



**EFETIVIDADE DA ELIPTICINA E ARTEMISININA, EM
CONDIÇÕES NANOESTRUTURADAS, PARA ÀS ATIVIDADES
ANTIMALÁRICA E ANTITUMORAL**

NEILA SOARES PICAÑO

Manaus – AM

2018



NEILA SOARES PICAÇÃO

**EFETIVIDADE DA ELIPTICINA E ARTEMISININA, EM
CONDIÇÕES NANOESTRUTURADAS, PARA ÀS ATIVIDADES
ANTIMALÁRICAS E ANTITUMORAL**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de doutora em Biotecnologia, área de concentração saúde.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei

COORIENTADOR: Prof. Dr. Andriy Grafov

**Manaus - Amazonas
2018**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Picanco, Neila Soares Picanço

P585e Efetividade da elipticina e artemisinina, em condições

nanoestruturadas, para às atividades antimalárica e antitumoral. /

Neila Soares Picanço Picanco. 2018

74 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Wanderli Pedro Tadei

Coorientador: Andriy Grafov

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Elíptica. 2. Artemisinina. 3. nanopartículas. 4. antimaláricos.
5. antitumorais. I. Tadei, Wanderli Pedro II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Aos meus pais
Oswaldo de Oliveira Picanço (*in memoriam*)
e Tereza Soares Picanço,
aos meus irmãos e irmãs
e aos meus sobrinhos e afilhados
Luís Felipe, Luís Gabriel e Luís Henrique

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor misericordioso, que me conduz e permitiu a conclusão desse trabalho.

Aos meus pais Osvaldo de Oliveira Picanço (*in memoriam*) e Tereza Soares Picanço, os meus primeiros educadores, pela educação alicerçada a fé, nos valores éticos e respeito ao próximo.

As minhas irmãs, Neuza, Nelma e Nilce, e os meus irmãos José, Gervázio, Paulo, César, Antônio e Luiz pela amizade, colaboração, companheirismo e compreensão.

Aos meus anjos da guarda, Luís Felipe, Luís Gabriel e Luís Henrique e Ana Carolina que sempre me receberam com beijos e abraços, independentemente de qualquer cansaço.

As minhas sobrinhas e sobrinhos pela torcida que nos sustenta na caminhada.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei, pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, pela orientação deste trabalho bem como por todo o apoio, incentivo, paciência, disponibilidade e amizade, os quais foram fundamentais para esta realização. Obrigado por acreditar em mim!

Ao meu coorientador Andriy Grafov e sua esposa Iryna Grafova, pesquisadores da Universidade de Helsinki/Finlândia, por seus acolhimentos e ensinamentos fundamentais para a construção desse trabalho e pela oportunidade de participar do Projeto VAIKUTUS.

Ao Dr. Adrian Martin Pohlit, pesquisador de Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, por minha indicação para participar do Projeto VAIKUTUS na Universidade de Helsinki/Finlândia.

A Universidade de Helsinki/Finlândia onde a maior parte deste trabalho foi realizada através do Projeto VAIKUTUS financiado no âmbito da 7.^a área de investigação. FP7-PEOPLE-2011-IRSES Marie Curie.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA e Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) onde a complementação deste trabalho foi realizada.

A Universidade Federal do Amazonas – UFAM pela infraestrutura do Programa Multidisciplinar de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Ao Amigo Dr. Jorge Luis Lopez Lozano, pesquisador da Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), pela amizade, paciência, orientação e solidariedade que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

À Dra. Rosemary Aparecida Roque, pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, pela amizade e apoio sempre quando solicitada.

Ao Prof. Dr. Anderson Guimarães e o acadêmico Mateus Elias Soares de Almeida pela viabilização e disponibilidade para as análises de espectroscopia do infravermelho na Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM/UFAM.

Ao Dr. Emerson Lima da Silva por permitir as análises no laboratório Biophar/FCF/UFAM e pela doutoranda Márcia de Jesus Amazonas da Silva pelas análises de citotoxicidade.

À Dra. Tatiane Pereira de Souza por permitir o uso do aparelho Zetasizer Nano e ao técnico Newton de Leiros Garcia Júnior por seu acompanhamento no laboratório de Tecnologia de Fármacos da FCF/UFAM.

Ao Dr. Spartaco Astolfi Filho, por suas orientações sempre quando precisei.

À Dra. Soraya dos Santos Pereira, FIOCRUZ –RO, pela colaboração nas análises das amostras no Zetasizer Nano.

À amiga Dra. Ana Cyra dos Santos Lucas e ao amigo José Maria Tavares Guimarães, pelo acolhimento no Laboratório de Análises Toxicológicas.

À amiga Dra. Lígia Fonseca Heyer, pelas doces palavras que permitiram que eu continuasse a caminhar.

Ao amigo Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva, por sua amizade e colaboração para que esse projeto fosse realizado.

À amiga Dra. Ana Adenice Correa, por seu apoio, amizade, confiança no meu trabalho quando iniciei, em 2002, os caminhos de Coordenadora do Curso de Farmácia na Universidade Paulista – UNIP.

A Mestra Jaqueline Siqueira da Costa, e sua equipe Suellen Miquilles Monteiro, Laís Garcia Jordão e Marlene Rodrigues Marcelino Camargo pelos

testes antimaláricos realizados no laboratório de cultura para *P. falciparum* do INPA.

Aos amigos do INPA, Katak, Juan, Elerson, Vera, Deidre, Laura, William, Thamiles, Eunice, Augusto, Leandro e todos do grupo de pesquisa do laboratório Malária e Dengue.

Aos amigos e amigas da Casa 15, do INPA, pela colaboração sempre que solicitada.

A minha estimada família Albuquerque de Araújo, D. Rita, José Albuquerque, Márcio, Suelen e Heitor, pelo apoio incondicional, amizade e acolhida.

A minha Amiga – irmã, Gorette e seu esposo Irlan Portella, pelo fundamental apoio e amizade nos meus frágeis momentos, nas minhas correrias...sem vocês ficaria mais difícil essa realização.

A minha estimada família Mendonça, D. Andreлина, Giovani, Ana Luzia, Ana Cristine, Rosana, Silvana, Conceição, Camila, Victor, Amanda, Tércio, Tayana, que tanto me sustenta com suas orações e bem querer.

À amiga Da Luz Barbosa e sua família pelo acolhimento e amizade.

À amiga Cláudia Portella, obrigada pelo apoio sempre que solicitado.

As amigas Rochelly Mesquita e Eunice do Vale pela amizade e apoio durante o período de Helsinki/Finlândia que perdura até hoje.

As amigas Érika Inácio, Fabiane Veloso e ao amigo Pedro Rael pelo companheirismo nas atividades do laboratório em Helsinki.

Aos amigos Wallace Lira e Wenderson Farias pelo apoio incondicional.

As amigas Karla Lago e Hilkem Alves, sempre estiveram presente com palavras de otimismo que me encorajaram a continuar na caminhada.

As amigas da Catedral Nossa Senhora da Conceição Dirce Correa, Patrícia Cabral e Francilma Grana pela colaboração e paciência comigo.

As amigas da Arquidiocese de Manaus Renilde Queiroz e Esther Chacon, pelas palavras de carinho e apoio.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

*Porque Eu, o Senhor teu Deus,
te seguro pela mão e te declaro:
Não temas, eu te ajudarei.
(Isaías 41,13)*

*Há um tempo
em que é preciso abandonar
as roupas usadas,
que já tem a forma do nosso corpo,
e esquecer os nossos caminhos,
que nos levam sempre aos mesmos lugares.*

*É o tempo da travessia:
e, se não ousarmos fazê-la,
teremos ficado, para sempre,
à margem de nós mesmos.*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

A resistência parasitária aos fármacos antimaláricos comercialmente disponível é uma realidade, o que possibilita a busca por novas drogas e o desenvolvimento de pesquisas com plantas que possuem propriedades farmacológicas. As inúmeras discussões sobre as drogas antimaláricas de liberação rápida, vem ganhando força e adesão, pois apresenta vantagens relacionadas a sua eficácia, especificidade e tolerância por parte do paciente na terapia. Desta forma, a nanotecnologia oferece ferramentas importantes para o desenvolvimento de novos fármacos e as nanopartículas podem contribuir para uma terapia mais específica de ação seletiva na distribuição e absorção das drogas. De acordo com a biodiversidade Amazônica, o princípio ativo, elipticina envolvida em pesquisas como antimalárico foi isolado da *Aspidosperma Vargasii*, cujo nome popular é Amarelão ou Carapanaúba branca. A elipticina apresenta atividade antiplasmodial que foi demonstrado em teste *in vitro*, pois inibiu o crescimento do cristal de heme que ocorre no vacúolo digestivo do *Plasmodium ssp.* e está associado ao crescimento do parasito. Outro princípio ativo, que é extraído da *Artemisia annua* L. é a artemisinina. É considerada fundamental no tratamento da malária, por sua potência e sua rápida ação. As intervenções da terapia combinada baseada em artemisinina, diminuíram a morbidade e a mortalidade associadas a malária em várias partes do mundo. As combinações de artemeter-lumifantrine, artesunato-mefloquina e artesunato-amodiaquina, está relacionado a propriedades gametocitocidas da artemisinina que inibe a transmissão de parasitas para provavelmente reduzir o desenvolvimento de resistência antipalúdica. Recentes estudos mostram que o artesunato pode ser uma boa alternativa para o tratamento de alguns tipos de câncer, pelo mecanismo antiangiogênico. A sua baixa toxicidade representa um quimioterápico promissor. É importante salientar que o artesunato não é transportado por P-glicoproteínas, portanto não está envolvido em resistência a multidrogas. Na luta contra essas patologias, são apontados vários inconvenientes para o paciente como alguns efeitos adversos e horário de dosagens. Assim, considera que a avaliação de novos sistemas de liberação de medicamentos podem melhorar a eficácia terapêutica de futuras nanoformulações para fármacos antimaláricos e antitumorais. Neste sentido, este trabalho tem por objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar as nanopartículas no seu aspecto físico-químico e citotóxico por meio de bioensaios contra *Plasmodium falciparum* e células antitumorais. As substâncias utilizadas na síntese das nanoesferas foram sódio tetracloropaládio e cloridrato de elipticina. As substâncias envolvidas na síntese das nanofibras foram o cloridrato de artemisinina, polyvinilpirrolidona e polibutileno.

Palavras-chave: elipticina, artemisinina, nanopartículas, antimaláricos e antitumorais

ABSTRACT

Parasite resistance to commercially available antimalarial drugs is a reality, which makes it possible to search for new drugs and to develop researches with plants that have pharmacological properties. Numerous discussions on rapidly-releasing antimalarial drugs have been gaining strength and adherence, as it has advantages related to its efficacy, specificity and patient tolerance in therapy. In this way, nanotechnology offers important tools for the development of new drugs and nanoparticles can contribute to a more specific therapy of selective action in the distribution and absorption of drugs. According to the Amazonian biodiversity, the active principle, ellipticina involved in research as antimalarial was isolated from *Aspidosperma vargasii*, whose popular name is Amarelão or Carapanaúba branca. Ellipticin exhibits antiplasmodial activity that has been demonstrated in vitro test because it inhibited the growth of heme crystal that occurs in the digestive vacuole of *Plasmodium* ssp. and is associated with parasite growth. Another active principle, which is extracted from *Artemisia annua* L. is artemisinin. It is considered essential in the treatment of malaria, by its potency and its rapid action. Interventions of artemisinin-based combination therapy have reduced morbidity and mortality associated with malaria in several parts of the world. The combinations of artemeter-lumifantrine, artesunate-mefloquine and artesunate-amodiaquine, are related to artoisinin's gametocytocidal properties that inhibit the transmission of parasites to probably reduce the development of antimalarial resistance. Recent studies show that artesunate may be a good alternative for the treatment of some types of cancer by the antiangiogenic mechanism. Its low toxicity represents a promising chemotherapeutic. It is important to note that artesunate is not carried by P-glycoproteins, so it is not involved in multidrug resistance. In the fight against these pathologies, several inconveniences are pointed out for the patient as some adverse effects and dosing schedule. Thus, it considers that the evaluation of new drug release systems can improve the therapeutic efficacy of future nanoformulations for antimalarial and antitumor drugs. In this sense, this work aims to develop, characterize and evaluate nanoparticles in their physico-chemical and cytotoxic aspect by means of bioassays against *Plasmodium falciparum* and antitumor cells. The substances used in the synthesis of the nanospheres were sodium tetrachloropalladium and ellipticine hydrochloride. The substances involved in the synthesis of nanofibers were artemisinin hydrochloride, polyvinylpyrrolidone and polybutylene.

