NALLET, F.; STEINHART, M.; PUTAUX, J. L.; KONEFAŁ, R.; SPĚVÁČEK, J.; ULBRICH, K.; ŠTĚPÁNEK, P. Structural changes on polymeric nanoparticles induced by hydrophobic drug entrapment. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 538, p. 238–249, 2018.

JAIN, A.; KUNDURU, K. R.; BASU, A.; MIZRAHI, B.; DOMB, A. J.; KHAN, W. Injectable formulations of poly(lactic acid) and its copolymers in clinical use. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 213–227, 2016.

JAIN, D. S.; ATHAWALE, R. B.; BAJAJ, A. N.; SHRIKHANDE, S. S.; GOEL, P. N.; NIKAM, Y.; GUDE, R. P. Poly lactic acid (PLA) nanoparticles sustain the cytotoxic action of temozolomide in C6 Glioma cells. **Biomedicine and Aging Pathology**, v. 3, n. 4, p. 201–208, 2013.

JANG, S. H.; WIENTJES, M. G.; LU, D.; AU, J. L. S. Drug delivery and transport to solid tumors. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 9, p. 1337–1350, 2003.

JOG, R.; BURGESS, D. J. Pharmaceutical Amorphous Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n.1, p. 39-65, 2017.

JUCZEWSKA, M.; CHYCZEWSKI, L. Angiogenesis in cancer. **Vascular Health and Risk Management**, v. 42, n. 3, p. 86–100, 2006.

KARAVELIDIS, V.; GILIOPOULOS, D.; KARAVAS, E.; BIKIARIS, D. Nanoencapsulation of a water soluble drug in biocompatible polyesters. Effect of polyesters melting point and glass transition temperature on drug release behavior. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 5, p. 636–643, 2010.

KESHARWANI, P.; GORAIN, B.; LOW, S. Y.; TAN, S. A.; LING, E. C. S.; LIM, Y. K.; CHIN, C. M.; LEE, P. Y.; LEE, C. M.; OOI, C. H.; CHOUDHURY, H.; PANDEY, M. Nanotechnology based approaches for anti-diabetic drugs delivery. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 136, p. 52-77, 2018.

LAN, J.; LI, H.; LUO, X.; HU, J.; WANG, G. BRG1 promotes VEGF-A expression and angiogenesis in human colorectal cancer cells. **Experimental Cell Research**, p. 1–7, 2017.
LEE, B. K.; YUN, Y.; PARK, K. PLA micro- and nano-particles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016.

LEPELTIER, E.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 71, p. 86-97, 2014.

LI, F.; ZHU, A.; SONG, X.; JI, L.; WANG, J. The internalization of fluorescence-labeled PLA nanoparticles by macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 2, p. 506–513, 2013.

LIU, Y.; ZHU, Y. H.; MAO, C. Q.; DOU, S.; SHEN, S.; TAN, Z. Bin; WANG, J. Triple negative breast cancer therapy with CDK1 siRNA delivered by cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 192, p. 114–121, 2014.

LU, J.; CHUAN, X.; ZHANG, H.; DAI, W.; WANG, X.; WANG, X.; ZHANG, Q. Free paclitaxel loaded PEGylated-paclitaxel nanoparticles: Preparation and comparison with other paclitaxel systems in vitro and in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1–2, p. 525–535, 2014.

MAEDA, H.; BHARATE, G. Y.; DARUWALLA, J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 409–419, 2009.

MAEDA, H.; MATSUMOTO, T.; KONNO, T.; IWAI, K.; UEDA, M. Tailor-making of protein drugs by polymer conjugation for tumor targeting: A brief review on smancs. **Journal of Protein Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 181–193, 1984.

MAEDA, H.; NOGUCHI, Y.; SATO, K.; AKAIKE, T. Enhanced Vascular Permeability in Solid Tumor Is Mediated by Nitric Oxide and Inhibited by Both New Nitric Oxide Scavenger and Nitric Oxide Synthase Inhibitor. **Japanese Journal of Cancer Research**, v.3, n.2, p. 181-193, 1994.

MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M.; GREMI??O, M. P. D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1–2, p. 266–271, 2010.

MARKOWSKA, A.; SAJDAK, S.; MARKOWSKA, J.; HUCZYŃSKI, A. Angiogenesis and cancer stem cells: New perspectives on therapy of ovarian cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 1–8, 2017.

MARTÍNEZ RIVAS, C. J.; TARHINI, M.; BADRI, W.; MILADI, K.; GREIGE-GERGES, H.; NAZARI, Q. A.; GALINDO RODRÍGUEZ, S. A.; ROMÁN, R. Á.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532, n.1, p. 66-81, 2017.

MATTOS, A. C.; ALTMAYER, C.; TOMINAGA, T. T.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Polymeric nanoparticles for oral delivery of 5- fluorouracil: Formulation optimization, cytotoxicity assay and pre-clinical pharmacokinetics study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, p. 83–91, 2016.

