

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Paulo Guilherme Schimites

**DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO QUERCETINA OU CRISINA E
AVALIAÇÃO BIOLÓGICA EM CÉLULAS B16F10 E
EM MODELO DE MELANOMA *in vivo***

Santa Maria, RS
2020

Paulo Guilherme Schimites

**DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO QUERCETINA OU CRISINA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA EM
CÉLULAS B16F10 E EM MODELO DE MELANOMA *in vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Scheila Rezende Schaffazick

Santa Maria, RS
2020

Schimites, Paulo Guilherme
DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO QUERCETINA OU CRISINA E AVALIAÇÃO
BIOLÓGICA EM CÉLULAS B16F10 E EM MODELO DE MELANOMA in
vivo / Paulo Guilherme Schimites.- 2020.
88 p.; 30 cm

Orientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coorientadora: Scheila Rezende Schaffazick
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2020

1. Melanoma 2. Crisina 3. Quercetina 4. Adenosina 5.
Adenosina desaminase I. Leal, Daniela Bitencourt Rosa
II. Schaffazick, Scheila Rezende III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, PAULO GUILHERME SCHIMITES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Paulo Guilherme Schimites

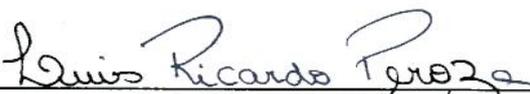
**DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO QUERCETINA OU CRISINA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA EM
CÉLULAS B16F10 E EM MODELO DE MELANOMA *in vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

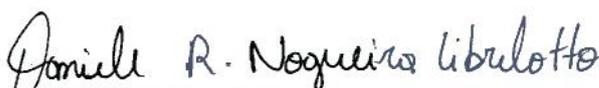
Aprovado em 24 de janeiro de 2020:



Scheila Rezende Schaffazick, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Coorientadora)



Luis Ricardo Peroza, Dr. (UFN)



Daniele Rubert Nogueira Librelotto, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

DEDICATÓRIA

Às minhas avós Nelcinda Müller Rübenich e Dóris Pettine Schimites, que infelizmente não estão mais conosco, mas que estariam muito contentes em poder comemorar mais uma conquista de um de seus netos.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos vão para todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que *esta dissertação fosse escrita. Meu muito obrigado:*

- à *Universidade Federal de Santa Maria, onde estudo desde 2004, pela oportunidade de cursar o Mestrado em Ciências Farmacêuticas concomitantemente ao desempenho de minhas atividades como servidor;*

- ao *Departamento de Microbiologia e Parasitologia pelo meu afastamento parcial do trabalho para cursar o mestrado, de Julho de 2018 a Outubro de 2018;*

- à *minha orientadora, Profa. Dra. Daniela, pela orientação, pela paciência e pelo suporte durante o final da graduação em Farmácia e durante o mestrado. Muito obrigado pela oportunidade e pela amizade.*

- à *minha coorientadora, Profa. Dra. Scheila, pela coorientação, pelo carinho, pelas conversas e desabafos, e por toda ajuda durante esse período que foi tão difícil. Muito obrigado pela confiança, paciência e especialmente por ser tão solícita comigo.*

- à *minha mãe Ivanir, que me acompanhou durante todo esse período, mas especialmente por estar comigo durante praticamente todo o experimento in vivo. Não foram dias e noites fáceis e não sei como eu poderia ter conseguido sem a tua ajuda, suporte, carinho e incentivo. Muito obrigado por dividir toda aquela angústia comigo e por tornar tudo um pouco mais fácil e suportável. Te desejo muita saúde e felicidades! Te amo, mãe!*

- aos *meus familiares, que sempre nos deram bons exemplos e que nos mostraram o caminho. Caminho esse que estamos percorrendo juntos. Agradeço especialmente à minha irmã Paula pelas conversas e suporte; ao meu pai Paulo pela torcida e confiança; às minhas tias Rosimar e Velcir pelo apoio e carinho que sempre me deram. Muito obrigado a todos os demais familiares.*

- aos *meu colegas e amigos do LABIBIO, Daniela, Pedro, Viviane, Patrícia, Renata, Fernanda, Alessandra, Jean, João, Matheus, Renan, Mauren e Enzo. Não tenho palavras para agradecer a ajuda, a atenção, os desabafos, os momentos de descontração e a paciência. Muito obrigado, pessoal. Vocês são demais!*

- aos *colegas e amigos do LABTEC, em especial a Maria, Camila, Victória, Charlene, Marci, Jéssica, Laura, July, Igor e Vinícius. Obrigado pela ajuda e pela companhia durante os experimentos. Vocês são muito queridos e tenho muitas saudades da nossa convivência!*

- às funcionárias do CCS, Mírian e Cléia, por me ajudarem com o acesso ao prédio 26 todos os sábados em que tive que ir ao CCS para realizar análises no HPLC. Obrigado também aos colegas Ritiel, Rafaela, Rose e Maria pela ajuda e também pelas conversas e torcida.

- à Universidade Franciscana (UFN), e aos colegas pesquisadores da UFN, Altevir e Profa. Dra. Luciana. Obrigado pela oportunidade de trabalhar com vocês, de conhecer a UFN e de aprender sobre cultivo celular. Muito obrigado pela ajuda, pela atenção, pela paciência e por serem tão solícitos! Sucesso para seu grupo!

- aos meus bons e velhos amigos, Andrewis, Kelley, Bernardo, Évelin, Tássia, Deise, Sandra, Arthur, Verinha, Ricardo, Juliane, Ana, Mariana, Mahira, Sophia, Pauline, Natieli e Nathaly. Obrigado por toda a torcida, energias positivas e apoio. Prometo ser um amigo mais presente! É sempre muito bom estar com vocês!

- aos meus amigos distantes Bruno, Henrique, Tainá, Garcia e Daniel, por todas as conversas, risos, momentos de descontração, papos cabeça e por fazerem as coisas ficarem um pouco mais leves e fáceis de suportar. Adoro vocês todos!

Por último, gostaria de agradecer à Clarice (UAP-CCS) e à Karen (Médica) por toda ajuda e suporte. Vocês são excelentes profissionais. Muito obrigado!

*“What happens to our dreams when we realize they're never going to come true?
- They turn into nightmares.”*

(Jessica Jones)

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO QUERCETINA OU CRISINA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA EM CÉLULAS B16F10 E EM MODELO DE MELANOMA *in vivo*

AUTOR: Paulo Guilherme Schimites

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Daniela Bitencourt Rosa Leal

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Scheila Rezende Schaffazick

Estudos demonstram que o processo inflamatório tem um papel relevante no desenvolvimento do melanoma cutâneo, sendo crítica a resposta imune, que atua de modo a controlar o desenvolvimento dessa patologia e de forma a prevenir que esta se torne mais agressiva. Apesar de haver um crescente número de estudos envolvendo o sistema purinérgico e o câncer, ainda não há uma compreensão completa a respeito do potencial terapêutico do sistema purinérgico no melanoma cutâneo. O sistema purinérgico, que é constituído por enzimas, como a adenosina desaminase (ADA), receptores ancorados à membrana celular, além de moléculas sinalizadoras como a adenosina (ADO), tem um papel fundamental na orquestra de eventos envolvidos na modulação do padrão de resposta imune. Os flavonoides são compostos naturais com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais importantes, e dentre esses compostos estão a quercetina e a crisina. Nesta pesquisa, foram desenvolvidas suspensões de nanocápsulas de Eudragit[®] RS100 contendo crisina ou quercetina, as quais apresentaram características físico-químicas adequadas para sistemas coloidais como tamanho de partículas (582 ± 54 nm; 568 ± 58 nm, respectivamente), com homogeneidade de distribuição de tamanho de partículas, teor total próximo ao valor teórico e elevada eficiência de encapsulamento, além de estabilidade por 14 dias de armazenamento. As suspensões foram avaliadas em ensaios de atividade antitumoral/citotóxica *in vitro*, tendo apresentado diminuição da viabilidade de células de melanoma (B16F10) em relação ao controle, em diferentes concentrações de crisina ou quercetina. Verificou-se também que as suspensões de nanocápsulas, contendo ou não os flavonoides, apresentaram diminuição da viabilidade de células não tumorais (macrófagos murinos; RAW 264.7), sendo que as nanoestruturas contendo crisina tenderam a um efeito citoprotetor. Após os testes *in vitro*, empregou-se as formulações em modelo animal (camundongos C57BL/6) de melanoma cutâneo induzido, através da inoculação subcutânea dorsal de suspensão de células B16F10. Investigou-se a atividade da ADA no soro dos camundongos, que desenvolveram o tumor e dos animais controles, que receberam por 14 dias tratamento (via oral) com as suspensões de nanocápsulas desenvolvidas e com quercetina ou crisina não encapsuladas (7,5 mg/kg). Os camundongos com tumor apresentaram atividades mais elevadas e a suspensão de nanocápsulas contendo crisina foi capaz de aumentar a atividade da ADA, na tentativa de diminuição dos níveis extracelulares de ADO, a qual pode facilitar o desenvolvimento, infiltração e metástase do tumor. Com isso, as formulações com quercetina ou crisina desenvolvidas apresentaram atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* que corroboram com a literatura científica sobre as propriedades antitumorais de flavonoides e sobre como essas propriedades podem ser favorecidas pelo aumento da biodisponibilidade dos compostos através da incorporação dessas substâncias em nanocarreadores.

Palavras-chave: melanoma, crisina, quercetina, adenosina e adenosina desaminase.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF POLYMERIC NANOCAPSULE SUSPENSIONS CONTAINING QUERCETIN OR CHRYSIN AND ITS BIOLOGICAL EVALUATION EMPLOYING B16F10 CELLS AND *in vivo* MODEL OF MELANOMA

AUTHOR: Paulo Guilherme Schimites
ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Daniela Bitencourt Rosa Leal
CO-ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Scheila Rezende Schaffazick

Studies have shown that the inflammatory process plays a relevant role in the development of cutaneous melanoma, moment when the immune response is critical, operating to control the development of this pathology and to prevent it from becoming more aggressive. Despite the fact that there is a growing number of studies involving the purinergic system and cancer, there is lack of information about the therapeutic potential of the purinergic system in cutaneous melanoma. Composed by enzymes such as adenosine deaminase (ADA), cell membrane anchored receptors and signaling molecules such as adenosine (ADO), the purinergic system plays a key role in orchestrating events involved in modulating the immune response pattern. Flavonoids, such as chrysin and quercetin, are natural compounds with important anti-inflammatory, antioxidant and anti-tumor properties. In this research, Eudragit[®] RS100 nanocapsule suspensions containing chrysin or quercetin were developed and showed adequate physicochemical characteristics for colloidal systems such as particle size (582 ± 54 nm; 568 ± 58 nm, respectively), homogeneity of size distribution, total content approximated to the theoretical value, high encapsulation efficiency, and stable up to 14 days of storage. These suspensions were evaluated by *in vitro* anti-tumor/cytotoxic activity assays and showed decreased viability of B16F10 melanoma cells compared to control at different concentrations of chrysin or quercetin. It was also found that suspensions of nanocapsules, containing or not flavonoids, showed decreased viability of non-tumor cells (murine macrophages; RAW 264.7), however, the nanostructures containing chrysin tended to a cytoprotective effect. After *in vitro* tests, suspensions were used in an animal model of cutaneous melanoma (C57BL/6 mices) induced through subcutaneous inoculation of B16F10 cell suspension. ADA activity was measured in serum of mices, which developed the tumor and the control animals, after receiving 14-day of oral treatment with the developed nanocapsule suspensions and unencapsulated chrysin and quercetin (7.5 mg/kg). Mices who developed the tumor showed higher ADA activity and suspension of chrysin nanocapsules was able to increase even more ADA activity in an attempt to decrease ADO extracellular levels, since ADO may facilitate tumor development, infiltration and metastasis. Thus, the suspensions developed presented *in vitro* and *in vivo* biological activities that corroborate the scientific literature about the potential anti-tumor properties of flavonoids and how these properties can be favored by increasing the bioavailability of these compounds through the incorporation of these substances in nanocarriers.

Keywords: melanoma, chrysin, quercetin, adenosine and adenosine deaminase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação de alguns componentes do Sistema Purinérgico.....	22
Figura 2 - Estrutura química da molécula de quercetina.....	23
Figura 3 - Estrutura química da molécula de crisina.....	25
Figura 4 - Representação da estrutura química do monômero de Eudragit® RS100.	29
Figura 5 - Estrutura química do monômero formador do PVA.....	31
Figura 6 - Representação simplificada da estrutura dos ácidos cáprico e caprílico, respectivamente.....	32
Figura 7 - Linha do tempo do experimento animal.....	37
Figura 8 – Esquema do processo de produção das suspensões de nanocápsulas.....	39
Figura 9 – Ilustração do processamento das amostras para determinação da EE%.....	43
Figura 10 – Ilustração da indução do melanoma na região dorsal dos animais.....	45
Figura 11 - Aspecto macroscópico das suspensões de nanocápsulas de Eudragit® RS100 desenvolvidas (NCQ, NCC e NCB, respectivamente).....	47
Figura 12 - Gráficos demonstrando o comportamento das suspensões de nanocápsulas contendo flavonoides em função da concentração de PVA (A e C : diâmetro médio relativo a volume D[4:3] para NCQ e NCC, respectivamente; B e D : valores de span para NCQ e NCC, respectivamente). A linha em A e C indica o limite máximo ideal para o parâmetro.....	48
Figura 13 - Comparação entre cromatogramas das nanocápsulas brancas (A e B) e das nanocápsulas de crisina (C) e quercetina (D) analisados pelos seus respectivos métodos.....	52
Figura 14 - Curvas analíticas dos métodos para quantificação de crisina (A) e quercetina (B).....	53
Figura 15 - Gráficos de distribuição de tamanho de partículas fornecidos pelo Mastersizer® para as suspensões de nanocápsulas contendo ou não flavonoide (A : NCB; B : NCC; C : NCQ).....	57
Figura 16 - Valores de pH das formulações nos ensaios de estabilidade até duas semanas.....	59
Figura 17 - Valores de potencial zeta para as formulações até duas semanas.....	59

Figura 18 - Tamanho médio de partículas (nanômetros) das suspensões de nanocápsulas analisadas por espalhamento de luz dinâmico. A linha pontilhada indica o limite da faixa nanométrica.	60
Figura 19 - Distribuição de tamanho por análise de espalhamento de luz dinâmico. A linha pontilhada indica o valor limite considerado ideal para o parâmetro.	61
Figura 20 - Tamanho médio de partículas (micrômetros) das suspensões de nanocápsulas analisadas por difração a laser no 14º dia. A linha pontilhada indica o limite da faixa nanométrica.	61
Figura 21 - Distribuição de tamanho por análise de difração a laser. A linha pontilhada indica o valor limite considerado ideal para o parâmetro.	62
Figura 22 - Teores das suspensões de nanocápsulas durante os ensaios de estabilidade.	62
Figura 23 - Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> das suspensões de nanocápsulas em cultura de células de macrófagos murinos (RAW 264.7).	63
Figura 24 - Avaliação de potencial atividade antitumoral (B16F10) das suspensões de nanocápsulas sem flavonoide (NCB) em relação ao controle, após 24 e 48 h de incubação.	64
Figura 25 - Comparação entre as nanocápsulas sem flavonoides e com esses encapsulados em relação à citotoxicidade para células B16F10, relativa a diferentes concentrações dos princípios ativos.	65
Figura 26 - Avaliação de potencial atividade citotóxica das suspensões de nanocápsulas de crisina (NCC) em células B16F10, após 24 e 48 h de incubação, comparativamente ao flavonoide livre (CL).	67
Figura 27 - Avaliação de potencial atividade citotóxica das suspensões de nanocápsulas de quercetina (NCQ) em células B16F10, após 24 e 48 h de incubação, comparativamente ao flavonoide livre (QL).	67
Figura 28 - Representação do tumor (melanoma) na região dorsal.	68
Figura 29 - Variação do peso dos tumores desenvolvidos pelos camundongos.	68
Figura 30 - Distribuição dos animais induzidos e não induzidos (que desenvolveram o melanoma e aqueles que não desenvolveram ou evoluíram para óbito).	69
Figura 31 - Fotografia de um tumor de tamanho moderado (em torno de 2,5 g; A) e de um tumor maior e com aspecto diferente do primeiro (em torno de 4,0 g;	

B). Em C um dos animais que desenvolveram tumor mas que evoluíram para óbito antes dos 14 dias de tratamento.	69
Figura 32 - Representação da administração de cisplatina via intraperitoneal, alteração do comportamento e evolução para óbito.	70
Figura 33 - Fotografia do estômago de um dos animais tratados com cisplatina, e que evoluiu para óbito. Na necropsia dos animais era constatada estase gástrica e retenção de alimento.	70
Figura 34 - Atividade da ADA em soro de camundongos C57BL6, com e sem melanoma induzido, tratados com as suspensões de nanocápsulas ou com os flavonoides não encapsulados.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição quali-quantitativa das suspensões de nanocápsulas para a preparação de 25 mL de formulação.....	39
Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos empregados nas análises de teor e de eficiência de encapsulamento das suspensões de nanocápsulas contendo crisina e quercetina.	41
Tabela 3 - Resultados dos testes de precisão para a quantificação de crisina em NCC.	53
Tabela 4 - Resultados dos testes de precisão para quantificar quercetina em NCQ.	54
Tabela 5 - Ensaio de exatidão para a quantificação dos flavonoides nas suspensões de nanocápsulas.	54
Tabela 6 - Valores de pH e potencial zeta das suspensões de nanocápsulas.....	55
Tabela 7 - Parâmetros de tamanho e distribuição de tamanho das suspensões de nanocápsulas.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ADA	Adenosina desaminase
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
C57BL/6	Linhagem de camundongos (<i>Black</i>)
CD 39	Trifosfato de ectonucleosídeo difosfo-hidrolase-1
CD 73	Ecto-5'-nucleotidase
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CLAE/UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-vis
DAD	<i>Diode array detector</i>
DMEM	<i>Dulbecco modified of Minimum Essential Media</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Eficiência de Encapsulamento
E-NTPDase	Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
HeLa	Linhagem celular de câncer cervical humano
KBU2046	4'-fluoroisoflavanona
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama (Michigan Cancer Foundation)
MeOH	Álcool metílico
MTT	Ensaio de avaliação da viabilidade celular empregando 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo
NaMoS	Morina-7-sulfato de sódio
NC	Suspensão de Nanocápsulas
NCB	Suspensão de Nanocápsulas brancas (sem composto ativo)
NCC	Suspensão de Nanocápsulas contendo crisina
NCQ	Suspensão de Nanocápsulas contendo quercetina
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PdI	<i>Polydispersity index</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PVA	Álcool polivinílico
RAW 264.7	Linhagem celular de macrófago murino
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640</i>
SK-MEL-28	Linhagem celular de melanoma humano
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
UV	Radiação ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
ZP	<i>Zeta potential</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo geral	17
1.1.2 Objetivos específicos	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 MELANOMA.....	18
2.2 CÉLULAS B16F10 E MODELOS EXPERIMENTAIS DE MELANOMA <i>IN VIVO</i>	19
2.3 SISTEMA PURINÉRGICO NA INFLAMAÇÃO E CÂNCER	20
2.2.1 Adenosina desaminase	21
2.4 FLAVONOIDES.....	23
2.4.1 Quercetina	23
2.4.2 Crisina.....	25
2.4.3 Moléculas sintetizadas com estrutura baseada em flavonoides	26
2.4.4 Flavonoides e carreadores nanoestruturados	27
2.5 NANOPARTÍCULAS CARREADORAS DE FÁRMACOS	27
2.5.1 Eudragit RS® 100.....	29
2.5.2 Álcool Polivinílico (PVA)	30
2.5.3 Triglicerídeos de cadeia média (TCM).....	32
2.5.4 Avaliação da toxicidade de sistemas nanocarreadores	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 MATERIAL	34
3.1.1 Matérias-Primas	34
3.1.2 Solventes e outros materiais	34
3.1.3 Equipamentos	35
3.2 MÉTODOS	36
3.2.1 Desenho experimental.....	36
3.2.2 Preparação das suspensões de nanocápsulas.....	38
3.2.3 Métodos analíticos e validação da metodologia	40
3.2.4 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas.....	41
3.2.6 Ensaio <i>in vitro</i> empregando as suspensões de nanocápsulas	44
3.2.7 Modelo experimental <i>in vivo</i> de melanoma murino	45
3.2.8 Atividade enzimática da adenosina desaminase (ADA) em soro	46
3.2.9 Análise estatística.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 DESENVOLVIMENTO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS	47

4.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	50
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	54
4.3.1 pH e potencial zeta	54
4.3.2 Tamanho médio de partícula e distribuição de tamanho	56
4.3.3 Teor dos flavonoides e eficiência de encapsulamento (EE%)	58
4.4 ESTABILIDADE	58
4.4.1 Aspectos macroscópicos	58
4.4.2 pH e potencial zeta	58
4.4.3 Tamanho médio de partículas e distribuição de tamanho	60
4.4.4 Teor dos flavonoides.....	62
4.5 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> EMPREGANDO AS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS.....	62
4.5.1 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> com células RAW 264.7	63
4.5.2 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> contra células B16F10	64
4.6 MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> DE MELANOMA HUMANO.....	68
4.6.1 Indução de melanoma nos camundongos	68
4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ADENOSINA DESAMINASE (ADA) EM SORO	71
5 CONCLUSÃO	74
6 REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA - UFSM.....	87

1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é um câncer agressivo que se desenvolve a partir dos melanócitos e que tem relação direta com a exposição da pele aos raios ultravioletas (UV) (VEIEROD *et al.*, 2003). Um grande problema relacionado ao desenvolvimento do melanoma cutâneo é o seu potencial metastático para o resto do corpo, tornando-se praticamente incurável (XING *et al.*, 2010). O número de casos de melanoma vem aumentando, de acordo com a *American Cancer Society*, e esse número varia de acordo com a idade dos pacientes, sendo que pessoas mais velhas apresentam maior propensão ao desenvolvimento desse tumor maligno (ACS, 2018).

No Brasil, para o período de 2020 a 2022, o número estimado de novos casos diagnosticados é de aproximadamente 8.500, com uma incidência média de 4 casos para cada 100 mil habitantes e dos quais a provável distribuição de acordo com o sexo será de 50% para homens e 50% para mulheres. Ainda, a Região Sul do Brasil é a que apresenta o maior número de casos de câncer de pele melanoma em comparação com outras regiões do país (INCA, 2018), o que se explica em razão de apresentar 75% da população declarada branca (maior porcentagem entre as regiões), conforme o IBGE (IBGE, 2018).

A resposta imune, de uma maneira geral, atua na tentativa de prevenir o desenvolvimento do melanoma enquanto a radiação UV induz imunossupressão e a progressão do tumor (MARGOLIN, 2014). O sistema purinérgico modula a resposta imune através de suas enzimas, nucleotídeos, nucleosídeo e receptores, sendo que esses receptores também são expressos nas células de melanoma (BURNSTOCK; VIRGILIO, 2013; WHITE *et al.*, 2009) e os nucleotídeos extracelulares apresentam ação antitumoral em alguns tipos de câncer (BURNSTOCK; VIRGILIO, 2013).

Uma das enzimas que pertencem ao sistema purinérgico é a adenosina desaminase (ADA), que controla os níveis extracelulares do nucleotídeo de adenina, a adenosina (ADO) (SACHDEVA; GUPTA, 2013; YEGUTKIN, 2008). A adenosina é uma molécula que apresenta importantes atividades biológicas, dentre elas vasodilatadora, de promoção da angiogênese e da diminuição da resposta imune celular (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017; OHTA *et al.*, 2006; SPYCHALA, 2000). Sendo assim, o aumento dos níveis extracelulares de adenosina pode levar a uma condição favorável ao desenvolvimento de um tumor, como o melanoma, ao passo que a regulação da concentração desse nucleosídeo, por meio da atividade da enzima

adenosina desaminase, pode contribuir com a diminuição das condições favoráveis à instalação, progressão e disseminação do tumor (RABINOVICH; GABRILOVICH; SOTOMAYOR, 2007; ZHANG, 2012).

Estudos demonstram que produtos naturais, como os flavonoides quercetina e crisina, apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas atividade antioxidante, anti-inflamatória e inclusive atividade antitumoral (CHINEMBIRI *et al.*, 2014). Embora haja uma variedade de estudos relatando o efeito da quercetina e da crisina na prevenção e no tratamento do câncer (JUNG *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2017; MEN *et al.*, 2014; TAGHIPOUR *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2005), é importante ressaltar que estes flavonoides apresentam uma baixa solubilidade em água e conseqüente baixa biodisponibilidade, o que limita o seu uso clínico no tratamento do câncer. Portanto, para melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade da quercetina e da crisina, algumas alternativas têm sido aplicadas. Dentre essas alternativas estão as alterações moleculares ou a utilização de sistemas de liberação de substâncias ativas, tais como complexos de inclusão, lipossomas, nanopartículas ou micelas, que proporcionam uma maior solubilidade aparente e biodisponibilidade (CAI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016; MEN *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2018). Considerando estes sistemas, é possível destacar as nanocápsulas poliméricas (LORENZONI, 2015; SOUSA-BATISTA *et al.*, 2017; WEISS-ANGELI *et al.*, 2012), as quais são capazes de controlar a liberação do composto ativo, permitindo que a mesma seja prolongada (FONTANA *et al.*, 2009; MARCHIORI *et al.*, 2010), bem como podem proporcionar melhoria na eficiência dos compostos associados, como já relatado para a quercetina e a crisina (LORENZONI, 2015; SOUSA-BATISTA *et al.*, 2017).

Portanto, tendo em vista que o mecanismo molecular do melanoma cutâneo ainda não está completamente elucidado, é importante estudar a participação do sistema purinérgico no desenvolvimento do melanoma, por este sistema estar intimamente ligado à modulação do padrão de resposta imune, com a finalidade de prover uma melhor compreensão sobre as possíveis alterações que ocorrem nesta patologia. Além disso, torna-se necessária a busca por estratégias terapêuticas a fim de prevenir ou reduzir a incidência do melanoma, e, inclusive, melhorar a qualidade de vida do paciente. Neste contexto, é interessante avaliar se a quercetina e a crisina livres ou nanoencapsuladas terão um efeito positivo no tratamento do melanoma cutâneo, através de seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver suspensões de nanocápsulas inéditas de Eudragit RS[®] 100, contendo crisina ou quercetina, para avaliação da potencial atividade antitumoral *in vitro* e da possível resposta imune através da atividade da adenosina desaminase em modelo animal de melanoma cutâneo.