Key words: ellipticina, artemisinin, nanoparticles, antimalarials and antitumorals

LISTA DE FÍGURAS

Figura 1	Estrutura química da Elipticina.....	22
Figura 2	Estrutura química do Cloridrato de Elipticina.....	22
Figura 3	Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	23
Figura 4	Fluxograma do delineamento experimental.....	28
Figura 5	Fluxograma processo de preparação das nanoesferas de cloridrato de elipticina	31
Figura 6	Cubetas utilizadas para determinação do tamanho das nanoesferas.....	33
Figura 7	Cubetas utilizadas para determinação do potencial zeta.....	34
Figura 8	Relatório do Potencial Zeta do Cloridrato de Elipticina.....	40
Figura 9	Solução nanocoloidal de paládio e Cloridrato de Elipticina.....	40
Figura 10	Distribuição do tamanho por intensidade das nanoesferas de Cloridrato de Elipticina.....	41
Figura 11	Distribuição do tamanho por volume das nanoesferas de Cloridrato de Elipticina.....	41
Figura 12	Estatística do tamanho das nanoesferas de Cloridrato de Elipticina....	42
Figura 13	Espectro de FT-IR do Sódio tetraclore paládio.....	43
Figura 14	Espectro de FT-IR do Cloridrato de Elipticina.....	43
Figura 15	Espectro de FT-IR do Cloridrato de Elipticina e Sódio tetraclore paládio (C ₁₇ H ₁₄ N ₂ .HCl + Na ₂ PdCl ₄).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Data dos primeiros casos registrados de resistência do <i>P.falciparum</i> aos antimaláricos.....	19
Tabela 2	Caracterização química das soluções utilizadas na síntese nas nanoesferas.....	30
Tabela 3	Resultados da característica das nanoesferas de Cloridrato de Elipticina.....	40
Tabela 4	Concentração inibitória 50% (CI ₅₀) <i>in vitro</i> frente à cepa W2 de <i>Plasmodium falciparum</i>	44
Tabela 5	Concentração inibitória 50% (CI ₅₀) <i>in vitro</i> frente e linhagem MRC-5.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

ACTs	Tratamento de combinação com artemisinina
ART	Artemisinina
ATCC	American Type Culture Collection
C ₁₇ H ₁₄ N ₂ .HCl	Cloridrato de elipticina
° C	Graus Celsius
cm ⁻¹	Centímetro
CAM	Central Analítica de Apoio Multidisciplinar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DLS	Dynamic light scattering
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco high glucose
DU 145	Células do epitélio da próstata
ElipNEs	Nanoesfera de Elipticina
FVS	Fundação de Vigilância Sanitária
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
g	Gramma
HB	Polibutileno
IC ₅₀	Concentração Inibitória
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
I	Inativo
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de Potássio
KN	Quilonewton
M	Molar
MA	Muito ativo
mg	Miligrama

mL	Mililitro
mV	MiliVolts
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MRC5	Células de fibroblasto de pulmão
Na ₂ PdCl ₄	Sódio tetracloro paládio
NaBH ₄	Boro hidreto de sódio
“N”	Produto natural inalterado
NEs	Nanoesferas
nm	Nanomêtro
NHME	Acetato de 9-hidróxi-2-metilelptícínico
NPMs	Material particulado
Pd	Paládio
PdCl ₂	Cloreto de Paládio
pH	Potencial Hidrogênioônico
P&D	Pesquisa & Desenvolvimento
P450s	Citrocromos P450
PVP	Polivinilpirrolidona
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
U	Unidade de massa atômica
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
VP	Vacúolo parasitóforo
W2	Cepa Cloroquina Resistente
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Justificativa.....	14
3. Revisão Bibliográfica.....	16
3.1 Malária.....	16
3.2 Aspectos epidemiológicos.....	16
3.3 Ciclo Biológico.....	17
3.4 Resistência as drogas.....	18
3.5 Busca por novas drogas.....	19
3.5.1. Elipticina.....	20
3.5.2. Artemisinina.....	22
3.6 Nanoestruturas mas utilizadas à fármacos.....	23
3.7 Nanopartículas.....	23
3.7.1 Caracterização por tamanho da partícula.....	24
3.7.2 Potencial Zeta.....	24
3.8 Aplicação das nanopartículas.....	25
4. 3.9 Liberação de Fármacos.....	26
Objetivos.....	
5. Metodologia.....	28
5.1 Reagentes e soluções utilizadas para síntese das nanoesferas de cloridrato de elipticina.....	29
5.2 Sínteses das nanoesferas de cloridrato de elipticina.....	31
5.3 Caracterização físico-química das nanoesferas de cloridrato de elipticina.....	32
5.4 Espectroscopia da região do Infravermelho com Transformada de Fourier.....	34
5.5 Avaliação Biológica <i>in vitro</i> para <i>Plasmodium falciparum</i>	35
5.6 Avaliação da viabilidade celular pelo método de Alamar blue.....	36
5.7 Caracterização e avaliação biológica da nanofibra de artemisinina..	38
6. Resultados e Discussões.....	39
7. Conclusão.....	47
8. Referências.....	48

1. INTRODUÇÃO

O grande avanço em pesquisas relacionadas à nanociência e nanotecnologia, estabelece para esta área do conhecimento inúmeros impactos científicos e tecnológicos. Com isso, os temas centrais das políticas de Ciência e Tecnologia estão sendo relacionados à saúde, incluindo o desenvolvimento de fármacos e medicamentos, matérias-primas e materiais, com abrangência para a ciência de nanomateriais. Neste contexto, a nanociência é definida como estudo dos fenômenos naturais que regem o comportamento de átomos, moléculas e estruturas em escalas nanométricas e a nanotecnologia consiste na aplicação da nanociência visando o controle e manipulação da matéria estruturada no nível atômico e molecular, permitindo o desenvolvimento de dispositivos, materiais funcionais e sistemas com propriedades diferentes daquelas observadas na escala microscópica ou macroscópica (GUTERRES, 2013).

De acordo com a área da saúde, particularmente nas áreas de nanobiotecnologia, nanotecnologia farmacêutica e de nanomedicina, o setor de pesquisa e desenvolvimento (P&D), visam projetar nanomedicamentos que ofereçam vantagens em relação aos seus homólogos, principalmente pelo seu tamanho reduzido. Neste sentido, várias nanopartículas estão em desenvolvimento, seja para a terapêutica ou para diagnóstico. As nanopartículas, devido a sua dimensão ser em nanoescala, em geral de 1 nm a 100 nm, apresentam propriedades novas ou melhoradas com base em suas características específicas em relação ao tamanho, distribuição, morfologia, fase, composição, entre outras, quando comparadas às partículas de maiores dimensões provenientes da mesma fonte, nas quais as nanopartículas foram formadas. (SILVA, 2017)

As motivações para o desenvolvimento de nanopartículas reside na possibilidade de produção de moléculas inéditas, portadoras de diferentes e incomuns propriedades físicas e químicas e desenvolver produtos com diferentes tipos de aplicações tecnológicas. A nanotecnologia farmacêutica, com o uso de nanomateriais, desenvolve fármacos de liberação controlada, frequentemente descritos como “*Drug Delivery Systems*”, que apresentam inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional (PIMENTEL *et al*, 2007; ROSSI – BERGMANN, 2008). Assim, as nanopartículas metálicas (NPMs) são

sistemas nanoestruturados que apresentam características físico-químico-biológicas dependentes da sua composição, tamanho e forma.

De acordo com Mittal *et al* 2014, podemos destacar as seguintes aplicações de NPMs: liberação de drogas, de insumos agropecuários e de cosméticos, elaboração de sensores para diagnóstico de doenças, infecções e contaminações, desenvolvimento de sistemas de transferência de genes, produção de nanopartículas superparamagnéticas, utilizadas para a biosseparação seletiva e magnetodiálise, controle de pragas e patógenos, desenvolvimento de catalisadores e sistemas de biorremediação, aplicações na indústria têxtil.

A natureza representa um recurso infinito para o desenvolvimento de novos fármacos, amplificação em medicamentos eficazes para uma multiplicidade de doenças. Os produtos naturais desempenharam um papel crítico como fonte de novas substâncias que possam ser medicamentos, especialmente para agentes antibacterianos e antitumorais. Embora as preparações de drogas à base de plantas tenham sido descritas há milhares de anos, a sua aplicação como compostos isolados e caracterizados começou apenas no século XIX. Atualmente, 11% dos 252 medicamentos considerados pela Organização Mundial de Saúde – OMS, como básicos e essenciais, são exclusivamente de origem natural e predominantemente anticancerígenos ou anti-infecciosos (HOARE,2008; CHEN, 2011; POHLIT, 2013).

Newmann & Cragg, 2016 propuseram códigos de categoria para os compostos ativos como, "B" para macromoléculas biológicas, "N" para produtos naturais inalterados e "S" para drogas sintéticas. De acordo com a classificação, ao longo da década de 1940, algumas moléculas foram estudadas na área de tratamento do câncer e foram classificadas como "N" porque o princípio ativo era de origem natural (GULATI, 2011).

Recentemente, várias substâncias foram estudadas como antimaláricas e antitumorais, dentre as quais, podemos citar a elipticina e artemisinina (FARKHZAD, 2009; STEVENSON, 2012). A elipticina é um dos alcalóides de origem natural, simples, com uma estrutura planar, que tem sido o objeto de estudo devido à sua atividade antitumoral. Os compostos isolados da elipticina são da casca da árvore amazônica identificada como *Aspidosperma vargasii* A. DC que é conhecida na Amazônia Brasileira pelo nome de carapanúaba e cujas infusões são administradas para a malária. (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007; HENRIQUE *et al.*, 2010),

A artemisinina, *Artemisia annua* L. foi descoberta na China em 1967, uma planta conhecida como madeira verme que era utilizada para a cura da febre. Porém, com a modificação no preparo de extração da planta afim de obter um produto mais ativo, foi comprovado que a substância possuía atividade antimalárica eficaz (UDAY KUMAR, 2014). As suas características farmacodinâmicas, farmacocinéticas e o seu efeito na eliminação dos parasitos de *Plasmodium* trouxeram muitas expectativas face a esta nova classe de fármacos antimaláricos. (VILAÇA, 2010). De forma semelhante, verificou-se que a artemisinina é capaz de afetar as células cancerosas devido à sua elevada concentração de ferro. Mais recentemente os derivados da artemisinina mostraram efeitos anticancerígenos, promissores contra múltiplas linhagens celulares derivadas de vários tipos de câncer (LAI, 2005; ZHANG, 2013).

Nos últimos anos, não somente plantas, mas organismos marinhos foram intensamente investigados para a obtenção de novos agentes terapêuticos. Porém, alguns apresentam limitações como toxicidade, baixa biodisponibilidade e solubilidade, o que restringe o âmbito de utilização para vários produtos naturais em seres humanos. Contudo, novas sínteses a partir dos compostos extraídos das plantas, podem ser desenvolvidas visando a elaboração de medicamentos nanoestruturados como possíveis antimaláricos e antitumorais (LIMA *et al*, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Na Amazônia Brasileira, infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* são as mais relevantes clinicamente. Já é observada a resistência dos parasitos aos antimaláricos disponíveis comercialmente. Assim, há uma urgência para a descoberta e desenvolvimento de novos antimaláricos com mecanismos de ações para combater os parasitos resistentes aos medicamentos de hoje. Atualmente, a síntese, processamento, caracterização e utilização de estruturas em faixa nanométrica, que compreende partículas na escala de 1 a 100 nm, estão sendo desenvolvidas e divulgadas. Os nanomateriais que podem ser nanocompósitos, nanopartículas, nanoesferas e outras nanoestruturas, despertam interesse no desenvolvimento de medicamentos na escala nanométrica. Com isso, possibilita uma farmacologia mais prática, com a qual a terapia será mais específica e seletiva, agindo na distribuição e liberação do medicamento.

Neste contexto, as vantagens associadas à nanopartícula e aos sistemas de liberação de drogas são: aumento da biodisponibilidade e estabilidade, escolha da administração da rota, entrega direta e toxicidade reduzida. As desvantagens estão relacionadas às questões de segurança e ética, produção em escala e coeficiente de eficácia.

Visando colaborar com novas descobertas e garantir a segurança terapêutica de uma substância natural ou sintética, deve ser comprovado que o uso das nanopartículas, não oferece danos à saúde humana. Os estudos farmacológicos, histopatológicos e toxicológicos, colaboram com a nanotecnologia farmacêutica pois algumas plantas podem sintetizar substâncias tóxicas que, na natureza, apresentam função de defesa. Assim sendo, as plantas contêm inúmeros constituintes em seus extratos que, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos, devido à presença de compostos ou estruturas diferentes.

A compreensão da fisiopatologia da malária, de células tumorais e o conceito de liberação de drogas por meio de sistemas nanoparticulados, pode colaborar para minimizar a incompatibilidade farmacocinética associada às moléculas terapêuticas e poderá ajudar na detecção precoce da doença.

Atualmente, a elipticina e seus derivados, foram objeto de inúmeros estudos farmacológicos em ensaios clínicos contra diferentes formas de câncer e como

antimalárico. Outra substância, que pode ser capaz de afetar as células cancerosas devido à sua elevada concentração de ferro, é a artemisinina. Mais recentemente seus compostos derivados, mostraram efeitos anticancerígenos promissores contra múltiplas linhas celulares antineoplásicas.

Portanto, novas sínteses a partir desses compostos, podem ser desenvolvidos visando a elaboração de medicamentos seguros, por estratégias de novas rotas de sínteses. Desta forma, a pesquisa está voltada para obtenção de princípios ativos nanoestruturados que possibilitem a viabilização como possíveis antimaláricos e antitumorais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Malária

Atualmente, uma grande parcela da população mundial é afetada pelas doenças parasitárias, que limita a qualidade de vida e o desenvolvimento de muitos países. Os protozoários são os responsáveis pela maioria das infecções parasitárias, protozooses, que afetam os humanos. Das protozooses mais conhecidas, se destaca a malária, que está presente, nos dias de hoje, em praticamente, todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. O protozoário, *Plasmodium* causador da malária é transmitido ao homem por fêmea infectada do mosquito do gênero *Anopheles*. Das 100 espécies desses protozoários, somente cinco são responsáveis por infectar seres humanos: *P. vivax*; *P. falciparum*; *P. ovale* e *P. malariae* e *P. knowlesi*, este último foi descrito recentemente como infeccioso para seres humanos. (WALKER *et al.*, 2014). Quanto ao vetor, o gênero *Anopheles* conta com cerca de 465 espécies das quais aproximadamente 70 são capazes de transmitir o parasito da malária para humanos ao redor do mundo (SINKA, 2013). A espécie notificada recentemente como vetor para humanos foi *An. stephensi* (FAULD *et al.*, 2104).

No Amazonas as infecções causadas somente pelo *P. falciparum*, e também as causadas tanto por *P. falciparum* quanto por *P. vivax* (infecções mistas) representaram 14,1% dos casos notificados entre os anos de 2015 e 2016, enquanto que as infecções por *P. vivax* correspondem a 85,8% da ocorrência da doença (BRAZ *et al.*, 2013).

3.2 Aspectos epidemiológicos

O risco de transmissão de malária pode ser considerado inexistente nas variadas regiões do Brasil com exceção da região norte, especialmente na região amazônica e na cidade de Manaus. Esse risco é mais iminente nas áreas rurais dessa região, contudo, alternativas tradicionais preventivas como uso de repelentes e mosquiteiros, além de terapia profilática a base de atovaquona-proguanil, doxiciclina ou mefloquina, apesar de essa última não ser uma recomendação obrigatória das diretrizes nacionais das autoridades sanitárias brasileiras, devem e podem ser consideradas por pessoas em situações de risco (WHO, 2017).

Na África Subsaariana, o *Plasmodium falciparum* é o parasito da malária mais prevalente sendo responsável por 99% dos casos estimados de malária em 2016. Fora da África, *P. vivax* é o parasito predominante na Região das Américas, com 64% dos casos de malária; está acima de 30% no Sudeste Asiático e 40% nas regiões do Mediterrâneo Oriental.