MEDEL, S.; SYROVA, Z.; KOVACIK, L.; HRDY, J.; HORNACEK, M.; JAGER, E.; HRUBY, M.; LUND, R.; CMARKO, D.; STEPANEK, P.; RASKA, I.; NYSTRÖM, B. Curcumin-bortezomib loaded polymeric nanoparticles for synergistic cancer therapy. **European Polymer Journal**, v. 93, p. 116–131, 2017.

MEUNIER, M.; GOUPIL, A.; LIENARD, P. Predicting drug loading in PLA-PEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1–2, p. 157–166, 2017.

MILADI, K.; SFAR, S.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to in vitro studies. **Industrial Crops and Products**, v. 72, p. 24–33, 2015.

MURRAY, L. J.; ROBINSON, M. H. Radiotherapy: Technical aspects. **Medicine (United Kingdom)**, v. 44, n. 1, p. 10–14, 2016.

MUSUMECI, T.; VENTURA, C. A.; GIANNONE, I.; RUOZI, B.; MONTENEGRO, L.; PIGNATELLO, R.; PUGLISI, G. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, n. 1–2, p. 172–179, 2006.

NAGAVARMA, B. V. N.; YADAV, H. K. S.; AYAZ, A.; VASUDHA, L. S.; SHIVAKUMAR, H. G. DIFFERENT TECHNIQUES FOR PREPARATION PREPARATION OF POLYMERIC NANOPARTICLES- A REVIEW. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 3, p. 16–23, 2012.

NAIKOO, N. A.; RASOOL, R.; SHAH, S.; AHANGAR, A. G.; SIDDIQI, M. A.; SHAH, Z. A. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF), its role in progression and prognosis of non-small cell lung carcinoma. **Cancer Genetics**, v. 216–217, p. 67–73, 2017.

NATFJI, A. A.; RAVISHANKAR, D.; OSBORN, H. M. I.; GRECO, F. Parameters Affecting the Enhanced Permeability and Retention Effect: The Need for Patient Selection. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 11, p. 3179–3187, 2017.

NGOUNE, R.; PETERS, A.; VON ELVERFELDT, D.; WINKLER, K.; PÜTZ, G. Accumulating nanoparticles by EPR: A route of no return. **Journal of Controlled Release**, v. 238, p. 58–70, 2016.

PADERA, T. P.; STOLL, B. R.; TOOREDMAN, J. B.; CAPEN, D.; TOMASO, E. di; JAIN, R. K. Pathology: Cancer cells compress intratumour vessels. **Nature**, v. 427, n. 6976, p. 695–695, 2004.

PANDEY, S. K.; GHOSH, S.; MAITI, P.; HALDAR, C. Therapeutic efficacy and toxicity of tamoxifen loaded PLA nanoparticles for breast cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 309–319, 2014.

PANDEY, S. K.; PATEL, D. K.; THAKUR, R.; MISHRA, D. P.; MAITI, P.; HALDAR, C. Anti-cancer evaluation of quercetin embedded PLA nanoparticles synthesized by emulsified nanoprecipitation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 521–529, 2015.

PEPTIDE, A.; ZHANG, W.; YANG, X.; SONG, J.; ZHENG, X.; CHEN, J.; MA, P.; ZHANG, B.; WANG, R. Pharmaceutical Engineering — Article Conjugation with Acridines Turns Nuclear Localization Sequence into Highly Active. **Engineering**, v. 1, n. 4, p. 500–505, 2015.

PIACENTINI, A. B.; MENEZES, H. Recentes Aspectos Sobre a Biologia Do Latest Aspects on the Biology of Cancer and Metastases. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 3, p. 593–604, 2012.

POLK, A.; SVANE, I. M.; ANDERSSON, M.; NIELSEN, D. Checkpoint inhibitors in breast cancer – Current status. **Cancer Treatment Reviews**. v.63, p. 122-134, 2018.

PRABHAKAR, U.; MAEDA, H.; K. JAIN, R.; SEVICK-MURACA, E. M.; ZAMBONI, W.; FAROKHZAD, O. C.; BARRY, S. T.; GABIZON, A.; GRODZINSKI, P.; BLAKEY, D. C. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. **Cancer Research**, v. 73, n. 8, p. 2412–2417, 2013.

PRABHU, R. H., PATRAVALE, V. B., & JOSHI, M. D. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology : current insights. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1001–1018, 2015.

RACHMAWATI, H.; YANDA, Y. L.; RAHMA, A.; MASE, N. Curcumin-loaded PLA nanoparticles: Formulation and physical evaluation. **Scientia Pharmaceutica**, v. 84, n. 1, p. 191–202, 2016.

RAMOT, Y.; HAIM-ZADA, M.; DOMB, A. J.; NYSKA, A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 153- 162, 2016.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

RAY, K. J.; SIBSON, N. R.; KILTIE, A. E. Treatment of Breast and Prostate Cancer by Hypofractionated Radiotherapy: Potential Risks and Benefits. **Clinical Oncology**, v. 27, n. 7, p. 420–426, 2015.

RESCIFINA, A.; ZAGNI, C.; VARRICA, M. G.; PISTARÀ, V.; CORSARO, A. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 95-115, 2014.