1.1.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar suspensões de nanocápsulas de Eudragit RS[®] 100, contendo os flavonoides crisina ou quercetina nanoencapsulados;
- Validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (CLAE/UV) para análises dos flavonoides nas suspensões de nanocápsulas;
- Realizar ensaio de estabilidade preliminar das formulações de nanocápsulas desenvolvidas;
- Avaliar a toxicidade de diferentes concentrações das formulações em ensaio *in vitro* empregando cultivo celular de macrófagos murinos (RAW 264.7);
- Investigar a potencial atividade antitumoral *in vitro* de diferentes concentrações dos flavonoides, livres e nanoencapsulados, em cultura de células de melanoma murino (B16F10);
- Induzir e avaliar o desenvolvimento de melanoma em camundongos C57BL/6 por inoculação de células B16F10 nos animais;
- Tratar os camundongos submetidos ao modelo de indução de melanoma com as suspensões de nanocápsulas branca, de crisina e quercetina, e com os flavonoides não encapsulados, por via oral e
- Analisar possíveis alterações na atividade da enzima adenosina desaminase no soro dos animais submetidos ao modelo de melanoma cutâneo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MELANOMA

O melanoma cutâneo é um câncer agressivo que tem origem a partir dos melanócitos, células que produzem a melanina, presentes na pele. Apesar de se propor que o desenvolvimento do melanoma é multicausal, a doença está diretamente ligada à exposição aos raios ultravioletas (UV) (VEIEROD *et al.*, 2003), que induzem inflamação, produção de espécies reativas de oxigênio, dano ao DNA, imunossupressão e carcinogênese na pele quando a exposição é crônica (WU *et al.*, 2011). Quando diagnosticado nos estágios iniciais, o prognóstico do melanoma cutâneo é bom, porém, quando metastático, o melanoma é praticamente incurável pelos tratamentos como cirurgia, quimioterapia e radioterapia (XING *et al.*, 2010).

Nos últimos 30 anos, de acordo com dados da American Cancer Society, as taxas de melanoma vêm aumentando (ACS, 2018). Dentre os tipos de câncer, o câncer de pele é o mais comum, sendo o melanoma responsável pelo maior número de mortes, acometendo especialmente pessoas entre 30 e 60 anos de idade, que vivem em latitudes baixas (elevada exposição à radiação) e de pele branca (BATAILLE *et al.*, 2004; RASTRELLI *et al.*, 2014). O risco de desenvolver melanoma é de aproximadamente 2% para os brancos, 0,5% para hispânicos e 0,1% para os negros. Segundo o Instituto Nacional do Câncer, no Brasil, 30% dos tumores malignos que foram registrados são câncer de pele, destes 3% são melanoma cutâneo, o mais grave devido ao elevado potencial metastáticos (INCA, 2018).

Pacientes com melanoma são tratados por meio de cirurgia, para remoção do tumor, imunoterapia, sessões de quimioterapia e/ou radioterapia. Dentre os quimioterápicos, os mais empregados no tratamento do melanoma são: a cisplatina (CDDP), dacarbazina e 5-fluorouracil (ACS, 2019; TAWBI; BUCH, 2010). Mesmo que os fármacos usados na quimioterapia sejam eficientes, eles possuem efeito citotóxico inespecífico que acaba tornando-se um efeito adverso importante e indesejável (ACS, 2019; SKLADANOWSKI; KONOPA, 1993). Dessa forma, faz-se importante o desenvolvimento de pesquisas na busca por coadjuvantes terapêuticos que sejam eficazes e que apresentem menor toxicidade, como moléculas encontradas na natureza, pois apesar dos avanços no tratamento de vários tipos de câncer, a mortalidade dos pacientes com melanoma metastático é alta, sendo a estimativa de vida média desses pacientes próxima a 5 anos (WHITE *et al.*, 2009).

A inflamação tem um papel muito relevante no desenvolvimento do melanoma cutâneo, sendo essencial a interação entre as respostas imune inata e adaptativa, que atuam de modo a controlar o desenvolvimento do melanoma e de forma a prevenir que este se torne mais agressivo. A inflamação é causada pela radiação ultravioleta, promovendo maior permeabilidade vascular do tecido, aumento do fluxo sanguíneo e o dano oriundo da geração de espécies reativas de oxigênio. Estes eventos induzidos pela radiação UV são capazes de promover efeitos imunossupressivos devido à produção de fatores imunes pelos queratinócitos e melanócitos. Sendo assim, a imunossupressão induzida pela radiação UV favorece o desenvolvimento do câncer por atuar reduzindo o número de células de Langerhans na pele, bem como diminuindo a apresentação de antígenos e a produção de citocinas, prostaglandinas-E2 e interleucinas IL-4 e IL-10 (MARGOLIN, 2014; WU *et al.*, 2011).

2.2 CÉLULAS B16F10 E MODELOS EXPERIMENTAIS DE MELANOMA *in vivo*

As células B16F10 são células aderentes, de coloração marrom a preta (melanócitos) provenientes da pele de camundongos C57BL/6 (*Mus musculus*) que espontaneamente desenvolveram melanoma, classificadas no nível de biossegurança 1 (WILSON; CHOSEWOOD, 2007). A linhagem B16F10 teve origem em uma metástase pulmonar de um melanoma espontâneo que foi excisada e levada para cultura celular, resultando na linhagem B16F0. Essa linhagem foi expandida e usada para indução de melanoma em outro camundongo C57BL/6. Novamente, quando encontrada metástase pulmonar, esta foi excisada e levada a expansão, dando origem a linhagem B16F1. Esse procedimento se repetiu até chegar na linhagem B16F10, muito agressiva e com alto potencial metastático. É interessante notar que, apesar de se classificar tal modelo experimental de melanoma como metastático, cada foco de massa tumoral encontrada no pulmão do animal não se trata de uma metástase, mas sim de um tumor primário que teve como origem a indução por injeção subcutânea (GHEORGHEOSU *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2013).

O modelo de indução de melanoma em camundongos através da inoculação subcutânea de suspensão de células B16F10 (transplante singênico) é amplamente empregado e de difícil tratamento (OVERWIJK; RESTIFO, 2001; SILVA *et al.*, 2013), sendo aplicado inclusive para modelos de dor (RIGO *et al.*, 2013). Suspensão de células B16F10, inoculadas via subcutânea, gera a formação de tumor palpável (de 5 a 10 dias), adquirindo volume de 1 cm³ entre 14 e 21 dias, período em que o

crescimento exagerado do tumor, pode provocar ulceração e sangramento em razão do tecido necrosar (recomendada a eutanásia antes que o animal chegue neste estágio) (OVERWIJK; RESTIFO, 2001).

Estudo demonstrou que camundongos C57BL/6 desenvolveram tumores maiores, com maior número de órgãos com metástases e de forma mais rápida que em modelo empregando camundongos Balb/c, quando células B16F10 foram inoculadas por diversas vias (subcutânea, intraperitoneal e intravenosa) nessas espécies. Os autores sugerem que a resposta imune dos camundongos C57BL/6 não é robusta visto que o transplante das células B16F10 é singênico, apresentando antígenos conhecidos, evadindo a resposta imune (FU *et al.*, 2016).

2.3 SISTEMA PURINÉRGICO NA INFLAMAÇÃO E CÂNCER

O sistema purinérgico, que é constituído por enzimas, nucleotídeos, nucleosídeo e receptores purinérgicos, participa da regulação da resposta imune. Os nucleosídeos e nucleotídeo de adenina têm as suas concentrações extracelulares reguladas por ação de enzimas como a ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase, CD39, EC 3.6.1.5) e adenosina desaminase (ADA, EC 3.5.4.4). Esses nucleotídeos e nucleosídeo são agonistas dos receptores purinérgicos P1 e P2Y (metabotrópicos) e P2X (ionotrópico) (COLGAN *et al.*, 2006; YEGUTKIN *et al.*, 2011; ZIMMERMANN, 2001). Os receptores envolvidos na sinalização purinérgica também são expressos em células de melanoma (BURNSTOCK; VIRGILIO, 2013; WHITE *et al.*, 2009). A literatura relata que os nucleotídeos extracelulares apresentam ação antitumoral em diferentes tipos de câncer (BURNSTOCK; VIRGILIO, 2013).

As enzimas do sistema purinérgico atuam na regulação dos níveis extracelulares dos nucleotídeos e nucleosídeo, os quais são moléculas sinalizadoras. A enzima ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase, CD39, EC 3.6.1.5) catalisa a desfosforilação sequencial do nucleotídeo trifosfato de adenosina ($ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP$), enquanto a enzima 5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5) catalisa a desfosforilação do nucleosídeo monofosfato ($AMP \rightarrow ADO$) e a enzima adenosina desaminase (ADA, EC 3.5.4.4) catalisa a desaminação da adenosina (ADO) em inosina (COLGAN *et al.*, 2006; YEGUTKIN *et al.*, 2011; ZIMMERMANN, 2001).

A modulação da resposta imune pelo Sistema Purinérgico se dá através da ligação dos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina aos seus receptores e mediando uma variedade de respostas que vão desde a estimulação do crescimento, de

apoptose e de quimiotaxia para a diferenciação das células, nocicepção, secreção de citocinas, bem como a neurotransmissão (BURNSTOCK; VIRGILIO, 2013).

Há relatos na literatura em relação à ação antitumoral dos nucleotídeos extracelulares em diferentes tipos de câncer, como a leucemia, o câncer colorretal, de esôfago, de pele de células escamosas, de pulmão e o melanoma (BURNSTOCK; VIRGILIO, 2013). As células tumorais possuem maior concentração de ATP em comparação com a maioria das células saudáveis (SPYCHALA, 2000). Portanto, acredita-se que estratégias de esgotamento do ATP possam levar a uma condição desfavorável ao desenvolvimento tumoral (MARTINS *et al.*, 2012).

A molécula de adenosina é capaz de induzir a promoção do tumor (SPYCHALA, 2000). Além disso, estudos relataram que a progressão do tumor foi inibida em camundongos deficientes da enzima CD73 (YEGUTKIN *et al.*, 2011), enquanto que a enzima CD39 promoveu diretamente o crescimento das células tumorais (FENG *et al.*, 2011). Esses dados justificam o crescente interesse no potencial terapêutico da sinalização purinérgica para o tratamento do melanoma.

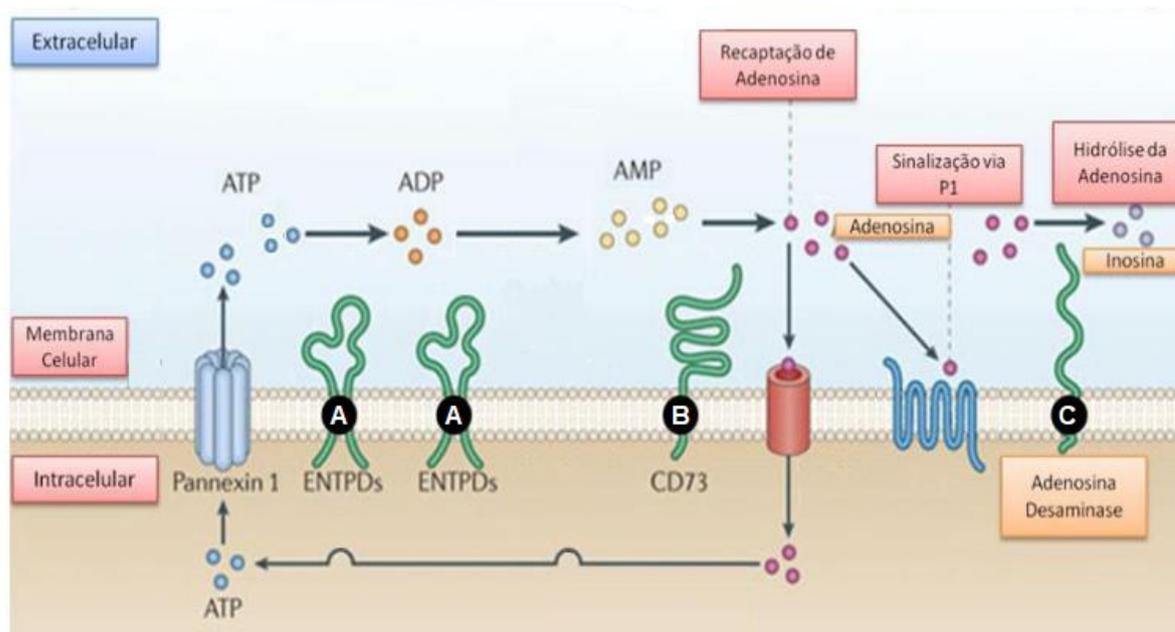
O papel dessas enzimas, nucleotídeos e nucleosídeo tem sido avaliado em condições patológicas e toxicológicas, como no diabetes (LUNKES *et al.*, 2003), na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LEAL *et al.*, 2005), no câncer (ARAUJO *et al.*, 2005; MALDONADO *et al.*, 2010), na esclerose múltipla (SPANVELLO *et al.*, 2010) e na intoxicação por alumínio (KAIZER *et al.*, 2007) e por cádmio (ABDALLA *et al.*, 2013, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2012), na artrite (LUCAS *et al.*, 2019) e hiperlipidemia (BRAUN *et al.*, 2018). Tem-se verificado que o uso de compostos com propriedades antioxidantes é capaz de reverter ou prevenir efeitos prejudiciais dessas patologias (ABDALLA *et al.*, 2013, 2014; BRAUN *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2012; JAQUES *et al.*, 2011; LUCAS *et al.*, 2019).

2.2.1 Adenosina desaminase

A adenosina desaminase (ADA) é uma enzima que pode estar presente em tecidos e células (isoforma I) ou no plasma/soro (isoforma II). A isoforma II da ADA é predominante no plasma e é produzida e secretada por linfócitos e monócitos em resposta a fatores patogênicos (LARIJANI *et al.*, 2017).

A ADA é a enzima que catalisa a conversão de adenosina a inosina (Figura 1), regulando as concentrações extracelulares de adenosina (YEGUTKIN, 2008) que tem atividade imunossupressora (BOURS *et al.*, 2006; GHIRINGHELLI *et al.*, 2012).

Figura 1 - Representação de alguns componentes do Sistema Purinérgico.



Fonte: adaptado de JUNGER, 2011.

A sinalização que a adenosina exerce em seus receptores celulares (acoplados à proteína G), como o receptor A2A, ativa a supressão da resposta imune celular por meio da inibição da proliferação e invasão de Linfócitos T no tumor (BRAVO; CARVALHO; SALDANHA-ARAUJO, 2016). Mutações que geram a deleção desse receptor e o uso de antagonistas desses receptores promoveram a diminuição da instalação e progressão do tumor em modelo de melanoma (OHTA *et al.*, 2006).

A resposta da sinalização da adenosina em seus receptores inclui vasodilatação, promoção do crescimento do tumor, angiogênese e a supressão da resposta imune (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017; OHTA *et al.*, 2006; SITKOVSKY *et al.*, 2008; ZHANG, 2010), promovendo a supressão da resposta antitumoral e favorecendo a instalação, progressão tumoral e metástases, uma vez que o próprio tumor libera adenosina (BLAY; WHITE; HOSKIN, 1997), que por sua vez desempenha funções fisiológicas, citadas anteriormente, favoráveis ao desenvolvimento do tumor (RABINOVICH; GABRILOVICH; SOTOMAYOR, 2007; ZHANG, 2012).

2.4 FLAVONOIDES

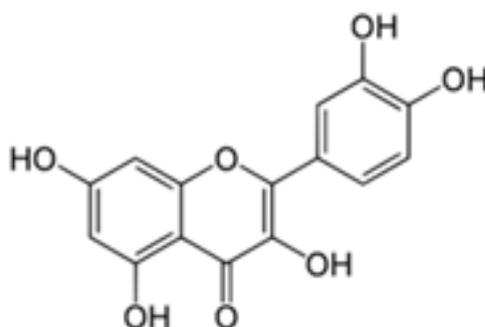
Os flavonoides são compostos fenólicos que possuem ampla distribuição na natureza e estão presentes em concentrações elevadas em vegetais usados na alimentação (BARRAS *et al.*, 2009; CAMPOS *et al.*, 2004). Esses compostos são metabólitos secundários produzidos por organismos vegetais, sendo relevantes no seu desenvolvimento e proteção, além de possuírem importantes atividades biológicas (NAVEEN; LINGARAJU; ANITHA, 2017).

O uso de compostos naturais provenientes da dieta ou medicina alternativa, como os flavonoides, vem sendo amplamente estudado, uma vez que os efeitos antitumorais como a potenciação de apoptose, inibição da proliferação de células e inibição da metástase para estes compostos é descrito na literatura (CHINEMBIRI *et al.*, 2014; TAVAKOLI *et al.*, 2018).

2.4.1 Quercetina

A quercetina (3,3',4',5,7-pentaidroxiflavona; Figura 2) apresenta massa molar de 302,24 g/mol, sendo um pó amarelo de baixa solubilidade em água (WU *et al.*, 2008). É considerado um dos compostos flavonoides mais abundantes em alimentos, estando presente em frutas, legumes e vegetais (PRIOR, 2003). É um composto não carcinogênico e que possui baixa toxicidade (HARWOOD *et al.*, 2007). Dentre algumas potenciais aplicações terapêuticas da quercetina estão as atividades anti-inflamatória, antioxidante, antitrombótica, vasoprotetora, neuroprotetora e antitumoral (ABDALLA *et al.*, 2013, 2014; CHOI; CHEE; LEE, 2003; COOK; SAMMAN, 1996).

Figura 2 - Estrutura química da molécula de quercetina.



Fonte: próprio autor.

A baixa solubilidade da quercetina em água (cerca de 1 µg/mL) e a rápida metabolização (em ratos 93% de uma dose de 50 mg/kg foi metabolizada em uma hora) a torna um composto de uso clínico limitado no tratamento do câncer (DING *et al.*, 2014). Para melhorar a biodisponibilidade, em função da sua solubilidade, a quercetina pode ser usada em uma formulação nanotecnológica (CAI *et al.*, 2013; MEN *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2008), como por exemplo, no caso da sua incorporação em nanocápsulas (SOUSA-BATISTA *et al.*, 2017; WEISS-ANGELI *et al.*, 2012).

Cabe evidenciar que nanocápsulas são sistemas vesiculares (*core-shell*), com diâmetro inferior a 1 µm, baseados em um núcleo oleoso ou aquoso envolto por um invólucro polimérico (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Nesse sentido, a quercetina tem sido empregada em diversos tipos de carreadores, como nanopartículas poliméricas, lipossomas e em micropartículas (WANG *et al.*, 2016), bem como a crisina e outros compostos flavonoides (TAGHIPOUR *et al.*, 2017), visando aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade desses compostos e/ou prevenir a sua degradação em formulações.

Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo quercetina (0,042 mg/mL; 222 nm), preparadas com poli(ε-caprolactona) e triglicerídeos de cadeia média, foram avaliadas no tratamento de *Leishmania amazonenses* após administração oral em ratos. O nanoencapsulamento da quercetina promoveu maior efetividade na redução do tamanho das lesões e da carga parasitária em relação ao flavonoide administrado na forma livre, mesmo em doses 40 vezes menores (SOUSA-BATISTA *et al.*, 2017).

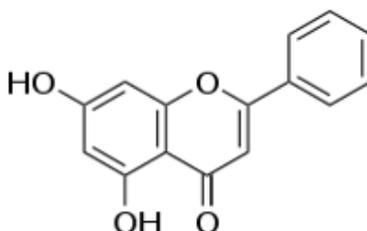
Quanto à atividade antitumoral da quercetina, acredita-se que seja atribuída a sua atividade antioxidante e anti-inflamatória (JUNG *et al.*, 2013). Estudos *in vitro* demonstram o efeito antitumoral da quercetina em cultura de células de melanoma, relatando que a quercetina, em baixas doses, afeta a viabilidade celular e, em altas doses, induz a apoptose celular (HOLLMAN *et al.*, 1997). Zhang e colaboradores (2005) sugerem que a quercetina induza a apoptose de células de melanoma (B16-BL6) através do aumento da atividade da caspase-3 (ZHANG *et al.*, 2005).

O efeito antitumoral da quercetina no melanoma também já foi atribuído à ativação de sinais transdutores e ativadores de transcrição 3 (STAT3), uma vez que a quercetina induziu a apoptose em células de melanoma reduzindo a proliferação, migração e invasão celular através da baixa regulação dos STAT3. Além disso, já foi relatado que a quercetina inibe o crescimento e a metastase do melanoma *in vivo* (CAO *et al.*, 2014).

2.4.2 Crisina

A crisina (5,7-dihidroxi-flavona; Figura 3) é um flavonoide de massa molar 254,25 g/mol, que se apresenta como um pó fino amarelo de baixa solubilidade em água e solúvel em metanol, etanol e dimetilsulfóxido (CASTRO; FERRETTI; BLANCO, 2005). A sua baixa solubilidade em água desfavorece a sua absorção no organismo, limitando a sua biodisponibilidade e aplicação no campo farmacêutico (KIM *et al.*, 2017).

Figura 3 - Estrutura química da molécula de crisina.



Fonte: próprio autor.

São fontes alimentares de crisina o própolis, o mel e vegetais do gênero *Passiflora*. Assim como a quercetina, a crisina possui uma rápida metabolização e por esta razão tem sido estudada a sua incorporação em nanocarreadores como lipossomas e nanocápsulas (MANI; NATESAN, 2018).

A crisina é estudada em função de suas propriedades antioxidantes (SOUZA *et al.*, 2015), antitumorais (REHMAN *et al.*, 2013; SAMARGHANDIAN; AFSHARI; DAVOODI, 2011) e anti-inflamatórias (BAE; LEE; KIM, 2011; SHIN *et al.*, 2009). Ainda, estudos apontam o potencial de proteção da crisina aos queratinócitos em relação a danos induzidos por radiação UVA e UVB (fotoproteção) (WU *et al.*, 2011), também na inibição da hiperpigmentação (KIM *et al.*, 2011) e efeito citotóxico *in vitro* em cultura de células de melanomas murino e humano (REDDY *et al.*, 2015).

Lorenzoni (2015) desenvolveu suspensões de nanocápsulas de etilcelulose contendo crisina (0,3 e 0,75 mg/mL; 104 a 161 nm), preparadas com diferentes óleos, capazes de controlar a liberação desse flavonoide. Nesse estudo, observou-se aumento da atividade antioxidante *in vitro* (por DPPH) tanto da crisina quanto dos óleos vegetais quando presentes na formulação nanoestruturada desenvolvida.

No ensaio *in vitro* de citotoxicidade, as nanocápsulas contendo crisina apresentaram atividade antiproliferativa em células de câncer de mama (MCF-7) e de melanoma (SK-ME L-28), de maneira dose-dependente e com influência do tipo de ensaio (MTT ou NRU). Após 48 h de incubação, as nanocápsulas de crisina provocaram maior redução na viabilidade das células de melanoma humano em comparação ao composto livre, pelo método do MTT (5,0 e 10,0 µg/mL) e NRU (2,5-10,0 µg/mL). As nanocápsulas sem crisina reduziram a viabilidade celular em ambos os métodos.

2.4.3 Moléculas sintetizadas com estrutura baseada em flavonoides

Na tentativa de aplicação de moléculas como flavonoides no tratamento de doenças, o problema relativo à solubilidade dessas substâncias em meio aquoso passa a ser um fator limitante da sua aplicação (WANG *et al.*, 2014). Alternativas como a modificação estrutural e a incorporação dessas moléculas em sistemas de carreadores nanoparticulados são tentativas de tornar solúveis em meio aquoso algumas moléculas que possuem diferentes atividades biológicas, dentre elas a antitumoral (TAGHIPOUR *et al.*, 2017).

Nesse sentido, a molécula do flavonoide morina (3, 5, 7, 2', 4' – pentahidroxi-flavona), muito semelhante estruturalmente à quercetina, foi modificada para dar origem ao seu derivado sintético a morina-7-sulfato de sódio (NaMoS). Esse derivado de flavonoide apresentou maior solubilidade e na sua aplicação *in vitro*, empregando células B16F10, diminuiu a proliferação celular dessa linhagem, com efeito dependente de dose, diminuindo também a invasividade do tumor (mobilidade celular) e promovendo a apoptose das células B16F10 (LI *et al.*, 2016). Outra pesquisa, na qual se modificou estruturalmente a crisina, foram obtidos bons resultados em comparação com a molécula original em ensaios *in vitro*, diminuindo a proliferação celular em culturas de linhagens A549, MCF-7 e HeLa, de forma dependente da dose do composto e do tempo de cultivo (XUAN *et al.*, 2016).

Quando se é capaz de reconhecer um mecanismo regulatório de uma condição patológica e se estabelecer um alvo terapêutico, o desenvolvimento de uma molécula com características químicas e seletividade para interferir na patogênese pode ser muito promissor. Assim, baseados na estrutura da genisteína (um flavonoide com propriedade de diminuição da motilidade tumoral) foi sintetizada a 4'-fluoroisoflavanona (KBU2046), que a nível sistêmico foi um seletivo redutor de metástases em modelo murino de tumor de próstata humano (XU *et al.*, 2018).

Um derivado penta-acetilado da quercetina foi avaliado em leishmaniose cutânea quando em nanocápsulas de policaprolactona, em comparação à quercetina, sendo eficaz, entretanto, menos impacto houve na incorporação em nanoestruturas do que a quercetina original (SOUSA-BATISTA *et al.*, 2017).

A incorporação dessas moléculas sintéticas em sistemas nanoestruturados pode aliar a modificação estrutural estratégica aos benefícios dos sistemas nanoparticulados carreadores de fármacos, especialmente quanto ao controle de liberação, manutenção de níveis plasmáticos, vetorização e metabolização. No entanto, até o presente momento, não foram encontrados na literatura trabalhos em que essas moléculas sintéticas mencionadas foram incorporadas a sistemas nanoestruturados. Contudo, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de melhorar as atividades biológicas da crisina e a quercetina via incorporação a sistemas nanoestruturados.