De acordo com o último relatório da Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS, após quase uma década de diminuição da carga da doença na América Latina (2005- 2014), houve um aumento gradativo, na região, de casos da doença nos anos de 2015, 2016 e 2017. Em 2016, oito países registraram aumento de casos de malária, além do Brasil, houve registros da Colômbia, Equador, El Salvador, Haiti, Honduras, Nicarágua, Panamá e Venezuela. No relatório da OPAS, em 2017, os cinco países mais afetados na América Latina foram Brasil, Equador, México, Nicarágua e Venezuela, que registraram aumento no número de casos no período. Na região amazônica brasileira, onde ocorrem 99,7% dos casos da doença. Entre janeiro e novembro de 2017, o Brasil notificou 174.522 casos de malária na região Amazônica, um aumento de 48% em relação aos 117.832 casos reportados em 2016, com destaque para os estados do Acre, Amazonas e Pará.

Mesmo que o Relatório Anual da Malária da Organização Mundial da Saúde - OMS destacar as conquistas da saúde pública mundial na luta contra a doença, o documento revela que após um período de êxito, o controle continuado do progresso está paralisado, e uma atenção especial deve ser voltada para esses novos dados, pois são um alerta para que as autoridades de saúde dos países endêmicos reforcem suas ações. (WHO, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

3.3 Ciclo biológico

O ciclo biológico dos plasmódios humanos compreende duas fases: uma fase assexuada ou esquizogônica, que se passa no ser humano e outra sexuada ou esporogônica, que se passa nas fêmeas do mosquito vetor do gênero *Anopheles* (GREENWOOD, *et al.*, 2008).

Segundo dados do Ministério da Saúde, 2010, a infecção inicia-se quando os parasitos (esporozoítos) são inoculados na pele pela picada do vetor, os quais irão

invadir as células do fígado, os hepatócitos. Nessas células multiplicam-se e dão origem a milhares de novos parasitos (merozoítos), que rompem os hepatócitos e, caindo na circulação sanguínea, vão invadir as hemácias, dando início à segunda fase do ciclo, chamada de esquizogonia sanguínea. É nessa fase sanguínea que aparecem os sintomas da malária. Após invadir o hepatócito, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos. Estes se multiplicam por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais e posteriormente a milhares de merozoítos que invadirão os eritrócitos (NEVES, 2011).

Todas as fases do desenvolvimento do parasito acontecem no vacúolo parasitóforo (VP), sendo que sua formação nos hepatócitos é de fundamental importância. Esta se inicia a partir da junção entre parasito-célula hospedeira, através da qual o parasito se projeta para o interior de alguma invaginação da membrana plasmática celular. Assim, a membrana do VP constitui uma importante interface entre o parasito e o hospedeiro.

Na fase sanguínea do ciclo, os merozoítos formados rompem a hemácia e invadem outras, dando início a ciclos repetitivos de multiplicação eritrocitária. Os ciclos eritrocitários repetem-se a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae*. Após diversos ciclos de replicação, os merozoítos eritrocíticos se desenvolvem em formas sexuadas, sendo gametócitos femininos e masculinos. Em infecções por *P. falciparum*, eles são formados mais tardiamente se comparado ao *P. vivax*. Esses gametas no interior das hemácias (gametócitos) não se dividem e, quando ingeridos pelos insetos vetores, irão fecundar-se para dar origem ao ciclo sexuado do parasito (LEITE, 2012).

3.4 Resistência às drogas e tratamento

Segundo Neves, 2011, o tratamento adequado e oportuno da malária é hoje o principal alicerce para o controle da doença. Antes do surgimento da resistência do *Plasmodium falciparum* a cloroquina, esta droga era utilizada para as quatro espécies de plasmódios que parasitam o homem. Hoje, além da cloroquina, o *P. falciparum* apresenta resistência a diversos outros antimaláricos, tomando o seu tratamento um dilema para o médico e um desafio para as autoridades de saúde responsáveis pelo controle da malária.

No entanto, a cloroquina ainda é a substância de escolha para tratamento em alguns países, principalmente para tratar infecções por *P. vivax* em áreas nas quais esse fármaco ainda é eficaz, mas em áreas com *P. vivax* CQR, terapias baseadas em artemisinina precisam ser adotadas (AGUIAR *et al.*, 2012)

Gomes, *et al* em 2011, diz que um aspecto essencial do tratamento da malária grave é o controle da parasitemia, que funciona como fator determinante da gravidade; desta feita, utilizam-se prioritariamente os esquizotocidas eritrocitários de ação rápida – por exemplo, os derivados da artemisinina –, lembrando-se que não devem ser administrados fármacos como a mefloquina, a cloroquina e o halofantrine, disponíveis apenas por via oral, uma vez que a terapia medicamentosa deve ser administrada por via intravenosa, para obtenção de níveis séricos com mais rapidez.

O *P. falciparum* se reproduz rapidamente nas células do sangue, e ao surgir os sintomas da malária, a doença se encontra num estágio de proliferação do parasita, ocasionando o caso de malária mais grave (RANG *et al.*, 2012). A maioria dos antimaláricos existentes não são eficazes no controle dessa espécie.

Tabela 1. Data dos primeiros casos registrados de resistência do *P.falciparum* aos antimaláricos.

Fármaco	Introdução na terapia	Primeiro registro da resistência	Diferença (anos)
Quinino	1632	1910	278
Cloroquina	1945	1957	12
Proguanil	1948	1949	1
Sulfadoxina-Pirimetamina	1967	1967	0
Mefloquina	1977	1982	5
Artemisinina e derivados	1980	-	-

CRAVO & ROSÁRIO, 2003

3.5 Buscas de novas drogas como possíveis antimaláricos e antitumorais.

Novas drogas com estruturas e mecanismos de ação únicos são urgentemente necessárias para se tratar cepas de *Plasmodium* multirresistentes. Sabe-se que as estruturas dos produtos naturais possuem características de alta diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que fazem delas, estruturas favoráveis como compostos líderes para a descoberta

de novos fármacos, e servem para diferenciá-las de bibliotecas de componentes sintéticos e combinatórios, sobretudo no que diz respeito aos seus mecanismos de ação (KAUR *et al.*, 2009).

Os medicamentos extraídos de produtos naturais tendem a ser anticancerígenos ou anti-infecciosos. Isso comprova o importante papel dos produtos naturais na descoberta e desenvolvimento de medicamentos, pois a maioria das estruturas centrais de produtos químicos sintéticos são formulados a partir dos produtos naturais. (BRANDÃO, 2010)

Há quase 20 anos, Newmann & Cragg propuseram seus códigos de categoria para os compostos ativos (por exemplo, "B" para macromoléculas biológicas, "N" para produtos naturais inalterados, "S" para drogas sintéticas, etc.). De acordo com a classificação, ao longo do período de aproximadamente a década de 1940 atualizado, 131 das 175 pequenas moléculas ou 74,8% estudadas na área de tratamento do câncer foram classificadas como "diferentes de S" (ou seja, foram feitas por síntese total, mas o farmacóforo era de origem natural). Os 85 ou 48,6% deles eram, na verdade, produtos naturais ou derivados deles (GULATI, 2011).

3.5.1 Elipticina

A medicina tradicional amazônica usa a casca da árvore de *Aspidosperma vargasii* (Apocynaceae) como remédio antipalúdico. A casca contém elíptica que pode ser isolada pela extração alcalina de etanol e foi descrita sua alta atividade *in vitro* contra *P. falciparum* (ANDRADE-NETO, 2007; MONTOIA, 2014).

Recentemente, o oligóxido de monoterpene indole e seus derivados foram cuidadosamente estudados como terapêuticas contra diferentes formas de câncer e como potentes antimaláricos (KAUR, 2009; ZSILA, 2016). A elipticina é um dos alcalóides de ocorrência natural mais simples com uma estrutura planar, que tem sido o centro de atenção de muitos grupos de pesquisadores devido à sua atividade antitumoral.

Diferentes hipóteses sobre mecanismos de ação da elipticina foram propostas. Na última década, as evidências de diferentes efeitos do ciclo celular da elipticina vieram à luz. Em particular, a elipticina é capaz de interagir com a proteína

supressora de tumor p53, Akt-quinase e c-Kit quinase, enquanto seus efeitos sobre outras proteínas celulares ainda estão sendo descobertos. Assim, a elipticina exibe uma atividade citotóxica multimodal, o que não é claramente especificado (O'SULLIVAN, 2013). Uma via de bio-oxidação foi originalmente proposta, supondo que a elipticina possa servir de substrato para peroxidases *in vivo* (MILLER, 2012). Estudos demonstraram que a elipticina se liga de forma covalente ao DNA depois de ser ativada enzimaticamente com citocromos P450 (P450s) ou peroxidases (STIBOROVA, 2006; AIMOVA, 2007). Derivados de elipticina tais como o acetato de 9-hidroxi-2-metilelipticínio (NHME) e cloreto de 2- (dietilaminoetil) -9-hidroxi-ilipicínio estão atualmente na fase de ensaios clínicos. (MILLER, 2012)

As propriedades farmacológicas, tais como a forte inibição da atividade da DNA topoisomerase II, a formação de aductos de DNA covalente mediados pela oxidação da elíptica com citocromo P 450 e peroxidases, também poderiam explicar a atividade antimalárica de derivados de elipticina. (PASSEMAR, 2011).

Devido as funções positivas da elipticina, há uma necessidade de produzir análogos de elipticina potentes e direcionados. A preparação da síntese é um desafio. Além disso, há necessidade de diferentes modificações, em particular, a solubilidade e, portanto, a biodisponibilidade da elipticina e de seus derivados é um problema urgente. Outro ponto crítico é um preço muito elevado da elipticina, de cerca de US\$ 10 / mg (cf Merck, Santa Cruz Biotec), o que limitou seu uso (O'SULLIVAN, 2013).

Tendo em conta o enorme interesse pela elipticina, foram desenvolvidas várias rotas sintéticas para a elipticina, a partir da abordagem de R.B.Woodward (DEANE, 2011). Geralmente, as rotas sintéticas que conduzem à elipticina são classificadas de acordo com a construção do último anel como tipos B, C, D e B + C, conforme Figura.1. Entre as inúmeras rotas sintéticas disponíveis, o método originalmente proposto por Cranwell & Saxton pareceu ser o mais prático (CRANWEL, 1962).

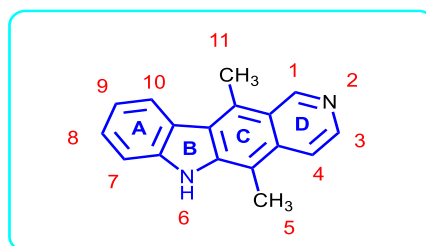


Figura 1. Estrutura química da Elipticina

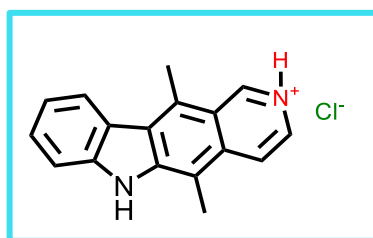


Figura 2. Estrutura química do Cloridrato de Elipticina

3.5.2 Artemisinina

Os derivados de artemisinina são as principais drogas antimalárica utilizadas na atualidade. A molécula de artemisinina foi isolada das folhas de *Artemisia annua* L., uma Asteraceae, originária do norte da China utilizada pela medicina tradicional chinesa há mais de 2000 anos para o tratamento de febre e malária (BILIA, 2006). A artemisinina possui ação rápida atuando contra *P. vivax* e *P. falciparum*, inclusive sobre as formas de malária resistentes aos tratamentos convencionais em casos de malária cerebral. (AMARAL, 2015). O endoperóxido sesquiterpeno de artemisinina e os tratamentos de combinação com ART (ACTs) podem representar uma abordagem útil para combater a resistência, e de fato é recomendado pela Organização Mundial da Saúde (DEANE, 2011). O mecanismo de ação da ART na terapia da malária é atribuído à presença de um grupo de endoperóxido dentro de sua molécula. Ao reagir com ferro, o grupo de endoperóxido se separa, produzindo radicais. Quando formados dentro de um parasita da malária, os radicais podem levar ao dano celular e à morte celular.

Recentemente os derivados da artemisinina mostraram efeitos anticancerígenos promissores contra múltiplas linhas celulares derivadas de vários tipos de câncer. Além de algumas evidências do potencial anticancerígeno da

artemisinina, o mecanismo exato de ação desse fármaco no câncer ainda não está claro.

3.6 Nanoestruturas mais utilizadas pela nanotecnologia a fármacos

As nanoestruturas utilizadas pela indústria farmacêutica para a encapsulação de ativos são: lipossomas, nanopartículas poliméricas e lipídicas, ciclodextrinas, dendrímeros, etc. Estes permitem maior eficiência de encapsulação e liberação quando comparadas aos sistemas de encapsulação convencionais como, menor flutuação dos níveis plasmáticos do fármaco e redução dos efeitos indesejáveis. (FAHNING, 2011).

Neste contexto, as vantagens associadas ao uso de nanoestruturas são: proteção do fármaco no sistema terapêutico, aumento da eficácia terapêutica; liberação progressiva e controlada do fármaco, diminuição da toxicidade, diminuição da instabilidade, possibilidade de direcionamento a alvos específicos, diminuição da dose terapêutica, redução no número de administrações e melhor aceitação da terapia pelo paciente (PIMENTEL, *et al*, 2007).

3.7 Nanopartículas

O termo nanopartículas, aplicado à liberação controlada de fármacos, faz referência a dois tipos diferentes de estrutura que são denominadas de nanoesferas e as nanocápsulas. As nanoesferas são sistemas em que o fármaco está homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. As nanocápsulas são sistemas do tipo reservatórios, onde é possível identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido, onde a substância está envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo (Azevedo, 2002)

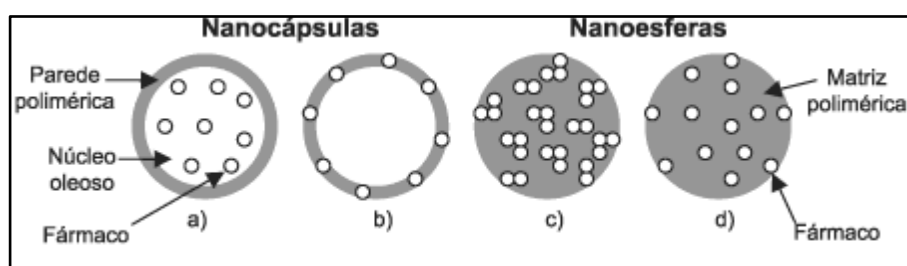


Figura 3 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. Fonte: SCHAFFAZICK, 2003

3.7.1 Caracterização por tamanho da partícula

O controle de algumas propriedades físicas e químicas é de fundamental importância para a caracterização do tamanho das nanopartículas. A dimensão do tamanho das nanopartículas podem ser medidos incluindo a intensidade, número e volume.