ROUSSAKI, M.; GAITANAROU, A.; DIAMANTI, P. C.; VOUYIOUKA, S.; PAPASPYRIDES, C.; KEFALAS, P.; DETSI, A. Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles. **Polymer Degradation and Stability**, v. 108, p. 182–187, 2014.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n.2, p. 85-99, 2014.

SAINI, P.; ARORA, M.; KUMAR, M. N. V. R. Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 47-59, 2016.

SANGTANI, A.; NAG, O. K.; FIELD, L. D.; BREGER, J. C.; DELEHANTY, J. B. Multifunctional nanoparticle composites: progress in the use of soft and hard nanoparticles for drug delivery and imaging. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, 2017.

SARATH K.YANDRAPU, ARUN K. UPADHYAY, J. MARK PETRASH, and U. B. K. Nanoparticles in Porous Microparticles Prepared by Supercritical Infusion and Pressure

Quench Technology for Sustained Delivery of Bevacizumab. **Molecular pharmaceutical**, v. 10, n. 12, p. 4676–4686, 2014.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 9, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanopartículas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99–106, 2002.

SHEN, S.; DU, X. J.; LIU, J.; SUN, R.; ZHU, Y. H.; WANG, J. Delivery of bortezomib with nanoparticles for basal-like triple-negative breast cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 208, p. 14–24, 2015.

SIEMANN, D. W. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. **Cancer Treatment Reviews**, v. 153, p. 107–124, 2011.

SIEMANN, D. W.; HORSMAN, M. R. Modulation of the tumor vasculature and oxygenation to improve therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 153, p. 107–124, 2015.

SONG, W.; MUSETTI, S. N.; HUANG, L. Nanomaterials for Cancer Immunotherapy. **Biomaterials**, v. 148, p. 16–30, 2017.

SOUIBGUI, A.; GAUCHER, A.; MARROT, J.; BOURDREUX, F.; ALOUI, F.; BEN HASSINE, B.; PRIM, D. New series of acridines and phenanthrolines: Synthesis and characterization. **Tetrahedron**, v. 70, n. 18, p. 3042–3048, 2014.

SOUTO, E. B.; GENÓMICA, C. De; TRÁS-OS-MONTES, U. De; DOURO, A.; BIOTECNOLÓGICOS, D. D. P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de polímeros pré-formados - Parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101–106, 2012.

TANG, X.; LIANG, Y.; FENG, X.; ZHANG, R.; JIN, X.; SUN, L. Co-delivery of docetaxel and Poloxamer 235 by PLGA-TPGS nanoparticles for breast cancer treatment. **Materials Science and Engineering C**, v. 49, p. 348–355, 2015.

TYLER, B.; GULLOTTI, D.; MANGRAVITI, A.; UTSUKI, T.; BREM, H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications[white star]. **Adv Drug Deliv**

Rev, v. 107, p. 163–175, 2016.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025–1058, 2009.

VILKOVA, M.; PROKAIOVA, M.; IMRICH, J. Spontaneous cyclization of (acridin-9-ylmethyl) thioureas to spiro of acridine spirocycles. **Tetrahedron**, v. 70, p. 944–961, 2014.

WACHSMANN, P.; LAMPRECHT, A. Ethylcellulose nanoparticles with bimodal size distribution as precursors for the production of very small nanoparticles. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 7, p. 1165–1171, 2015.

WANG, W.; CHEN, S.; ZHANG, L.; WU, X.; WANG, J.; CHEN, J.; LE, Y. Poly (lactic acid)/ chitosan hybrid nanoparticles for controlled release of anticancer drug. **Materials Science and Engineering C**, v. 46, p. 514–520, 2015.

WUJCIK, D. Science and mechanism of action of targeted therapies in cancer treatment. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 30, n. 3, p. 139–146, 2014.

YOO, B. C.; KIM, K.-H.; WOO, S. M.; MYUNG, J. K. Clinical multi-omics strategies for the effective cancer management. **Journal of Proteomics**, 2017.

YOUSHA, J.; ALI, M. E.; LAMPRECHT, A. Artificial neural network based particle size prediction of polymeric nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 119, p. 333–342, 2017.

ZEALAND, N.; HOSPITAL, M. V. OXIDATIVE METABOLISM OF AMSA RINE BY THE NEUTROPHIL ENZYME MYELOPEROXIDASE Cl-9Zf. **Biochemicd Pharmacology**, v. 44, n. 9, p. 1731–1738, 1992.

ZHOU, Z.; KENNELL, C.; JAFARI, M.; LEE, J. Y.; RUIZ-TORRES, S. J.; WALTZ, S. E.; LEE, J. H. Sequential delivery of erlotinib and doxorubicin for enhanced triple negative Breast cancer treatment using polymeric nanoparticle. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 530, n. 1–2, p. 300–307, 2017.

APÊNDICE

APÊNDICE I

- Varredura espectral entre 200-800 nm para análise do comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$)

Figura 1: Varredura espectral do AMTAC-01 em acetonitrila (1mg/mL)