2.4.4 Flavonoides e carreadores nanoestruturados

O emprego de diferentes flavonoides, devido às suas múltiplas atividades biológicas, foi alvo de estudo de revisão da literatura referente a pesquisas com a aplicação desses compostos naturais em formulações nanoestruturadas, usadas no tratamento de diferentes tipos de câncer. Em conclusão, o emprego desses compostos em nanoestruturas pode otimizar os efeitos dos flavonoides por aumentar a biodisponibilidade destes, vetorizar os compostos aos sítios de ação, diminuir a toxicidade em células normais e por, conseqüentemente, aumentar a eficiência e a atividade dos compostos nos ensaios anticâncer (TAGHIPOUR *et al.*, 2017). Assim, a aplicação de moléculas encontradas na natureza, como a crisina e a quercetina, vem sendo estudada em relação às suas propriedades antitumorais, apresentando resultados promissores para seu emprego na patologia, em especial em estudos com câncer melanoma (HARRIS *et al.*, 2016; SASSI *et al.*, 2018; TAVAKOLI *et al.*, 2018).

2.5 NANOPARTÍCULAS CARREADORAS DE FÁRMACOS

Como citado anteriormente, o conjunto de diferentes sistemas dispersos compostos por partículas ou gotículas na faixa nanométrica, nas quais são incorporadas substâncias que apresentam baixa solubilidade em água, é um dos métodos empregados para aumentar a biodisponibilidade desses compostos, assim como a modificação estrutural molecular, na qual as características químicas das

moléculas podem ser alteradas, dentre elas, a solubilidade em água (XU *et al.*, 2018; XUAN *et al.*, 2016). No entanto, a inclusão de moléculas em sistemas coloidais apresenta outras vantagens em relação à modificação estrutural molecular dos compostos, dentre elas a possibilidade de vetorização do fármaco para o sítio de ação, liberação controlada da substância ativa, proteção contra metabolização e a diminuição da concentração da substância ativa necessária na formulação, podendo implicar em eficiência e segurança iguais ou maiores que na administração de fármacos por formulações farmacêuticas convencionais (ANDRADE *et al.*, 2011; CAMPOS *et al.*, 2004; DING *et al.*, 2014; MEHRAVAR; JAHANSHAH; SAGHATOLESLAMI, 2009; MOHANRAJ; CHEN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; WU; ZHANG; WATANABE, 2011; WU *et al.*, 2008).

Pertencem a esse conjunto de diferentes sistemas coloidais as nanocápsulas de núcleo oleoso ou aquoso, nanoesferas, lipossomas, dentre outros, que diferem basicamente em relação a sua composição e a sua forma de preparo (ALONSO, 2004; MOHANRAJ; CHEN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

As suspensões de nanocápsulas de núcleo oleoso, por exemplo, são sistemas coloidais nos quais um óleo dissolve uma ou mais substâncias lipossolúveis formando o núcleo que é envolto por uma cápsula polimérica, enquanto nanoesferas não apresentam um núcleo oleoso, mas sim composto por polímero no qual a substância pode estar adsorvida à superfície ou internalizada. O polímero pode exercer a função de liberar o fármaco de forma controlada, proteger o fármaco de metabolização ou também melhorar a estabilidade do sistema (ALONSO, 2004; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; WEISS-ANGELI *et al.*, 2012).

As suspensões de nanocápsulas de núcleo oleoso podem ser preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, que consiste basicamente na precipitação das nanocápsulas, ao se adicionar a fase orgânica do sistema à fase aquosa, e a redução do volume do solvente até a concentração desejada de ativo na formulação (MOHANRAJ; CHEN, 2007; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A fase orgânica é composta por um óleo, o polímero, o ativo, tensoativo opcional e um solvente orgânico (etanol, acetona, etc) e a fase aquosa, por exemplo, por água e estabilizante, (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Idealmente, esses sistemas devem apresentar determinadas características físico-químicas que são avaliadas por meio do tamanho médio de partículas e da distribuição de tamanho (homogeneidade do sistema), carga superficial (potencial

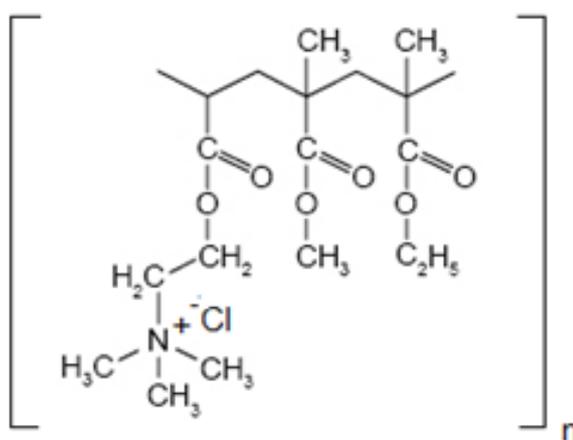
zeta), teor e eficiência de encapsulamento do fármaco. Essas características servem para a caracterização inicial das suspensões e podem ser empregadas para avaliar a estabilidade do sistema, de forma que quanto menos alterações esses parâmetros iniciais sofrerem ao longo de um determinado período de tempo, maior a estabilidade do sistema (VETTEN *et al.*, 2014; WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

Como as características dos sistemas desenvolvidos dependem de fatores relacionados à composição (componentes, concentração, compatibilidade, etc) e às variáveis referentes ao preparo (temperatura, velocidades de agitação, injeção da fase orgânica na fase aquosa, etc.) durante o desenvolvimento dos sistemas ocorre a otimização das condições de preparo e das concentrações de componentes para que a formulação apresente as características físico-químicas e estabilidade esperadas (BLAKNEY *et al.*, 2019; CHISHTI *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2014).

2.5.1 Eudragit RS® 100

O Eudragit RS® 100 (monômero representado na Figura 4) é um polímero inerte que está entre os materiais mais empregados para revestimento de formas farmacêuticas para liberação controlada dos compostos ativos. Trata-se de uma substância sólida, incolor, com grânulos semitransparentes e com odor de amina. É insolúvel em pH fisiológico mas pode sofrer intumescimento em meio aquoso por conta dos grupos de amônio quaternário presentes na estrutura e que o tornam permeável (PIGNATELLO; BUCOLO; PUGLISI, 2002).

Figura 4 - Representação da estrutura química do monômero de Eudragit® RS100.



Fonte: adaptado de PIGNATELLO; BUCOLO; PUGLISI, 2002.

O Eudragit RS[®] 100, assim como outros polímeros semelhantes, formam nanossuspensões mais homogêneas, com menor tamanho de partícula e que apresentam carga positiva em sua superfície, moderada força bioadesiva sem apresentar potencial irritante para mucosas (EL-NAHAS *et al.*, 2017).

Nanopartículas de Eudragit RS[®] 100 passaram a ser desenvolvidas para que fosse aumentada a biodisponibilidade dos fármacos incorporados aos nanossistemas, para controle da liberação, para que carreassem fármacos e diminuíssem sua metabolização e para que atingissem alvos específicos no organismo, exemplo disso é a incorporação de antibióticos à nanoestruturas poliméricas contendo este polímero e que apresentam afinidade com as cápsulas ou membranas de microrganismos, o que pode provocar a internalização do fármaco driblando assim um mecanismo de resistência do microrganismo relativo ao efluxo do fármaco da célula ou inativação enzimática (ADIBKIA *et al.*, 2016).

A aplicação deste polímero em suspensões de nanopartículas para aplicação ocular foi propiciada pela baixa toxicidade e irritabilidade nos tecidos como córnea, íris e conjuntiva em experimento *in vivo* com coelhos, bem como pelo baixo tamanho de partículas obtidos no sistema testado, com diâmetros menores que 100 nm e adequado potencial zeta para a aplicação pretendida (PIGNATELLO; BUCOLO; PUGLISI, 2002). Outro estudo do mesmo grupo empregando nanossuspensões do polímero com ibuprofeno também não evidenciou toxicidade da formulação testada novamente em coelhos e observando aumento das concentrações do fármaco no humor aquoso dos animais, evidenciando a segurança e eficácia desse polímero na liberação de fármacos pela via ocular (PIGNATELLO *et al.*, 2002).

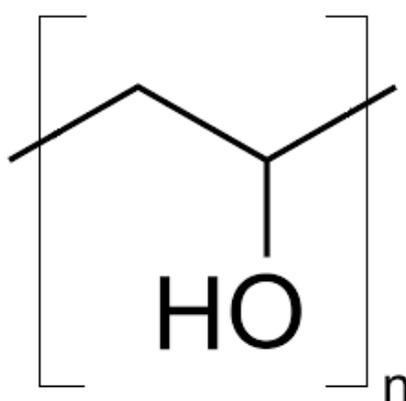
Estudos empregando Eudragit RS[®] 100, para administração oral de compostos nanoencapsulados e microencapsulados, avaliaram as características dos sistemas produzidos e a toxicidade das formulações. Os resultados demonstraram que os sistemas possuem segurança, aplicabilidade e características adequadas para a via oral (EL-NAHAS *et al.*, 2017; TRAPANI *et al.*, 2007).

2.5.2 Álcool Polivinílico (PVA)

O álcool polivinílico (monômero representado na Figura 5) é um polímero sintético, solúvel em água, preparado através da polimerização do acetato de vinila seguida de hidrólise parcial do acetato de polivinila. Esse polímero é empregado como revestimento de comprimidos para via oral, sendo também usado como agente de

modificação de viscosidade e formador de filme, e amplamente empregado por seu histórico de segurança em um grande número de produtos, inclusive como aditivo alimentar. Em estudo de toxicidade subcrônica com administração oral de PVA em dose de até 5000 mg/kg/dia em ratos Sprague-Dawley, as cobaias não mostraram efeitos adversos, toxicológicos, alteração de peso ou de consumo da dieta. Também não foram observadas alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias, funcionais, motoras ou mesmo nos órgãos, microscópica e macroscopicamente (KELLY *et al.*, 2003).

Figura 5 - Estrutura química do monômero formador do PVA.



Fonte: próprio autor.

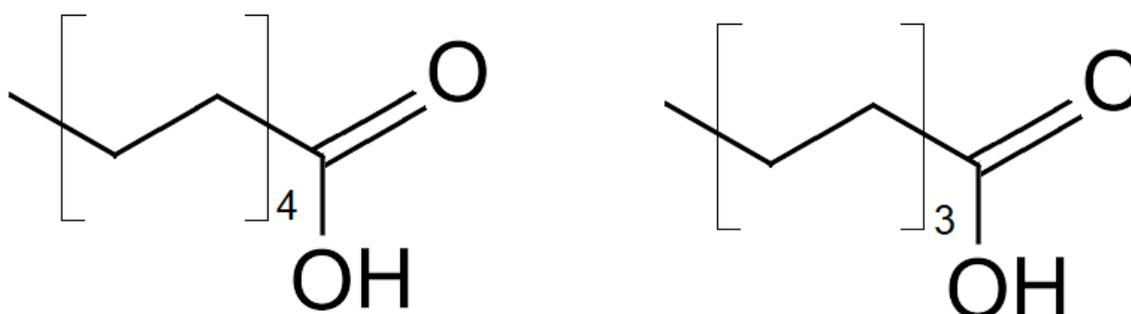
DeMerlis e Schoneker (2003) relataram em sua revisão que o PVA é seguro quando administrado por via oral, sendo adequado para a sua aplicação como revestimento de suplementos alimentares e produtos farmacêuticos. As propriedades do PVA dependem do seu peso molecular e a sua aplicação farmacêutica requer níveis de impurezas ou resíduos de solventes muito baixos. O PVA é um polímero estimado por sua solubilidade e biodegradabilidade, reduzindo assim qualquer impacto ambiental relacionado ao seu uso (DEMERLIS; SCHONEKER, 2003).

Em formulação de nanopartículas evidenciou-se que resíduos de PVA na interface do polímero com a água diminuíam o tamanho de partículas de forma proporcional à concentração deste na suspensão (SAHOO *et al.*, 2002). Ainda, na otimização da formulação de lipossomas, a adição de PVA como estabilizante do sistema aumentou a estabilidade e a eficiência de encapsulamento, sendo um componente interessante em formulações do gênero (MU; ZHONG, 2006).

2.5.3 Triglicerídeos de cadeia média (TCM)

O TCM é composto por ésteres de glicerol com cadeias de ácidos graxos saturados, apresentando de 8 a 10 átomos de carbono. São óleos com baixa viscosidade, estáveis quanto à oxidação e que não apresentam cor ou odor (RONIS *et al.*, 2016). Dentre os ácidos graxos esterificados que podem compor o TCM estão o ácido cáprico ($C_{10}H_{20}O_2$ - 172,26 g/mol) e o ácido caprílico ($C_8H_{16}O_2$ - 144,21 g/mol) (LAI; LOW; AKOH, 2005), com estruturas simplificadas representadas na Figura 6.

Figura 6 - Representação simplificada da estrutura dos ácidos cáprico e caprílico, respectivamente.



Fonte: próprio autor.

O TCM tem seu emprego em formulações de nano e micropartículas, tendo uma boa compatibilidade com o polímero Eudragit® (SANTOS *et al.*, 2013; WAGDARE *et al.*, 2011), apresentando também propriedades relacionadas à modulação da resposta inflamatória por mecanismo ainda não elucidado (YU; GO; KIM, 2019).

O TCM vem sendo amplamente empregado como componente de sistemas nanoestruturados (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; OURIQUE *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2013; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

2.5.4 Avaliação da toxicidade de sistemas nanocarreadores

A avaliação da toxicidade dos nanocarreadores de fármacos, como as suspensões de nanocápsulas, representa um desafio para agências reguladoras que passaram a preocupar-se com o estabelecimento de protocolos ou com recomendações de ensaios para este fim (DOBROVOLSKAIA; GERMOLEC; WEAVER, 2009; RÖSSLEIN *et al.*, 2015).

O emprego de culturas celulares é uma alternativa interessante devido ao grande número de células as quais podem ser empregadas em *ensaios in vitro* de triagem de atividade biológica ou de toxicidade de formulações para predizer essas propriedades em futuras aplicações *in vivo*. Assim, a cultura de células RAW 264.7 (macrófago murino) é comumente empregada para este fim, apesar de que culturas primárias de leucócitos seriam ideais para testar a resposta imune inata e adaptativa (MERLY; SMITH, 2017).

O emprego da linhagem celular RAW 264.7 na avaliação de toxicidade de formulações nanoestruturadas foi relatado recentemente (ALSALEH *et al.*, 2019) em estudo da avaliação da viabilidade celular através da detecção de metabólitos gerados pelas células viáveis em cultura expostas aos compostos ou a formulações a serem testados (MOSMANN, 1983; RÖSSLEIN *et al.*, 2015). Contudo, é relatado na literatura o aumento de falsos positivos ou falsos negativos na avaliação de toxicidade de nanomateriais (KUKU *et al.*, 2016), o que faz com que a avaliação toxicológica desses sistemas seja complexa e devesse ser realizada em conjunto com outras técnicas, incluindo a avaliação *in vivo* com emprego de não vertebrados como *C. elegans* e *A. salina* (ATES *et al.*, 2019; MOON; KWAK; AN, 2019), e por fim em vertebrados, para produzir dados confiáveis, convergentes e relevantes a respeito do potencial tóxico dessas formulações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Matérias-Primas

- Crisina - SM Empreendimentos Farmacêuticos (teor 99,2%; CBSY20160310; São Paulo, Brasil);
- Quercetina - Galena Química e Farmacêutica LTDA (teor 95,6%; QA151207; São Paulo, Brasil);
- Óleo TCM - PharmaSpecial (São Paulo, Brasil).
- Eudragit® RS 100 - (Röhm Pharma, Alemanha; doado por Almapal, São Paulo, Brasil);
- Álcool Polivinílico (PVA) – Sigma Aldrich®; (Lote SLBH1898V)
- Adenosina - Sigma Aldrich®;
- Linhagem de células murina B16F10;
- Linhagem de células murina RAW 264.7;

3.1.2 Solventes e outros materiais

- Acetona – Dinâmica (São Paulo, Brasil);
- Metanol HPLC – Tedia (Rio de Janeiro, Brasil);
- Metanol HPLC – Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Acetonitrila HPLC – Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Dispositivo de ultrafiltração – centrifugação (Amicon® Ultra, 0,5 mL; Ultracel 10K membrana de celulose regenerada; 10,000 MWCO; Millipore);
- Meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) - Sigma Aldrich®
- Meio RPMI 1640 - Sigma Aldrich®
- MTT formazan - Sigma Aldrich®
- Soro fetal bovino - InVitrogen®
- Penicilina/Estreptomicina – Sigma Aldrich®
- DMSO – Synth
- Coluna C₁₈ Phenomenex (150 x 4,60mm; 5µm, 110 Å);
- Pré-coluna C₁₈ (4 x 3 mm; 5µm, 110 Å);

Todos os demais reagentes e solventes empregados nos ensaios apresentados nessa dissertação apresentavam grau analítico e foram empregados como recebidos.

3.1.3 Equipamentos

- Agitador magnético – Tecnal TE – 0851;
- Balança analítica – Shimadzu AU220;
- Cromatógrafo líquido – Shimadzu LC – 20^a (Kyoto, Japão), com bomba LC 20 AT, e detector UV/Vis SPD – M20A (DAD, *diode array detector*), equipado com injetor automático SIL – 20A HT;
- Microcentrífuga – Sigma 1 – 14;
- Ultrassom – ALT Sonic Clean 3PA;
- Mastersizer[®] 3000 E – Malvern Instruments;
- Zetasizer[®] Nano series Nano - Zs – Malvern Instruments;
- Leitor de microplacas – Thermo Plate;
- Capela de fluxo laminar – PACHANE;
- Estufa de CO₂ – Iceltec (L212);
- Freezer -80 °C – Rtmed;
- Ultrapurificador de água - Gradient A10 Milli-Q - Millipore[®].

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Desenho experimental

A preparação, a otimização, a caracterização físico-química e estudo da estabilidade das formulações de nanocápsulas brancas (sem os compostos ativos), de crisina e de quercetina, bem como a validação de metodologia analítica para análise dos flavonoides foram realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LabTec) do Departamento de Farmácia Industrial (DFI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), anexo C do prédio 26 do Centro de Ciências da Saúde (CCS), empregando também equipamentos de outros laboratórios do DFI.

O cultivo de células B16F10, a indução de melanoma nos animais, os ensaios de toxicidade e de atividade antitumoral das formulações desenvolvidas nesse trabalho foram realizados através de parceria com o Laboratório de Biociências da Universidade Franciscana de Santa Maria (UFN), em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Luciana Maria Fontanari Krause.

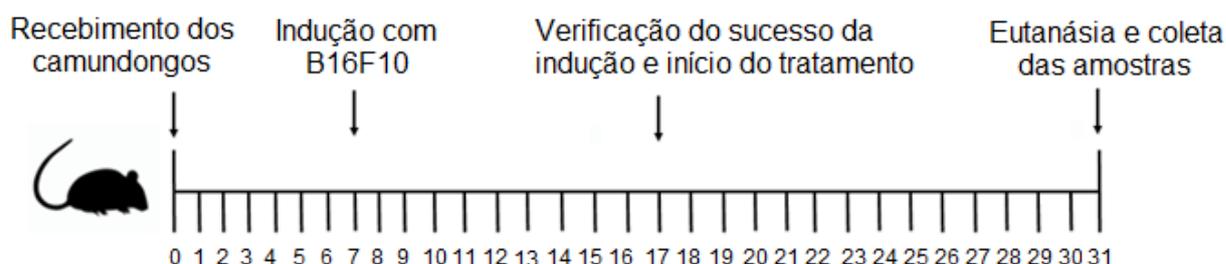
Os animais utilizados neste projeto de pesquisa foram provenientes do Biotério Central da UFSM e permaneceram no biotério de experimentação do prédio 21 (Fisiologia/Farmacologia) na UFSM durante todo o período de duração da ambientação, indução do melanoma e tratamento. O biotério do prédio 21 possui sistema de exaustão de ar e controle de temperatura. Os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro e tiveram água e comida fornecidos *ad libitum*. No momento do recebimento dos animais, eles passaram por uma ambientação durante 7 dias. Então, os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em caixas coletivas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm). As gaiolas foram modificadas para haver enriquecimento ambiental através do uso de canos de PVC para os animais se esconderem e descansarem. Este projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSM (nº 2896191216) (Anexo I).

A eutanásia, o processamento das amostras e os ensaios enzimáticos foram realizados no Laboratório de Imunobiologia Experimental e Aplicada (LabIBIO), localizado no prédio 20 (Departamento de Microbiologia), no campus da UFSM.

Os animais usados nesse estudo foram camundongos C57BL/6 isogênicos, adultos, machos, com aproximadamente 8 a 9 semanas, pesando em torno de 20 a 30 g. Os camundongos foram divididos de forma aleatória em 14 grupos. Inicialmente o “n” era de 10 animais por grupo.

Os animais foram entregues conforme disponibilidade do Biotério central da UFSM. Os animais foram divididos em dois grandes grupos, induzidos e não induzidos. A Figura 7 apresenta os eventos relacionados ao experimento *in vivo*, em função do tempo.

Figura 7 - Linha do tempo do experimento animal.



Os camundongos tiveram melanoma induzido pela inoculação subcutânea de células B16F10 no dorso. Após o período de 10 dias da data da inoculação das células de melanoma, os animais passaram a receber por 14 dias o tratamento com os flavonoides, nas suas formas livres e nanoencapsuladas, por via oral (gavagem).

Os grupos experimentais utilizados foram:

Animais sem melanoma (não induzidos)	G1: veículo (TCM);
	G2: cisplatina 10 mg/kg;
	G3: NCB;
	G4: quercetina livre 7,5 mg/kg;
	G5: NCQ 7,5 mg/kg;
	G6: crisina livre 7,5 mg/kg;
	G7: NCC 7,5 mg/kg;
Animais com melanoma (induzidos)	G8: veículo (TCM);
	G9: cisplatina 10 mg/kg;
	G10: NCB;
	G11: quercetina livre 7,5 mg/kg;
	G12: NCQ 7,5 mg/kg;
	G13: crisina livre 7,5 mg/kg;
G14: NCC 7,5 mg/kg;	

Como alguns animais induzidos não desenvolveram o melanoma, assim como alguns animais que desenvolveram o tumor de forma muito agressiva acabaram evoluindo para o óbito, o “n” para os 14 grupos precisou ser alterado para viabilizar o projeto. Assim, o número de animais não induzidos por grupo de tratamento foi de n=7 e para os induzidos um número de 5 animais por grupo (com tumor induzido com sucesso e que não evoluíram para óbito).

Passados os processos de recebimento, indução do tumor e tratamento, os animais foram eutanasiados e tiveram sangue, tumor e órgãos coletados para a realização dos ensaios pretendidos. Os animais com tumor induzido que não desenvolveram o melanoma foram tratados e tiveram suas amostras processadas, porém, não tiveram seus dados considerados para esta pesquisa.

Os flavonoides livres foram solubilizados/suspensos em TCM. O veículo empregado como controle foi o mesmo óleo. As concentrações escolhidas para o ensaio são as concentrações máximas de flavonoides nanoencapsulados que poderiam ser administradas por gavagem, utilizando-se o volume máximo de administração possível para esta via.

3.2.2 Preparação das suspensões de nanocápsulas

O método utilizado para a fabricação das suspensões de nanocápsulas de núcleo oleoso foi a deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). Para a preparação das suspensões de nanocápsulas, preparou-se, em um béquer, a fase orgânica (FO), que continha o polímero Eudragit® RS 100 e óleo (TCM), em acetona, mantida sob agitação em banho-maria à temperatura de 40°C, até completa solubilização. Em seguida, adicionou-se o flavonoide (quercetina ou crisina) à fase orgânica, deixando-a sob agitação (40°C por 10 minutos). Uma fase aquosa também foi preparada, composta por PVA, como estabilizante da formulação, e água destilada, a qual foi levada a chapa de aquecimento, sob agitação, até a solubilização do PVA.

Após a adição da fase orgânica à fase aquosa (FA), com auxílio de um funil, sob agitação moderada, ocorreu imediatamente a formação das nanocápsulas, sendo a mistura mantida em agitação por 10 minutos. Em seguida, através de um evaporador rotatório e balão de fundo redondo âmbar, procedeu-se a evaporação da acetona e parte da água, à 40°C, ajustando-se a concentração dos flavonoides nas suspensões finais. As formulações (Tabela 1) foram preparadas em triplicata e armazenadas em frascos de vidro, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz.

Tabela 1 - Composição quali-quantitativa das suspensões de nanocápsulas para a preparação de 25 mL de formulação.

Composição	NCB	NCC	NCQ
		(0,75mg/mL de Crisina)	(0,75mg/mL de Quercetina)
<i>Eudragit® RS 100</i>	0,25 g	0,25 g	0,25 g
FO <i>TCM</i>	0,75 g	0,75 g	0,75 g
<i>Acetona*</i>	132 mL	132 mL	132 mL
<i>Flavonoide**</i>	0,00 g	0,01875 g	0,01875 g
FA <i>PVA</i>	1,125 g	1,125 g	1,125 g
<i>Água***</i>	132 mL	132 mL	132 mL

NCB – suspensão de nanocápsulas sem flavonoide; NCC – suspensão de nanocápsulas contendo crisina; NCQ - suspensão de nanocápsulas contendo quercetina.