O Zetasizer Nano é um instrumento que mede o tamanho das partículas através da técnica de espalhamento dinâmico de luz, onde as partículas devem estar dispersas em um determinado solvente onde se movimentam aleatoriamente. O sistema Zetasizer determina o tamanho de primeira medição do movimento browniano das partículas usando a técnica de espalhamento de luz e, em seguida, interpreta o tamanho. O Movimento Browniano é definido como o movimento aleatório de partículas em um líquido devido ao bombardeio pelas moléculas que os rodeiam. As partículas em um líquido em movimento aleatório e a sua velocidade de movimento é usada para determinar o tamanho da partícula. (ADITYA, 2013; VIEIRA, 2013;)

3.7.2 Potencial Zeta

O potencial zeta é um indicador de estabilidade e utilizando o Zetasizer Nano pode ser determinado o potencial elétrico das nanopartículas. O potencial elétrico é medido através do plano hidrodinâmico de cisalhamento, que depende da superfície da partícula, e do meio dispersante, que pode ser afetado pelo pH ou pela força iônica do meio em que a nanopartícula for dispersa. A interação das partículas ocorre pela magnitude do potencial zeta e não por sua carga de superfície, assim, podemos prever a estabilidade de suspensões coloidais. As nanopartículas que apresentam potenciais zeta próximos à -40 mV indicam formação de nanocápsulas, e as que apresentam potenciais zeta próximo à -16 mV indicam a formação de nanoesferas. (MOSQUEIRA, 2000).

Esse potencial pode ser determinado experimentalmente e, se correlaciona com a repulsão eletrostática entre as partículas e com a estabilidade de suspensão. É um indicador útil da carga e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. A estabilidade da suspensão de nanopartículas, depende, do balanço entre as forças repulsivas e atrativas existentes

no meio. A importância da medida do potencial zeta é um indicativo da força repulsiva que está presente e pode ser usada para prever a estabilidade do material nanoestruturado. (ZETASIZER NANO, 2005).

3.8 Aplicação das nanopartículas

O número de trabalhos envolvendo as nanopartículas tem crescido rapidamente nos últimos anos. Algumas técnicas são empregadas para a fabricação das nanopartículas. A técnica de *top-down*, de cima para baixo, consiste em desenvolver um objeto pela eliminação de material existente em uma amostra maior do material. Geralmente, são as chamadas técnicas de litografia, que correspondem a uma série de etapas de corrosão química seletiva e extremamente precisa para a preparação final do objeto nanométrico a partir de um bloco macroscópico do material. Assim, há necessidade do uso de máquinas que possam reproduzir os padrões, como no caso da confecção de chips. (PIMENTA, 2007)

Outro procedimento é o *bottom-up*, de baixo para cima, que consiste em tentar construir o material a partir de seus componentes básicos, como, seus átomos e moléculas em sistemas interconectados. Geralmente, os processos *top-down* são produzidos em sistemas secos, enquanto que os *bottom-up* são elaborados em meio aquoso ou solvente orgânico. (ABDI, 2011).

Nesse contexto, destacamos algumas aplicações das nanopartículas como: liberação de drogas; cosméticos e insumos agropecuários; elaboração de sensores para diagnóstico de doenças, infecções e contaminações; desenvolvimento de sistemas transferência de genes; produção de nanopartículas utilizadas para biosseparação; controle de pragas e patógenos; desenvolvimento de catalisadores e sistema de biorremediação e aplicações da indústria têxtil. (ALVES, 2008).

Métodos top-down
(do macro para o nano)

Cauterização química
Ablação a laser/térmica
Moagem de alta energia
Pulverização catódica
Processos explosivos

Métodos bottom-up
(desenvolvimento a
partir de precursores
moleculares/iônicos)

Processo Sol-gel
Deposição química em fase vapor
Pirólise a laser ou spray
Condensação atômica ou molecular
Uso de moldes
Redução química

Características das principais estratégias utilizadas para produzir nanoestruturas pelas abordagens *top-down* e *bottom-up*.

3.9 Liberação de Fármacos

O uso das inovações tecnológicas na indústria farmacêutica utiliza a nanotecnologia para desenvolver fármacos dentro de um sistema chamado de liberação controlada (AZEVEDO, 2002). Os fármacos de liberação controlada são aqueles que tem como objetivo fornecer uma dose terapêutica de uma droga para um local do corpo predeterminado, e manter esta concentração desejada (GENNARO, 2004). Dessa forma, pode ser controlada a velocidade e tempo apropriado, visando também manter os níveis sanguíneos terapêuticos adequados e evitar doses tóxicas. (ALLEN JR., 2007).

Várias pesquisas são desenvolvidas na preparação de carreadores de polímeros degradáveis para a liberação de fármacos. Os fármacos de liberação controlada são formas farmacêuticas que liberam o fármaco em uma velocidade constante, fornecendo concentrações plasmáticas que permanecem invariáveis com o tempo. (ZHU, 2012).

Dentre as várias vantagens do sistema de liberação de fármacos, destacamos: a manutenção da concentração do fármaco por um tempo prolongado, administração menos frequente do medicamento e menor dose do fármaco a ser administrado. (MAGALHÃES JR., 2012). Porém, são sistemas relativamente novos que apresentam certas limitações que precisam ser resolvidas para atingir sua excelência. Os fatores farmacocinéticos e farmacodinâmicos podem interferir na biodisponibilidade do fármaco impedindo o controle da doença e absorção do fármaco. (ALLEN JR., 2007).

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Sintetizar nanopartículas inorgânicas com elipticina e artemisinina avaliando o grau de toxicidade e a efetividade em condições de laboratório, contra *Plasmodium falciparum* e células tumorais.

4.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver o processo de síntese de nanopartículas inorgânicas com elipticina e artemisinina.
- Caracterizar as nanopartículas contidas com elipticina e artemisinina.
- Avaliar a citotoxicidade nas nanopartículas inorgânicas com elipticina e artemisinina por meio de bioensaios em laboratório contra *Plasmodium falciparum* e células tumorais.

5. METODOLOGIA

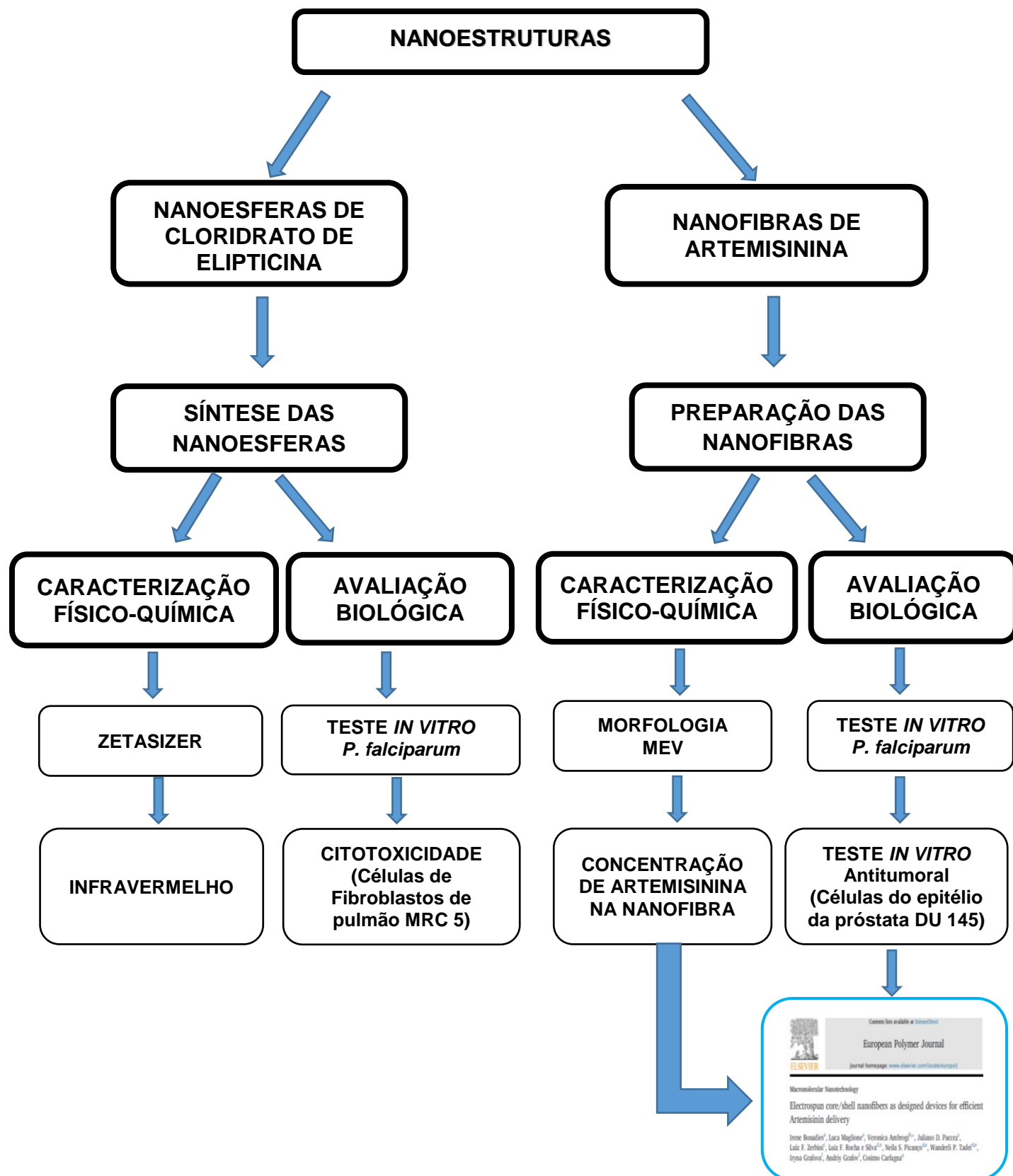


Figura 4. Fluxograma do delineamento experimental

O desenvolvimento deste trabalho foi realizado de forma interdisciplinar e interinstitucional, pois a síntese e a caracterização das medidas de diâmetro hidrodinâmicas e de potencial zeta foram realizadas no laboratório de Química Inorgânica da Universidade de Helsinki – Finlândia. A espectroscopia no infravermelho foi realizada na Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM da Universidade Federal do Amazonas – UFAM e a microscopia eletrônica, bem como o teste do *Plasmodium falciparum*, foram realizados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. O teste de citotoxicidade foi desenvolvido no Laboratório de cultura de células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM.

5.1 Reagentes e solventes utilizados para a síntese das nanoesferas de Cloridrato de Elipticina (ElipNEs).

5.1.1 Solução Estoque de Sódio Tetracloropaládio (Na_2PdCl_4)

A solução de estoque de Sódio Tetracloropaládio na concentração de 0,04 M foi obtida pela dissolução de 1 g de Cloreto de Paládio (PdCl_2) com 0,66 g de Cloreto de Sódio (NaCl) e foi acidificada a pH 6.0, observada na Tabela 1, com ácido clorídrico concentrado em 25 mL de água Milli-Q. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana 0,45 μm GHP ACRODISC 13 e aquecida em banho maria 45 °C e a solução foi diluída até 110 mL de volume final com água Milli-Q.

5.1.2 Solução metanólica de Sódio Tetracloropaládio

Essa solução metanólica na concentração de 0,04 M foi preparada diluindo 0,5 mL da solução de estoque de Sódio Tetracloropaládio em 5mL de metanol. A solução apresentou pH de 6.0, conforme apresentamos na Tabela 1.

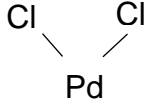
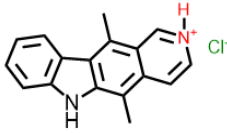
5.1.3 Solução metanólica de Boro hidreto de Sódio (NaBH_4)

A solução metanólica de Boro Hidreto de Sódio na concentração de 0,03M foi obtida pela dissolução de 0,0945 g de Boro Hidreto de Sódio e 0,18 g de Hidróxido de Sódio em 100 mL de metanol. A solução apresentou pH de 9.9, conforme observamos a Tabela 1.

5.1.4 Solução metanólica de Cloridrato de Elipticina ($C_{17}H_{14}N_2.HCl$)

A solução metanólica de Cloridrato de Elipticina na concentração de 0,05M foi preparada pela dissolução de 0,01 g do Cloridrato de Elipticina em 10 mL de metanol. A solução apresentou pH igual a 4.9, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 2. Características química das soluções utilizados na síntese das nanoesferas.

Reagente	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural	Massa Molar	Concentração	pH
Cloro de Paládio	$PdCl_2$		177,42 g/mol	0,05M (solução aquosa)	6.8
Sódio Tetracloro Paládio	Na_2PdCl_4	$Na^{2+} \left[\begin{array}{c} Cl \\ \\ Cl - Pd \\ \quad \backslash \\ Cl \quad Cl \end{array} \right]$	294,42 g/mol	0,04 M (solução metanólica)	6.0
Borohidreto de Sódio	$NaBH_4$	$Na^{2+} \left[\begin{array}{c} H \\ \\ H - B \\ \quad \backslash \\ H \quad H \end{array} \right]$	37,83 g/mol	0,03M (solução metanólica)	9.9
Cloridrato de Elipticina	$C_{17}H_{14}N_2.HCl$		282,81 g/mol	0,05M (solução metanólica)	4.9

5.2 Síntese das nanoesferas de Cloridrato de Elipticina

As nanoesferas de Cloridrato de Elipticina (ElipNEs) foram sintetizadas gotejando 4,5 mL da solução metanólica de Boro Hidreto de Sódio em um recipiente contendo 41 μL da solução de elipticina e 410 μL da solução de Sódio Tetracloropaládio, conforme Figura 5.