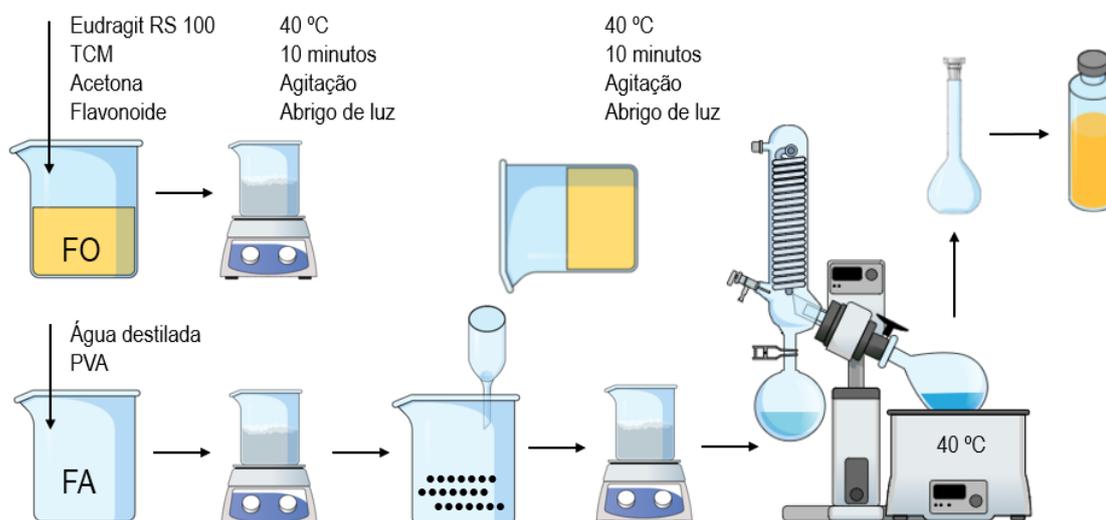
*Evaporada ao final da preparação;

**Massa ajustada conforme pureza/teor da matéria-prima.

***Concentrada ao volume final de 25mL;

Na Figura 8, é representado o processo de fabricação das suspensões de nanocápsulas. As nanocápsulas brancas foram preparadas conforme descrito, apenas não adicionando flavonoide na FO, para fins comparativos e analíticos.

Figura 8 – Esquema do processo de produção das suspensões de nanocápsulas.



Fonte: adaptado de mindthegraph.com.

As nanocápsulas de núcleo oleoso desenvolvidas foram preparadas em lotes com volumes finais de 10 mL (pré-formulação) ou 25 mL (estudos definitivos), na concentração de 0,75 mg/mL de composto ativo. A composição quali-quantitativa das formulações está descrita na Tabela 1.

Previamente à otimização da formulação em relação à quantidade de PVA e de composto ativo, preparou-se suspensões de nanocápsulas contendo diferentes concentrações de PVA (1,0; 2,5; 3,0; 4,0; 4,5 e 5,0%) e de flavonoide (0,75 e 1,00 mg/mL). Testou-se também a substituição do PVA por polissorbato 80 a 1,0 %, como fórmula alternativa, para fins comparativos.

3.2.3 Métodos analíticos e validação da metodologia

Dois métodos analíticos diferentes, mas similares, foram empregados para as análises de nanocápsulas de crisina e de quercetina. Para a validação dos métodos, empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), levou-se em consideração a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 166 de 24 de Julho de 2017 (ANVISA/MS, 2017).

Os parâmetros analisados para avaliar se os métodos atendem aos requisitos necessários para seu uso pretendido foram: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e recuperação (exatidão).

Na avaliação da especificidade dos métodos, foram realizadas análises de pureza dos picos e comparação entre cromatogramas das suspensões de nanocápsulas dos flavonoides e suspensão de nanocápsulas brancas, empregando-se os respectivos métodos, com o objetivo de avaliar se os demais constituintes das formulações poderiam estar sofrendo sobreposição ao pico do analito e, portanto, interferindo ou não na determinação dos flavonoides.

Para o estudo da linearidade dos métodos, em 3 dias diferentes, foram preparadas duas soluções padrão em metanol, uma contendo 1,0 mg/mL de crisina e outra 1,0 mg/mL de quercetina. Foram realizadas diluições dessas soluções para alcançar as concentrações empregadas nas curvas analíticas: 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL.

Os dados foram avaliados por regressão linear, empregando-se o método dos mínimos-quadrados. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados a partir da média das 3 curvas para cada flavonoide e empregando-se as equações a seguir, onde DP é o desvio padrão do intercepto e IC é a inclinação da curva analítica:

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{IC} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad \text{Equação 2}$$

A precisão dos métodos foi avaliada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (interdias). Foram preparadas as extrações das suspensões de nanocápsulas de crisina (n=6) e quercetina (n=6), com concentração teórica final de 6,0 µg/mL em metanol, em dois dias diferentes, analisadas e avaliadas em termos de repetibilidade e precisão intermediária dos resultados, expressos como média ± desvio padrão e desvio padrão relativo (DPR% = desvio padrão/média X100).

Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos empregados nas análises de teor e de eficiência de encapsulamento das suspensões de nanocápsulas contendo crisina e quercetina.

Parâmetros	Crisina	Quercetina
Coluna	C ₁₈ – 150 x 4,5 mm; 5µm, 110 Å	
Pré-coluna	C ₁₈ – 4 x 3 mm	
Vazão	1 mL/min	
Volume de injeção	20 µL	
Comprimento de onda	266 nm	373 nm
Tempo de corrida	9 minutos	6 minutos
Fase Móvel	H ₃ PO _{4(aq)} 0,1% (50%) Acetonitrila (50%)	H ₃ PO _{4(aq)} 0,1% (50%) Acetonitrila (40%) Metanol (10%)

Foi realizado ensaio de recuperação dos fármacos, o que fornece informação sobre a exatidão dos métodos. O ensaio ocorreu através da adição de solução padrão metanólica de cada flavonoide a volume de 1,0 mL de suspensão de nanocápsulas brancas, mimetizando a análise da formulação contendo princípio ativo, e procedendo-se todo o processo de extração e análise cromatográfica no nível de concentração final teórica de 6,0 µg/mL.

3.2.4 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas

Para os ensaios de caracterização dos sistemas nanoparticulados, foram produzidos e avaliados um lote de suspensão de nanocápsulas brancas e três lotes (25 mL) de suspensões de nanocápsulas contendo os flavonoides (0,75 mg/mL).

Após a preparação, os sistemas foram caracterizados considerando os seguintes parâmetros: aspectos macroscópicos, pH, tamanho médio de partículas (Zetasizer® e Mastersizer®), distribuição de tamanho de partículas (polidispersão - Pdl e span), potencial zeta, teor e eficiência de encapsulamento (EE%).

3.2.4.1 Avaliação macroscópica

As suspensões de nanocápsulas foram submetidas à inspeção visual para avaliação da cor, homogeneidade e a presença ou não de precipitados. Ainda, durante a manipulação das suspensões, foi possível avaliar seu odor.

3.2.4.2 Determinação do pH

A determinação do pH de cada suspensão de nanocápsulas foi realizada com potenciômetro digital calibrado (soluções tampão de pH 4,00 e 7,00) pela simples imersão do eletrodo nas formulações, em temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

3.2.4.3 Determinação do tamanho de partícula, distribuição de tamanho e potencial zeta

O perfil granulométrico dos sistemas foi determinado empregando difração a laser (Mastersizer®), diluindo as amostras em água destilada até atingir a obscuração necessária, empregando o índice de refração 1,38 referente ao Eudragit® RS100 (CONTRI *et al.*, 2014).

O diâmetro médio das nanoestruturas em suspensão foi avaliado também utilizando Zetasizer® (espalhamento de luz dinâmico/espectroscopia de correlação de fótons), após a diluição em água ultrapura (1:500 v/v).

A avaliação da homogeneidade de distribuição de tamanho de partículas foi realizada pelos parâmetros fornecidos pelos analisadores Zetasizer® e Mastersizer®, como o índice de polidispersão (Pdl) e span, respectivamente.

O potencial zeta foi determinado em Zetasizer®, através de mobilidade eletroforética de uma diluição 1:500 (v/v) das suspensões em NaCl 10mM a 25 °C.

3.2.4.4 Determinação do teor e eficiência de encapsulamento (EE%)

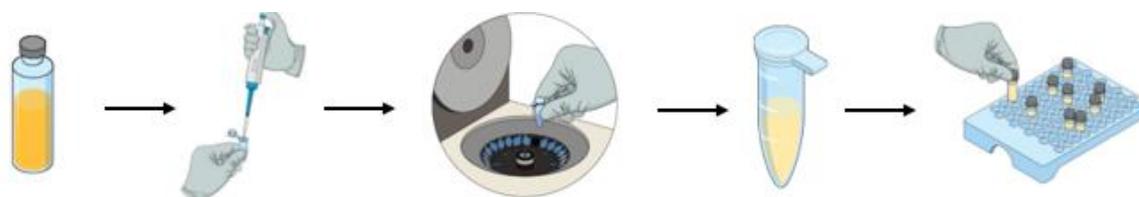
O teor e eficiência de encapsulamento dos compostos nas suspensões de nanocápsulas se deu por CLAE/UV – DAD, com integração automática das áreas dos picos pelo programa Shimadzu LC solution software, empregando as condições descritas anteriormente (Tabela 2).

Para a análise do teor total, em razão da constituição das nanocápsulas (PVA), a extração dos flavonoides, a partir destas, precisou ser realizada em duas etapas: uma extração hidroalcoólica com Metanol (MeOH) e água ultrapura (H₂O UP) na proporção 1:1, seguida por extração alcoólica com MeOH (100%). A extração foi realizada de forma que a concentração final teórica de flavonoide na solução a ser injetada no cromatógrafo fosse 6,0 µg/mL, correspondente ao ponto médio da curva analítica adotada (2,0 – 10,0 µg/mL).

Para iniciar a extração, homogeneizou-se as suspensões (0,75 mg/mL de flavonoide), de onde foi pipetado 1,0 mL, em um primeiro balão âmbar de 10 mL, adicionou-se uma barra para agitação magnética e solvente (metanol: água ultrapura 1:1 v/v). Deixou-se o balão agitando por 15 minutos e então o mesmo foi levado para banho de ultrassom por 30 minutos. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, o agitador magnético foi retirado e o volume do balão completado com solução de metanol e água ultrapura (1:1 v/v). Foram, na sequência, pipetados 800 µL da solução do balão anterior para um segundo balão âmbar de 10 mL, ao qual foi adicionado metanol, levado para o ultrassom por 15 minutos e, após atingir a temperatura ambiente, seu volume foi ajustado com metanol. Após ajuste o conteúdo do balão foi centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm, para a remoção de quaisquer resíduos sólidos provenientes da formulação. Então, a solução foi filtrada em membrana (0,45 µm) para um *vial* e então injetada no cromatógrafo.

Para a determinação da eficiência de encapsulamento (quantidade de ativo que permanece na estrutura das nanocápsulas), as suspensões foram submetidas à técnica de ultrafiltração–centrifugação. Para isso, 300 µL das suspensões contendo os ativos foram adicionados aos dispositivos (Amicon® Ultra 10.000 MW; Millipore), centrifugados por 10 minutos a 7.000 rpm, obtendo-se assim o ultrafiltrado, onde se encontraria o flavonoide livre (não associado às nanocápsulas) presente na fase aquosa, conforme Figura 9.

Figura 9 – Ilustração do processamento das amostras para determinação da EE%.



Fonte: adaptado de mindthegraph.com.

A determinação da eficiência de encapsulamento dos ativos se dá pela diferença entre a concentração total (suspensão) e a sua concentração livre (ultrafiltrado), conforme a equação a seguir:

$$EE = \frac{\text{teor total} - \text{teor livre}}{\text{teor total}} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

3.2.5 Estabilidade das suspensões de nanocápsulas

3.2.5.1 Estabilidade durante o armazenamento

As suspensões de nanocápsulas foram armazenadas em frascos de vidro âmbar, à temperatura ambiente, durante duas semanas. Os parâmetros utilizados para as análises de caracterização foram reavaliados para as mesmas suspensões de nanocápsulas NCB (n=1), NCC (n=3) e NCQ (n=3), no tempo 0, 7 e 14 dias, exceto EE%. Assim, mudanças que possam ocorrer durante o armazenamento das suspensões de nanocápsulas e que inviabilizariam sua aplicação no experimento, por alteração das suas propriedades físico-químicas, foram estudadas.

3.2.6 Ensaios *in vitro* empregando as suspensões de nanocápsulas

3.2.6.1 Ensaio de citotoxicidade in vitro com células RAW 264.7

Neste ensaio, empregou-se cultura de células RAW 264.7 (macrófagos murinos) e seguiu-se a mesma metodologia empregada no ensaio com células B16F10 (detalhada a seguir), com a diferença do meio de cultura utilizado ter sido o RPMI 1640 para células RAW 264.7 (MOSMANN, 1983).

3.2.6.2 Ensaio de citotoxicidade in vitro contra células B16F10

Para este ensaio, empregou-se células de melanoma murino B16F10, a mesma linhagem de células utilizadas na indução do melanoma no modelo animal utilizado nesta pesquisa.

A semeadura das células aconteceu em placa de 96 poços com fundo chato, pela adição de 200 µL de suspensão de células em meio DMEM contendo 1×10^4 células por poço. A placa foi mantida em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas para adesão das células. Após esse período, o meio foi retirado e adicionou-se novo meio às células contendo os tratamentos em triplicata, as células foram incubadas com as suspensões de nanocápsulas NCB, NCC e NCQ, crisina e

quercetina livres (1,25; 2,5; 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$), controle positivo (H_2O_2 100mM) e controle não tratado (meio de cultura + células). Após adição do tratamento no meio as placas foram novamente dispostas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 , por 24 e 48 horas. Após esse período, o meio foi removido e foi adicionado aos poços 20 μL do reagente MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5- difenil tetrazólio] diluído em PBS 1x conforme metodologia estabelecida (MOSMANN, 1983).

Depois de 3 horas, novamente retirou-se o sobrenadante dos poços nos quais foram então adicionados 200 μL de DMSO para solubilizar o produto da reação anterior. A absorbância da solução nos poços foi determinada em leitor de placas em comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade das células foi expressa como porcentagem das células controle não tratadas (100%).

3.2.7 Modelo experimental *in vivo* de melanoma murino

3.2.7.1 Indução do melanoma nos camundongos

A indução de melanoma nos camundongos se deu pela inoculação subcutânea de suspensão de células B16F10 a $1,2 \times 10^5$ cel/mL na região dorsal dos animais. O cultivo das células B16F10, mantidas em ultra-freezer -80°C , foi realizado em monocamada com uso do meio DMEM (*Dulbecco modified of Minimum Essential Media*), com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de penicilina/estreptomicina.

Após a cultura atingir aproximadamente 80% de confluência em diversas garrafas de cultivo celular, as células foram soltas mecanicamente e ressuspendidas, centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em meio novo. A suspensão de células teve sua concentração ajustada após contagem de células viáveis em câmara de Neubauer, com emprego de solução de azul de tripan. Foram utilizados 100 μL da suspensão a $1,2 \times 10^5$ cel/mL para injeção na região do dorso dos animais, como representado na Figura 10.

Figura 10 – Ilustração da indução do melanoma na região dorsal dos animais.



Fonte: mindthegraph.com.

Dez dias após a inoculação da suspensão, foram realizadas avaliações dos animais para verificar o desenvolvimento do câncer, evidenciado por protuberância localizada na região dorsal dos animais induzidos (OVERWIJK; RESTIFO, 2001).

Após esse período, os camundongos receberam o tratamento durante 14 dias, com quercetina ou crisina, nas suas formas livres e nanoencapsuladas, por via oral (gavagem), na dose de 7,5 mg/kg, conforme os grupos descritos anteriormente. Ao final do período de tratamento, os animais foram eutanasiados e tiveram seus órgãos, tumor e sangue coletados para as análises a serem realizadas.

3.2.8 Atividade enzimática da adenosina desaminase (ADA) em soro

Para a coleta das amostras de soro, ao final do período de tratamento, os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória com isoflurano e foram eutanasiados através de exsanguinação por punção cardíaca. O sangue coletado foi acondicionado em microcubos com gel separador e ativador de coágulo. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3.500 rpm para obtenção do soro empregado nas análises. O soro dos animais foi acondicionado em outro microtubo identificado e congelado (-20 °C) para a realização do ensaio enzimático.

A atividade da ADA foi analisada conforme protocolo descrito por Giusti e Galanti (1984) baseado na liberação de amônia por ação da ADA na presença de excesso de substrato (adenosina) (GIUSTI; GALANTI, 1984) empregando espectrofotometria, com leitura em 630nm. A atividade da ADA foi expressa em ηmol de NH_3 liberado por minuto para o volume de soro ($\eta\text{mol NH}_3/\text{min/mL}$).

3.2.9 Análise estatística

O programa G*Power Data Analysis foi utilizado para determinar o número de animais em cada grupo. Os resultados referentes à caracterização e estabilidade das suspensões de nanocápsulas foram expressos como a média \pm desvio padrão. A análise estatística dos resultados de caracterização e estabilidade das suspensões de nanocápsulas foi realizada através análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey (GraphPad Prism® 5). Os resultados dos ensaios de atividade antitumoral, citotoxicidade e atividade enzimática foram expressos por média \pm erro padrão médio (SEM) e a análise estatística empregou ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni (GraphPad Prism® 5). Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

Assim que preparadas, as suspensões de nanocápsulas brancas e contendo flavonoide, crisina ou quercetina, foram avaliadas macroscopicamente para observar a presença de precipitados ou grumos e alteração da coloração usual de cada suspensão. Todas as suspensões apresentavam aspecto leitoso, opaco e bastante fluido, sem a presença de grumos ou precipitados (Figura 11), após a preparação, conforme a composição da Tabela 1 pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1989), empregando 0,075% (p/v) de flavonoide, 1,0% (p/v) de polímero, 3,0% (p/v) de óleo e 4,5% (p/v) de estabilizante PVA.

Cabe evidenciar que a combinação Eudragit® RS100 e triglicerídeos de cadeia média (TCM) é adequada à preparação de nanocápsulas, uma vez que Santos e colaboradores (2013) verificaram que filmes preparados com esse polímero não sofrem alteração (inchamento ou dissolução) devido ao contato com esse óleo, sendo apropriada para a formação da estrutura núcleo-casca que caracteriza esses sistemas reservatórios (SANTOS *et al.*, 2013).

A suspensão de nanocápsulas sem flavonoide (NCB) apresentou coloração branca com reflexo azulado (*efeito Tyndall*), típico de sistemas coloidais (XIAO *et al.*, 2019). As suspensões de nanocápsulas contendo crisina (NCC) apresentaram uma coloração amarelo pálido e as suspensões de nanocápsulas contendo quercetina (NCQ) apresentaram uma coloração amarela mais pronunciada (Figura 8).

Figura 11 - Aspecto macroscópico das suspensões de nanocápsulas de Eudragit® RS100 desenvolvidas (NCQ, NCC e NCB, respectivamente).



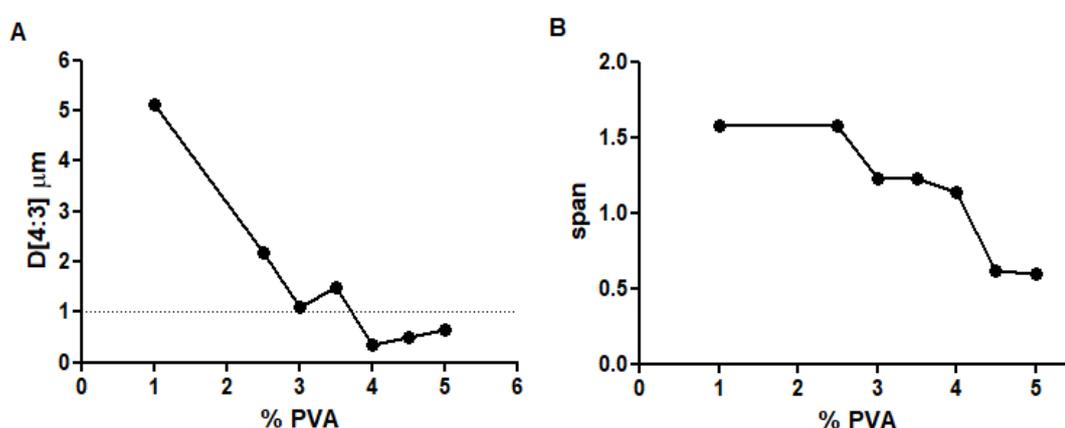
Fonte: próprio autor.

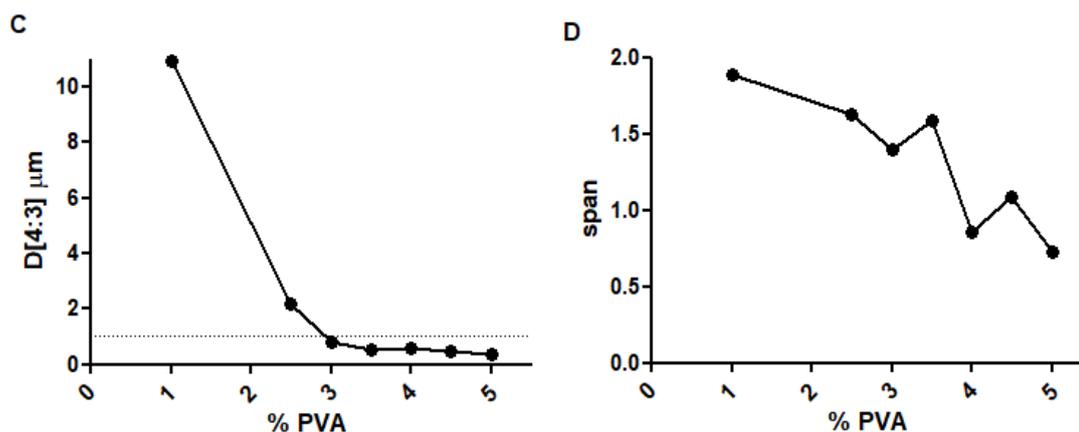
Ressalta-se que a otimização da formulação em relação ao tamanho de partículas, para chegar à sua composição final (Tabela 1), envolveu o emprego de diferentes concentrações de PVA (1,0; 2,5; 3,0; 4,0; 4,5 e 5,0% p/v) e dos ativos crisina e quercetina (0,75 e 1,0 mg/mL). A concentração máxima de 4,5% de PVA, como aditivo alimentar ou coadjuvante de tecnologia, é autorizada pela ANVISA para uso em suplementos alimentares (como realçador de sabor), conforme RDC N° 239, de 26 de Julho de 2018 (ANVISA/MS, 2018).

Os experimentos iniciaram com 5% de PVA (p/v) na composição, já apresentando bons resultados quanto ao tamanho e distribuição de tamanho de partículas. Entretanto, testou-se concentrações mais baixas, para verificar a possibilidade de enquadramento na resolução acima, no sentido de manter a faixa nanométrica e homogeneidade do sistema nanoestruturado.

Observou-se que (Figura 12) com o aumento da concentração de PVA no sistema, menores eram os diâmetros de partículas e mais homogêneo era o sistema, o que pode ser evidenciado, respectivamente, pelos parâmetros D[4:3] e span, fornecidos pelo analisador Mastersizer®, tanto para a otimização das suspensões de nanocápsulas de quercetina quanto de crisina. Esses resultados foram encontrados em outras pesquisas com o emprego deste estabilizante na formulação (MU; ZHONG, 2006; SAHOO *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2008).

Figura 12 - Gráficos demonstrando o comportamento das suspensões de nanocápsulas contendo flavonoides em função da concentração de PVA (**A e C**: diâmetro médio relativo a volume D[4:3] para NCQ e NCC, respectivamente; **B e D**: valores de span para NCQ e NCC, respectivamente). A linha em A e C indica o limite máximo ideal para o parâmetro.





Com base nesses dados, evidenciou-se a importância da concentração de PVA, notando-se que somente a partir de 3,0 - 4,0 % de estabilizante foi possível a obtenção de sistemas coloidais. Em razão disso, decidiu-se pela utilização da concentração de 4,5% de PVA, ficando em conformidade com a legislação atual brasileira de aditivos alimentares, em suplementos. Ainda, observou-se nas formulações com menor quantidade de PVA a menor estabilidade do sistema pelo aumento da facilidade de precipitação das nanocápsulas com o passar do tempo.

É importante mencionar também que, sobre a concentração dos princípios ativos, testou-se 0,75 e 1,00 mg/mL. Nesta etapa, evidenciou-se que a suspensão de nanocápsulas de quercetina a 1,00 mg/mL (5,0% de PVA) manteve parâmetros relativos a diâmetro médio e de distribuição de tamanho de partículas adequados ($D_{[4:3]}$ 0,637 µm; span 0,595; $D_{(90)}$ 0,837 µm; diâmetro médio 515 nm; Pdl 0,188), ao passo que a suspensão de nanocápsulas de crisina passou a apresentar partículas fora da faixa nanométrica quando analisados por difração a laser (dados não mostrados). Selecionou-se, assim, a concentração de 0,75 mg/mL para a comparação dos sistemas.

Cabe relatar, ainda, que não foi necessária a adição de um tensoativo de baixo EHL (ex: monooleato ou monoestearato de sorbitano) para auxiliar na estabilização dos sistemas, na formulação desenvolvida com PVA. O emprego desses tensoativos é usual no desenvolvimento de nanocápsulas (CHASSOT *et al.*, 2014; OURIQUE *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2013, 2014). CONTRI e colaboradores (2014) também não empregaram tensoativo de baixo EHL ao prepararem nanocápsulas de Eudragit® RS100 contendo capsaicina, estabilizadas somente com polissorbato 80 (CONTRI *et al.*, 2014).

Ainda, em relação à otimização da formulação em função do tamanho de partículas, testou-se a substituição do PVA por polissorbato 80 (1,0%), tensoativo usual na preparação de nanocápsulas (OURIQUE *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2013, 2014; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003, 2008, 2006).

Avaliou-se as suspensões de concentração de 0,75 mg/mL de flavonoides, em analisador por difração a laser, e os resultados apresentaram ampla distribuição de partículas com presença de micropartículas. Houve a formação de precipitados rapidamente, após a preparação, e a diminuição dos teores (< 85%) quando comparadas à formulação final estabelecida com PVA. Após a preparação das formulações otimizadas, inspeção visual e armazenamento das suspensões em frascos âmbar, estas foram direcionadas para as demais avaliações, em triplicata, que são apresentadas a seguir, após a validação da metodologia analítica.

4.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

Inicialmente, procurou-se utilizar para as análises de teor de quercetina a metodologia previamente descrita para a análise cromatográfica de crisina, devido às semelhanças estruturais dos dois flavonoides (DMITRIENKO *et al.*, 2012). Porém, as condições cromatográficas do método da crisina, apesar de fazer com que a quercetina eluísse com aproximadamente 2 minutos de corrida, faziam com que a presença de picos próximos ao pico da quercetina tivessem influência na pureza do mesmo. Essa impureza estava presente em outra quercetina analisada (Sigma), o que reforçou a ideia de impureza relativa ao processo de obtenção do flavonoide. Em razão disso, estudou-se outras condições cromatográficas para a realização das análises de quercetina que afastassem o pico do flavonoide dos picos das impurezas.

Vale salientar que os picos das impurezas não só estavam presentes após a extração da quercetina das nanocápsulas como também eram detectados nas análises da substância pura, como nas curvas de calibração. Ainda, os picos destas impurezas não se faziam presentes nos cromatogramas onde se avaliou a suspensão de nanocápsulas brancas, empregando a mesma extração e metodologia analítica.

Assim, o método para análise da crisina (Tabela 2) emprega pré-coluna e coluna com octadecilsilano (C₁₈) de 4 e 150 mm, respectivamente, vazão de 1 mL/min., volume de injeção de 20 µL, comprimento de onda de análise de 266 nm e fase móvel constituída de solução ácida a 0,1% de H₃PO₄ (50%) e acetonitrila (50%).

Para as análises da quercetina, necessitou-se, portanto, da modificação das condições cromatográficas, conforme relatado acima. Antes de modificar as condições cromatográficas, procurou-se diminuir as concentrações das curvas com a finalidade de tentar reduzir a concentração da impureza a níveis não detectáveis ou suficientes para que esta não tornasse o pico impuro. No entanto, isso não foi suficiente, e, por vezes, o pico continuava tendo impurezas.

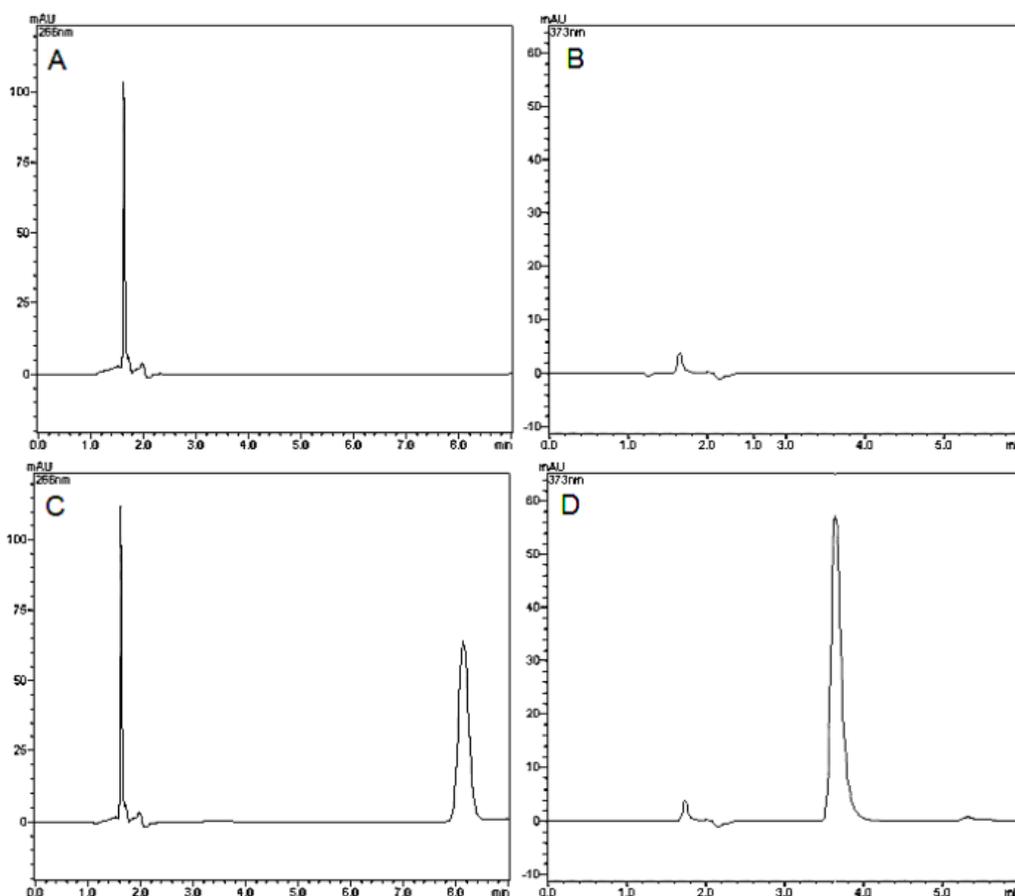
Apesar de algumas vezes a impureza do pico ser detectada nos estudos de linearidade e da sua presença não interferir na linearidade, decidimos modificar os parâmetros cromatográficos usados a fim de separar os picos próximos do pico da quercetina.

Além disso, diferentes vazões, comprimentos de coluna, pHs, proporções dos constituintes e a adição de outros solventes à fase móvel foram testados, considerando ajustar a fase móvel e a extração dos flavonoides. Depois de todos esses testes, optou-se por empregar a mesma coluna cromatográfica, mesma vazão da fase móvel, mas com diferente constituição e diferente comprimento de onda para a quantificação dos compostos ativos. Assim, o método cromatográfico para análise da quercetina empregava pré-coluna e coluna com octadecilsilano (C₁₈) de 4 e 150 mm, respectivamente, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL, comprimento de onda de análise de 373 nm e fase móvel constituída de solução ácida a 0,1% de H₃PO₄ (50%), acetonitrila (40%) e metanol (10%).

Os ensaios de validação do método da quercetina, assim como a reavaliação do método da crisina, foram conduzidos a fim de verificar a aplicabilidade destes ao que se propõem (doseamento destes flavonoides nas suspensões de nanocápsulas desenvolvidas) e foram avaliados pelos parâmetros que seguem.

A especificidade do método analítico demonstra a capacidade deste de detectar a presença do analito de interesse sem a interferência dos demais constituintes da formulação. A análise deste parâmetro é possível através da sobreposição dos cromatogramas das suspensões de nanocápsulas branca e destes contendo os analitos (Figura 13), onde no cromatograma da NCB (no tempo de retenção do analito) não deve haver nenhum pico que possa coeluir com o pico do analito, o que pode ser avaliado também pela pureza do pico, fornecida pelo detector.

Figura 13 - Comparação entre cromatogramas das nanocápsulas brancas (A e B) e das nanocápsulas de crisina (C) e quercetina (D) analisados pelos seus respectivos métodos.



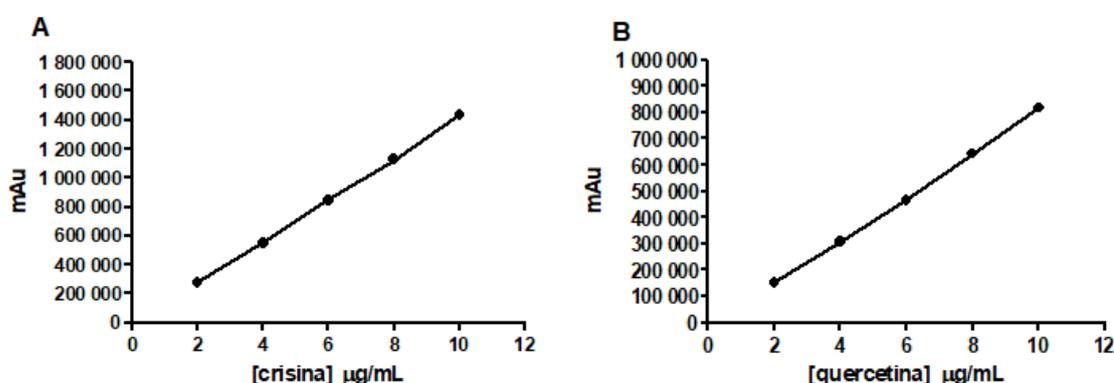
Os cromatogramas A e B (Figura 13) não apresentaram picos eluídos nos tempos de retenção da crisina (~ 8,15 min; C) ou da quercetina (~ 3,64 min; D). O detector também não indicou a presença de impurezas nos picos da crisina e quercetina no emprego dos respectivos métodos para cada flavonoide (índices de pureza > 0,9999). Sendo assim, ambos os métodos apresentam especificidade adequada para a identificação e quantificação destes compostos. Pode-se notar no final do cromatograma D a presença dos prováveis picos que interfeririam na determinação da quercetina quando mantidas as mesmas condições cromatográficas de análise da crisina. Com o emprego do novo método, para a análise da quercetina, os picos foram afastados do principal e não interferiram mais no sinal.

Para os dois métodos analíticos, a faixa de trabalho estabelecida foi de 2,0 – 10,0 µg/mL, tendo as curvas 5 pontos (2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados pelas equações 1 e 2.

A curva analítica (n=3; Figura 14 A) para o método da crisina é representada pela equação $y = 144.797x - 2.1828$ e apresenta coeficiente de correlação linear de 0,9997. O limite de detecção calculado foi de 0,5 µg/mL e o de quantificação 1,5 µg/mL.

Para o método da quercetina, a curva analítica (n=3; Figura 14 B) é representada pela equação $y = 83.435x - 23.649$ com coeficiente de correlação linear de 0,9991. O limite de detecção calculado foi de 0,2 µg/mL e o de quantificação 0,6 µg/mL.

Figura 14 - Curvas analíticas dos métodos para quantificação de crisina (A) e quercetina (B).



Assim, ambos os métodos são lineares na faixa de trabalho estabelecida, apresentando coeficientes de correlação $> 0,999$ e regressão linear significativa ($p < 0,05$; ANOVA), bem como são sensíveis o suficiente para detectar e quantificar os analitos nessa faixa de concentrações.

Os resultados dos testes para avaliação da precisão dos métodos de análise encontram-se nas Tabelas 3 e 4. Considerando os baixos valores de DPR ($< 2,0\%$), verifica-se que ambos os métodos são precisos o suficiente para o desenvolvimento dos sistemas propostos nesse trabalho.

Tabela 3 - Resultados dos testes de precisão para quantificar crisina em NCC.

Amostra NCC	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Teor (%)	DPR (%)
Dia 1 (n=6)	6,00	5,99 ± 0,05	99,95 ± 0,77	0,77
Dia 2 (n=6)	6,00	5,97 ± 0,07	99,51 ± 1,16	1,17
Inter-dias (n=12)	6,00	5,98 ± 0,06	99,73 ± 0,97	0,97

Tabela 4 - Resultados dos testes de precisão para quantificar quercetina em NCQ.

Amostra NCQ	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	DPR (%)
Dia 1 (n=6)	6,00	5,99 \pm 0,07	99,98 \pm 1,13	1,13
Dia 2 (n=6)	6,00	6,02 \pm 0,03	100,34 \pm 0,52	0,52
Inter-dias (n=12)	6,00	6,01 \pm 0,05	100,17 \pm 0,86	0,85

O teste realizado para avaliar a exatidão dos métodos baseou-se na recuperação da concentração adicionada de padrão à matriz das nanocápsulas (NCB), simulando o mesmo volume de amostra empregado para a análise da extração dos flavonoides das formulações, considerando a concentração de trabalho do método (6,0 $\mu\text{g/mL}$). Na Tabela 5 encontram-se os resultados dos ensaios.

Tabela 5 - Ensaio de exatidão para a quantificação dos flavonoides nas suspensões de nanocápsulas.

	Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
NCC	6,00	6,09 \pm 0,05	101,52 \pm 0,80
NCQ	6,00	6,19 \pm 0,12	103,15 \pm 1,95

A recuperação dos flavonoides, nesse ensaio, foi considerada satisfatória para o fim proposto, sendo os métodos exatos para a determinação dos compostos ativos nas suspensões desenvolvidas.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Para a caracterização físico-química das três diferentes suspensões de nanocápsulas (NCB, NCC e NCQ), após a sua produção, foram avaliados parâmetros como pH, tamanho médio de partículas, distribuição de tamanho de partículas, potencial zeta, teor e eficiência de encapsulamento.

4.3.1 pH e potencial zeta

O pH das 3 diferentes suspensões de nanocápsulas de Eudragit® RS100 foi avaliado diretamente em potenciômetro digital e o potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética, nas amostras diluídas. Os valores contam na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de pH e potencial zeta das suspensões de nanocápsulas.

	NCB (n=1)	NCC (n=3)	NCQ (n=3)
pH	6,35	5,53 ± 0,02	5,68 ± 0,03
Potencial Zeta	0,987	0,99 ± 0,13	0,53 ± 0,08

Todas as formulações apresentaram pH levemente ácido e potencial zeta positivo. As suspensões contendo os flavonoides apresentaram uma acidez superior em comparação com NCB. Esses valores podem ser atribuídos às características químicas dos flavonoides e seu comportamento em meio aquoso (ionização de grupos funcionais). Componentes presentes na interface partículas/água podem influenciar o pH e o potencial zeta dos sistemas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Os valores de pH são compatíveis com a via de administração oral que foi pretendida para as nanocápsulas (CHAN; STEWART, 1996).

Os potenciais zeta das formulações foram positivos e próximos a 1 mV. Valores de potencial zeta próximos a 0 ± 10 mV podem indicar que a suspensão pode ser instável pela maior facilidade de agregação das nanopartículas. Valores de ZP > 10 mV (em módulo), fazem com que a suspensão com essas partículas de mesma carga se mantenha mais estável e homogênea (macroscopicamente). No entanto, o ZP das suspensões depende de outros parâmetros das formulações, especialmente o pH, que por sua vez, pode refletir alterações da estabilidade química dos sistemas nanoestruturados (BHATTACHARJEE, 2016).

Nanocápsulas de Eudragit® RS100, contendo ou não clotrimazol, preparadas com monooleato de sorbitano/polissorbato 80 como tensoativos estabilizadores e TCM como núcleo, também apresentaram valores ácidos de pH (5,0 – 5,2), bem como potencial zeta positivo (12 – 14 mV), devido à natureza catiônica do polímero (SANTOS *et al.*, 2013) o qual contém grupos de amônio quaternário (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Fato semelhante ocorreu quando as mesmas nanocápsulas foram preparadas com óleo de coco como núcleo (pH 5,6-5,7; 13-15 mV;(SANTOS *et al.*, 2014)). No nosso trabalho, a presença de PVA, um estabilizante não iônico, com elevado peso molecular, presente na superfície dos sistemas, reduziu (em módulo) os valores de potencial zeta, promovendo estabilização sobretudo estérica.

4.3.2 Tamanho médio de partícula e distribuição de tamanho

Para avaliar o tamanho médio das partículas e a homogeneidade de distribuição de tamanho, as suspensões de nanocápsulas foram testadas nos analisadores Mastersizer® 3000 E e Zetasizer® Nanoseries Nano-ZS (Malvern Instruments).

Os dois analisadores empregam técnicas diferentes de análise de tamanho de partículas e podem ser usados em conjunto para analisar e confirmar os resultados. Os resultados das análises encontram-se na Tabela 7.

Objetivando confirmar a natureza apenas coloidal das suspensões (KECK; MÜLLER, 2008), análises foram realizadas por difração a laser (Mastersizer®), técnica capaz de detectar uma faixa maior de tamanho de partículas em relação ao Zetasizer®. A partir dos dados gerados, foi possível evidenciar que as suspensões de Eudragit® RS100 desenvolvidas apresentaram-se em uma faixa submicrométrica, com distribuição de tamanho uniforme (span inferiores a 2,0) e unimodal, indicados pelos diâmetros médio em volume ($D_{4:3}$; <700 nm) e D_{90} inferiores a 1,0 μm (FERREIRA *et al.*, 2014).

Tabela 7 - Parâmetros de tamanho e distribuição de tamanho das suspensões de nanocápsulas.

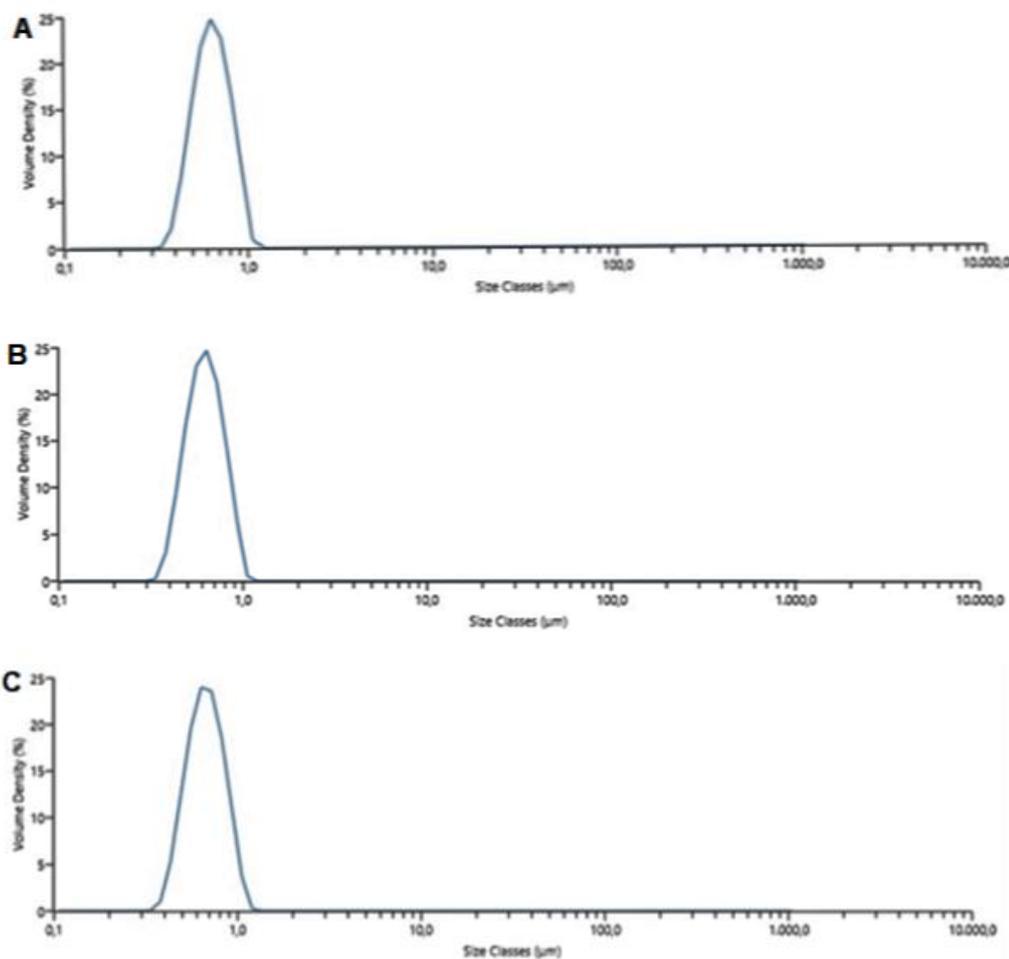
	Parâmetro	NCB (n=1)	NCC (n=3)	NCQ (n=3)
Mastersizer®	D[4:3] μm	0,467	0,469 \pm 0,03	0,696 \pm 0,01
	Span^a	1,089	1,471 \pm 0,07	0,612 \pm 0,01
	D(90)^b μm	0,727	0,665 \pm 0,02	0,919 \pm 0,02
Zetasizer®	Diâmetro médio (nm)	499,3	582 \pm 54	568 \pm 58
	PdI^c	0,222	0,231 \pm 0,07	0,203 \pm 0,08

^aSpan= $d(0,9)-d(0,1)/d(0,5)$, onde $d(0,9)$, $d(0,1)$ e $d(0,5)$ correspondem a 90% (D_{90})^b, 10% e 50% da distribuição cumulativa dos diâmetros, equivalentes ao volume de esferas.

^cÍndice de polidispersão.

A Figura 15 mostra os gráficos de distribuição de tamanho referentes a essas análises. Por esta técnica, as suspensões de nanocápsulas contendo crisina apresentaram diâmetro médio em volume e D_{90} inferiores às de quercetina ($p < 0,05$), entretanto, com distribuição mais ampla (span maior; $p < 0,05$).

Figura 15 - Gráficos de distribuição de tamanho de partículas fornecidos pelo Mastersizer® para as suspensões de nanocápsulas contendo ou não flavonoide (A: NCB; B: NCC; C: NCQ).



Considerando a espectroscopia de correlação de fótons, técnica mais precisa para a faixa coloidal (KECK; MÜLLER, 2008), as suspensões de nanocápsulas apresentaram diâmetro médio também submicrométrico, independentemente da presença ou não de flavonoide. Por esta técnica, os diâmetros médios de partículas foram semelhantes ($p > 0,05$) para os dois flavonoides (568-582 nm), ao contrário do Mastersizer®, essas diferenças podem ser atribuídas aos diferentes princípios de operação dos equipamentos. As suspensões contendo crisina (PDI = 0,23) apresentaram distribuição de tamanho um pouco acima do ideal (PDI inferior a 0,2) mas foi considerada adequada para a via oral, levando-se em conta os baixos valores de span (Span < 1,5) e valores aceitos por outros estudos (DA SILVA *et al.*, 2013; MEHRAVAR; JAHANSHAH; SAGHATOLESLAMI, 2009). A suspensão branca apresentou PDI mais elevado, entretanto baixos valores de span.

4.3.3 Teor dos flavonoides e eficiência de encapsulamento (EE%)

O teor de crisina nas suspensões NCC (n=3), após a preparação, foi de 101,0 ± 0,6%, correspondendo à concentração aproximada de 0,758 mg/mL de flavonoide. Para a formulação NCQ (n=3), o teor de quercetina foi de 99,6 ± 1,21%, o que corresponde a uma concentração aproximada de 0,747 mg/mL. Portanto, os teores totais foram adequados, estando próximos da concentração teórica de flavonoide, indicando que não houve evidência de perdas/degradação ou precipitação dos compostos ativos durante a preparação dos sistemas.

A eficiência de encapsulamento dos flavonoides, nas respectivas suspensões de nanocápsulas, foi alta, maior do que 99%, evidenciando a partição favorável dos compostos às partículas em relação à fase aquosa contínua. Outros trabalhos também tiveram sucesso na encapsulação desses flavonoides, tendo EE>95% (BARRAS *et al.*, 2017; DING *et al.*, 2014; LORENZONI, 2015; WU *et al.*, 2008)

4.4 ESTABILIDADE

As suspensões de nanocápsulas NCB, NCC e NCQ foram armazenadas em frascos âmbar, à temperatura ambiente, durante duas semanas e foram monitoradas por exame macroscópico visual, pH, avaliação de tamanho médio de partícula, distribuição de tamanho, potencial zeta e teor. A formulação sem flavonoide foi acompanhada apenas para fins comparativos, não tendo resultados em triplicata.

4.4.1 Aspectos macroscópicos

Durante o período de armazenamento das formulações (14 dias), estas não apresentaram alterações organolépticas aparentes. Não houve precipitação das nanopartículas, porém, após 14 dias de armazenamento, as NCC passaram a apresentar um leve sedimento com a coloração do flavonoide crisina, sendo que essa deposição aumentou com o passar do tempo.

4.4.2 pH e potencial zeta

O pH das suspensões de nanocápsulas não sofreu alterações significativas em relação ao tempo (Figura 16), tendo apresentado apenas significativa redução do pH quando se incorporava os respectivos flavonoides às formulações, como mostrado anteriormente (Tabela 6).

A manutenção do pH neste período é indicativo de estabilidade físico-química das suspensões de nanocápsulas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Em relação ao potencial zeta (Figura 17), inicialmente próximo a 1,0 mV, com o passar dos dias, esse parâmetro alterou-se significativamente em comparação com os valores iniciais, entretanto, não trouxe prejuízo à estabilidade dos sistemas durante o período analisado.

Figura 16 - Valores de pH das formulações nos ensaios de estabilidade até duas semanas.

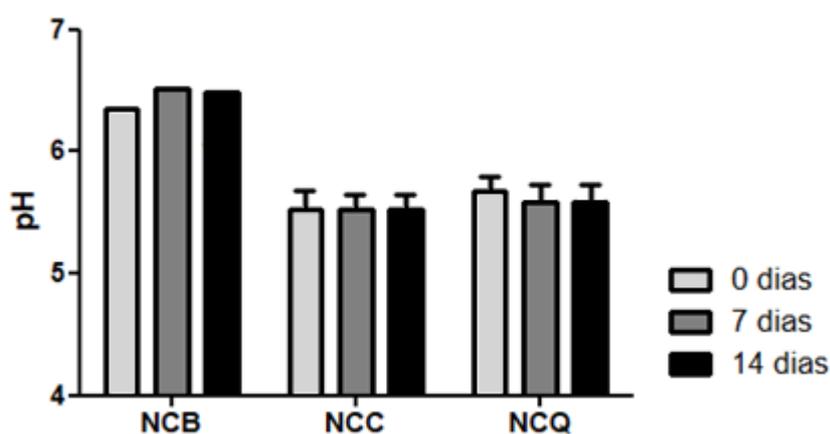
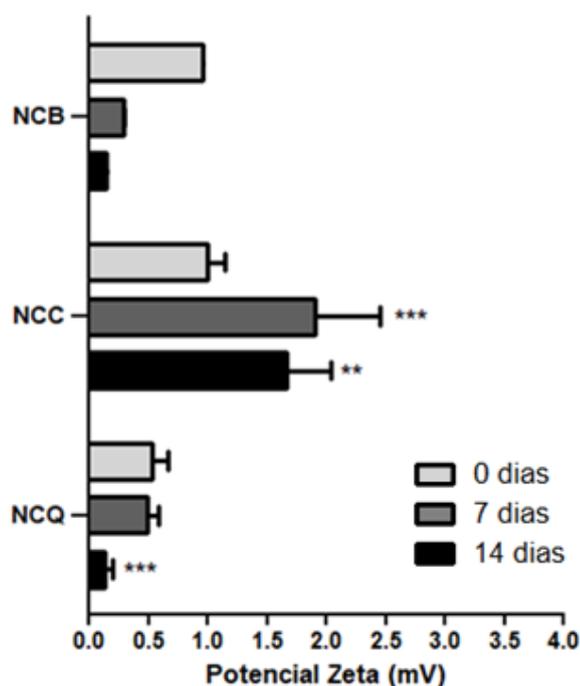


Figura 17 - Valores de potencial zeta para as formulações até duas semanas.