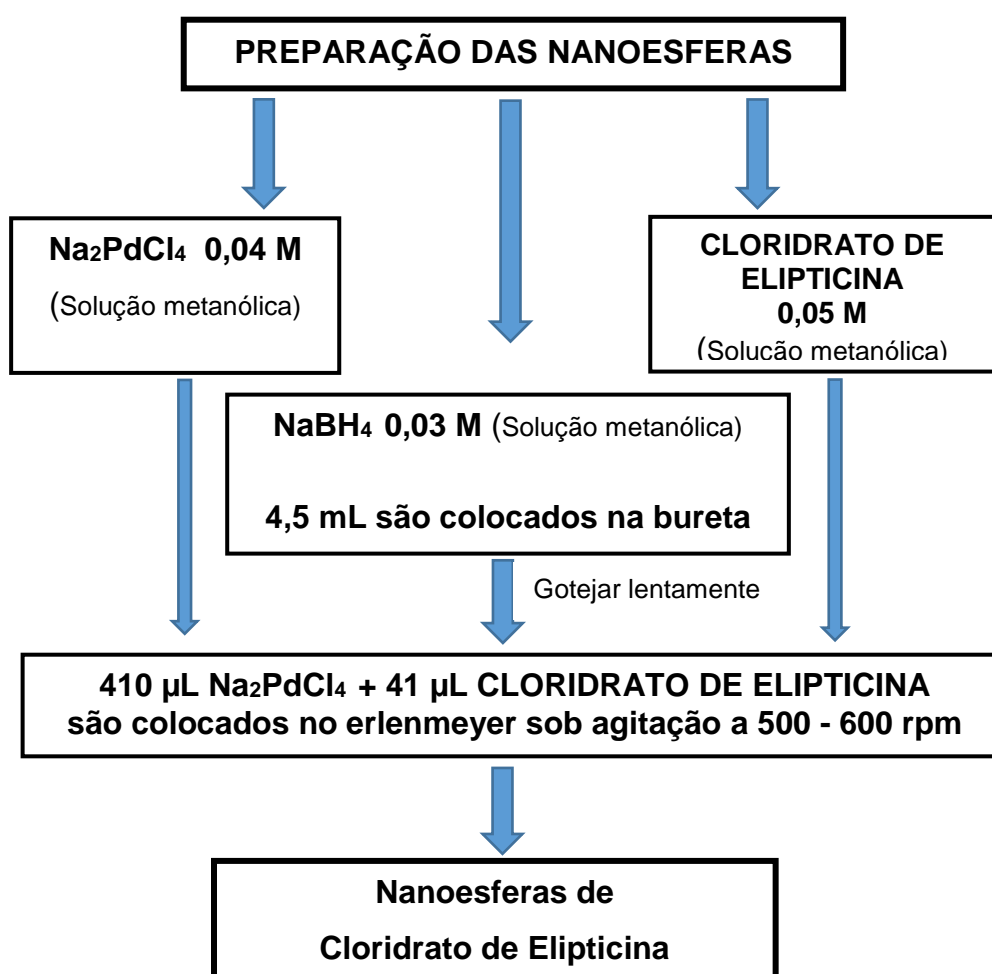


Figura 5. Fluxograma do processo de preparação das nanoesferas de Cloridrato de Elipticina (ElipNEs).

5.3 Caracterização Físico – Química das Nanoesferas de Cloridrato de Elipticina (ElipNEs)

5.3.1 Determinação das medidas de diâmetro hidrodinâmico e de potencial zeta das ElipNEs.

As dimensões do diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta das nanoesferas de Cloridrato de Elipticina foram realizadas a temperatura ambiente, em um equipamento Zetasizer Nano ZS90, da marca Malvern Instruments. O equipamento apresenta um sistema de entrada para as medições do tamanho das partículas sob ângulo de dispersão de 90° e também para a medição do potencial zeta. A técnica empregada de espalhamento de luz dinâmico, Dynamic light scattering – DSL, tem como objetivo auxiliar na caracterização dos sistemas de nanopartículas preparadas, garantindo que as mesmas apresentem dimensões nanométricas. O processo foi realizado segundo manual do fabricante. (ZETASIZER NANO, 2005)

O equipamento Zetasizer Nano ZS90 mede o tamanho das partículas em um líquido pela observação do espalhamento da luz dinâmico e do movimento Browniano, que é movimento aleatório de partículas em um líquido devido ao bombardeio pelas moléculas que os rodeiam.

O princípio da medição pela Dissipação Dinâmica de Luz e Movimento Browniano depende do tamanho e da viscosidade das partículas em suspensão. A Dissipação Dinâmica de Luz mede as flutuações dependentes do tempo na intensidade de dispersão para determinar o coeficiente de difusão de translação (D) e subsequentemente o diâmetro hidrodinâmico (DH) (a partir da equação de Stokes-Einstein)

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Onde:

d(H) = diâmetro hidrodinâmico

D = coeficiente de difusão translacional (curva de correlação da intensidade)

k = constant de Boltzmann,

T = temperature absoluta,

η = viscosidade

A distribuição de tamanho da intensidade é medida com base na intensidade da luz dispersa pelas partículas. As únicas propriedades da amostra requeridas para essa determinação são a viscosidade do dispersante e o índice de refração. Porém, a presença de grandes partículas, agregados e poeiras constituem grandes interferentes na hora da determinação.

As distribuições de tamanho de volume são equivalentes à massa ou distribuição de peso e às propriedades ópticas das partículas são necessárias para fazer esta transformação do índice de refração e de absorção das partículas.

As distribuições de tamanho do número relacionam as propriedades ópticas das partículas, índice de refração e a absorção de partículas. (ZETASIZER NANO, 2005)



Figura 6. Cubetas utilizadas para determinação do tamanho das nanoesferas.

O potencial zeta mede a estabilidade das dispersões coloidais que é determinada pela soma de forças atrativas de Van der Waal e as forças repulsivas, eletrostáticas, que as nanopartículas experimentam quando se aproximam umas das outras. O potencial zeta é a carga que uma partícula tem em um meio particular e depende da superfície química e do dispersante. Para as dispersões estabilizadas eletrostaticamente, quanto maior o valor do potencial zeta, mais estável é a dispersão. A linha divisória de estabilidade é geralmente considerada como ± 30 mV para sistemas aquosos.

Os fatores que afetam o potencial zeta são: alterações no pH; condutividade e alterações na concentração de um componente da formulação.

A dispersão de luz eletroforética é o movimento de uma partícula carregada em relação ao líquido em que está suspenso sob a influência de um campo elétrico

aplicado. As partículas se movem com uma velocidade característica que depende da força do campo, da constante dielétrica do meio e da viscosidade do meio. É determinada por um feixe de laser passado através da amostra na célula capilar submetida a electroforese e a luz dispersa das partículas em movimento é deslocada em frequência. (ZETASIZER NANO, 2005)

O desvio de frequência Δf é igual a:

$$\Delta f = 2v \sin(\theta/2)/\lambda$$

Onde:

v = velocidade da partícula

λ = comprimento de onda do laser

θ = Ângulo de dispersão

De acordo com o exposto, é necessária a medição do Potencial Zeta para nanopartículas usadas para a administração de fármacos, emulsões farmacêuticas, lipossomas catiônicos em terapia genética, nanoemulsões proteinizadas, lipossomas revestidos por PEG, hormônio do crescimento e anticorpos.



Figura 7. Cubetas utilizadas para determinação do potencial zeta.

5.4 Espectroscopia da região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As medidas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de *Fourier* – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR) foram realizadas na Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM da Universidade Federal do Amazonas. Os espectros de FT-IR das amostras foram obtidos em um

espectrofotômetro Thermo Electron, modelo Nicoletti S10, com 32 varreduras na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . Cada amostra foi misturada com KBr na proporção 1:100 e prensada em disco na pressão 80 KN por 1 minuto. (BARBOSA, 2007)

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma análise em que a radiação infravermelha (IV) com os comprimentos de onda, é guiada através de um interferômetro, ao invés de se coletar os dados da variação da frequência da luz infravermelha monocromática. Depois de passar pela amostra o sinal medido é o interferograma. Ao realizar uma FTIR, no sinal, resulta um espectro idêntico ao da espectroscopia (IV) convencional. A espectroscopia no infravermelho se baseia na frequência de vibrações específicas que as ligações químicas das substâncias possuem e que correspondem ao nível de energia gerado. O nível de vibração das moléculas depende de vários fatores como da geometria molecular, massa de átomos e acoplamento de vibrações. (BARBOSA, 2007)

5.5 Avaliações biológicas *in vitro*

5.5.1 Ensaio da cultura e inibição *in vitro* do *P. falciparum* para as nanoesferas de cloridrato de elipticina

A atividade antimalárica *in vitro* foi realizada frente à cepa W2 de *Plasmodium falciparum*. A cepa W2 (cloroquina resistente) foi mantida em cultivo contínuo segundo o método de Trager e Jensen (1976). Para o microteste foi utilizada uma parasitemia inicial de 1 a 2% e hematócrito de 2%. As amostras foram solubilizadas em DMSO na concentração estoque de 5 mg/mL, e posteriormente diluídas em meio completo para obtenção das concentrações de teste (50 e 5 $\mu\text{g/mL}$). O teste foi realizado como descrito por Andrade-Neto *et al.* (2007). As diluições das amostras foram aplicadas em poços de microplaca contendo hemácias parasitadas. Cada concentração foi testada em triplicata. A placa foi incubada por 48h a 37°C. Passado o período de incubação foram confeccionados esfregaços sanguíneos do conteúdo dos poços da placa e depois foi avaliado mediante microscopia óptica.

A inibição do crescimento dos parasitos será determinada pela comparação com os controles de crescimento sem amostra, segundo, a diminuição da parasitemia do controle e a parasitemia das amostras, multiplicado por cem e dividido pela parasitemia do controle, segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{\text{parasitemia do controle} - \text{parasitemia com amostra}}{\text{parasitemia do controle}} \right) \times 100$$

As respostas da concentração inibitória (IC₅₀) em comparação com os controles livres de drogas foram estimadas por interpolação usando o software Microcal Origin. Os valores de concentração de teste em unidades de log µg/mL foram plotados contra a viabilidade do parasita, proporção das parasitemias médias dos poços de teste para as parasitemias médias dos poços de controle, para cada concentração usando a função de análise de ajuste sigmoidal para gerar uma curva. O valor IC₅₀ é obtido a partir do gráfico e corresponde a uma viabilidade de 0,5.

5.5.2 Análise estatística dos dados *in vitro*

Em relação ao microteste de susceptibilidade, a inibição do crescimento dos parasitas foi determinada através de curva dose-resposta mediante a comparação da média das parasitemias de cada concentração da amostra com a média dos controles sem a droga, obtendo-se a IC₅₀ mediante regressão linear utilizando o programa de software Microcal Origin® 8.1 (OriginLab, Northampton, MA, EUA).

5.6 Avaliação da viabilidade celular pelo método Alamar blue

5.6.1 Cultura das Células

Nos experimentos *in vitro* foram utilizadas células de fibroblastos de pulmão humano (MRC5) adquiridos a partir da *American Type Culture Collection*®, EUA - ATCC. Estas células foram mantidas em estufa bacteriológica à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em *Meio Eagle Modificado por Dulbecco high glucose DMEM* - MRC5 e *Roswell Park Memorial Institute RPMI 1640 - J774A.1* todos suplementados com 10% soro fetal bovino - SFB (*GIBCONN by life technologie*), e acrescentado de 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (*GIBCONN by life technologie*). Os cultivos destas células foram realizados no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

5.6.2 Ensaio de viabilidade celular

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Dr. Emerson Silva Lima e foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células (FCF/UFAM). Inicialmente foi realizado a citotoxicidade dos compostos por Alamar blue dos nitroestirenos NPA, 7B, 7D e 7E, a fim de determinar as concentrações não tóxicas dos compostos para seguimento aos ensaios. A citotoxicidade foi avaliada pelo método Alamar blue segundo Nakayama et al.,1997, utilizando-se fibroblastos de pulmão humano (MRC5). Essas células foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células/poço com um volume final de 100 μ L por poço. Observada às 24 horas de incubação e aderência, as células foram tratadas com os compostos previamente diluídos em Dimetilsulfóxido DMSO (Sigma-Aldrich, Alemanha) 10 mg/mL, e em seguida testados nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, e 1.56 μ g/mL em MRC5. O ensaio foi realizado em triplicata por um tempo de tratamento de 24 horas, utilizando-se como controle positivo Doxorubicina (Sigma-Aldrich, Alemanha) fármaco padrão de morte e realizada curva nas mesmas concentrações e controle negativo DMSO 0,5% e a seguir deixados em incubadora de CO₂.

Decorrido o tempo de tratamento foi adicionado 10 μ L de uma solução preparada com 950 μ L de meio de cultura + 50 μ L resazurina 0,4%, e em seguida esperou-se o tempo de metabolização designado para cada linhagem celular conforme protocolo, de 2 horas para MRC5 e 3 horas para J774A.1, em seguida realizou-se a leitura de fluorescência em aparelho de microplaca (DTX-800 Beckman Coulter) na faixa de 540 nm excitação e 585 nm de emissão. O cálculo foi realizado conforme fórmula abaixo.

$$\%Viabilidade = \frac{Ft \times 100}{\Delta Fb}$$

Onde:

Ft= (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina)

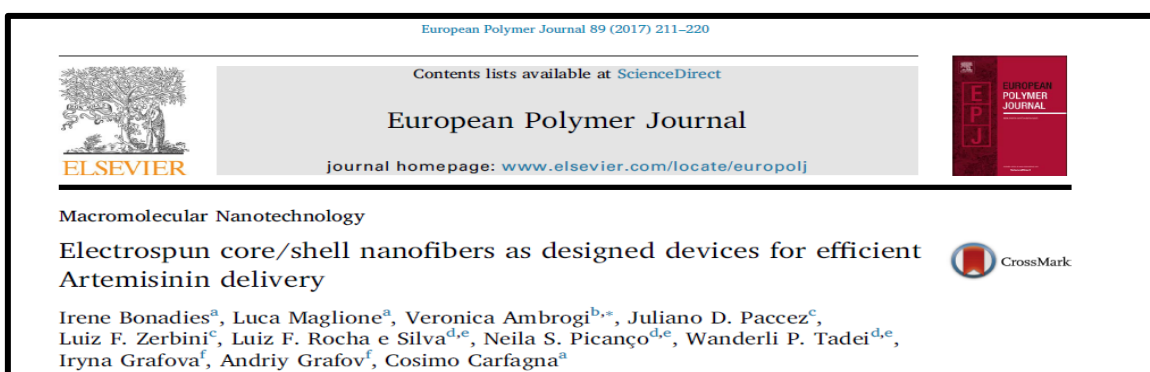
ΔFb = (fluorescência da célula + meio + resazurina)

Em relação ao teste de viabilidade celular, os valores de CI₅₀ foram calculados em programa de estatística Graph Pad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) e foram obtidos por meio da curva sigmoide da concentração droga-

resposta pela interpolação linear. Os experimentos foram realizados em triplicada, analisados usando as médias e seus intervalos de confiança de 95% (IC) correspondentes com base na regressão não linear onde $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativo. Os resultados de porcentagem de viabilidade celular acima de 90% foram considerados aceitável para substâncias não tóxicas.

5.7 Caracterização e avaliação biológica da nanofibra de Artemisinina

(conforme publicação em anexo)



The image shows the front cover of a journal article. At the top, it reads "European Polymer Journal 89 (2017) 211-220". Below this, there is a navigation bar with the Elsevier logo on the left, the text "Contents lists available at ScienceDirect" in the center, and a small thumbnail of the journal cover on the right. The main title of the article is "Electrospun core/shell nanofibers as designed devices for efficient Artemisinin delivery", with the journal title "European Polymer Journal" above it. The authors listed are Irene Bonadies^a, Luca Maglione^a, Veronica Ambrogi^{b,*}, Juliano D. PACEZ^c, Luiz F. Zerbini^c, Luiz F. Rocha e Silva^{d,e}, Neila S. Picanço^{d,e}, Wanderli P. Tadei^{d,e}, Iryna Grafova^f, Andriy Grafov^f, and Cosimo Carfagna^a. A CrossMark logo is visible in the bottom right corner of the article preview.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização da síntese das nanoesferas de Cloridrato de Elipticina.

O tamanho médio, distribuição do tamanho de partícula e o potencial zeta, que é um importante indicador da estabilidade das nanoesferas, foram avaliados com um dispositivo dinâmico de dispersão de luz (DLS) Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Reino Unido). O aparelho foi ajustado com as seguintes características: índice de refração do material 4,10; dispersante metanol com índice de refração de 1,326 e viscosidade de 0,5476 a temperatura da medição foi a 25°C. A nanoesfera foi formada em um meio acidificado, pH 4.4, conforme Figura 9. de aspecto translúcido, coloração amarelo claro, sem precipitação.

Na Tabela 3 mostramos o diâmetro das nanopartículas que foram 28,21nm; 32,67 nm; 37,84 nm, respectivamente, e o potencial zeta de -13.7 mV; 17.6 mV e -21.5 mV. O potencial zeta está relacionado com cargas de superfície provocadas pela dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula e o meio dispersante ou pela adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso ou alcoólico onde a nanoesfera foi dispersa (MOSQUEIRA, 2000).

A amostras foram submetidas ao Zetasizer logo após o término da síntese para verificar o tamanho médio das nanopartículas. No equipamento, os gráficos revelaram as distribuições de tamanho, intensidade, volume e a estatística do tamanho das nanoesferas.

Na Figura 10, observamos o gráfico do tamanho de intensidade das nanopartículas que estão entre 30 a 40 nm, o que comprova mais especificamente com os dados da Tabela 3. Segundo SINITRA 2013, as médias das nanopartículas com desvio padrão de $\pm 0,46$, indica que as mesmas estavam monodispersas na solução, semelhante às nanoesferas de cloridrato de elipticina que apresentam dentro da escala nanométrica e com desvio padrão de $\pm 0,01$ nm (VIEIRA, 2013). Com base na intensidade da luz dispersas pelas nanopartículas podemos afirmar que a viscosidade do dispersante e o índice de refração do metal, responsável pelo carregamento do princípio ativo, são propriedades essenciais para essa determinação. Dessa forma, podemos observar a dispersão das partículas, pois não houve precipitação pelo tamanho das nanopartículas.

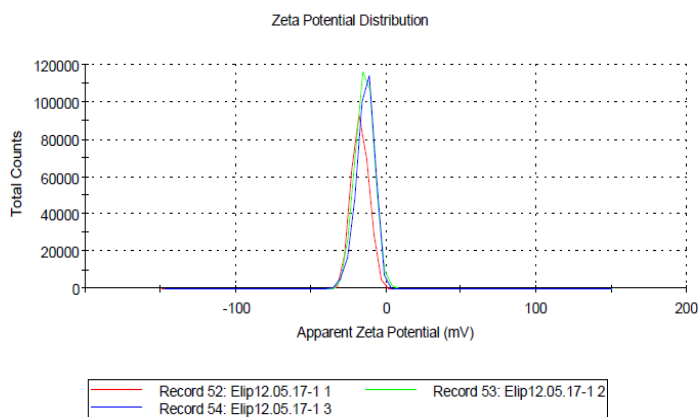


Figura 8. Relatório do Potencial Zeta do Cloridrato de Elipticina

Tabela 3. Resultados da caracterização das nanoesferas de Cloridrato de Elipticina

Nanoesferas	Tamanho das partícula (nm)	Potencial zeta (mV)
Cloridrato de Elipticina	28,21 ± 0,01	-13,7 ± 5,91
+	32,67 ± 0,01	-17,6 ± 5,55
Sódio Tetracoloro Paládio	37,84 ± 0,01	-21,5 ± 5,11

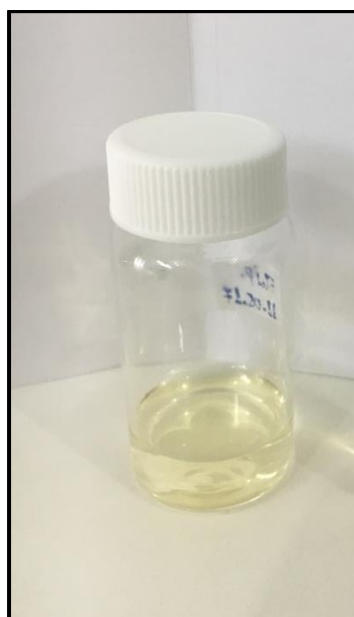


Figura 9. Solução nanocoloidal de paládio com cloridrato de elipticina.

Na Figura 11 observamos o gráfico do volume das nanoesferas segundo a distribuição do tamanho. As propriedades ópticas necessárias para essa determinação são o índice de refração e a absorção dos fótons pelas nanopartículas. (ZETASIZER NANO, 2005).

Na Figura 12, apresentamos a estatística referente ao tamanho das nanopartículas onde destacamos que 25% apresentam tamanho de 28,21 nm; 25% com tamanho de 32,61 nm e 50% 37,84 nm e, portanto 100% da nanoesferas estão na escala nanométrica monodispersas.

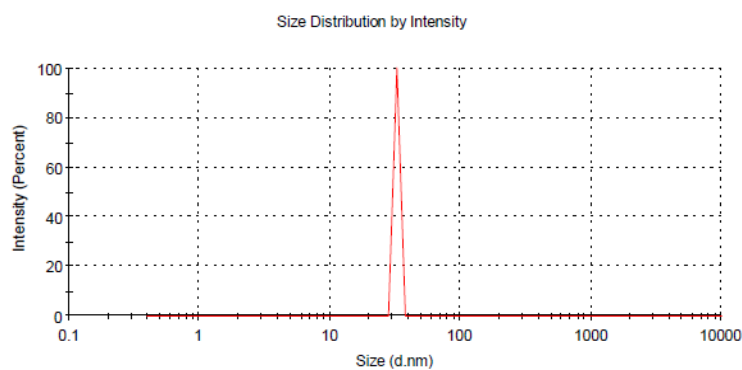


Figura 10. Distribuição de Tamanho por Intensidade das nanoesferas de Cloridrato de Elipticina

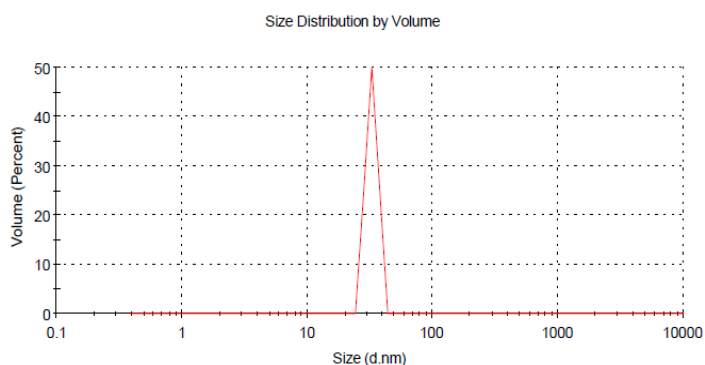


Figura 11 Distribuição de Tamanho por Volume das nanoesferas de Cloridrato de Elipticina

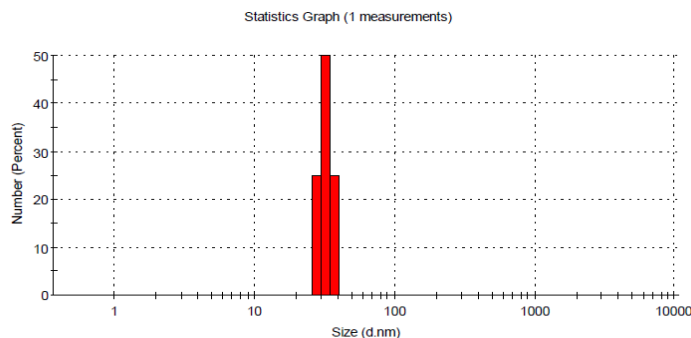


Figura 12. Estatística de tamanho das nanoesferas de Cloridrato de Elipticina

6.2 Análise no Infravermelho (FT-IR)

Os espectros do Sódio Tetracloro Paládio (Na_2PdCl_4) são mostrados na Figura 13, a banda em 3648 cm^{-1} foi atribuída a vibração de estiramento de hidroxila sugerindo uma possível contaminação por água ou metanol. A banda em 1636 cm^{-1} foi atribuída a vibração de estiramento possivelmente de origem cetônica (contaminante) e a banda 477 cm^{-1} atribuída ao Paládio, embora o mesmo se encontre ligado ao cloro, uma vez que ligações simétricas com H_2 e Cl_2 não absorvem radiações no infravermelho (BHARTI, 2010)

Na Figura 14 é mostrado o espectro do Cloridrato de Elipticina ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\cdot\text{HCl}$) se observa a banda em 3416 cm^{-1} que foi atribuída a vibração de estiramento do grupo amina, a vibração de estiramento em $1.601.40\text{ cm}^{-1}$ corresponde a ligação $\text{C}=\text{C}$ e a vibração de estiramento em $1.243.11\text{ cm}^{-1}$ corresponde a ligação $\text{C}-\text{H}$, dados de estiramento para esses grupos químicos segundo. (BARBOSA, 2007)

A Figura 15 mostra o espectro da nanopartícula formada de Cloridrato de Elipticina mais Paládio ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\cdot\text{HCl} + \text{Na}_2\text{PdCl}_4$) observa - se um perfil de infravermelho que sugere a adsorção da elipticina no paládio posto que, observa-se as vibrações do estiramento do infravermelho de ambas as substâncias.

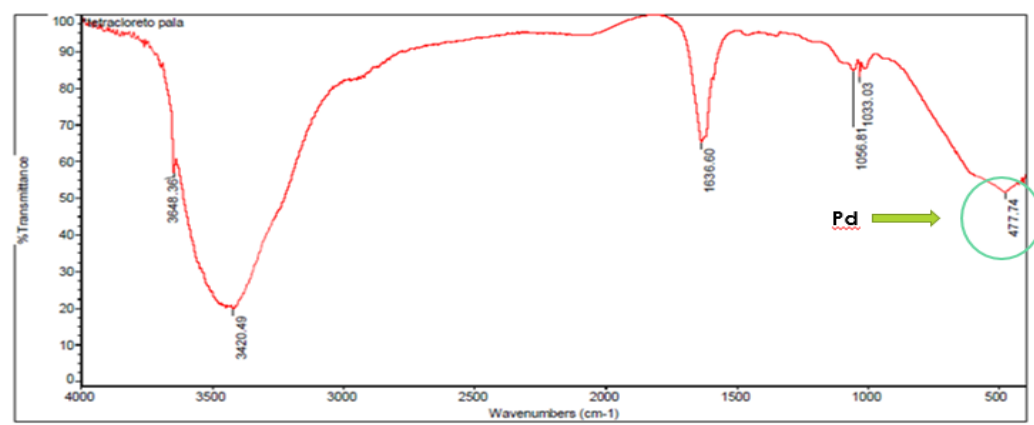


Figura 13. Espectro de FT-IR do Sódio Tetraclore Paládio (Na_2PdCl_4)

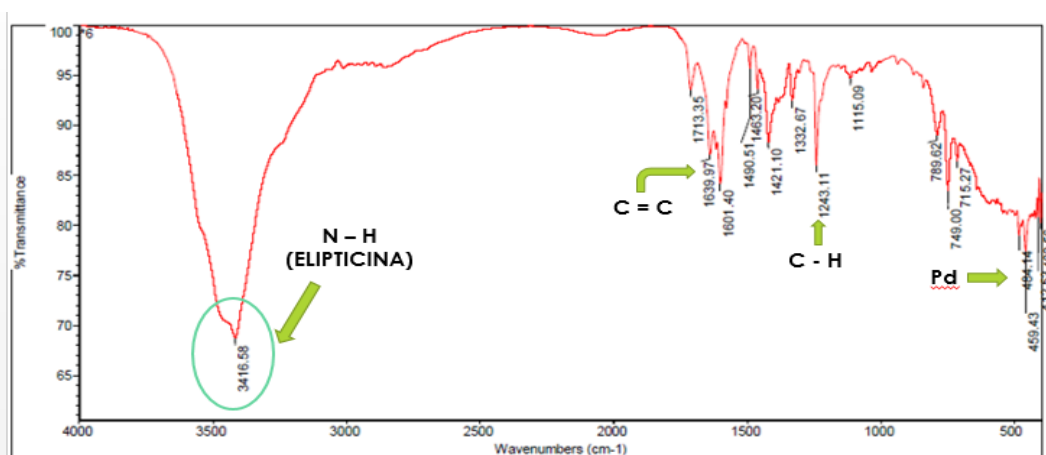


Figura 14. Espectro de FT-IR do Cloridrato de Elipticina ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\cdot\text{HCl}$)

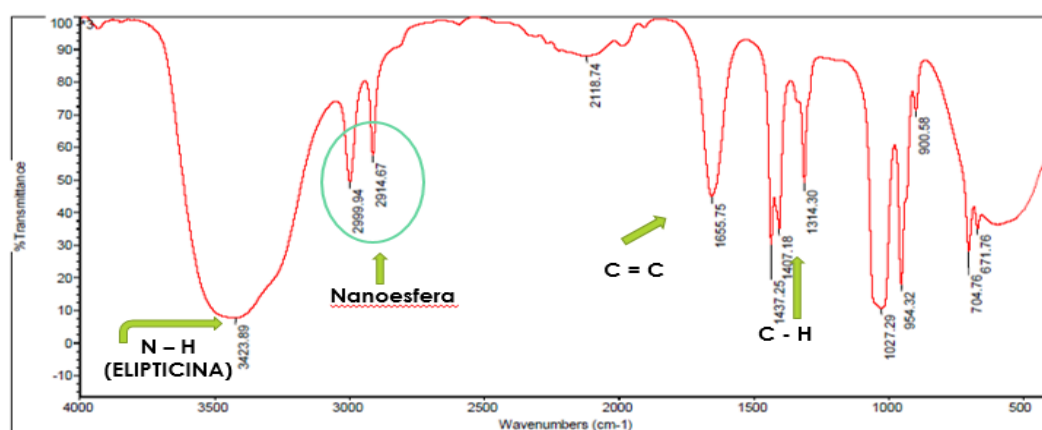


Figura 15. Espectro de FT-IR do Cloridrato de Elipticina mais Paládio ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\cdot\text{HCl} + \text{Na}_2\text{PdCl}_4$)

6.3 Avaliação Biológica – Atividade antimalárica *in vitro*

A atividade antimalárica *in vitro* para o *Plasmodium falciparum* foram determinadas em concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) contra a cepa W2.

De acordo com os parâmetros para a categoria de atividades *in vitro* para substâncias isoladas, são consideradas aquelas com CI₅₀ < 0,1 µg/mL muito ativo (MA); CI₅₀ entre 0,1 a 5 µg/mL ativo (A); CI₅₀ entre 5 a 10 µg/mL atividade moderada (AM); CI₅₀ > 11 µg/mL inativo (I). (BERTANI *et al.*, 2005)

A amostra do Cloridrato de Elipticina, solubilizada em DMSO na concentração da solução de estoque de 5 mg/mL, apresentou concentração inibitória maior (0,33 µg/m) quando comparado com a nanoesfera de Cloridrato de Elipticina (ElipNEs 57,5µg/mL), de acordo com a Tabela 3. O Cloridrato de Elipticina, por estar na forma de sal é muito mais solúvel em solventes polares, e se mostrou muito ativa em todas as diluições da solução mãe. Resultados publicados por Passemar *et. al.*, 2011 para o *P. falciparum* FcM29-Cameroon mostraram um CI₅₀ de Cloridrato de Elipticina de 0,60 µM e para Elipticina obteve um resultado de 0,19 µg/mL, o que comprova ser uma substância ativa para atividade antimalárica frente a esta cepa. De acordo com Montoia (2014) os testes realizados para as cepas K1 e 3D7 foram de 0,19 µg/mL e 0,085 µg/mL, respectivamente. Ressaltamos, que os dados apresentados nessa pesquisa são referentes aos testes com a cepa W2, confirmando ser uma substância ativa para *Plasmodium falciparum*. Em relação as nanoesferas com Cloridrato de Elipticina mostraram inativas para a atividade antimalárica, podemos considerar que o meio da solução em que foi preparada, sua hidrofobicidade e o agente redutor utilizado no processo não são as condições ideais para formulação de nanopartículas com Cloridrato de Elipticina. Serão realizadas novas sínteses com outros agentes redutores.

Tabela 5 – Concentração inibitória 50% (CI₅₀) *in vitro* frente à cepa W2 de *P. falciparum*

Amostras	Classificação da atividade	IC ₅₀ (µg/mL)
Elipticina	A	0,55
Cloridrato de Elipticina	A	0,33
ElipNEs	I	57,5

*Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras com IC₅₀ de Bertani *et al.* (2005) adotaram a classificação: IC₅₀ < 0,1 µg/mL = muito ativo (MA); entre 0,1 a 5 µg/mL = ativo (A); entre 5 a 10 µg/mL = atividade moderada (AM); > 11 µg/mL = inativo (I).

6.4 Avaliação da viabilidade celular

Os testes para avaliar a toxicidade *in vitro* em células normais tem sua importância para fazer a previsão sobre a letalidade das substâncias. A relevância de avaliar a citotoxicidade se deve ao fato de que esta é uma das principais razões pelas quais se pode fazer uma avaliação das substâncias, tendo em vista que é nessa fase inicial da investigação que as drogas podem ser descartadas ou não. Isso vai depender do grau de toxicidade, principalmente quando se almeja avaliar sua efetividade como substância antimalárica e antitumoral. (HUANG et al., 2016)

As substâncias foram testadas pelo método de Alamar blue para determinação de seus níveis de citotoxicidade em linhagem MRC-5, células normais de fibroblasto de pulmão humano, durante um período de 48 horas. As concentrações utilizadas para o teste foram de 1,56 $\mu\text{M}/\text{mL}$; 3,12 $\mu\text{M}/\text{mL}$; 6,25 $\mu\text{M}/\text{mL}$; 12,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$; 25 $\mu\text{M}/\text{mL}$; 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$; $\mu\text{M}/\text{mL}$; 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ e 200 $\mu\text{M}/\text{mL}$ em MRC5. Conforme a Tabela 6, podemos verificar os níveis da concentração inibitória para a citotoxicidade das substâncias.

Tabela 5. Concentração inibitória 50% ($\text{CI}_{50\%}$) *in vitro* frente a linhagem MRC-5 pelo método de Alamar blue.

Amostras	CI_{50} ($\mu\text{M}/\text{mL}$)
Eliplicina	7.239 *(6.003-8.729)
Cloridrato de Eliplicina	>200
ElipNEs	>200

* Intervalo de confiança


O critério adotado para a classificação desses derivados como não sendo uma classe de substâncias citotóxicas se baseia em um valor de CI_{50} mínimo a partir do qual cada uma delas passou a ser letal para as células normais do hospedeiro (MRC-5). Assim sendo, quanto menor for a citotoxicidade da substância maior será seu índice de seletividade e sua especificidade de atuação no parasita (ROCHA-E-SILVA et al., 2012).

Desta forma, com base na CI_{50} da doxorrubicina, droga controle utilizada como padrão positivo de citotoxicidade e que exhibe CI_{50} em cerca de 1,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (29,6 μM) contra essa linhagem de célula humanas, vem-se adotando como critério considerar citotóxicas as substâncias com $\text{CI}_{50} < 50 \mu\text{g}/\text{mL}$. Assim, os valores da

concentração inibitória para o Cloridrato de Elipticina e para as nanoesferas de Elipticina revelaram que essas substâncias são menos tóxicas que a Elipticina, conforme Tabela 5.

6.5 Caracterização das nanofibras de Artemisinín (conforme publicação em anexo)


European Polymer Journal 89 (2017) 211–220




Contents lists available at ScienceDirect

European Polymer Journal

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



Macromolecular Nanotechnology

Electrospun core/shell nanofibers as designed devices for efficient Artemisinín delivery  CrossMark

Irene Bonadies^a, Luca Maglione^a, Veronica Ambrogi^{b,*}, Juliano D. Pაცეზ^c, Luiz F. Zerbini^c, Luiz F. Rocha e Silva^{d,e}, Neila S. Picanço^{d,e}, Wanderli P. Tadei^{d,e}, Iryna Grafova^f, Andriy Grafov^f, Cosimo Carfagna^a

^a Institute for Polymers, Composites and Biomaterials (IPCB), CNR, Via Campi Flegrei, 34, 80078 Pozzuoli, Napoli, Italy
^b Department of Chemical, Materials and Production Engineering (DICMAP), University of Naples Federico II, P. le Tecchio 80, 80125 Napoli, Italy
^c International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Arzoo Road, Observatory, 7925 Cape Town, South Africa
^d The National Institute of Amazonian Research, Malaria and Dengue Laboratory, Av. André Araújo, 2936 Manaus, Brazil
^e Federal University of Amazonas, Postgraduate Program in Biotechnology, 69010-300 Manaus, Brazil
^f Laboratory of Inorganic Chemistry, University of Helsinki, A.I. Virtasen aukio 1, 00014 Helsinki, Finland

7- CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos, foi possível desenvolver um processo de síntese das nanopartículas de elipticina e artemisinina, na forma de nanoesferas e nanofibras.

As nanofibras elaboradas constitui uma abordagem promissora para a luta contra as doenças parasitárias e tumorais. Graças às nanofibras bem estruturadas e ao diferente caráter hidrofóbico do polibutileno (HB) e da polivinilpirrolidona (PVP), a biodisponibilidade de Artemisinina não foi comprometida e o princípio ativo foi efetivamente liberado no sistema biológico. Os resultados do teste para inibição *in vitro* de parasitas de *P. falciparum* revelaram que o encapsulamento da Artemisinina nas fibras PVP/HB tem o potencial de substituir efetivamente os antimaláricos tradicionais. Além disso, o ensaio de proliferação e viabilidade celular mostrou que os sistemas fibrosos efetivamente reduziram a possibilidade do câncer de próstata.

Em relação as nanoesferas de Cloridrato de Elipticina, concluímos que se faz necessário a continuação deste estudo para aprimoramento da síntese das nanoesferas com Elipticina. Os testes de $CI_{50\%}$ para *Plasmodium falciparum* e de citotoxicidade revelaram que não teve atividade antimalárica embora apresente baixa toxicidade.

Portanto, esperamos que novas pesquisas com nanoestruturas venham surgir, para que possamos dar passos importantes no desenvolvimento de uma possível droga antimalária e/ou antitumoral.

8- REFERÊNCIAS

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL (ABDI). Panorama nanotecnologia / **Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial**. Cartilha sobre Nanotecnologia. Brasília. 2011. 60 p.

AMARAL, E. F. Malária: Aspectos históricos e utilização da Artemisinina em seu tratamento. Monografia. **Universidade Federal de São João Del-Rei**. 2015. p .56

ANDRADE-NETO, V.F.; POHLIT, A.M.; PINTO, A.C.S.; SILVA, E.C.C. NOGUEIRA, K.L.; MELO, M.R.S.; HENRIQUE, M.C.; AMORIM, R.C.N.; SILVA, L.F.R.; COSTA, M.R.F.; NUNOMURA, R.C.S.; NUNOMURA, S.M.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.C.; CHAVES, F.C.M.; VIEIRA, P.P.R. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. p. 359-365, 2007.

ADITYA, N.P; VATHSALA, P.G; VIERA, V.; MURTHY, R.S.R.; SOUTO, E.B. Advances nanomedicenes for malaria treatment. Advances in Colloid na Interface Sciense. Journal homepage: www.elsevier.com/cis. p.2-13.2013.

AGUIAR, A. C. C.; ROCHA, E. M. D.; SOUZA, N. B. D.; FRANÇA, T. C.; KRETTLI, A. U. New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 831-845, 2012.

ALLEN JR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8.ed. Porto Alegre. **Artmed**, 2007. 775 p.

ALVES, G. P.; MARTINS, F.; SANTANA, M. H. A. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos. **Fármacos & Medicamentos**. São Paulo, ano 9, p. 44-50, 2008.

ALVES, O. L. (Resp. Tec.). Cartilha sobre nanotecnologia. São Paulo: ABDI, 2010. Disponível em: <<http://www.abdi.com.br/Estudo/Cartilha%20nanotecnologia.pdf>>. Acesso em 04 abril 2017.

AZEVEDO, M.M.M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. In. Workshop Tópicos Especiais em Química Inorgânica IV - Introdução à Nanotecnologia: Um Enfoque Químico, 2002, São Paulo.

AUCLAIR, C, PAOLETTI, C. Bioactivation of the antitumor drugs 9-hydroxyellipticine and derivatives by a peroxidase-hydrogen peroxide system. **J Med Chem.** p .289-295.1981

AIMOVA, D; SVOBODOVA, L; KOTRBOVA, V, *et al.* The Anticancer Drug Ellipticine Is a Potent Inducer of Rat Cytochromes P450 1A1 and 1A2, Thereby Modulating Its Own Metabolism. **Drug Metab Dispos.** p. 1926-1934. 2007.

BARBOSA LCA. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa. **UFV.** 2007.

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J.C.; ESTERRE, P.; DEHARO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **J. Ethnopharmacol.** 98. p.45-54, 2005.

BHARTI, S. K.; NATH, G.; TILAK, R.; SINGH, S. K. Synthesis, anti-bacterial and antifungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 45, n. 2, p. 651-660, 2010.

BILIA, A. R.; MELILLO DE MAGALHÃES. P.; BERGONZI, M.C.; VINCIERI, F.F. Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar. **Phytomedicine.** 13(7) p. 487-493. 2006.

BONADIES, I.; MAGLIONE, L.; AMBROGI, V.; PACCEZ, J. D.; ZERBINI, L. F.; SILVA, L. F. R.; PICANÇO, N, S.; TADEI, W.P.; IRYNA GRAFOVA, I.; GRAFOV, A.; CARFAGNA, C. Electrospun core/shell nanofibers as designed devices for efficient Artemisinin delivery. **European Polymer Journal** 89. p. 211-220, 2017.

BRANDÃO, H.N.; DAVID, J. P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J.A.P; DAVID, J.M.; Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 6, 1359-1369, 2010

BRAZ, R. M. Monitoramento da incidência da malária na Amazônia Brasileira utilizando algoritmo automatizado. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** (Doutorado em Medicina Tropical) —Universidade de Brasília, Brasília, p. 284, 2013.

CHEN,S.; CHENG, S.-X.; ZHUO, R. XI. Self-assembly strategy for the preparation of polymer-based nanoparticles for drug and gene delivery. **Macromol. Biosci.** 11. p. 576-589. 2011

CRANWELL, P.A; SAXTON, J.E. A synthesis of ellipticine. **J Chem Soc.** p. 3482-3487.1962.

CRAVO, P.; ROSÁRIO, V.D. Aspectos de genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos. **Boletim de Biotecnologia.** Lisboa. 2003.

DEANE, F.M; MILLER, C.M; MAGUIRE, A.R; MCCARTHY, F.O. Modifications to the Vilsmeier-Haack formylation of 1,4-dimethylcarbazole and its application to the synthesis of ellipticines. **J Heterocycl Chem.** p. 814-823. 2011.

EGOROVA, E.M.; KUBATIEV, A. A.; SCHVETS, U.I.; Biological effects of Metal Nanoparticles. **Russia: Springer**, 2016.

FAHNING, B.M; LOBÃO, E.B. Nanotecnologia aplicada a fármacos. Trabalho de conclusão de curso. 98 folhas. **Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo.** Vitória, 2011.

FAULD, M.K.; RUEDA, L.M.; KHAIREH, B.A. First recordo of the Asias malaria vector *Anopheles stenphensi* and the its possible role in the resurgence of malaria in Djibouti, Horn of Africa. **Acta Tropical**, v. 139, p. 39 – 43, 2014.

FAROKHZAD, O.C. RANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery, **ACS Nano** 3. p. 16-20. 2009.