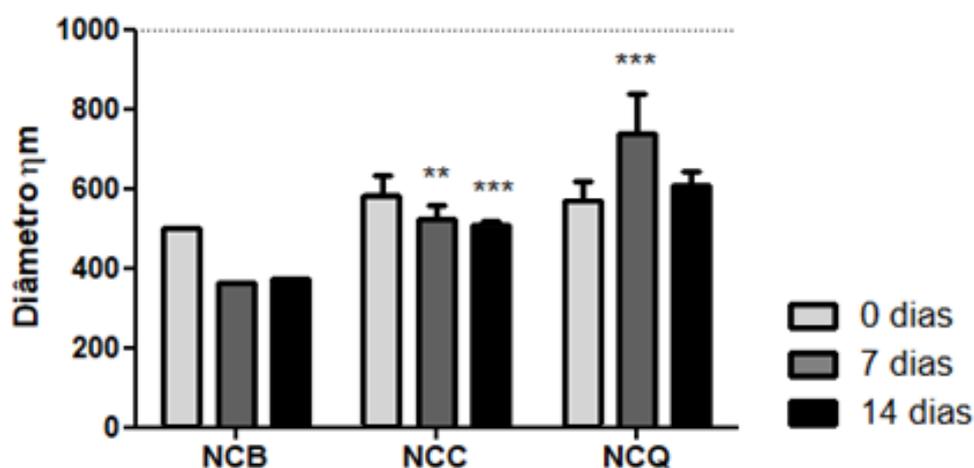
** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) indicam diferença significativa no ZP em relação ao tempo 0 dias.

4.4.3 Tamanho médio de partículas e distribuição de tamanho

Assim como para a caracterização inicial das suspensões de nanocápsulas, as análises de tamanho médio de partículas e de distribuição de tamanho foram realizadas por espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer®) e por difração a laser (Mastersizer®), a fim de se verificar com maior segurança a presença ou não de mistura de tamanho de partículas.

Por espalhamento de luz dinâmico (Figura 18), alterações nos diâmetros médios de partículas das suspensões contendo flavonoide ao longo dos 14 dias foram observadas ($p < 0,05$), mas os tamanhos permaneceram próximos a 600 nm após o período analisado, não se distanciando muito dos valores iniciais, principalmente naquelas contendo flavonoide.

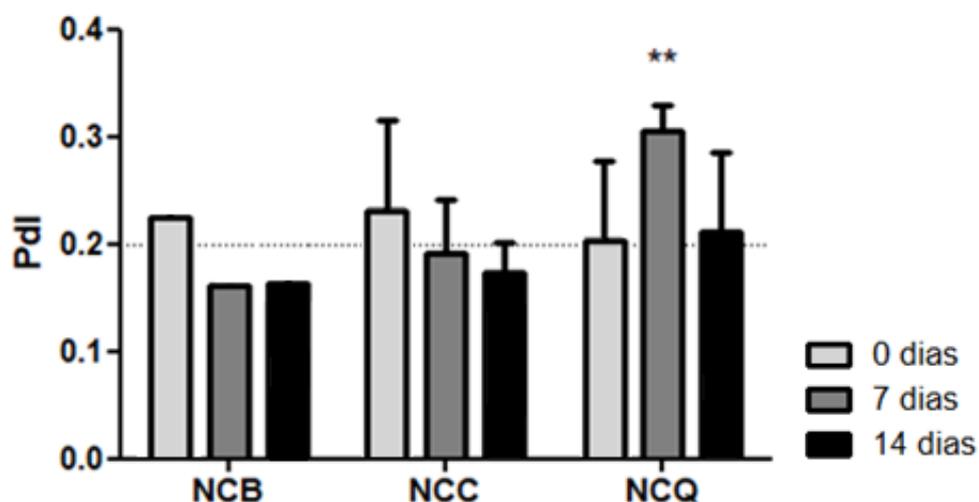
Figura 18 - Tamanho médio de partículas (nanômetros) das suspensões de nanocápsulas analisadas por espalhamento de luz dinâmico. A linha pontilhada indica o limite da faixa nanométrica.



** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) indicam diferença significativa no diâmetro em relação ao tempo 0 dias.

Quanto à distribuição de tamanho das partículas (Pdl; Figura 19), não variou significativamente ao longo dos 14 dias para as suspensões de nanocápsulas, apenas um aumento no tempo de 7 dias para NCQ. Os valores de Pdl mantiveram-se próximos a 0,2 no tempo final do estudo, sendo considerados adequados.

Figura 19 - Distribuição de tamanho por análise de espalhamento de luz dinâmico. A linha pontilhada indica o valor limite considerado ideal para o parâmetro.



** ($p < 0,01$) indica diferença significativa no Pdl em relação ao tempo 0 dias.

Considerando a análise por difração a laser (Figura 20), após os 14 dias de armazenamento, os sistemas permaneceram com diâmetro médio em volume submicrométrico, inferior a $0,600 \mu\text{m}$, confirmando a manutenção da natureza coloidal das formulações, com permanência de homogeneidade de distribuição de tamanho ($\text{span} < 1,5$; Figura 21).

Figura 20 - Tamanho médio de partículas (micrômetros) das suspensões de nanocápsulas analisadas por difração a laser no 14º dia. A linha pontilhada indica o limite da faixa nanométrica.

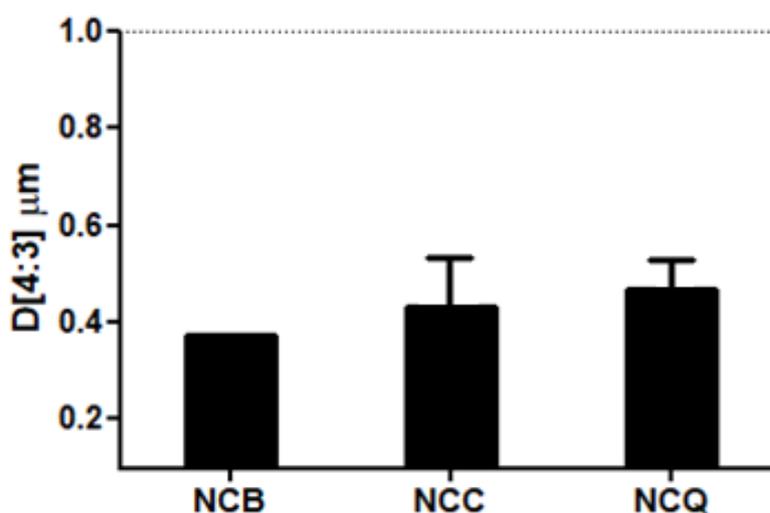
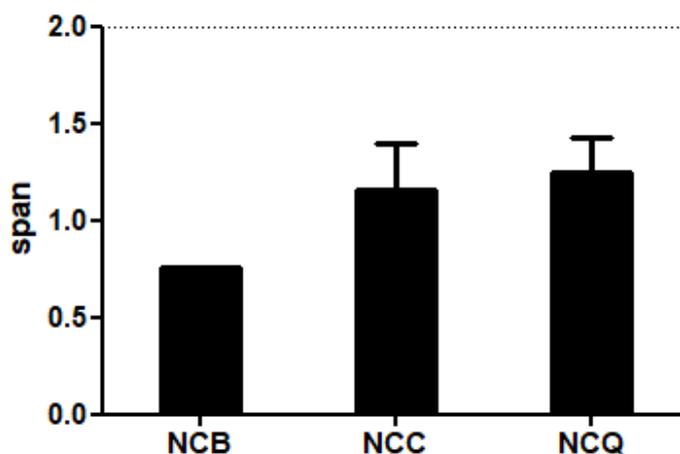


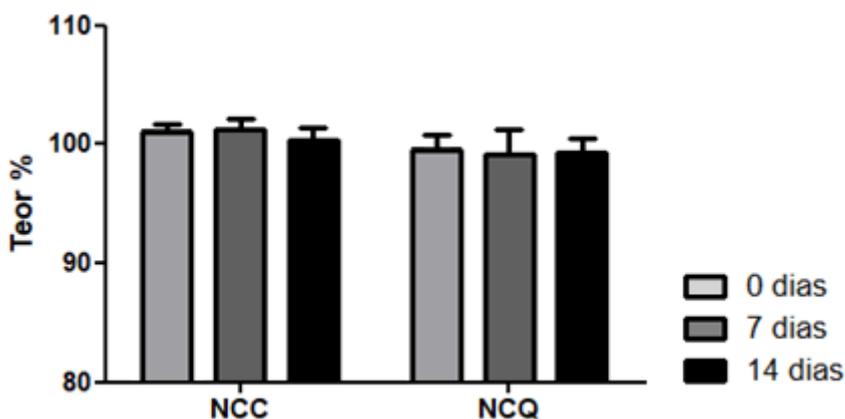
Figura 21 - Distribuição de tamanho por análise de difração a laser. A linha pontilhada indica o valor limite considerado ideal para o parâmetro.



4.4.4 Teor dos flavonoides

Até os 14 dias de armazenamento das formulações, os teores dos flavonoides não variaram significativamente (Figura 22), inclusive para a NCC, que nos 14 dias apresentava um leve sedimento.

Figura 22 - Teores das suspensões de nanocápsulas durante os ensaios de estabilidade.



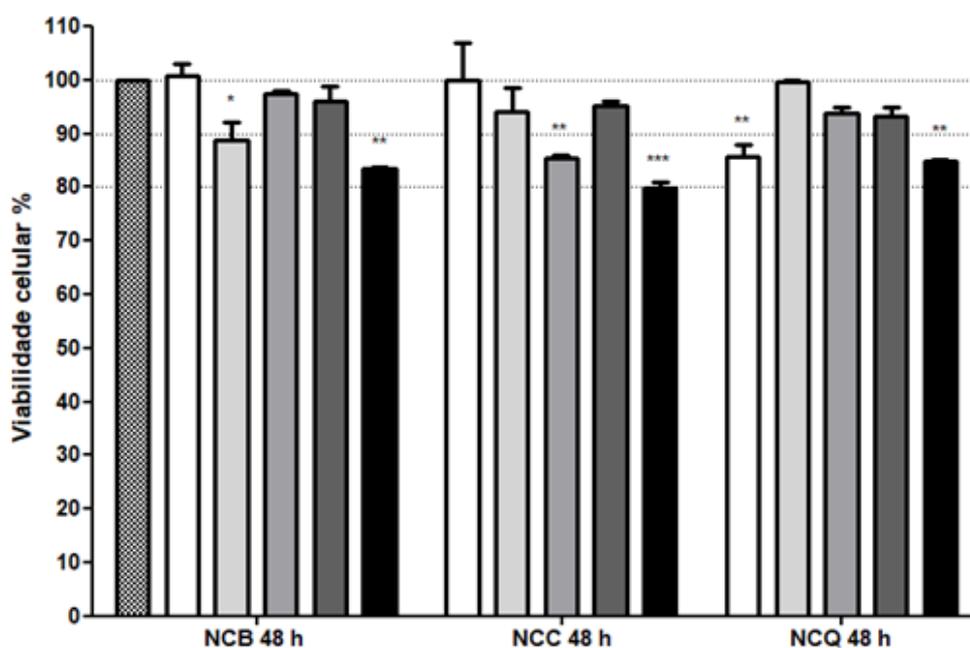
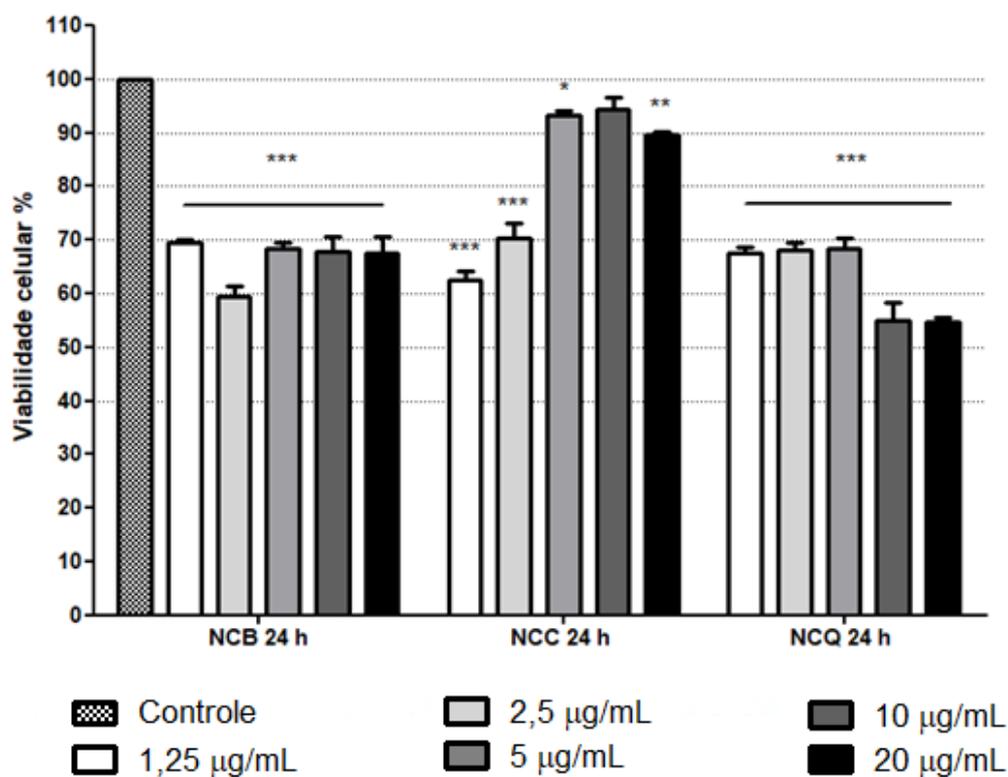
4.5 ENSAIOS *IN VITRO* EMPREGANDO AS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

Nestes ensaios, a viabilidade celular foi calculada em relação ao controle não tratado (apenas meio de cultura considerando a viabilidade como 100%) e o controle positivo das células foi feito com solução de peróxido de hidrogênio 10%, tóxico para as células, onde a viabilidade celular foi próxima a 0%.

4.5.1 Atividade citotóxica *in vitro* com células RAW 264.7

Macrófagos murinos (RAW 264.7) foram empregados para avaliar a possível toxicidade das nanopartículas em modelo de células não tumorais (Figura 23).

Figura 23 - Avaliação da citotoxicidade *in vitro* das suspensões de nanocápsulas em cultura de células de macrófagos murinos (RAW 264.7).



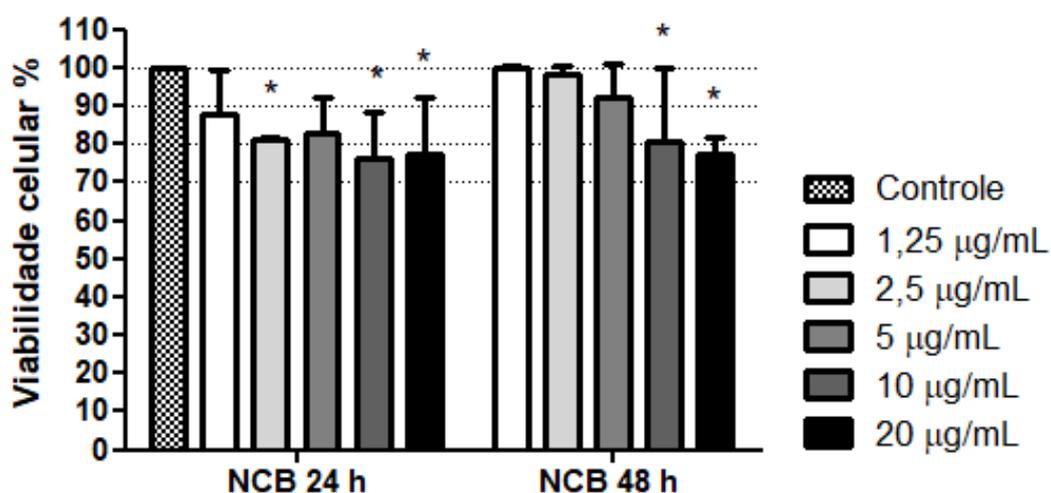
* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) indicam diferença significativa na viabilidade celular em relação ao controle.

Nesse ensaio, observa-se também citotoxicidade para as nanocápsulas, com ou sem flavonoide, em razão da diminuição da viabilidade celular, em 24 e 48 h de incubação, mais pronunciada após 24 h (viabilidade maior que cerca de 55 %), em relação ao maior período (> cerca de 80%). Interessante notar que as nanocápsulas contendo crisina apresentaram efeito citoprotetor, em relação à formulação sem o ativo, em concentração a partir de 5,0 $\mu\text{g/mL}$, em 24 h de incubação, mantendo a viabilidade maior do que 90%.

4.5.2 Atividade citotóxica *in vitro* contra células B16F10

A avaliação da suspensão NCB em diferentes concentrações (relativas ao conteúdo de flavonoides das demais suspensões) demonstrou uma significativa redução da viabilidade das células B16F10 (Figura 24).

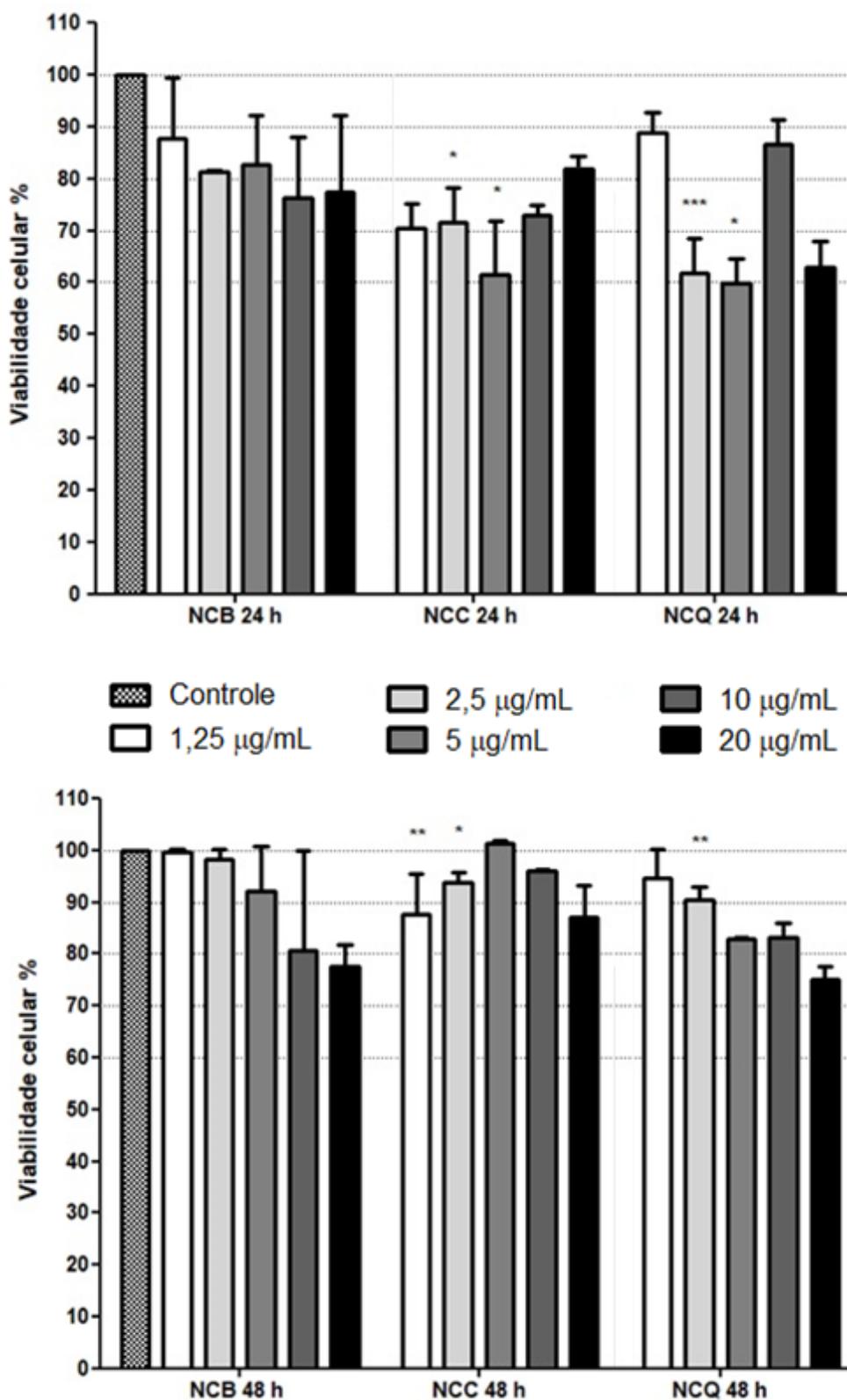
Figura 24 - Avaliação de potencial atividade antitumoral (B16F10) das suspensões de nanocápsulas sem flavonoide (NCB) em relação ao controle, após 24 e 48 h de incubação.



* ($p < 0,05$) indica diferença significativa na viabilidade em relação ao controle.

Essa redução da viabilidade das células tumorais parece demonstrar uma toxicidade inespecífica da matriz da formulação uma vez que a suspensão de NCB não apresenta nenhum ativo ou componente que isoladamente justifique esta atividade.

Figura 25 - Comparação entre as nanocápsulas sem flavonoides e com esses encapsulados em relação à citotoxicidade para células B16F10, relativa a diferentes concentrações dos princípios ativos.



* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) indicam diferença significativa na viabilidade celular em relação a mesma concentração de NCB no período.

Apesar de a suspensão NCB demonstrar efeito na redução da viabilidade das células tumorais, as suspensões com os flavonoides (Figura 25) apresentaram redução significativa da viabilidade ($p < 0,05$) quando comparadas em algumas doses. Efeito significativo ocorreu para as concentrações intermediárias de 2,5 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ dos flavonoides encapsulados, em 24 h de incubação, e para as menores concentrações (1,25 e/ou 2,5 $\mu\text{g/mL}$) em 48 horas, como pode ser visto na Figura 25.

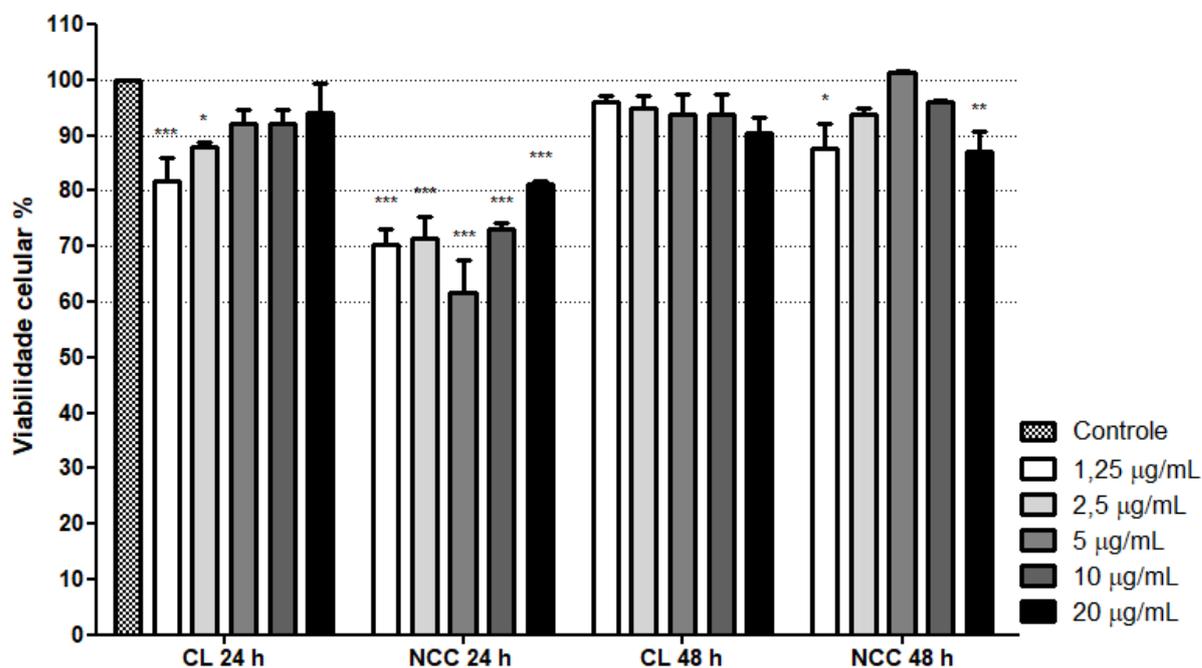
Comparando-se isoladamente cada flavonoide livre e nanoencapsulado, observou-se a redução significativa da viabilidade celular no emprego da suspensão de nanocápsulas de crisina em 24 horas de incubação, em todas as concentrações, em relação ao controle (Figura 26).

A atividade antitumoral da NCC, avaliada através da viabilidade celular, não ocorreu de forma dose-dependente, mas houve diferença estatística em relação à crisina na sua forma livre em todas as concentrações ($p < 0,05$). Em 48 horas de incubação, essa atividade está diminuída, mas ainda se encontra significativa em duas concentrações (1,25 e 20 $\mu\text{g/mL}$), para a crisina nanoencapsulada. Essa mesma tendência de redução de efeito foi observada para a formulação branca (Figura 24) e para NCQ (Figura 25) em 48 h de incubação, ao comparar os dados com 24 h.

Para a suspensão de nanocápsulas de quercetina, houve uma significativa redução da viabilidade celular em 24 h de incubação (Figura 27), fato que não ocorreu com a quercetina não encapsulada, também não tendo o efeito concentração-dependente. Para as NCQ, a redução da viabilidade manteve-se significativa em 48 h de incubação para todas as concentrações testadas (exceto 1,25 $\mu\text{g/mL}$), de maneira que a viabilidade celular diminuiu com o aumento da concentração de quercetina.

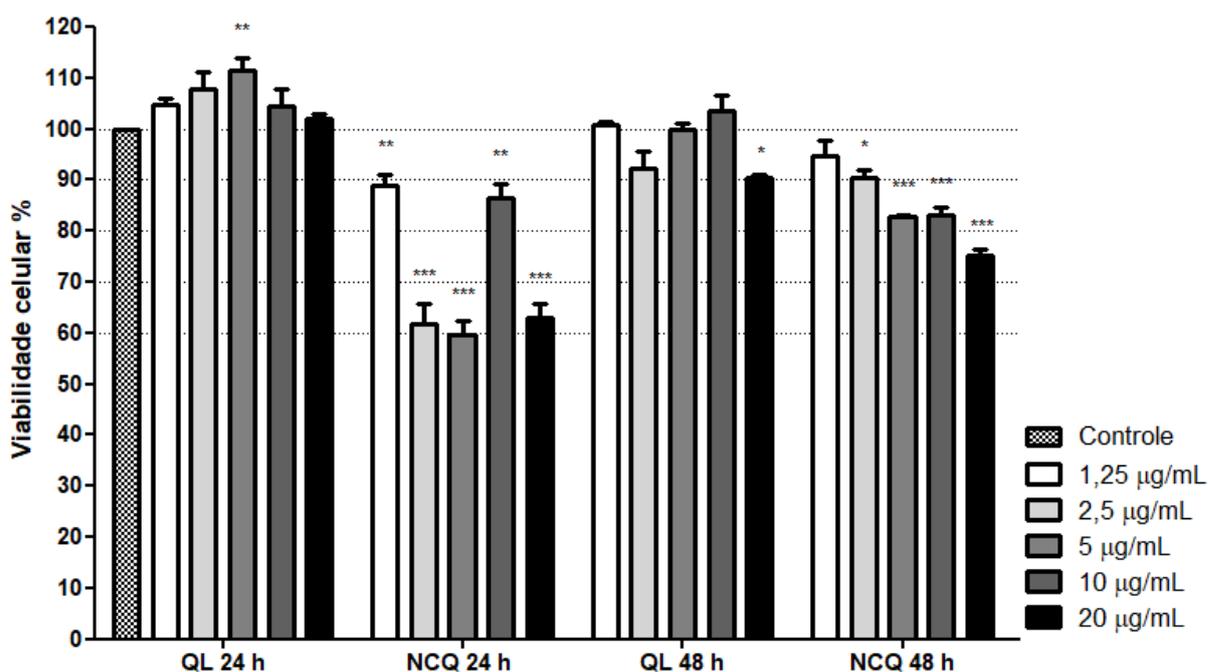
Ao comparar as formulações NCB com NCC e NCQ, em relação à atividade citotóxica para células B16F10 em 24 e 48 horas, percebe-se que a NCB apresenta redução da viabilidade celular e que o nanoencapsulamento dos flavonoides favoreceu a redução da viabilidade celular do melanoma murino, nas concentrações de 2,5 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ em 24 horas e 1,25 e/ou 2,5 $\mu\text{g/mL}$ em 48 horas de incubação.

Figura 26 - Avaliação de potencial atividade citotóxica das suspensões de nanocápsulas de crisina (NCC) em células B16F10, após 24 e 48 h de incubação, comparativamente ao flavonoide livre (CL).



* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) indicam diferença significativa na viabilidade celular em relação ao controle.

Figura 27 - Avaliação de potencial atividade citotóxica das suspensões de nanocápsulas de quercetina (NCQ) em células B16F10, após 24 e 48 h de incubação, comparativamente ao flavonoide livre (QL).



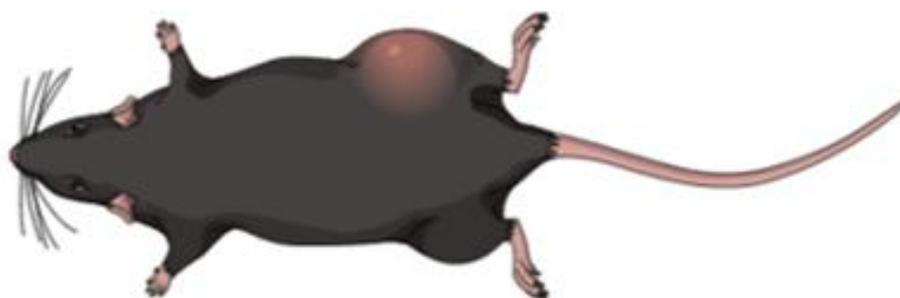
* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) indicam diferença significativa na viabilidade celular em relação ao controle.

4.6 MODELO EXPERIMENTAL *in vivo* DE MELANOMA HUMANO

4.6.1 Indução de melanoma nos camundongos

O modelo de indução do melanoma (Figura 28), através da inoculação de células B16F10 nos animais (FU *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2013), apresentou alguns inconvenientes, como: o grande número de animais que tiveram o tumor induzido e que não o desenvolveram, a grande variação de peso da massa dos tumores ao final dos tratamentos (Figura 29), as mortes de muitos animais (Figura 30), aspectos diferentes das lesões (Figura 31), dentre outros.

Figura 28 - Representação do tumor (melanoma) na região dorsal.



Fonte: mindthegraph.com.

Figura 29 - Variação do peso dos tumores desenvolvidos pelos camundongos.

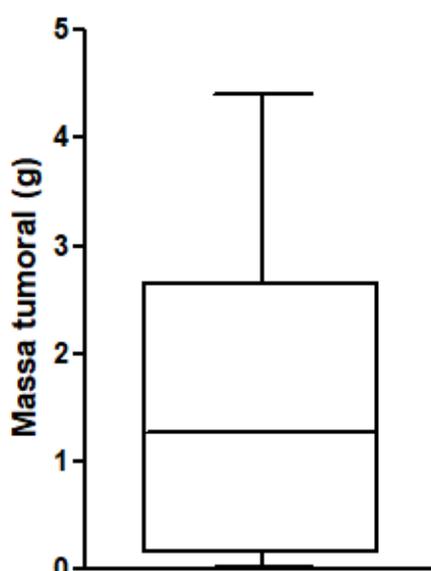
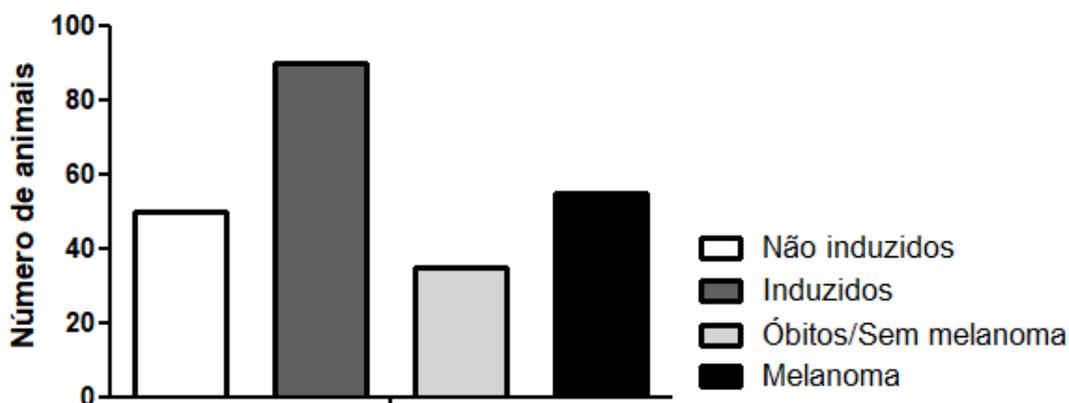
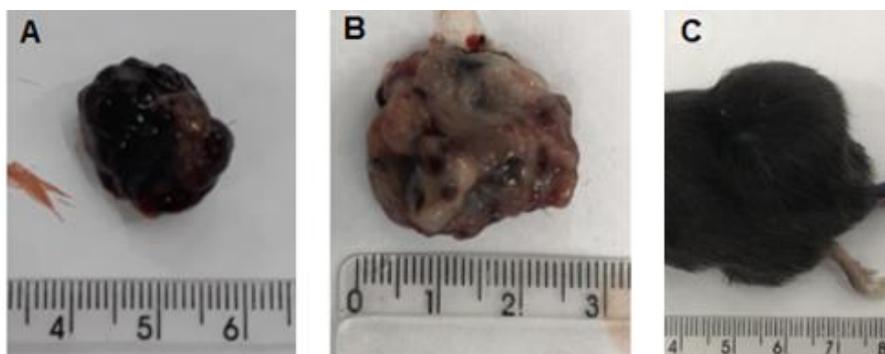


Figura 30 - Distribuição dos animais induzidos e não induzidos (que desenvolveram o melanoma e aqueles que não desenvolveram ou evoluíram para óbito).



Assim, a alteração do "n" inicial para cada grupo se deu em razão de que diversos animais ou não desenvolveram o tumor ou então evoluíram para óbito.

Figura 31 - Fotografia de um tumor de tamanho moderado (em torno de 2,5 g; **A**) e de um tumor maior e com aspecto diferente do primeiro (em torno de 4,0 g; **B**). Em **C** um dos animais que desenvolveram tumor mas que evoluíram para óbito antes dos 14 dias de tratamento.



Durante os experimentos, alguns animais apresentavam sinais de dor, especialmente aqueles em que o tumor tinha um desenvolvimento muito superior à média (~1,3 g). Esses animais precisaram de um agente analgésico para controle da dor, para que continuassem se alimentando, se hidratando e se locomovendo com maior facilidade. Assim, excluímos a alternativa de anti-inflamatórios por poderem alterar diretamente os ensaios biológicos. Optou-se pelo uso de opióide, no entanto, o uso de morfina poderia diminuir o desenvolvimento do tumor conforme a literatura (SASAMURA *et al.*, 2002; TUERXUN; CUI, 2018). Assim, optou-se pelo controle da dor com uso de solução oral de cloridrato de tramadol a 5,0 mg/kg quando os animais

se apresentavam prostrados, com alteração postural, contraídos, se locomovendo com dificuldade, dentre outros sinais (FLECKNELL, 2009).

Durante o desenvolvimento do experimento animal, os camundongos tratados semanalmente com cisplatina (intraperitoneal; Figura 32), dos grupos 2 (não induzidos) e 9 (induzidos), passaram a apresentar sinais de dor como alteração postural (contração ventral), prostração e orelhas baixas (FLECKNELL, 2009).

Os animais evoluíram para óbito após a segunda administração de cisplatina (depois do 8º dia de tratamento). Em necropsias realizadas nos animais que evoluíram para óbito e com animais desses grupos com tratamento interrompido (eutanásia), evidenciou-se que os animais apresentavam estase gástrica, com distensão do órgão por acúmulo de alimento (Figura 33) e alteração da coloração do fígado e rins para tons pálidos. A partir da segunda semana de tratamento, os grupos 2 e 9 (tratados com cisplatina) foram excluídos do estudo.

Figura 32 - Representação da administração de cisplatina via intraperitoneal, alteração do comportamento e evolução para óbito.



Fonte: adaptado de mindthegraph.com.

Figura 33 - Fotografia do estômago de um dos animais tratados com cisplatina, e que evoluiu para óbito. Na necropsia dos animais era constatada estase gástrica e retenção de alimento.



Escala em centímetros (cm).

O regime de administração da cisplatina varia em estudos relatados na literatura empregando camundongos, tanto em relação à dose quanto ao intervalo e número de administrações (FERREIRA *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2020; JUN ZHOU *et al.*, 2019), assim como acontece em indicações para humanos (TSANG; AL-FAYEA; AU, 2009). A administração em humanos acontece por via intravenosa, de 50 a 120 mg/m² de superfície corporal a cada 3 ou 4 semanas (JAMIESON; LIPPARD, 1999). A dose administrada nos camundongos foi de 10 mg/kg, 1 vez por semana, o que corresponde a uma dose de 30 mg/m² de superfície corporal em humanos (DAKUP *et al.*, 2018; REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2007).

4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ADENOSINA DESAMINASE (ADA) EM SORO

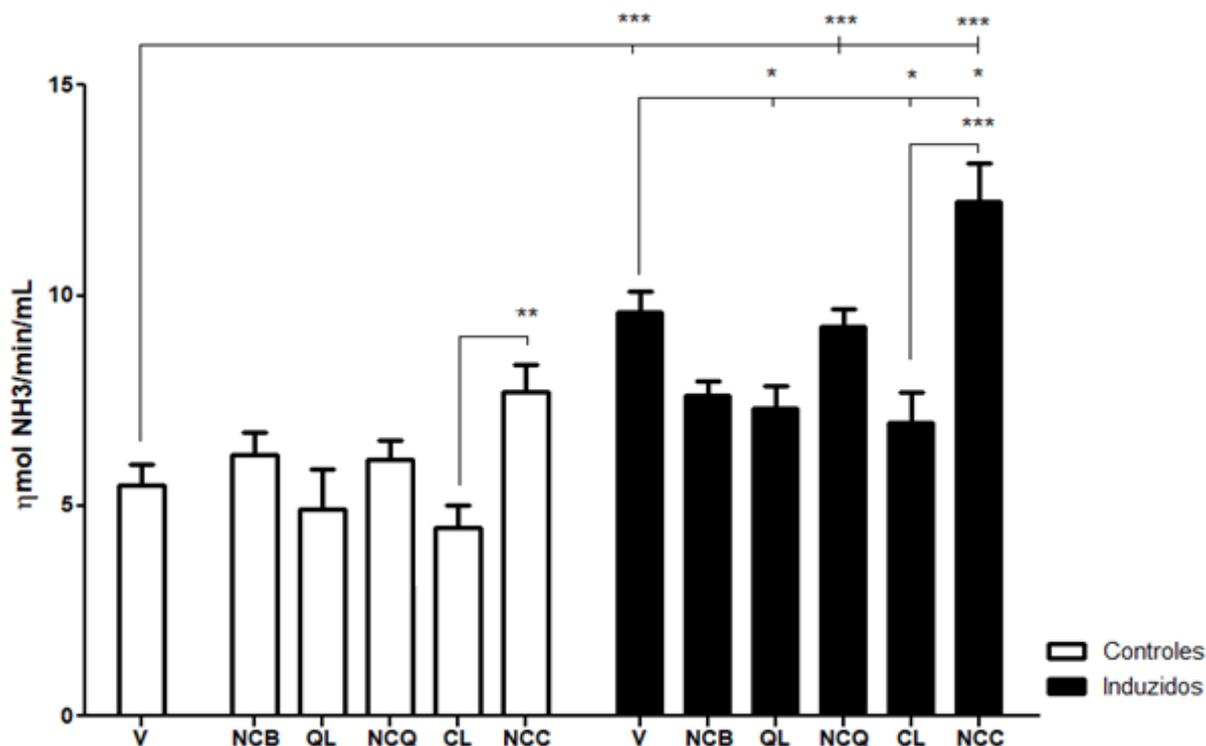
A adenosina, produto da degradação sequencial da molécula de ATP (por enzimas do sistema purinérgico), por meio de seus receptores, promove uma série de respostas que facilitam a instalação, progressão e metástase dos tumores como a imunossupressão, vasodilatação, angiogênese e citoproteção (BOURS *et al.*, 2006; GHIRINGHELLI *et al.*, 2012; OHTA *et al.*, 2006; SITKOVSKY *et al.*, 2008).

Os níveis aumentados dessa molécula podem ser consequência da produção pela massa tumoral (BLAY; WHITE; HOSKIN, 1997), como consequência da alteração da atividade de outras enzimas do sistema purinérgico (GHIRINGHELLI *et al.*, 2012; YEGUTKIN *et al.*, 2011; ZHANG, 2010, 2012) e como tentativa do organismo promover proteção tecidual no processo inflamatório (BERGAMIN *et al.*, 2012).

Em vista disso, níveis elevados e imunossupressivos de adenosina são regulados pela ADA, a partir da desaminação irreversível da adenosina até inosina (YEGUTKIN, 2008), diminuindo os seus efeitos fisiológicos que resultam no sucesso da progressão tumoral. Assim, uma elevada atividade da enzima pode indicar elevadas concentrações da molécula, bem como a tentativa de defesa do organismo em não promover um ambiente propício ao desenvolvimento tumoral.

A atividade da ADA no soro dos camundongos, submetidos ao modelo de melanoma cutâneo, foi avaliada e comparada para os diferentes tratamentos empregando os flavonoides na sua forma livre (QL; CL) e nas nanocápsulas (NCC; NCQ), inclusive nos animais não induzidos. Os resultados são apresentados na Figura 34.

Figura 34 - Atividade da ADA em soro de camundongos C57BL6, com e sem melanoma induzido, tratados com as suspensões de nanocápsulas ou com os flavonoides não encapsulados.



V = veículo; NCB = suspensão de NC sem flavonoide; QL e CL = quercetina e crisina livres, respectivamente; NCQ e NCC = suspensão de NC contendo quercetina ou crisina, respectivamente.
* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

Pode-se observar que entre os grupos veículo (V) houve um aumento significativo na atividade da ADA para o grupo V induzido em relação ao V saudável, assim como aconteceu para os grupos NCQ e NCC induzidos em comparação com V saudável.

Nota-se que para grupos induzidos e não induzidos houve um aumento da atividade da enzima no soro dos animais tratados com as nanocápsulas de crisina ($p < 0,05$), mas não significativo para as nanocápsulas de quercetina, quando comparadas aos grupos tratados com os flavonoides nas suas formas livres.

Apesar do pequeno aumento da atividade da ADA nos animais induzidos e tratados com NCQ, em relação aos tratados com quercetina livre, essa elevação da atividade não foi significativa, especialmente quando comparada com o grupo induzido veículo, ao contrário do que aconteceu para a NCC.

A atividade da ADA foi significativamente mais elevada, em animais induzidos e não induzidos, para aqueles que receberam o tratamento com NCC do que naqueles que receberam a crisina na sua forma livre.

Os dois tratamentos possuem a mesma concentração de crisina e isso demonstra um importante efeito relativo à nanoencapsulação da crisina. Assim, nos animais com melanoma, o aumento significativo da atividade da ADA nos animais tratados com NCC pode contribuir para a regulação dos níveis extracelulares pela simples encapsulação da crisina, uma vez que nos animais tratados com crisina livre houve, inclusive, diminuição da atividade da enzima.

Em estudo com pacientes com melanoma, a atividade da ADA de linfócitos e plaquetas encontrava-se 3 vezes maior do que em pacientes controle, indicando um provável aumento das concentrações do substrato. A elevação das concentrações de adenosina e dos níveis de IL-10 faz parte de uma resposta anti-inflamatória do organismo, mas propiciam a evolução do tumor (MANICA *et al.*, 2018).

Assim, a elevação da atividade da ADA aconteceu de forma esperada no soro dos camundongos com melanoma, mas teve um aumento de atividade quando os animais induzidos foram tratados com a suspensão de nanocápsulas de crisina, demonstrando que a formulação pode participar da redução de algumas das condições fisiológicas (dependentes de adenosina) que contribuem para o desenvolvimento, progressão e metástase do tumor ao regular os níveis de adenosina por meio da atividade da ADA. Em hipótese, estes resultados podem ter relação com um provável aumento da biodisponibilidade oral da quercetina e, sobretudo, da crisina, devido ao nanoencapsulamento.

Nanocápsulas contendo quercetina (0,042 mg/mL; 222 nm), preparadas com poli(ϵ -caprolactona) e triglicerídeos de cadeia média, também favoreceram a atividade biológica deste bioativo, em comparação ao livre, ao ser administradas por via oral, no tratamento de Leishmaniose cutânea (*Leishmania amazonensis*) após administração oral em ratos (SOUSA-BATISTA *et al.*, 2017).

Ainda, nanopartículas de quercetina com composição semelhante às desenvolvidas neste estudo, mas obtidas através do método de nanoprecipitação e com emprego de outro polímero (Eudragit® E) e PVA, também apresentaram maior atividade antioxidante em ensaios *in vitro* quando comparados com a forma livre do flavonoide (WU *et al.*, 2008).

5 CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento/otimização das suspensões de nanocápsulas, em termos de quantidade de estabilizante (PVA) e de ativos (flavonoides), foram obtidas suspensões com características físico-químicas adequadas para seu emprego nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Os métodos analíticos empregados na avaliação de teor e de eficiência de encapsulamento foram adequados para estes propósitos.

Nos ensaios *in vitro* de potencial atividade antitumoral, frente à cultura de células de melanoma (B16F10), as nanocápsulas diminuíram a viabilidade das células tumorais, em diferentes concentrações, mas sem relação concentração-efeito. Ainda, observou-se que a suspensão de nanocápsulas branca apresentou atividade citotóxica no ensaio e que, ao se nanoencapsular os flavonoides, as formulações foram mais efetivas em concentrações menores, mesmo quando comparadas aos flavonoides livres empregados nas mesmas concentrações.

Apesar de uma avaliação toxicológica das formulações necessitar de mais ensaios para confirmar os resultados, foi realizado o emprego das suspensões de nanocápsulas em cultura de macrófagos murinos como ensaio de triagem toxicológico em células não tumorais, tendo havido diminuição da viabilidade destas, com ou sem flavonoide. Entretanto, as formulações com crisina nanoencapsulada apresentaram efeito citoprotetor em relação às suspensões sem ativo, nas concentrações maiores.

A atividade da ADA no modelo de melanoma foi aumentada apenas nos animais com tumores induzidos, tratando-se de uma tentativa de regulação da resposta imune, através do sistema purinérgico, já observada em estudo anterior. A atividade da ADA foi aumentada de forma significativa com o tratamento de nanocápsulas contendo crisina em relação aos animais induzidos e tratados com crisina livre e veículo, o que poderia favorecer a redução da progressão tumoral.

Assim, o desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas de Eudragit® RS100 contendo crisina ou quercetina e o seu emprego em ensaios *in vitro* e *in vivo* resultaram em dados que estão de acordo com estudos encontrados na literatura científica em relação ao potencial antitumoral desses flavonoides e em relação ao aumento da eficiência de formulações com ativos nanoencapsulados em comparação aos mesmos livres, aqui demonstrado em relação ao melanoma, uma patologia de elevada gravidade e de crescente incidência mundial.

6 REFERÊNCIAS

- ABDALLA, F. H. *et al.* Neuroprotective effect of quercetin in ectoenzymes and acetylcholinesterase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats. **Molecular and Cellular Biochemistry** , v. 381, p. 1–8, 2013.
- ABDALLA, F. H. H. *et al.* Protective effect of quercetin in ecto-enzymes, cholinesterases, and myeloperoxidase activities in the lymphocytes of rats exposed to cadmium. **Molecular and Cellular Biochemistry** , v. 396, p. 201–211, 2014.
- ACS. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html> - Acessado em 01/06/2018 , 2018.
- ACS. **Chemotherapy for Melanoma Skin Cancer**, 2019.
- ADIBKIA, K. *et al.* Anti Pneumococcal Activity of Azithromycin-Eudragit RS100 Nano-Formulations. **Advanced Pharmaceutical Bulletin** , v. 6, n. 3, p. 455–459, 2016.
- ALONSO, M. J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. **Biomedicine & Pharmacotherapy** , v. 58, p. 168–172, 2004.
- ALSALEH, N. B. *et al.* Silver nanoparticle immunomodulatory potential in absence of direct cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages and MPRO 2.1 neutrophils. **Journal of Immunotoxicology** , v. 16, n. 1, p. 63–73, 2019.
- ANDRADE, F. *et al.* Chitosan Formulations as Carriers for Therapeutic Proteins. **Current Drug Discovery Technologies** , v. 8, p. 157–172, 2011.
- ANVISA/MS. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. **Ministério da Saúde - MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA** , v. 2017, p. 123, 2017.
- ANVISA/MS. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 239, DE 26 DE JULHO DE 2018. **Ministério da Saúde - MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA** , p. 25, 2018.
- ATES, M. *et al.* Assessment of Oxidative Stress on *Artemia salina* and *Daphnia magna* After Exposure to Zn and ZnO Nanoparticles. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** , p. 134869, 2019.
- BAE, Y.; LEE, S.; KIM, S. H. Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: Involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- κ B. **Toxicology and Applied Pharmacology** , v. 254, n. 1, p. 56–64, 2011.
- BARRAS, A. *et al.* Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics** , v. 379, p. 270–277, 2009.
- BARRAS, A. *et al.* Lipid-core nanocapsules increase the oral efficacy of quercetin in cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics** , v. 12, n. 2, p. 270–277, 2017.

BATAILLE, V. *et al.* Exposure to the sun and sunbeds and the risk of cutaneous melanoma in the UK : a case – control study. [*S. I.*], v. 40, p. 429–435, 2004.

BERGAMIN, S. *et al.* Differential Macrophage Activation Alters the Expression Profile of NTPDase and Ecto-5'-Nucleotidase. **Macrophage Activation and Ectonucleotidases** , v. 7, n. 2, p. 1–10, 2012.

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.

BLAKNEY, A. K. K. *et al.* Inside out: optimization of lipid nanoparticle formulations for exterior complexation and in vivo delivery of saRNA. **Gene Therapy** , v. 26, n. 9, p. 363–372, 2019.

BLAY, J.; WHITE, T. D.; HOSKIN, D. W. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. **Cancer Research** , v. 57, n. 13, p. 2602–2605, 1997.

BOURS, M. J. L. *et al.* Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology and Therapeutics** , v. 112, n. 2, p. 358–404, 2006.

BRAUN, J. B. S. *et al.* Pretreatment with quercetin prevents changes in lymphocytes E-NTPDase / E-ADA activities and cytokines secretion in hyperlipidemic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry** , v. 444, n. 1, p. 63–75, 2018.

BRAVO, M. D. O.; CARVALHO, J. L.; SALDANHA-ARAÚJO, F. Adenosine production : a common path for mesenchymal stem-cell and regulatory T-cell-mediated immunosuppression. **Purinergic Signalling** , 2016.

BURNSTOCK, G.; VIRGILIO, F. Di. Purinergic signalling and cancer. **Purinergic Signalling** , v. 9, p. 491–540, 2013.

CAI, X. *et al.* Bioavailability of Quercetin : Problems and Promises. **Current Medicinal Chemistry** , v. 20, n. 20, p. 2572–2582, 2013.

CAMPOS, A. M. De *et al.* Chitosan Nanoparticles as New Ocular Drug Delivery Systems: in Vitro Stability, in Vivo Fate, and Cellular Toxicity. **Pharmaceutical Research** , v. 21, n. 5, p. 8,3-810, 2004.

CAO, H. *et al.* Quercetin exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling. **Biochemical Pharmacology** , v. 87, n. 3, p. 424–434, 2014.

CASTRO, G. T.; FERRETTI, F. H.; BLANCO, S. E. Determination of the overlapping pKavalues of chrysin using UV-vis spectroscopy and ab initio methods. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** , v. 62, n. 1–3, p. 657–665, 2005.

CHAN, O. H.; STEWART, B. H. Physicochemical and drug-delivery considerations for oral drug bioavailability. **Drug Discovery Today** , v. 1, n. 11, p. 461–473, 1996.