FUJII, S. KODAMA, M. MATSUZAWA, S. HAMASAKI, H. OHTAKA, A. NAKAMURA, Y. Conducting Polymer Metal Nanocomposite Coating on Vibers. Department of Applied Chemistry, **Faculto of Engineering**. p.48-67. 2006.

GENNARO, A.R. Remington: a ciência e a prática da farmácia. 20.ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**. 2004. 2208 p.

GOMES, A.P. *et al.* Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Bras Terapia Intensiva**. v .23, n.(3), p. 358-369, 2011.

GUTERRES, S. S. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, P. 1520-1526, 2013

GREENWOOD, B. M.; FIDOCK, D. A.; KYLE, D. E.; KAPPE, S. H. I.; ALONSO, P. L.; COLLINS, F. H.; DUFFY, P. E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 118, n. 4, p. 1266-1276, 2008.

GULATI, K; AW, M.S; LOSIC, D. Drug-eluting ti wires with titania nanotube arrays for bone fixation and reduced bone infection, **Nanoscale Res. Lett.** **6**. p. 571-576, 2011.

HENRIQUE, M.C.; NUNOMURA, S.M.; POHLIT, A.M. Alcaloides indólicos das cascas de *Aspidosperma Vargasii* e *Aspidosperma desmanthum*. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 284-287, 2010.

HOARE ,T.R.; KOHANE ,D.S.; Hydrogels in drug delivery: progress and challenges, **Polymer** **49**. p.1993-2007, 2008.

HUANG, R.; XIA, M.; SAKAMURU, S.; ZHAO, J.; SHAHANE, S. A.; ATTENRAMOS, M.; ZHAO, T.; AUSTIN, C. P.; SIMEONOV, A. Modelling the Tox21 10K chemical profiles for *in vivo* toxicity prediction and mechanism characterization. **Nature communicatios**, v.7, n.1042, p.1-10, 2016.

JING, H. WANG, H. Strudural Evolution of Ag-Pd Bimetallic Nanoparticles through Controlled Galvanic Replacement: Effects of Mild Reducing Agents. Department of **Chemistry and Biochemistry**, University of South Carolina, Colombia, South Carolina 29208, United States.p.2172 – 2179. 2015.

JUNGES, Alexander. Estudo da Síntese de Nanopartículas Metálicas de Paládio para uso em Catalise Heterogênea. **Dissertação de Mestrado**. Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS. 2011.

KAUR, K.; JAIN, M.; KAUR, T.; JAIN, T. Antimalarials from nature. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 17 p. 3229-3256. 2009.

LAI, H; SASAKI, T; SINGH, N.P. Targeted treatment of cancer with artemisinin and artemisinin-tagged iron-carrying compounds, **Expert Opin Ther. Targets**; p.995-1007.2005

LEITE, F. H. A.; FONSECA, A. L.; NUNES, R. R.; JÚNIOR COMAR, M.; VAROTTI, F. de P.; TARANTO, A. G. Malaria: From old drugs to new molecular targets. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. v.2 n.4 p. 59-76. 2013.

LIMA, R. B. S.; ROCHA E SILVA, L. F.; MELO, M.R.S.; COSTA, J. S.; PICANÇO, N. S.; LIMA, E. S.; VASCONCELLOS, M. C.; BOLETI, A. P. A.; SANTOS, J. M. P.; AMORIM, R. C. N.; CHAVES, F. C. M.; COUTINHO, J.P.; TADEI, W. P.; KRETTILI, A. U.; POHLIT, A. M. In vitro and in vivo anti-malarial activity of plants from the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**.14:508. 2015.

MAGALHÃES JÚNIOR, G. A. Síntese de microesferas e nanopartículas de quitosana e goma do chichá (*Sterculia striata*) como matriz para liberação controlada de fármaco para o tratamento da malária. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Ceará. p. 151. 2012

MATIJEVIC, E. Controlled Colloid Formation Center for Advanced Processing. Charkson University, Potsdam, New York. p176-182. 1996.

MILLER, C. M.; MCCARTHY, F. O. Isolation, biological activity and synthesis of the natural product ellipticine and related pyridocarbazoles. **RSC Adv**. P. 8883. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças Transmissíveis. **Coordenação Geral dos Programas Nacionais de Controle e Prevenção**. Dados de 2017 atualizados em 01/02/2018. Sivep-Malária/SVS.

MITTAL, A.K; BHAUMIK, J; KUMAR S, BANERJEE, U.C. Biosynthesis of silver nanoparticles: Elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential. **Journal of Colloid and Interface Science**. p. 39-47. 2014.

MONTOIA, A. ROCHA-E-LUIZ, L.F.; TORRES, Z.E.; COSTA, D.S.; MARYCLEUMA, C.H.; LIMA, E.S.; VASCONCELLOS, M.C.; SOUZA, R.C.Z; COSTA, M.R.F.; GRAFOV, A.; GRAFOVA, I.; EBERLIN, M.N.; TADEI, W.P.; AMORIM, R.C.N; POHLIT, A. M. Antiplasmodial activity of synthetic ellipticine derivatives and an isolated analog. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 24; p.2631-2634. 2014.

MONTOIA, A. Semi-Síntese de derivados da elipticina e atividade antimalárica de isolados e infusão de *Aspidosperma vargasii*. Programa de Pós-graduação em Química. **Universidade Federal do Amazonas**. 2013.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(d,l-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displace process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **J. Pharm. Sci.** v. 89, p. 614- 626, 2000.

MURAMBIWA,P.;MASOLA,B.;GOVENDER,T.;MUKARATIRWA,S.; MUSABAYANE, C.T. Anti- Malarial drug formulations and novel delivery systems: A review. **Acta Tropica**, Jornal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica. p. 72-77. 2011.

NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, n. 2, p. 205–208, may. 1997.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat Prod.** 25; 79 (3): 629-61. 2016.

NEVES, David P. **Parasitologia Humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

O'SULLIVAN, E.C, MILLER, C.M; DEANE,F.M, MCCARTHY, F.O. Emerging Targets in the Bioactivity of Ellipticines and Derivatives. *In: Studies in Natural Products Chemistry*. p. 189-232. 2013

PASSEMAR, C.; SALÉRY, M.; SOH, P. N.; LINAS, M-D.; AHOND, A.; POUPAT, C.; BENOIT-VICAL, F. Indole and aminoimidazole moieties appear as key structural units in antiplasmodial molecules. **Phytomedicine**. p. 1118-1125. 2011.

PIMENTA, M. A., MELO, C. P. Nanociência e Nanotecnologia. **3º Escola de Inverno de Física da Universidade Federal de Santa Maria**. 2007.

PIMENTEL, L.F; JUNIOR, A.T.J; MOSQUEIRA, V.C.F; MAGALHÃES, N.S.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. p. 504-510. 2007.

POHLIT, A.M.; LIMA, R.B.S.; FRAUSIN, G.; ROCHA E SILVA, L. F.; LOPES, S. C.P.; MORAES, C. B.; CRAVO, P.; LACERDA, M. V. G.; SIQUEIRA, A. M.; FRIESTAS-JUNIOR, L.H.; COSTA, F.T. M. Amazonian Plant Natural Products: Perspectives for Discovery os New Antimalarial Drug Leads. **Molecules** 18(8), p.9219-9240. 2013.

POHLIT. A.M. Antiplasmodial activity of synthetic ellipticine derivatives and an isolated analog. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 2631-2634, 2014.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M.M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 7a ed.; Elsevier, 2012.

ROCHA, H. A. Preparação e caracterização de nanocompósitos de uso em sistemas de liberação controlada de fármacos. Rio de Janeiro, 130f. **Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Polímeros)** - Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2008.

ROCHA E SILVA, L.F.; MONTOIA, A.; AMORIM, R.C.N.; MELO, M.R.; HENRIQUE, M.C.; NUNOMURA, S.M.; COSTA, M.R.F.; ANDRADE NETO, V.F.; COSTA, D.S.; DANTAS, G.; LAVRADO, J.; MOREIRA, R.; PAULO, A.; PINTO, A.C.; TADEI, W.P.; ZACARDI, S.; EBERLIN, M.N.; POHLIT, A.M. Comparative in vitro and in vivo antimalarial activity of the indole alkaloids ellipticine, olivacine, cryptolepine and a synthetic cryptolepine analog. **Phytomedicine**, v.20, p.71-76, 2012.

ROCHA E SILVA, L.F.; LIMA, E.S.; VASCONCELLOS, M.C.; ARANHA, E.S.P.; COSTA, D.S.; MUSTAFA, E.V.; MORAIS, S.K.R.; ALECRIM, M.G.C.; NUNOMURA, S.M.; STRUWE, L.; ANDRADE-NETO, V.F.; POHLIT, A.M. In vitro and in vivo antimalarial activity and cytotoxicity of extracts, fractions and a substance isolated from the Amazonian plant *Tachia grandiflora* (*Gentianaceae*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, n.4, p.501-507. 2013.

ROSSI - BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciências e Cultura**. São Paulo, v.60, n.2, 2008.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE LUCCA FREITAS, L; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, p. 99 - 106, 2003.

SILVA, L. P.; BONATTO, C. C.; PEREIRA, F. D. E. S.; SILVA, L. D.; ALBERNAZ, V. L.; POLEZ, V. L. P. **Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas**. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. Blucher. p. 967-1012. 2017.

SINKA, M.E. Global distribution of the dominant vector species of malaria, *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors, **InTech**, 2013.

SINTARA, M. Size Effect Investigation of Palladium Nanoparticles Supported Into Silica Colloids as the Catalyst for Suzuki Cross Coupling Reaction. **Master of Rhode Island**. 2013.

STEVENSON, C.L.; SANTINI, J.T.; LANGER, Jr. R. Reservoir-based drug delivery systems utilizing microtechnology, **Adv Drug Deliv Rev.** 64.p. 1590-1602. 2012.

STIBOROVA, M.; RUPERTOVA, M.; SCHMEISER, H. H.; FREI, E. Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. **Biomed. Pap. Med. Fac.** p. 13-23. 2006.

TORRES, Z. SILVEIRA, E. SILVA, L. LIMA, E. VASCONCELOS, M. UCHOA, D. FILHO, R. POHLIT, A. Chemical Composition of *Aspidosperma Ulei* Markgs and Antiplasmodial Activity of Selected Indole Alkaloids. **Molecules**. p.6282-6294. 2013.

TRAGER, W., JENSEN, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, 193, p. 673-675, 1976.

UDAY KUMAR, S.; MATAI, I.; DUBEY, P.; BHUSHAN, B.; SACHADEV, A.; GOPINATH, P. Differentially cross-linkable core-shell nanofibers for tunable delivery of anticancer drugs: synthesis, characterization and their anticancer efficacy. **RSC Advances Journal**. 2014.

VIEIRA, K.O. Preparação e caracterização de nanocompósitos coloidais envolvendo nanotubos de carbono e pontos quânticos de cdte. **Revista Científica Vozes dos Vales**. UFVJM. Nº 06. Ano III. Minas Gerais. 2014.

VILAÇA, M. J. L. Artemisinina no tratamento da malária: perspectivas futuras. **Acta Médica Portuguesa**. 2010.

WALKER, N.F.; NADJM, B; WHITTY, C.J.M. Malaria. **Medicine**, v.42, n.2, p.100 – 106, 2014.

WHO - **World Health Organization**. World Malaria Report 2017.

ZETASIZER nano séries. User manual. 3 ed. **Malvern Instruments**. England. 2005.


ZHANG, Y. J.; GALLIS, B.; TAYA, M; WANG, S.; HO, R. J.Y.; SASAKI, T. pH-Responsive Artemisinin Derivatives and Lipid Nanoparticle Formulations Inhibit Growth of Breast Cancer Cells In Vitro and Induce Down-Regulation of HER Family Members. **PLOS ONE** 8(3): e59086. p. 1-8. 2013.

ZHU, C, et al. Bifunctional fluorescent carbon nanodots: green synthesis via soy milk ad application as metal-free electrocatalysts for oxygen reduction. **Chem. Commun**. v.48 n.48, p. 9367–9369, 2012.

ZSILA, F. The anticâncer agente ellipticine binds to glycosaminiglycans at midly acidic pH characteristics of extracelular matrix of tumor tissues. **Royal Society of Chemistry**. p. 810-814. 2016.

ANEXO


European Polymer Journal 89 (2017) 211–220




Contents lists available at ScienceDirect

European Polymer Journal

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



Macromolecular Nanotechnology

Electrospun core/shell nanofibers as designed devices for efficient Artemisinin delivery  CrossMark

Irene Bonadies^a, Luca Maglione^a, Veronica Ambrogi^{b,*}, Juliano D. Pაცეც^c, Luiz F. Zerbini^c, Luiz F. Rocha e Silva^{d,e}, Neila S. Picanço^{d,e}, Wanderli P. Tadei^{d,e}, Iryna Grafova^f, Andriy Grafov^f, Cosimo Carfagna^a

^a Institute for Polymers, Composites and Biomaterials (IPCB), CNR, Via Campi Flegrei, 34, 80078 Pozzuoli, Napoli, Italy
^b Department of Chemical, Materials and Production Engineering (DICMAP), University of Naples Federico II, P. le Tecchio 80, 80125 Napoli, Italy
^c International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Anzio Road, Observatory, 7925 Cape Town, South Africa
^d The National Institute of Amazonian Research, Malaria and Dengue Laboratory, Av. André Araújo, 2936 Manaus, Brazil
^e Federal University of Amazonas, Postgraduate Program in Biotechnology, 69010-300 Manaus, Brazil
^f Laboratory of Inorganic Chemistry, University of Helsinki, A.I. Virtasen aukio 1, 00014 Helsinki, Finland

Lima *et al.* *Malar J* (2015) 14:508
DOI 10.1186/s12936-015-0999-2

Malaria Journal

RESEARCH

Open Access  CrossMark

In vitro and in vivo anti-malarial activity of plants from the Brazilian Amazon

Renata B. S. Lima^{1,2,3}, Luiz F. Rocha e Silva^{1,2,3}, Marcia R. S. Melo⁴, Jaqueline S. Costa¹, Neila S. Picanço^{1,2}, Emerson S. Lima⁵, Marne C. Vasconcellos⁵, Ana Paula A. Boleti⁵, Jakeline M. P. Santos⁵, Rodrigo C. N. Amorim¹, Francisco C. M. Chaves⁶, Julia P. Coutinho⁷, Wanderli P. Tadei⁸, Antoniana U. Krettli⁷ and Adrian M. Pohlit^{1*} 