CHASSOT, J. M. *et al.* Beclomethasone Dipropionate-Loaded Polymeric Nanocapsules: Development, In Vitro Cytotoxicity, and In Vivo Evaluation of Acute Lung Injury. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** , v. 14, p. 1–10, 2014.

CHINEMBIRI, T. N. *et al.* Review of Natural Compounds for Potential Skin Cancer Treatment. **Molecules** , v. 19, p. 11679–11721, 2014.

CHISHTI, N. *et al.* Preparation, Optimization, and In Vivo Evaluation of Nanoparticle-Based Formulation for Pulmonary Delivery of Anticancer Drug. **Medicina** , v. 55, p. 1–28, 2019.

CHOI, E. J.; CHEE, K.; LEE, B. H. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. [*S. I.*], v. 482, p. 281–285, 2003.

COLGAN, S. P. *et al.* Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signalling** , n. 2, p. 351–360, 2006.

CONTRI, R. V. *et al.* Structural analysis of chitosan hydrogels containing polymeric nanocapsules. **Materials Science and Engineering C** , v. 42, p. 234–242, 2014.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. [*S. I.*], v. 7, p. 66–76, 1996.

DA SILVA, S. B. *et al.* Development and validation method for simultaneous quantification of phenolic compounds in natural extracts and nanosystems. **Phytochemical Analysis** , v. 24, n. 6, p. 638–644, 2013.

DAKUP, P. P. *et al.* The circadian clock regulates cisplatin-induced toxicity and tumor regression in melanoma mouse and human models. **Oncotarget** , v. 9, n. 18, p. 14524–14538, 2018.

DEMERLIS, C. C.; SCHONEKER, D. R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). **Food and Chemical Toxicology** , v. 41, p. 319–326, 2003.

DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene** , v. 36, n. 3, p. 293–303, 2017.

DING, B. *et al.* Preparation and evaluation of folate-modified lipid nanocapsules for quercetin delivery. **Journal of Drug Targeting** , v. 22, n. 1, p. 67–75, 2014.

DMITRIENKO, S. G. *et al.* Specifics of Separation of Flavonoids by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography on the Luna 5u C18 (2) Column. **Moscow University Chemistry Bulletin** , v. 67, n. 6, p. 369–373, 2012.

DO CARMO ARAÚJO, M. *et al.* Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease** , v. 1740, n. 3, p. 421–426, 2005.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; GERMOLEC, D. R.; WEAVER, J. L. Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. **Nature Nanotechnology** , v. 4, n. 7, p. 411–414, 2009.

EL-NAHAS, A. E. *et al.* Silymarin-Loaded Eudragit Nanoparticles: Formulation, Characterization, and Hepatoprotective and Toxicity Evaluation. **AAPS PharmSciTech** , v. 18, n. 8, p. 3076–3086, 2017.

FENG, L. *et al.* Vascular CD39/ENTPD1 Directly Promotes Tumor Cell Growth by Scavenging Extracellular Adenosine Triphosphate. **Neoplasia** , v. 13, n. 3, p. 206-IN2, 2011.

FERREIRA, A. *et al.* Redispersible liposomal-N-acetylcysteine powder for pulmonary administration: Development , in vitro characterization and antioxidant activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** , v. 65, p. 174–182, 2014.

FERREIRA, N. H. *et al.* Europium(III)-doped yttrium vanadate nanoparticles reduce the toxicity of cisplatin. **Journal of Inorganic Biochemistry** , v. 182, p. 9–17, 2018.

FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics** , v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.

FLECKNELL, P. Laboratory Animal Anaesthesia. **Laboratory Animal Anaesthesia** , 2009.

FONTANA, M. C. *et al.* Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: Influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology** , v. 5, n. 3, p. 254–263, 2009.

FU, Q. *et al.* Novel murine tumour models depend on strain and route of. **International Journal of Experimental Pathology** , v. 97, n. 4, p. 351–356, 2016.

GHEORGHEOSU, D. *et al.* Development of the B16 murine melanoma model. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology** , v. 16, n. 2, p. 148–152, 2011.

GHIRINGHELLI, F. *et al.* Production of adenosine by ectonucleotidases: A key factor in tumor immunoescape. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** , v. 2012, 2012.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Methods of enzymatic analysis. **Bergmeyer HU. Weinheim: Verlag Chemie** , p. 315–323, 1984.

GONÇALVES, J. F. *et al.* Hematological indices and activity of NTPDase and cholinesterase enzymes in rats exposed to cadmium and treated with N-acetylcysteine. **BioMetals** , v. 25, n. 6, p. 1195–1206, 2012.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles , Nanospheres and Nanocapsules , for Cutaneous Applications. **Drug Target Insight** , n. 2, p. 147–157, 2007.

HARRIS, Z. *et al.* Quercetin as an emerging Anti-Melanoma Agent: A Four-Focus Area Therapeutic Development Strategy. **Frontiers in Nutrition** , v. 3, p. 1–14, 2016.

HARWOOD, M. *et al.* A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity , including lack of genotoxic / carcinogenic properties. **Food and Chemical Toxicology** , v. 45, p. 2179–2205, 2007.

HOLLMAN, P. C. H. *et al.* Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. **Cancer Letters** , v. 114, p. 139–140, 1997.

HUANG, S.-J. *et al.* The renoprotective effect of curcumin against cisplatin-induced acute kidney injury in mice: involvement of miR-181a/PTEN axis. **Renal Failure** , v. 42, n. 1, p. 350–357, 2020.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Censo 2018.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/Acessado%20em%2001/06/2018) Acessado em 01/06/2018 , 2018.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin – DNA Adducts. **Chemical Reviews** , v. 99, p. 2467–2498, 1999.

JAQUES, J. A. dos S. *et al.* Lung and blood lymphocytes NTPDase and acetylcholinesterase activity in cigarette smoke-exposed rats treated with curcumin. **Biomedicine and Preventive Nutrition** , v. 1, n. 2, p. 109–115, 2011.

JUN ZHOU *et al.* TAK1 deficiency attenuates cisplatin-induced acute kidney injury. **Carbohydrate Polymers** , v. 318, n. 1, p. 209–215, 2019.

JUNG, M. *et al.* Anticarcinogenic effect of quercetin by inhibition of insulin-like growth factor (IGF)-1 signaling in mouse skin cancer. **Nutrition Research and Practice** , v. 7, n. 6, p. 439, 2013.

KAIZER, R. R. *et al.* The effect of aluminium on NTPDase and 5'-nucleotidase activities from rat synaptosomes and platelets. **International Journal of Developmental Neuroscience** , v. 25, n. 6, p. 381–386, 2007.

KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry-90% of the published measurements are false. **International Journal of Pharmaceutics** , v. 355, n. 1–2, p. 150–163, 2008.

KELLY, C. M. *et al.* Subchronic toxicity study in rats and genotoxicity tests with polyvinyl alcohol. **Food and Chemical Toxicology** , v. 41, p. 719–727, 2003.

KIM, D. C. *et al.* Inhibition of melanogenesis by 5,7-dihydroxyflavone (chrysin) via blocking adenylyl cyclase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications** , v. 411, n. 1, p. 121–125, 2011.

KIM, K. M. *et al.* Improved chemotherapeutic efficacy of injectable chrysin encapsulated by copolymer nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine** , v. 12, p. 1917–1925, 2017.

KUKU, G. *et al.* Surface-Enhanced Raman Scattering to Evaluate Nanomaterial Cytotoxicity on Living Cells. **Analytical Chemistry** , v. 88, n. 19, p. 9813–9820, 2016.

LAI, O. M. M.; LOW, C. T. T.; AKOH, C. C. C. Food Chemistry Lipase-catalyzed acidolysis of palm olein and caprylic acid in a continuous bench-scale packed bed bioreactor. **Food Chemistry** , v. 92, n. 3, p. 527–533, 2005.

LARIJANI, B. *et al.* Diagnostic Value of Adenosine Deaminase and its Isoenzymatic Activity in Nepalese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Medical Science** , v. 4, n. 4, p. 349, 2017.

LEAL, D. B. R. *et al.* HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research** , v. 1746, n. 2, p. 129–134, 2005.

LI, H. W. *et al.* Anticancer effects of morin-7-sulphate sodium, a flavonoid derivative, in mouse melanoma cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy** , v. 84, p. 909–916, 2016.

LORENZONI, A. S. Desenvolvimento de nanocápsulas para a liberação controlada de Crisina: avaliação da atividade antioxidante e da citotoxicidade in vitro. 2015. 152p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas: Controle e Avaliação de Produtos e Insumos Farmacêuticos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS** , 2015.

LUCAS, J. *et al.* Co-Nanoencapsulation of Vitamin D3 and Curcumin Regulates Inflammation and Purine Metabolism in a Model of Arthritis. **Inflammation** , p. 1–16, 2019.

LUNKES, G. I. *et al.* Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research** , v. 109, n. 4, p. 189–194, 2003.

MALDONADO, P. A. *et al.* Nucleotide degrading enzymes in platelets from uterine cervical neoplasia patients treated with conization or radiotherapy. **Biomedicine and Pharmacotherapy** , v. 64, n. 7, p. 499–504, 2010.

MANI, R.; NATESAN, V. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. **Phytochemistry** , v. 145, p. 187–196, 2018.

MANICA, A. *et al.* High levels of extracellular ATP lead to chronic inflammatory response in melanoma patients. **Journal of Cellular Biochemistry** , v. 119, n. July 2017, p. 3980–3988, 2018.

MARCHIORI, M. L. *et al.* Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: Preparation, characterization, and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy** , v. 36, n. 8, p. 962–971, 2010.

MARGOLIN, K. Introduction to the Role of the Immune System in Melanoma. *[S. l.]*, v. 28, p. 537–558, 2014.

MARTINS, J. P. *et al.* The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. **British Journal of Pharmacology** , v. 165, n. 1, p. 183–196, 2012.

MEHRAVAR, R.; JAHANSHAH, M.; SAGHATOLESLAMI, N. Production of biological nanoparticles from α -lactalbumin for drug delivery and food science application. **African Journal of Biotechnology** , v. 8, n. 24, p. 6822–6827, 2009.

MEN, K. *et al.* Nanoparticle-delivered quercetin for cancer therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry** , v. 14, n. 6, p. 826–832, 2014.

MERLY, L.; SMITH, S. L. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something? **Immunopharmacology and Immunotoxicology** , v. 39, n. 2, p. 55–58, 2017.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** , v. 5, n. 1, p. 561–573, 2007.

MOON, J.; KWAK, J. II; AN, Y. J. The effects of silver nanomaterial shape and size on toxicity to *Caenorhabditis elegans* in soil media. **Chemosphere** , v. 215, p. 50–56, 2019.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics** , v. 385, p. 113–142, 2010.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods** , v. 65, p. 55–63, 1983.

MU, X.; ZHONG, Z. Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)-stabilized liposomes. **International Journal of Pharmaceutics** , v. 318, n. 1–2, p. 55–61, 2006.

NAVEEN, P.; LINGARAJU, H. B.; ANITHA, K. S. P. Simultaneous determination of rutin, isoquercetin, and quercetin flavonoids in *Nelumbo nucifera* by high-performance liquid chromatography method. **International Journal of Pharmaceutical Investigation** , v. 7, n. 2, p. 94–100, 2017.

OHTA, A. *et al.* A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences** , v. 103, n. 35, p. 13132–13137, 2006.

OURIQUE, A. F. *et al.* Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** , v. 79, n. 1, p. 95–101, 2011.

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a mouse model for human melanoma. **Curr Protoc Immunol** , v. Chapter 20, p. Unit 20 1, 2001.

PIGNATELLO, R. *et al.* Eudragit RS100® nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** , v. 16, n. 1–2, p. 53–61, 2002.

PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; PUGLISI, G. Ocular tolerability of Eudragit RS100® and RL100® nanosuspensions as carriers for ophthalmic controlled drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences** , v. 91, n. 12, p. 2636–2641, 2002.

PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **The American Journal of Clinical Nutrition** , v. 78, p. 570–578, 2003.

RABINOVICH, G. A.; GABRILOVICH, D.; SOTOMAYOR, E. M. Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. **Annual Review of Immunology** , v. 25, p. 267–296, 2007.

RASTRELLI, M. *et al.* Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. **In vivo** , v. 28, p. 1005–1012, 2014.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal** , v. 22, p. 659–661, 2007.

REDDY, E. *et al.* Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. **Toxicology Letters** , v. 233, p. 214–225, 2015.

REHMAN, M. U. *et al.* Chrysin suppresses renal carcinogenesis via amelioration of hyperproliferation, oxidative stress and inflammation: Plausible role of NF- κ B. **Toxicology Letters** , v. 216, n. 2–3, p. 146–158, 2013.

RIGO, F. K. *et al.* Spider peptide Pahl β induces analgesic effect in a model of cancer pain. **Cancer Science** , v. 104, n. 9, p. 1226–1230, 2013.

RONIS, M. J. J. J. *et al.* Featured Article Medium chain triglycerides dose-dependently prevent liver pathology in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. **Experimental Biology and Medicine Volume** , v. 238, n. 2, p. 151–162, 2016.

RÖSSLEIN, M. *et al.* Use of cause-and-effect analysis to design a high-quality nanocytotoxicology assay. **Chemical Research in Toxicology** , v. 28, n. 1, p. 21–30, 2015.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th. ed: London, 2009. *E-book*.

SACHDEVA, S.; GUPTA, M. Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. **Saudi Pharmaceutical Journal** , v. 21, n. 3, p. 245–253, 2013.

SAHOO, S. K. *et al.* Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. **Journal of Controlled Release** , v. 82, n. 1, p. 105–114, 2002.

SAMARGHANDIAN, S.; AFSHARI, J. T.; DAVOODI, S. Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3. **Clinics** , v. 66, n. 6, p. 1073–1079, 2011.

SANTOS, S. S. *et al.* Clotrimazole-loaded Eudragit RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science & Engineering C** , v. 33, n. 3, p. 1389–1394, 2013.

SANTOS, S. S. *et al.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** , v. 116, p. 270–276, 2014.

SASAMURA, T. *et al.* Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. **European Journal of Pharmacology** , v. 441, p. 185–191, 2002.

SASSI, A. *et al.* Chrysin, a natural and biologically active flavonoid suppresses tumor growth of mouse B16F10 melanoma cells: In vitro and In vivo study. **Chemico-Biological Interactions** , v. 283, n. November 2017, p. 10–19, 2018.

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

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** , v. 69, p. 64–71, 2008.

SCHAFFAZICK, S. R. R. *et al.* Development of Nanocapsule Suspensions and Nanocapsule Spray-Dried Powders Containing Melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society** , v. 17, n. 3, p. 562–569, 2006.

SHARMA, D. *et al.* Formulation and Optimization of Polymeric Nanoparticles for Intranasal Delivery of Lorazepam Using Box-Behnken Design: In Vitro and In Vivo Evaluation. **BioMed Research International** , p. 1–15, 2014.

SHIN, E. K. *et al.* Chrysin, a natural flavone, improves murine inflammatory bowel diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications** , v. 381, n. 4, p. 502–507, 2009.

SILVA, F. N. da *et al.* Experimental models of in vivo murine melanoma. **Carbohydrate Polymers** , v. 97, n. 4, p. 73–80, 2013.

SITKOVSKY, M. V. *et al.* Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: Tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. **Clinical Cancer Research** , v. 14, n. 19, p. 5947–5952, 2008.

SKLADANOWSKI, A.; KONOPA, J. Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells . **Biochemical Pharmacology** , v. 46, n. 3, p. 373–382, 1993.

SOUSA-BATISTA, A. J. *et al.* Lipid-core nanocapsules increase the oral efficacy of quercetin in cutaneous leishmaniasis. **Parasitology** , p. 1–6, 2017.

SOUZA, L. C. *et al.* Flavonoid Chrysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** , v. 134, p. 22–30, 2015.

SPANEVELLO, R. M. *et al.* The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. **Clinica Chimica Acta** , v. 411, n. 3–4, p. 210–214, 2010.

SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacology and Therapeutics** , v. 87, n. 2–3, p. 161–173, 2000.

TAGHIPOUR, Y. D.- *et al.* Polyphenol nanoformulations for cancer therapy: experimental evidence and clinical perspective. **International Journal of Nanomedicine** , v. 12, p. 2689–2702, 2017.

TAVAKOLI, F. *et al.* Effects of nano-encapsulated curcumin-chrysin on telomerase, MMPs and TIMPs gene expression in mouse B16F10 melanoma tumour model. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology** , v. 46, n. sup2, p. 75–86, 2018.

TAWBI, H.; BUCH, S. Chemotherapy Resistance Abrogation in Metastatic Melanoma. **Clinical Advances in Hematology & Oncology** , v. 8, n. 4, p. 259–266, 2010.

TRAPANI, A. *et al.* Eudragit RS 100 microparticles containing 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** , v. 30, p. 64–74, 2007.

TSANG, R. Y.; AL-FAYEA, T.; AU, H. J. **Cisplatin overdose: Toxicities and management.** [*S. l.: s. n.*]. v. 32E-book.

TUERXUN, H.; CUI, J. The dual effect of morphine on tumor development. **Clinical and Translational Oncology** , 2018.

VEIEROD, M. *et al.* A prospective study of pigmentation , sun exposure , and risk of cutaneous malignant melanoma in women . **Journal of the National Cancer Institute** , v. 95, p. 1530–1538, 2003.

VETTEN, M. A. *et al.* Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine** , 2014.

WAGDARE, N. A. *et al.* Microcapsules with a pH responsive polymer: Influence of the encapsulated oil on the capsule morphology. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** , v. 88, n. 1, p. 175–180, 2011.

WANG, S. *et al.* Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. **Journal of Nutritional Biochemistry** , v. 25, n. 4, p. 363–376, 2014.

WANG, W. *et al.* The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. **Trends in Food Science and Technology** , v. 56, p. 21–38, 2016.

WEISS-ANGELI, V. *et al.* Sustained Antioxidant Activity of Quercetin-Loaded Lipid-Core Nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** , v. 12, n. 3, p. 2874–2880, 2012.

WHITE, N. *et al.* An in vivo model of melanoma : treatment with ATP. **Purinergic Signalling** , v. 5, p. 327–333, 2009.

WILSON, D. E.; CHOSEWOOD, L. C. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. **Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health HHS Publication** , n. December, p. 21–1112, 2007.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews** , v. 63, n. 6, p. 456–469, 2011.

WU, N. L. N. *et al.* Chrysin Protects Epidermal Keratinocytes from UVA- and UVB-Induced Damage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , v. 59, n. 15, p. 8391–8400, 2011.

WU, T.-H. *et al.* Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics** , v. 346, n. 1–2, p. 160–8, 2008.

XIAO, W. *et al.* Highly Sensitive Colorimetric Detection of a Variety of Analytes via the Tyndall Effect. **Analytical Chemistry** , v. 23, n. 91, p. 15114–15122, 2019.

XING, Y. *et al.* Conditional Survival Estimates Improve Over Time for Patients With Advanced Melanoma. [*S. I.*], n. February 2009, p. 2234–2241, 2010.

XU, L. *et al.* Precision therapeutic targeting of human cancer cell motility. **Nature Communications** , v. 9, p. 1–14, 2018.

XUAN, H. *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Anti-tumor activity evaluation of novel chrysin – organotin compound in MCF-7 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** , v. 26, n. 2, p. 570–574, 2016.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research** , v. 1783, n. 5, p. 673–694, 2008.

YEGUTKIN, G. G. *et al.* Frontline Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. **European Journal of Immunology** , v. 41, p. 1231–1241, 2011.

YU, S.; GO, G. woong; KIM, W. Medium chain triglyceride (MCT) oil affects the immunophenotype via reprogramming of mitochondrial respiration in murine macrophages. **Foods** , v. 8, n. 11, 2019.

ZANINI, D. *et al.* Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry** , v. 374, n. 1–2, p. 137–148, 2013.

ZHANG, B. CD73: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. **Cancer Research** , p. 6407–6412, 2010.

ZHANG, B. CD73 promotes tumor growth and metastasis. **Oncolmmunology** , p. 67–70, 2012.

ZHANG, X.-M. *et al.* Apoptosis of murine melanoma B16-BL6 cells induced by quercetin targeting mitochondria , inhibiting expression of PKC- a and translocating PKC- d. **Cancer Chemother Pharmacology** , v. 55, p. 251–262, 2005.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases : Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. **Drug Development Research** , v. 56, p. 44–56, 2001.

ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA - UFSM



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO PERFIL DO SISTEMA PURINÉRGICO EM MODELO DE MELANOMA CUTÂNEO: EFEITOS DO TRATAMENTO COM A QUERCETINA E A CRISINA", protocolada sob o CEUA nº 2896191216, sob a responsabilidade de **Daniela Bitencourt Rosa Leal** e equipe; *Livia Gelain Castilhos* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 16/02/2017.

We certify that the proposal "EVALUATION OF PURINERGIC SYSTEM PROFILE IN SKIN MELANOMA MODEL: EFFECTS OF TREATMENT WITH QUERCETINE AND CRISINE", utilizing 140 Isogenics mice (140 males), protocol number CEUA 2896191216, under the responsibility of **Daniela Bitencourt Rosa Leal and team; Livia Gelain Castilhos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 02/16/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)Vigência da Proposta: de [02/2017](#) a [10/2019](#)Área: [Microbiologia E Parasitologia](#)Origem: [Biotério Central UFSM](#)Espécie: [Camundongos isogênicos](#)sexo: [Machos](#)idade: [8 a 9 semanas](#)N: [140](#)Linhagem: [C57BL/6](#)Peso: [20 a 30 g](#)

Resumo: Estudos demonstram que a inflamação desempenha um papel importante no desenvolvimento do melanoma cutâneo e que a interação entre a resposta imune inata e adaptativa desempenha um papel importante no controle do desenvolvimento do tumor e na prevenção contra a malignidade do mesmo. Embora exista um crescente número de estudos sobre os papéis da sinalização purinérgica no câncer, ainda não existe uma compreensão completa acerca do potencial terapêutico do sistema purinérgico no melanoma cutâneo. O sistema purinérgico, constituído por enzimas e receptores ancorados à membrana celular e moléculas sinalizadoras como nucleotídeos e nucleosídeos, tem um papel fundamental na orquestra de eventos envolvidos na modulação do padrão de resposta imune. Pesquisas têm descrito várias aplicações terapêuticas da quercetina e da crisina incluindo suas atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral. A proposta deste projeto de pesquisa é investigar o perfil do sistema purinérgico em um modelo de melanoma cutâneo induzido em animais bem como avaliar se o tratamento com a quercetina e a crisina poderia prevenir ou reverter o desenvolvimento do melanoma. Camundongos da linhagem C57BL/6 serão utilizados neste experimento. Os animais serão randomicamente divididos em 14 grupos: G1: animais sem indução do melanoma + salina; G2: animais sem indução do melanoma + cisplatina 10mg/kg (controle positivo); G3: animais sem indução do melanoma + quercetina livre 100 mg/kg; G4: animais sem indução do melanoma + crisina livre 100mg/kg; G5: animais sem indução do melanoma + NP branca; G6: animais sem indução do melanoma + quercetina NANO 0,75mg/ml; G7: animais sem indução do melanoma + crisina NANO 0,75mg/ml; G8: animais com melanoma induzido + salina; G9: animais com melanoma induzido + cisplatina 10mg/kg (controle positivo); G10: animais com melanoma induzido + quercetina livre 100 mg/kg; G11: animais com melanoma induzido + crisina livre 100mg/kg; G12: animais com melanoma induzido + NP branca; G13: animais com melanoma induzido + quercetina NANO 0.75/ml; G14: animais com melanoma induzido + crisina NANO 0,75mg/ml. Ao término do experimento, as amostras de sangue, para os testes biológicos serão coletadas por punção cardíaca, sendo assim, a eutanásia se dará por exsanguinação após anestesia geral inalatória. O sangue será utilizado para obtenção de soro e linfócitos. Os testes referentes a comprovação da indução do melanoma (imunohistoquímica) bem como as demais análises serão realizadas no Laboratório de Biologia e Imunologia Aplicada, no Prédio 20. Serão também avaliadas neste experimento as análises qualitativas e quantitativas por citometria de fluxo das subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos B, bem como da expressão de moléculas de superfície do sistema purinérgico como os marcadores de diferenciação CD39 e CD73 e dos receptores P1, P2X7, P2Y1 e P2Y2. Também será avaliado por citometria de fluxo o padrão de resposta imune nos diferentes grupos estudados através da quantificação de interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF), interferon- γ (IFN- γ), e interleucina-17A (IL-17A). Também será realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a quantificação de agonistas purinérgicos adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e adenosina (ADO) no soro. Em linfócitos de sangue periférico, serão ensaiadas por espectrofotometria as atividades das enzimas ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase, CD39, EC3.6.1.5) e ADA (EC 3.5.4.4) e será avaliado por Western blot a expressão das proteínas CD39 e CD73 e do receptor P1, P2X7,



Comissão de Ética no Uso de Animais

da *Universidade Federal de Santa Maria*

P2Y1 e P2Y2. O principal resultado esperado com o desenvolvimento deste projeto de pesquisa é contribuir para um melhor entendimento das sinalizações purinérgicas no modelo de melanoma cutâneo bem como os efeitos do tratamento com a quercetina e a crisina nessa condição patológica, e, conseqüentemente, possibilitar uma alternativa coadjuvante e eficaz para a prevenção/tratamento desta enfermidade.

Local do experimento: Os animais serão mantidos no biotério de experimentação prédio 19 na UFSM. Antes do início do experimento, os animais serão aleatoriamente distribuídos em gaiolas coletivas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm). Os animais serão mantidos no Biotério do prédio 19 (Bioquímica Toxicológica da UFSM), que possui sistema de exaustão de ar. Os camundongos, após ambientação de 7 dias, serão distribuídos randomicamente em gaiolas coletivas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), contendo no máximo 5 camundongos em cada gaiola. Para enriquecimento ambiental serão realizadas modificações nas gaiolas, utilizando tubos de PVC para os animais se esconderem e prateleiras para descansarem. Os ensaios bioquímicos serão realizados no Laboratório de Biologia e Imunologia Experimental e Aplicada do Prédio 20, na UFSM.

Santa Maria, 21 de maio de 2019

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria