



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

SERAFIM FLORENTINO NETO

**NANOCÁPSULAS CAREGADAS COM α , β -AMIRINA:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
FARMACOLÓGICA**

**Manaus
2023**

SERAFIM FLORENTINO NETO

**NANOCÁPSULAS CAREGADAS COM α , β - AMIRINA:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
FARMACOLÓGICA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas - UFAM para obtenção de título de Doutor em Inovação Farmacêutica.

Orientador: Prof^a Dr^a TATIANE PEREIRA DE SOUZA
Coorientador: Prof^o Dr JESUS RAFAEL RODRIGUEZ AMADO

**MANAUS
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

F633n Florentino Neto, Serafim
Nanocápsulas carregadas com α , β - amirina: desenvolvimento, caracterização e atividade farmacológica / Serafim Florentino Neto. 2023
86 f.: il. color; 31 cm.
Orientadora: Tatiane Pereira de Souza
Coorientador: Jesus Rafael Rodriguez Amado
Doutorado (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.
1. Amirina; 2. Nanocápsulas; 3. Nanotecnologia; 4. Leucemia; 5. Antitumoral; 6. Diabetes.
I. Souza, Tatiane Pereira de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**“Nanocápsulas carregadas com α,β - amirina: desenvolvimento,
caracterização e atividade farmacológica”**

DISCENTE: SERAFIM FLORENTINO NETO

PARECER:

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus - AM, 11/04/2023.

Documento assinado digitalmente
 EMERSOM SILVA LIMA
Data: 05/05/2023 11:33:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Emersom Silva Lima
Coordenador do PPGIF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes

Professores:
Documento assinado digitalmente
 TATIANE PEREIRA DE SOUZA
Data: 12/04/2023 18:02:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Tatiane Pereira de Souza

Or  MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS
Data: 25/04/2023 19:44:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos

Documento assinado digitalmente
 ANTONIO LUIZ RIBEIRO BOECHAT LOPES
Data: 22/04/2023 23:26:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes

Documento assinado digitalmente
 MARCO ANTONIO UTRERA MARTINES
Data: 24/04/2023 12:05:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marco Antônio Utrera Martines

Documento assinado digitalmente
 JOAO VICENTE BRAGA DE SOUZA
Data: 25/04/2023 10:35:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. João Vicente Braga Souza
Membro (INPA)

dedico este trabalho...

À minha mãe **BEATRIZ** (*in memoriam*): minha maior referência em caráter e minha primeira e fiel educadora.

Às minhas filhas **LAVINIA e LAÍSE** e minha filha do coração **ESMERALDA** e meu cunhado **JÚLIO CEZAR**, minha esposa **RAIMARA**: Os preciosos presentes que Deus me ofertou e hoje são partes e integrantes da minha vida. Saibam que vocês contribuíram imensamente para esta grande conquista e quando me deparava com dificuldades era em vocês que buscava apoio.

Ao meu pai **MANOEL** e meus irmãos **FRANCISCO, VERISSIMO, JOSÉ, ODAIR** (*in memoriam*) e **VERIDIANO** e minhas irmãs: **APARECIDA, BETÂNIA, MARLENE e LUANA**: Vocês são minha espiração, tenho muito orgulho de fazer parte desta família. Estaremos sempre unidos.

Aos demais **FAMÍLIARES**. Todo meu respeito e admiração.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela superação constante aos obstáculos encontrados e a transposição de cada um deles com paz e serenidade.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Tatiane Pereira de Souza, por acreditar e confiar que o projeto apresentado poderia ser desenvolvido com êxito, e ainda, sempre buscou proporcionar condições favoráveis ao desenvolvimento desta pesquisa, quer seja com o fomento de material necessário para realização dos experimentos, quer seja com sua disponibilidade de tempo para orientar.

Ao Prof^o. Dr. Jesus Rafael Rodríguez Amado, pelo apoio contínuo e ainda, sempre prestativo as atividade de pesquisa, mesmo de forma remota, mas sempre bem coerente e assertivo em suas orientações.

A Prof^a Dr^a Fernanda Guilhon Simplício, pela contribuição em ceder as instalações e equipamentos do FITHOFAR, para processamento das amostras.

Ao Prof.^o Dr. Emerson Silva Lima, por permitir o uso das instalações do BIOFHAR, para realização de análises biológicas.

Ao Prof^o. Dr. José Fernando Marques Barcellos - LABHISTO - Laboratório Didático de Histologia, UFAM, por sua contribuição no processo e leitura histopatológica.

Ao Caro colega Leonard Domingo Acho, pelas contribuições para esta pesquisa.

Aos meus familiares (esposa, filhas, pais, irmãos, tios, sobrinhos e cunhados), por me compreender nos momentos que estive ausente.

Aos amigos(as) do LIDETEF, Patrícia, Diego, Fernanda, Fabrício, Jandiarra, Fran, Hermelly, Natália, Nathana e Newton pelo apoio diário nas atividade de rotina no laboratório;

As colegas do FITHOFAR, Talita e Lívia, pelo apoio diário nas atividade de rotina no laboratório;

Ao caro amigo Erick, pelo apoio diário as atividade de rotina no laboratório, bem como as mensagens de incentivo;

Aos amigos da caserna, Vitor, Thomaz, Lima, Xerfan, Jules, Andersom, Rosilene, Andrade, Lucas e Benezar, pelo apoio a mim dispensado.

MUITO OBRIGADO!!!

É preciso escolher um caminho que não tenha fim, mas, ainda assim, caminhar sempre na expectativa de encontrá-lo.

Geraldo Magela Amaral

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Introdução..... | 16 |
| 2. | Objetivo geral..... | 17 |
| 2.1 | Objetivos específicos..... | 17 |
| 3. | Revisão da Literatura..... | 18 |
| 3.1 | Amirinas..... | 18 |
| 3.1.1 | Toxicidade das amirinas..... | 20 |
| 3.2 | Nanotecnologia..... | 21 |
| 3.2.1 | Tipos de Nanopartículas Poliméricas..... | 21 |
| 3.3 | Atividade antileucêmica e antitumoral..... | 24 |
| 3.3.1 | Atividade antileucêmica..... | 24 |
| 3.3.2 | Atividade antitumoral..... | 26 |
| 3.4 | Diabetes..... | 29 |
| 3.4.1 | Modelos Experimentais de Diabetes..... | 30 |
| 4. | Materiais e Métodos..... | 32 |
| 4.1 | Procedimentos experimentais..... | 32 |
| 4.2 | Reagentes..... | 32 |
| 4.3 | Desenvolvimento das nanocápsulas contendo α , β -amirina..... | 33 |
| 4.4 | Avaliação do tamanho das partículas e índice de polidispersidade..... | 34 |
| 4.5 | Determinação do Potencial zeta e condutividade..... | 34 |
| 4.6 | Eficiência de encapsulamento | 35 |
| 4.7 | Capacidade de carregamento..... | 35 |
| 4.8 | Perfil de liberação das nanocápsulas de amirinas | 36 |
| 4.9 | Avaliação do efeito do pH sobre o tamanho das partículas..... | 36 |
| 4.10 | Avaliação do efeito da temperatura sobre o tamanho das partículas..... | 36 |
| 4.11 | Avaliação da morfologia por <i>MEV</i> e <i>MET</i> | 37 |
| 4.12 | Avaliação da estabilidade em prateleira..... | 37 |
| 4.13 | Avaliação da atividade biológica..... | 37 |
| 4.13.1 | Avaliação da atividade antiglicante..... | 37 |
| | Via oxidativa..... | 37 |
| | Via não oxidativa..... | 38 |
| 4.13.2 | Atividade inibitória da lipase pancreática..... | 38 |
| 4.13.3 | Atividade inibitória da α -glicosidase..... | 39 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.13.5 | Avaliação da atividade antileucêmica | 40 |
| | Ensaio de anexina V / 7- AAD..... | 41 |
| | Clivagem das carpases-3..... | 41 |
| 4.13.6 | Avaliação da atividade antitumoral..... | 41 |
| 4.13.7 | Avaliação da atividade hipoglicemiante das nanocápsulas de amirinas..... | 42 |
| | Animais..... | 42 |
| | Indução do diabetes..... | 43 |
| 4.13.8 | Toxicidade aguda oral..... | 44 |
| 4.14 | Análises Estatísticas..... | 44 |
| 5. | Resultados e Discursão..... | 45 |
| 5.1 | Caracterização das nanocápsulas de amirinas..... | 45 |
| 5.2 | Tamanho de partícula e potencial zeta..... | 45 |
| 5.3 | Morfologia das nanocápsulas de amirinas..... | 46 |
| 5.4 | Eficiência de encapsulação e capacidade de carga..... | 48 |
| 5.5 | Perfil de liberação..... | 48 |
| 5.6 | Efeito do pH..... | 50 |
| 5.7 | Efeito da temperatura..... | 51 |
| 5.8 | Estabilidade em prateleira | 52 |
| 5.9 | Atividade antiglicante: Via Oxidativa e não oxidativa..... | 53 |
| 5.10 | Atividade inibitória de lipase pancreática e α -glicosidase | 54 |
| 5.11 | Atividade antileucêmica..... | 56 |
| 5.12 | Atividade antiproliferativa de células tumorais..... | 59 |
| 5.13 | Atividade hipoglicemiante..... | 63 |
| 5.14 | Toxicidade aguda oral..... | 65 |
| 6. | Conclusões..... | 69 |
| | Perspectivas Futuras..... | 70 |
| | Referências..... | 72 |
| | Anexo e apêndices..... | 82 |
| | Anexo I - Composições farmacêuticas contendo nanopartículas de α , β amirina: síntese e utilidade farmacológica..... | 84 |
| | Anexo II - α -amyrin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells..... | 86 |

LISTA DE TABELAS, FIGURAS, ANEXOS E APÊNDICES

Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Modelos experimentais usados para estudos pré-clínicos de diabetes tipo 1 e tipo 2..... | 30 |
| Tabela 2. Distribuição dos grupos experimentais no ensaio de atividade hipoglicemiante..... | 43 |
| Tabela 3. Propriedades físicas das formulações de nanocápsula de α , β - amirina e das nanocápsulas branco, após 48 h de preparação..... | 45 |
| Tabela 4. Tamanho de partículas, índice de polidispersidade, ζ potencial e pH da formulação de nanocápsula de amirinas de acordo com o tempo decorrido..... | 53 |
| Tabela 5. Efeito da atividade antiglicante das Nanocápsulas de amirinas..... | 54 |
| Tabela 6. Efeito inibidor da lipase pancreática e da α -glicosidase das nanocápsulas de amirinas.... | 55 |
| Tabela 7. Efeitos das Nanocápsulas de amirinas em linhagens celulares de leucemia..... | 58 |
| Tabela 8. atividade antiproliferativa que produzem as nanocápsulas carregadas com amirinas sobre diversas linhagens de células tumorais..... | 61 |
| Tabela 9. Comportamento da glicemia dos grupos experimentais durante a avaliação da atividade hipoglicemiante..... | 63 |
| Tabela 10. Consumo de água e alimentos..... | 66 |
| Tabela 11. Comportamento do peso corporal dos animais durante o ensaio de toxicidade aguda oral das nanocápsulas de amirinas..... | 66 |

Figura

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura química dos triterpenos pentacíclicos, A) α amirina, B) β amirina e C) lupeol..... | 18 |
| Figura 2. Exemplos de nanopartículas (“a” nanocápsulas núcleo líquido, “b” nanocápsula contendo dispersão molecular, “c” nanocápsula núcleo sólido e “d” nanoesferas)..... | 21 |
| Figura 3. Representação esquemática de preparação de nanopartículas obtidas pelo método deposição do polímero pré-formado..... | 23 |
| Figura 4. Número de adultos (20-79 anos) com diabetes em todo o mundo..... | 29 |
| Figura 5. Fluxograma experimental..... | 33 |
| Figura 6. Preparação das Nanocápsulas de amirinas - método emulsificação e difusão do solvente.... | 34 |
| Figura 7. Formulações de nanocápsulas de amirinas desenvolvidas e caracterizadas neste trabalho (A, nanocápsula carregada com α,β -amirina; B, nanocápsula branco (sem α,β - amirina)..... | 45 |
| Figura 8. Distribuição de tamanho de partícula (A), potencial zeta (B) das nanocápsulas de amirinas, 48h após sua preparação..... | 46 |
| Figura 9. Morfologia da amirina princípio ativo, e das nanocápsulas carregadas com amirina secas por spray drying e em solução..... | 47 |
| Figura 10. Perfil de liberação das nanocápsulas carregadas de amirinas em buffer PBS (pH 7.4) | 49 |
| Figura 11. Efeito do pH no tamanho das partículas e potencial zeta das nanocápsulas carregadas de amirinas..... | 50 |
| Figura 12. Efeito da temperatura (de 10 a 70 °C) no tamanho da partícula e índice de polidispersidade de nanocápsulas carregadas de amirinas..... | 51 |
| Figura 13. Seleção de linhagem leucêmica suscetível a nanocápsulas carregadas de amirinas (NC $\alpha\beta$ A)..... | 57 |
| Figura 14. Curvas de Citotoxicidade de Nanocápsulas de amirinas contra células leucêmicas..... | 57 |
| Figura 15. Nanocápsulas de amirina promovem a morte celular por apoptose na linhagem Kasumi-1..... | 59 |

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|--|
| AA | <i>Associação Americana de Diabetes</i> |
| Amirinas | Mistura isomérica de α,β -amirinas isolada e purificada |
| ATCC CRL-1658 | Fibroblastos normais de murino NIH/3T3 |
| ATCC SCRC-1041 | Fibroblastos normais de prepúcio humano HFF-1 |
| ATCC CRL-1435 | Células tumorais prostáticas PC-3 |
| ATCC CRL-1932 | Células de adenocarcinoma renal humano 786-O |
| ATCC HTB-22 | Células tumorais de câncer de mama MCF7 |
| ATCC HB-8065 | Células de carcinoma hepático Hep G2 |
| ATCC HTB-26 | Células de câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231 |
| BALB/c | Estirpe albina, criada em laboratório, do camundongo da qual são derivadas várias sub-cadeias comuns |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| DM | Diabetes Mellitus |
| DM1 | Diabetes Mellitus Tipo 1 |
| DM2 | Diabetes Mellitus Tipo 2 |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EHL | Equilíbrio hidrofílico-lipofílico |
| IDF | Federação Internacional de Diabetes (do inglês: <i>International Diabetes Federation</i>) |
| Kollicoat® | Copolímero de ácido metacrílico: metacrilato de etila (1:1) |
| LIDETEF | Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica |
| NC $\alpha\beta$ A | Nanocápsulas carregada com α,β -amirina ou nanocápsulas de amirinas |
| 4-NPGP | 4-nitrofenil-D-glucopiranosídeo |
| PBMC | Células mononucleares de sangue periférico humano |
| PdI | Índice de polidispersão (do inglês: <i>Polydispersity index</i>) |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| TNBC | células de câncer de mama triplo negativo (do inglês: <i>triple negative breast cancer</i>) |

Introdução: É urgente elucidar e ampliar novas formas de tratamento para doenças como diabetes, leucemias, câncer de próstata e câncer de mama. Estas são doenças que têm um impacto severo na saúde de homens e mulheres no mundo. O uso da nanotecnologia pode oferecer e agregar vantagens no esforço para desenvolver medicamentos mais eficazes para essas e outras doenças. **Objetivo:** avaliar a atividade antileucêmica, antitumoral e hipoglicemiante das nanocápsulas poliméricas carregadas com amirina. Adicionalmente foi feita a avaliação da estabilidade em prateleira e da toxicidade aguda oral. **Metodologia:** as nanocápsulas foram sintetizadas pelo método de deposição de polímero, em seguida foi avaliada a estabilidade em prateleira. Se avaliou a atividade antileucêmica em células Jurkat e Molt (leucemia linfocítica aguda humana), Kasumi-1 (leucemia mieloide aguda humana) e em células K562 (leucemia mieloide crônica humana) e C1498 (leucemia mieloide aguda do camundongo). A atividade antitumoral foi avaliada pelo método MTT usando linhagem câncer de próstata (PC-3), renal (786-0), hepático (HepG2) e de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Se avaliou a atividade hipoglicemiante em um modelo de diabetes induzido por estreptozotocina em Camundongos Balb/c. Por último, se avaliou a toxicidade aguda oral pelo método das classes de toxicidade da OECD. **Resultados e discussão:** foi obtida uma formulação de nanocápsulas esféricas com 128,80 nm de tamanho e uma alta homogeneidade (polidispersão 0,107), que mantem sua estabilidade em prateleira por um ano e meio. O processo de preparação teve um 65,47% de eficiência de encapsulação e uma capacidade de carga 2,4 g de amirinas por cada 100 g de nanocápsulas seca. As nanocápsulas liberam 90% de amirina em 33 min, o que poderia melhorar a biodisponibilidade. Observou-se uma forte atividade inibitória do crescimento de células tumorais prostáticas PC-3 (GI_{50} 7,00 $\mu\text{g/mL}$) com uma boa seletividade (3,85). Também teve atividade antiproliferativa moderada, mas com menor seletividade, de células de câncer de mama, câncer de renal e de fígado. As nanocápsulas mostraram boa atividade antileucêmica, com excelente seletividade na linhagem Kasumi-1 (leucemia mieloide aguda), induzindo a morte celular por apoptose, confirmada pela clivagens das Caspases. Nem a amirina nem as nanocápsulas carregadas com amirinas na dose na dose 10 mg/kg mostraram atividade hipoglicemiante. No entanto, na dose 5 mg/kg mostraram atividade hipoglicemiante que não foi estatisticamente diferente do fármaco padrão (acarbose, 100 mg/kg). As nanocápsulas, na dose 2000 mg/kg em uma única doses, não mostraram sinais que indicassem efeitos tóxicos durante os 14 dias após a administração, sendo classificada como “não classificada como substância tóxica” segundo o critério da OECD 423. **Conclusão** Foram desenvolvidas nanocápsulas estáveis, que não apresentam toxicidade aguda, que apresentam uma boa atividade antitumoral e antileucêmica, e uma moderada atividade hipoglicemiante em ratos. As nanocápsulas de amirina, são um produto promissor, que precisar seguir-se investigando para comprovar sua real utilidade como antitumoral e antileucêmico.

Palavras-chave: 1. amirina; 2. nanocápsulas; 3. nanotecnologia; 4. leucemia; 5. antitumoral; 6. diabetes.

Introduction: It is urgent to elucidate and expand new forms of treatments for diseases such as diabetes, leukemias, prostate cancer, and breast cancer. These are diseases that have a severe impact on the health of men and women around the world. The use of nanotechnology can offer enormous advantages in the effort to develop more effective drugs for these and other diseases.

Objectives: This work aimed to evaluate the antileukemic, antitumor, and hypoglycemic activity of polymeric nanocapsules loaded with amylin. Additionally, the stability in-shelf and the acute oral toxicity of the nanocapsules were evaluated.

Methodology: The nanocapsules were synthesized using the polymer deposition method, and then shelf stability was evaluated. The antileukemic effect was evaluated in Jurkat and Molt cells (human acute lymphocytic leukemia), Kasumi-1 (human acute myeloid leukemia), K562 cells (human chronic myeloid leukemia), and C1498 (acute myeloid leukemia). Antitumor activity was evaluated by the MTT method using prostate (PC-3), renal (786-0), hepatic (HepG2), and breast (MCF-7 and MDA-MB-231) cancers. The hypoglycemic effect was evaluated in a streptozotocin-induced diabetes model, using Balb/c mice. Finally, the acute oral toxicity was evaluated by the OECD toxicity class method.

Results and discussion: A formulation of spherical nanocapsules with a size of 128.80 nm and a high homogeneity (polydispersion 0.107) was obtained, which maintained its shelf stability for one and a half years. The preparation process had a 65.47% encapsulation efficiency and a load capacity of 2.4 g of amylin per 100 g of dry nanocapsules. The nanocapsules released 90% of amylin in 33 minutes, which could improve bioavailability. A strong inhibiting of the growth of PC-3 prostatic tumor cells (GI₅₀ 7.00 µg/mL) was observed with a good selectivity index of 3.85. The nanocapsules also showed moderate antiproliferative activity, but with less selectivity, against breast cancer, kidney, and liver cancer cells. The nanocapsules showed good antileukemic activity, with excellent selectivity in the Kasumi-1 cell line (acute myeloid leukemia), inducing cell death through apoptosis, confirmed by caspase cleavages. Neither amylin nor nanocapsules loaded with amylin at 10 mg/kg showed hypoglycemic activity. However, at the dose 5 mg/kg, they showed hypoglycemic activity that was not statistically different from the standard drug (acarbose, 100 mg/kg). The nanocapsules, at a dose of 2000 mg/kg in a single dose, showed no signs indicating toxic effects during the 14 days after administration and were classified as "not classified as a toxic substance" according to the OECD 423 criterion. **Conclusion:** Stable nanocapsules were developed that do not present acute toxicity, and show good antitumor and antileukemic activity, and moderate hypoglycemic activity in rats. Amylin nanocapsules are a promising product that needs to be further investigated to prove their real utility as antitumor and antileukemic.

Keywords: 1. Amylin; 2. Nanocapsules; 3. Nanotechnology; 4. leukemia; 5. Antitumoral; 6. Diabetes.

Substâncias derivadas de produtos naturais vêm desempenhando um papel cada vez mais marcante na pesquisa científica para o descobrimento de novas moléculas com atividade farmacológica. Um percentual bem expressivo de ativos com atividade antitumoral e anti-infecciosa, comercializados no mercado são obtidos de produtos naturais (DEHELEAN et al., 2021). Desse modo, a comunidade científica tem focado os estudos em extratos de origem vegetal, procurando identificar moléculas ativas e conhecer suas atividades biológicas e entender como agem contra doenças. Pode ser dito que, está ocorrendo uma popularização no estudo das plantas como fontes de ativos contra as mais diversas doenças (BELOSLUDTSEV et al., 2022).

Espécies nativas da floresta amazônica tem um enorme potencial farmacológico. As espécies de *Protium* (*Protium sp.*) estão entre as espécies de plantas mais abundantes na Amazonia (BARBOSA et al., 2018). Estas espécies produzem uma oleoresina conhecida como breu branco, que é usada tradicionalmente para o tratamento de feridas infectadas, úlceras da pele (Barbosa et al. 2018), e para reduzir inflamações (MORAES et al., 2013). A oleoresina de *Protium sp.* contém uma grande diversidade de substâncias químicas, principalmente triterpenos, onde α , e β -amirina (triterpenos pentacíclicos) são os mais importantes (FERREIRA et al., 2017).

As amirinas são substâncias apolares, insolúveis em água, solúveis em solventes orgânicos como éter etílico, n-hexano, benzeno e clorofórmio (MAHATO; KUNDU, 1994). Estudos das características físico-química destes triterpenos têm relatado sua alta lipofilia (Log P~8) como um fator limitante para seu uso terapêutico. Apesar dos estudos mostrarem uma boa atividade farmacológica, sua baixa solubilidade aquosa tem se apresentado como inconveniente para sua administração por via oral (MALLAVADHANI et al., 2004; FROTA, 2011).

Uma das formas mais inovadoras de usar produtos derivados de plantas, e melhorar sua atividade em diversas condições de saúde, é a formulação de nanopartículas. Entre as nanopartículas, as nanocápsulas tem apresentado um grande potencial como carreador de fármacos pouco solúveis. Isso, devido ao aumento da solubilidade e da biodisponibilidade dessas substâncias (MORA-HUERTAS et al., 2010). Segundo a literatura, apenas dois intentos de aumentar a solubilidade da mistura isomérica de α , β -amirina foram informadas. Rodrigues e colaboradores (2013) prepararam uma nanoemulsão contendo α , β -amirina para uma possível administração intravenosa, mas nenhum efeito farmacológico foi avaliado. Por outro lado, Fernandes et al. (2014) elaboraram uma nanoemulsão utilizando um extrato vegetal rico em α , β -amirina, que foi testada como inseticida, porém nenhuma outra formulação de nanopartículas contendo amirinas tem sido relatada.

No presente trabalho, foi realizada avaliação da estabilidade em prateleira das nanocápsulas poliméricas contendo α , β -amirina (desenvolvidas na dissertação de mestrado deste autor). Em seguida foram avaliadas a atividade hipoglicemiante *in vivo*, antileucêmica e antitumoral *in vitro* destas nanopartículas. Adicionalmente, foi avaliada a toxicidade aguda oral das nanocápsulas poliméricas contendo α , β -amirina.

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a estabilidade, atividade antileucêmica e antitumoral *in vitro*, assim como a atividade hipoglicemiante (*in vivo*) e a toxicidade aguda oral das nanocápsulas poliméricas carregadas com α , β -amirina.

2.2 Objetivos específicos

- Obter e caracterizar nanocápsulas poliméricas carregadas com α , β -amirina;
- Avaliar a estabilidade em prateleira das nanocápsulas contendo α , β -amirina;
- Avaliar a atividade antileucêmica e antitumoral *in vitro* das nanocápsulas contendo α , β -amirina;
- Avaliar a atividade hipoglicemiante das nanocápsulas contendo α , β -amirina;
- Avaliar a toxicidade aguda oral das nanocápsulas contendo α , β -amirina.

3.1 Amirinas

Os triterpenos estão entre os componentes mais comuns presentes nos produtos derivados de plantas, especialmente nos óleos essenciais e oleoresina. A mistura isomérica dos triterpenos α e β amirina é o principal constituinte isolados da oleoresina de *Protium ssp.* (FERREIRA et al., 2017). As amirinas (α e β) são triterpenos pentacíclicos (**Figura 1**) pertencentes ao grupo dos ursanos e oleanos. Apresentam diferença básica na estrutura química, apenas do anel aromático “E”. Assim, quando o anel está posicionado no C₂₀ e contém duas metilas é chamado de β -amirina (oleano) e quando contém uma metila no C₂₀ e outra no C₁₉ é chamado de α -amirina (ursano), sendo estereoisômeros (BARROS et al., 2011; HALDAR et al., 2014; OLIVEIRA, 2005).

As amirinas mostraram efeito anti-inflamatório (*in vivo*) em camundongos, o que poderia explicar seu uso etnofarmacológico (MORAES et al., 2013). Também foi relatado o efeito antinociceptivo das amirinas (em camundongos) no nível periférico, espinhal e supraespinhal via inibição da proteína quinase A e C (OTUKI et al., 2005). A α , β -amirina continua apresentar grande interesse científico devido ao seu potencial farmacológico como gastroprotetor e anti-inflamatório (OLIVEIRA et al. 2004; SANTOS et al. 2012; CARVALHO et al. 2017).

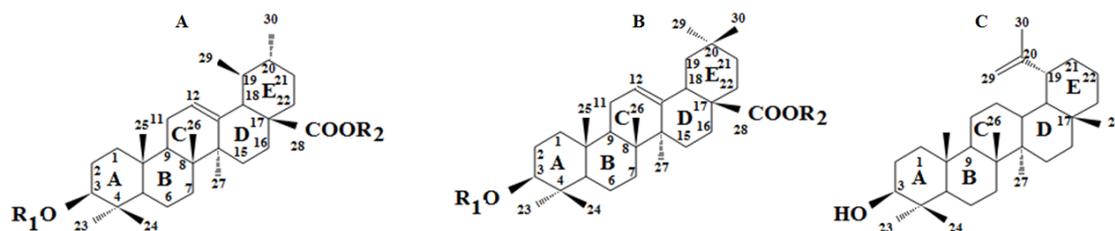


Figura 1. Estrutura química dos triterpenos pentacíclicos, A) α amirina, B) β amirina e C) lupeol

Os triterpenos α e β -amirina mostraram citotoxicidade contra algumas linhagens celulares de câncer, como HL-60, leucemia promielocítica, SF-295, glioblastoma, HCT-8,

câncer de cólon, MDAMB-435 e melanoma (BARROS, et al., 2011). Ambas as amirinas apresentaram atividade antineoplásica fraca mediada por apoptose, que, no entanto, foi seletiva, quando avaliadas contra outras linhas de células cancerígenas como adenocarcinoma de mama e colorretal, fígado, carcinoma pulmonar, adenocarcinoma pancreático, carcinoma de próstata e renal (BARROS, et al., 2011; MISHRA et al., 2016). Por estas razões, a oleoresina de *Protium spp.* representa não só um valioso produto extrativista, mas uma fonte de compostos naturais com grande potencial farmacológico, o que justifica o crescente interesse da comunidade científica por esse produto (NETO et al., 2021). Também foi reportado o efeito hipoglicêmico (SANTOS et al., 2012) e hipolipêmico das amirinas (SANTOS et al. 2012; CARVALHO et al., 2017), porém sua baixa solubilidade em água limita seu uso como um medicamento.

3.1.1 Toxicidade das amirinas

Oliveira et al., (2005) administraram em camundongos, via intraperitoneal, a oleoresina e a mistura isomérica α,β -amirina. O estudo não evidenciou sinais de toxicidade e nem potencialização de atividade tóxica. Nesse trabalho, os autores administraram (por gavagem) em ratos, a mistura de isômeros de amirina em dose de 5g/kg e pela via intraperitoneal até 2g/Kg. Os resultados mostraram ausência de toxicidade.

Um estudo realizado por Ishii et al., (2015), incubaram células endoteliais de veia umbilical humana, cultivadas em diferentes concentrações de β -amirina, em um intervalo de 24 a 72h. Não foi observado nenhum efeito inibitório da viabilidade celular. Thirupathi et al.,(2016), trataram ratos com β -amirina em doses 10 e 50 mg/kg por via oral durante 30 dias. O resultado mostrou ausência de eventos tóxicos. No entanto, quando a dose foi superior a 50 mg/kg, causou tremores nos animais, ataxia, aumento da respiração e letargia.

Em um experimento realizado por VITOR et al. (2009), foi administrado em camundongos a mistura triterpênica de α,β -amirina em doses variando entre 5 e 300 mg/kg.

Os animais foram observados até o 14^o dia e não apresentaram nenhum sinal de toxicidade, nem alteração no consumo de água e alimentos e no peso corporal, quando comparado com o grupo controle. Contudo, quando a dose é elevada para 2000 mg/kg um dos animais foi a óbito no período estabelecido anteriormente. O estudo mostrou que é seguro o uso do triterpeno em doses até 300 mg/kg em camundongos.

3.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia estuda as aplicações de objetos e dispositivos que possuam pelos menos uma de suas dimensões físicas na escala nanométrica (10^{-9} m) (PIMENTA; MELO, 2004). É uma ciência em desenvolvimento crescente que é capaz de associar metodologias de diversas áreas da pesquisa e tem diversos leques de aplicação (IRACHE et al., 2011). Pesquisas têm-se desenvolvido com o objetivo de obter novos produtos capazes de oferecer vantagens, como: melhor solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade. Essas vantagens são atribuídas ao tamanho nanométrico, que pode produzir efeitos melhorados às formulações, quando comparado ao fármaco usado na forma tradicional (DIMER, *et al.*, 2013).

As nanopartículas são usadas no âmbito farmacêutico como transportadores de princípio ativo, principalmente para ativo com propriedades insolúveis (PLAPIED, et al., 2011; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Elas se caracterizam por manter a estabilidade do princípio ativo por longos períodos frente a fatores como o oxigênio e umidade. Também protegem o princípio ativo do ambiente ácido estomacal e das enzimas, permitindo que o fármaco passe pelo estômago sem sofrer alteração. A forma de nanopartículas eleva biodisponibilidade e a solubilidade dos fármacos; permite o controle da liberação e seu direcionamento para um alvo específico.

3.2.1 Tipos de Nanopartículas Poliméricas

Nanopartículas poliméricas são estruturas coloidais que têm em sua composição polímeros de origens naturais, sintéticos ou semissintéticos biodegradáveis. Estas

estruturas poliméricas têm ampla utilização para liberação de fármacos podendo direcionar o agente terapêutico para locais específicos ou mesmo controlar sua liberação (RAWAT *et al.*, 2006). As nanopartículas poliméricas podem ser divididas em duas categorias: nanoesferas e nanocápsulas e esta divisão depende da composição e organização estrutural (**Figura 2**).

As nanocápsulas possuem um sistema tipo reservatório com núcleo líquido (**Figura 2a**). O núcleo pode ser oleoso ou aquoso e estará envolvido por uma camada de recobrimento polimérica sólida (**Figura 2b**) (invólucro ou parede polimérica). O fármaco pode estar dissolvido ou disperso no núcleo e/ou incluído ou adsorvido na parede polimérica (**Figura 2c**) (LETFORD; BURT, 2007; ANTON *et al.*, 2008). As nanoesferas (**Figura 2d**) têm como características a não diferenciação de parede e o núcleo é uma matriz onde o fármaco estará disperso no polímero (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). A formação de nanoesferas ocorre por um processo de trama entre o fármaco e os polímeros formadores da matriz (KHOEE; YAGHOUBIAN, 2008).

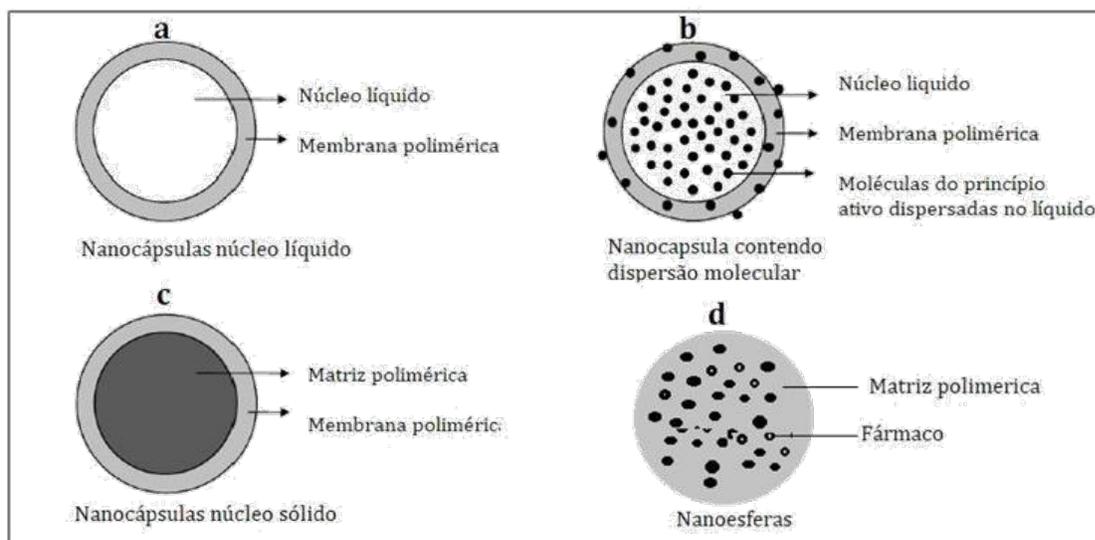


Figura 2. Exemplos de nanopartículas (“a” nanocápsulas núcleo líquido, “b” nanocápsula contendo dispersão molecular, “c” nanocápsula núcleo sólido e “d” nanoesferas).

Fonte: (Mora-Huertas *et al.*, 2010)

Existem duas grandes metodologias para obtenção de nanopartículas. Métodos de polimerização onde o polímero se forma por polimerização de monômeros na hora de formar a nanopartícula e uma segunda metodologia que utiliza polímeros pré-formados ou

prontos. Essa última é a mais usada em ciências farmacêuticas. Polímeros como os derivados do ácido metacrílico/ésteres de acrilato (Kollicoat[®], Eudragit), ácido poli-láctico, ácido poliláctico-co-glicólico e poli- ϵ -caprolactona estão entre os mais usados (FESSI et al., 1989; SCHAFFAZICK et al., 2003; GUTERRES et al; 2007; FATTAL; VAUTHIER, 2002; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2008).

Fessi et al., (1989) desenvolveu a técnica de deposição de polímero, também conhecido como nanoprecipitação (**Figura 3**). É um método que elimina a presença indesejável de monômeros e solventes residuais, que são produzidos pelo processo de polimerização *in situ* e evita a possibilidade de reação cruzada entre o monômero e o agente terapêutico. Esta técnica consiste na dissolução do fármaco e os polímeros em um solvente orgânico não perigoso (acetona ou etanol, por exemplo), que podem estar associados com óleo (se for necessário), e um tensoativo de baixo EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico).

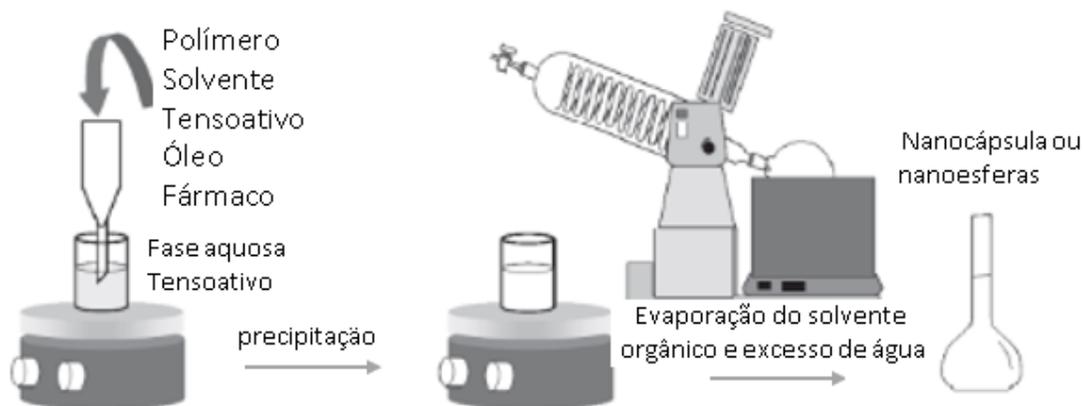


Figura 3. Representação esquemática de preparação de nanopartículas obtidas pelo método deposição do polímero pré-formado.

Fonte: Adaptado de GUTERRES et al., 2007

Esta fase, chamada de fase orgânica, é adicionada lentamente sobre a fase aquosa, composta de água e tensoativo de alto EHL. O resultado desta mistura com agitação é a formação de nanocápsulas (quando há presença de óleo) e ou de nanoesferas (na ausência de óleo), os tamanhos de partícula variam, geralmente, de 200 a 500 nm, e tem como

vantagem, alta estabilidade e elevada taxa de encapsulação em especial para agentes terapêuticos lipofílicos (SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003; GUTERRES, *et al.*, 2007;)

3.3 Atividade antileucêmica e antitumoral

3.3.1 Atividade antileucêmica

A leucemia é uma neoplasia das células sanguíneas formadas na medula óssea. Caracteriza-se por uma elevação da quantidade de leucócitos (leucocitose) no sangue periférico e na medula óssea. Os tipos principais de leucemia são a leucemia linfóide (ALL), leucemia linfóide crônica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC). A incidência de leucemia é elevada, com taxas que atingem os 474.519 diagnósticos na América do Norte (KRUEGER, 2008; GLOBAL CANCER STATISTICS, 2018). A doença pode ser diagnosticada em todas as idades desde o recém-nascido ao indivíduo idoso (JULIUSSON, *et al.*, 2012). A patologia pode disseminar por meio de uma cascata de acontecimentos moleculares que envolve intravasamento, extravasamento, e colonização dos tecidos (JIN, *et al.*, 2006; SIPKINS, *et al.*, 2005). O tratamento desta patologia, requer uma estratégia bem definida, e a recidiva da doença é bem frequente (DÖHNER, *et al.*, 2017; INABA H, GREAVES M, MULLIGHAN CG. 2013).

Leucemia Linfoblástica aguda - afeta principalmente a população infantil. A patologia inicia por conta de uma parada dos linfoblastos (precursores linfóides) no estágio inicial de crescimento. A medula óssea é invadida por fibroblastos, provocando uma diminuição acentuada das células sanguíneas normais. Ocorre também a colonização dos fibroblastos em outros órgãos como fígado, baço e gânglios linfáticos. O quadro clínico do paciente apresenta sintomas como febre, dor óssea, infecção, neutropenia, anemia, trombocitopenia e linfadenopatia (EBERT EC, HAGSPIEL KD . 2012; MEDINGER, *et al.*, 2019).

Leucemia linfocítica crônica - é o tipo mais frequente na população adulta. A média de idade está por volta dos 50 a 60 anos. Diferencia-se de outros tipos de leucemia devido

ao amontoamento de linfócitos maduros e imunocompetentes nos órgãos linfoides e na medula óssea. É normalmente assintomática, podendo ocorrer fadiga generalizada e esplenomegalia. Pode evoluir com gravidade levando o indivíduo a óbito por linfoma difuso de células grandes, chamado também de Síndrome de Richter (EBERT EC, HAGSPIEL KD., 2012; BOSCH F, DALLA-FAVERA R., 2019; SCARFÒ L, FERRERI AJ, GHIA P.,2016).

Leucemia Mieloide Aguda - acomete de forma acentuada a população adulta. Produz inibição do amadurecimento dos precursores hematopoiéticos sendo caracterizado por cerca de 20% de blastos na medula óssea. Tendo como consequência infiltração da medula óssea por células leucêmicas, reduzindo as células normais da medula e ainda, afeta a proliferação do processo no sangue (baço e fígado). Sintomas mais frequentes são: infecção, fadiga, sangramento e dispneia (EBERT EC, HAGSPIEL KD, 2012; AQUINO VM, 2002; YAHYA D, HACHMERIYAN M, MICHEVA I, CHERVENKOV T., 2022).

Uma geração nova de células leucêmicas com uma translocação cromossômica 8;21, chamada de Kasumi-1, foi descoberta. Originária de sangue periférico de uma criança de 7 anos com sintoma agudo de leucemia mieloide (LMA). As células Kasumi-1 tiveram testes positivos para mieloperoxidase mostrando uma morfologia de mieloide de maturação. A resposta do teste de proliferação foi evidenciada na cultura com fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), interleucina-3 (IL-3), IL-6, e granulócitos macrófagos LCR (GM-CSF), contudo, não teve o mesmo resultado com IL-1 ou IL-5. As maturações granulocítica e eosinofílica não foram observadas na cultura líquida quando adicionado dimetilsulfóxido, IL-5 ou G-CSF, respectivamente. Em contrário, a indução de macrófagos foi evidenciada quando adicionado éster de formol. Esta é primeira vez que se relata uma linhagem de células LMA humana com t(8;21) com características das linhagens de células mieloides e macrófagos. A célula pode ser um ponto de partida adequado para descobrir a fisiopatologia da LMA com t(8;21) (ASOU. et al., 1991).

Com a descoberta, das células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) este tipo celular vem sendo utilizadas com muita frequência em diversas áreas do conhecimento, que seja para teste de fármacos conhecidos e/ou novas moléculas *in vitro* ou para modelação de patologias (COLMAN A, DREESEN, 2009; YAMANAKA S. 2013; LÁZARO I, YILMAZER A, KOSTARELOS K., 2014). Alterações hematológicas, inclusa a leucemia mieloide (CML) vem sendo modelado pela comunidade científica (YILMAZER A, DE LÁZARO I, TAHERI H., 2015; HANNA. et al., 2007; LIM, 2015, AKTUNA, A. Y., 2018).

Leucemia mieloide crônica - este tipo de leucemia tem como principal característica a multiplicação de granulócitos e seus precursores. E tem a translocação cromossômica como agente causador da patologia. O cromossomo envolvido no processo foi nomeado como cromossomo Filadélfia. O quadro clínico é similar a leucemia linfocítica, ou seja, assintomático, podendo ocorrer mal-estar, anemia e esplenomegalia (EBERT EC, HAGSPIEL KD . 2012; ENRIGHT H, MCGLAVE PB. 1996; FADERL S, TALPAZ M, ESTROV Z, KANTARJIAN HM. 1999).

3.3.2 Atividade antitumoral

O câncer é uma das patologias mais predominante no mundo. De acordo com a OMS, quase 10 milhões de indivíduos vão a óbito anualmente por câncer. Uma em cada seis mortes ocorre em decorrência de neoplasia, estimado em 2018. Cerca de 70% de novos casos de câncer em todo o mundo são estimados para as duas décadas seguintes (Organização Mundial da Saúde, 2023). No Brasil, em 2015 a prevalência era de 576.000 novos casos. O número subiu entre 2020 e 2022 para os 625 mil novos casos a cada ano, o INCA estima em 704 mil o número anual até 2025 (INCA, Instituto Nacional do Câncer, 2023).

A neoplasia mamaria é um dos tipos de câncer mais invasivo, ocupando a primeira posição em ocorrência no sexo feminino. Representa 11,6 % de todos os diagnósticos de câncer do Brasil. O número de mortes no mundo em 2018 foi de aproximadamente 630.000

mulheres, representando 15% dos cânceres ligados a óbitos femininos (BRAY et al., 2018). O modelo para tratar a neoplasia mamaria é bastante amplo e envolve procedimento cirúrgico e quimioterapia (GRADISHAR et al., 2020). A taxa de recorrência é bastante elevada no pós-operatório, bem como as complicações em período curto de tempo, decorrente do processo cirúrgico (LISSONI et al., 1990; MURTHY et al., 2007). Deste modo, os esforços devem ser redobrados e concentrados em esclarecer com maior brevidade a patogênese da neoplasia mamaria, com finalidade de elucidar e ampliar novas formas de tratamento (LIN. et al., 2021).

O câncer de próstata é o quinto tipo de neoplasia mais frequente em todo mundo. Aproximadamente 240.000 novos casos são registrados a cada ano. Houve uma grande evolução na busca do diagnóstico precoce e tratamento desta doença nos últimos anos; contudo, seu prognóstico tem se mantido frágil (LI J, DAI L, LEI N et al., 2016).

O diagnóstico deste câncer é sustentado pela avaliação patológica (biópsia de tecido), mas as alternativas de tratamento são definidas pela estratificação do risco com base no escore de Gleason, e no PSA, quantificado em sangue sistêmico (HEIDENREICH, et al., 2013). A metástase é ainda, disparada o motivo que leva o paciente ao óbito pelo câncer prostático. Desse modo, é indispensável o esclarecimento da patogênese desta doença maligna, identificar os novos biomarcadores essenciais e descobrir os potenciais alvos terapêuticos (LI J, DAI L, LEI N et al., 2016).

O câncer de pulmão se apresenta como um dos principais causadores de óbitos no cenário mundial (1,52 milhão em 2012) (STEWART BW, 2014). Embora tenha se avançado nas medidas terapêuticas, a taxa de sobrevida está ao redor de 5 anos dos indivíduos portadores da doença (MOODY. et. al., 2015). Contudo, faz-se necessário a implementação de novas formas terapêuticas com a finalidade de se elevar as taxas de sobrevida destes pacientes (MORENO., et al. 2018).

O carcinoma de células renais tem sido descrito como o segundo tipo de câncer mais frequente no sistema urológico. É o causador de cerca de 3% das neoplasias malignas no mundo (TURAJLIC S, LARKIN J, SWANTON C. SNAPSHOT., 2015), com números que podem atingir 338.000 novos casos e 102.000 óbitos por ano (FERLAY et. al., 2015). O tipo mais comum é o carcinoma renal de células claras (75%) e o mais frequente subtipo histológico letal de CCR (SHENG et. al.,2017). Até o momento, cerca 40 % dos indivíduos têm seu diagnóstico inicial com metástase avançada. O procedimento cirúrgico é a única forma terapêutica curativa possível para indivíduos com CCR localizado. As terapias que produzem dano ao DNA são desaconselhadas por conta do surgimento de multirresistência (SHUCH. et al., 2015; BUTI. et al., 2013). Os desafios para o manejo do carcinoma renal de células claras é identificar novos alvos terapêuticos, bem como descobrir novos métodos para tratar de forma isolada ou associada (Xu. et al., 2018).

O câncer hepático é um dos principais motivos de óbitos no nível mundial. É o quinto tipo mais frequente de malignidade no sexo masculino e oitavo no sexo feminino. O câncer de fígado tem sido diagnosticado com muita frequência, os números são bastante elevados, cerca de 400.000 homens e mais de 250.000 mulheres tem sido diagnosticado com esta doença (SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL.,2016). As pesquisas mostram que esta doença hepática é diagnosticada precocemente (antes dos 20 anos de idade) em nações ricas, e somente cerca dos 50 anos em nações pobres (RYERSON AB, EHEMAN CR, ALTEKRUSE SF et al., 2016).

Estudos revelam que a prevalência da doença é mais elevada no indivíduo do sexo masculino, sendo duas vezes maior, quando comparado com o sexo feminino (RYERSON AB, EHEMAN CR, ALTEKRUSE SF et al., 2016). Aliás, a comunidade científica alerta para a elevação da incidência deste câncer em países desenvolvidos (CHEN W, ZHENG R, BAADE PD et al.,2016). A elevada ocorrência de câncer de fígado, os tratamentos padronizados escassos e os efeitos indesejáveis dos fármacos existentes, requerem

exploração e descobertas de novas moléculas bioativas originárias de plantas, para combater o alto grau de agressividade biológica produzido por esta patologia (WEN, SONG et al., 2018).

3.4 Diabetes

Diabetes mellitus é uma doença relacionadas a diversos distúrbios metabólicos. Sua principal característica é a hiperglicemia crônica, provocada pela produção e/ou ação insuficiente da insulina ou pela combinação dos ambos os mecanismos. Sua patogênese envolve fatores genéticos e ambientais (PINHAS-HAMIEL; ZEITLER, 2005). Segundo a *American Diabetes Association* (ADA) a persistência a longo prazo dos distúrbios metabólicos resulta em danos que altera a funcionalidade de diversos órgãos, incluindo os olhos, rins, nervos e vasos sanguíneos (ADA,2015).

Diabetes mellitus (DM) é um importante e crescente problema de saúde no mundo, independentemente do nível de desenvolvimento dos países. Estimativas da Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation*, IDF) indicam que 4,6% da população mundial (151 milhões de pessoas) tem diabetes tipo I, e 9,3% (463 milhões) tem diabetes tipo II. A previsão é que, para 2030, 10,2% (578 milhões) da população mundial com idade entre 20 e 79 anos conviva com diabetes.

A **figura 4** mostra o panorama global da doença. Mantendo estas tendências, a projeção para 2045, atinge um patamar de 10,9% (700 milhões) de pessoas acometidas com este mal (IDF DIABETES ATLAS, 2019). O crescente aumento do número de casos é decorrente de variados fatores como: urbanização descontrolada, obesidade, maus hábitos alimentares, atividades físicas escassas, maior sobrevida da população, bem como aumento da expectativa de vida para indivíduos com diabetes em tratamento (DIRETRIZ SBD, 2019).

A OMS revelou que casos de hiperglicemias se apresentam como o terceiro fator em importância relacionados a morte prematura, sendo superado apenas pela hipertensão

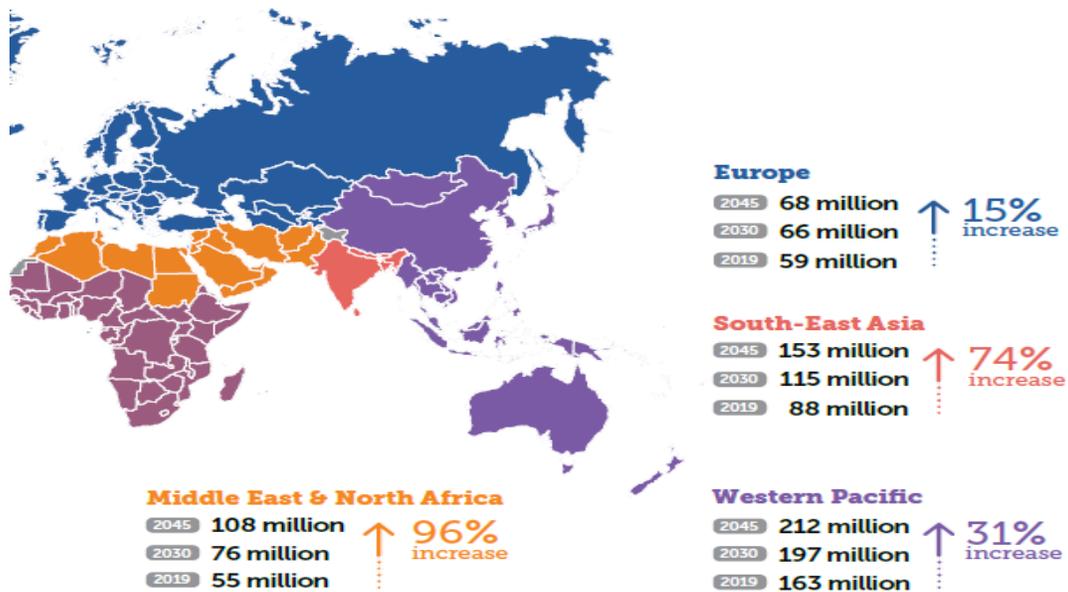


Figura 4. Número de adultos (20-79 anos) com diabetes em todo o mundo
Fonte: (IDF DIABETES ATLAS, 2019)

arterial e pelos problemas decorrentes do uso do tabaco. A falta de políticas públicas e comprometimento de alguns governantes e profissionais de saúde tem contribuído drasticamente para evolução do diabetes e suas complicações (BERGMAN; FINEGOOD; ADER, 1985). Esses fatores combinados contribuem para o desenvolvimento de processos patológicos e, ainda pesa nesta associação, a ausência de diagnóstico, ou seja, o indivíduo se mantém doente e não tem ciência da gravidade do caso. Isso ocorre em 50% dos casos (adultos), incidindo fortemente nos países em desenvolvimento atingindo cerca de 84,3% dos pacientes diabéticos (BEAGLEY et al., 2014). Isso aumenta o número de internações e eleva o custo do sistema de saúde impactando diretamente na sociedade (COLLABORATORS et al., 2016). Esta doença causa tanta preocupação no mundo que a OMS a declarou como a única doença não transmissível que é reconhecida como uma epidemia (OMS, 2011).

3.4.1 Modelos Experimentais de Diabetes

Diversos modelos experimentais podem ser usados para avaliar a atividade de fármacos em doenças como o diabetes. O uso de modelos experimentais em diversos tipos

de animais tem como finalidade demonstrar os mecanismos de cura e dos processos patológicos causados por medicamentos e outras substâncias (CESARETTI; KOHIMANN, 2006; FAGUNDES; TAHA, 2004).

Os camundongos, como biomodelo experimental, permitem, em grande medida, o entendimento das condições patológicas da espécie humana (PELTONEN L, MCKUSICK VA.,2001). A homologia genética entre as espécies (humana e animal) favorece o melhor entendimento da doença. Por isso, estes modelos são bastante utilizados (HEYDEMANN, 2016). Os modelos em ratos também são amplamente usados na tentativa de compreensão do efeito de fármacos na saúde humana e animal (ISLAM, M.S., LOOTS, D.T.,2009, IANNACCONE; JACOB, 2009). Alguns dos principais modelos experimentais em ratos e camundongos que tem se utilizados são apresentados na **tabela 1**.

Aloxana (5,5-dihidroxilpirimidina-2,4,6-triona) é uma molécula sintética derivada da ureia que causa inibição da enzima glucoquinase, que por sua vez, inibe a produção de

Tabela 1. Modelos experimentais usados para estudos pré-clínicos de diabetes tipo 1 e tipo 2

| Métodos de Indução | Modelo Animal | Descrição | Referências |
|------------------------|--|---|--------------------------------------|
| Indução Química | Indução com aloxano | inibição seletiva da secreção de insulina estimulada por glicose. | Rayburn WF, 1997 |
| | Indução com estreptozotocina | Danifica a célula β pancreática, causando hipoinsulinemia e hiperglicemia. | (GVAZAVA et al., 2018) |
| Autoimune espontâneo | Camundongos diabéticos não obesos | Modelo poligênico de diabetes tipo 1 caracterizado por hiperglicemia e infiltração leucocítica da ilhota pancreática de Langherans. | (KING, 2012) |
| | Rato BB (BioBreeding) | Desenvolver espontaneamente hiperglicemia e cetoacidose que caracterizam o início clínico do diabetes tipo 1 | (KING, 2012) |
| Induzido geneticamente | Ratos obesos Zucker | Modelo de obesidade genética caracterizado por hiperlipidemia e hipoinsulinemia. | (WANG; CHANDRAS EKERA; PIPPIN, 2014) |
| | Ratos diabéticos obesos Zucker | Desenvolvido com mutação missense no gene do receptor de leptina. Isto desenvolve obesidade sem diabetes e é usado no estudo do tipo 2 diabetes | (A, 2016) |
| Induzido por vírus | Modelo induzido pelo vírus Coxsackie B | Desenvolve diabetes mellitus insulino dependente como resultado da reestimulação das células T auto reativas resultantes. | HORWITZ et al .,1998) |

Fonte: DATASUS/MS, 2019

insulina pelas células β -pancreáticas (ROHILLA; ALI, 2012). Utiliza-se para induzir *Diabetes mellitus*, que leva a doença pelos seguintes mecanismos (LENZEN, 2008): por inibição da insulina estimulada pela glicose, isso ocorre devido a inibição elevada da enzima glucoquinase, que é a responsável por detectar a glicose nas células beta no pâncreas (MIKA KATOH, KOICHI SAKURAI, 2002) e pela a formação de radicais livre e, consequentemente, radicais superóxidos (SZKUDELSKI, 2001).

Estreptozotocina (STZ) quimicamente é n-(metilnitrosocarbamoil) - α -d-glucosamina. É produzida pelo fungo *Streptomicetos acromogenes* e produz atividade biológica antibacteriana (WU; YAN, 2015). As células β pancreáticas possuem alta afinidade por esta molécula, que provoca lesões irreversíveis nestas células (RAKIETEN N, RAKIETEN ML, NADKARNI MR, 1963). A STZ também provoca toxicidade celular semelhante a glicose (MIKA KATOH, KOICHI SAKURAI, 2002, RERUP C.C, 1970). A STZ é a molécula mais utilizada para induzir *Diabetes mellitus* em animais experimentais (ELEAZU et al., 2013).

4.1 Procedimentos experimentais

Os trabalhos foram realizados em três etapas (**Figura 5**): a primeira no Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas (LIDETEF), onde foram preparadas as nanocápsulas (em suspensão aquosa) que foram utilizadas na pesquisa, a morfologia das amirinas e das nanocápsulas foi realizada no Centro Multiusuário para Análises de Fenômenos Biomédicos (CMABio) da Universidade Estadual do Amazonas (UEA). A segunda etapa foi desenvolvida no Laboratório de atividade Biológica Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas (BioPhar). Neste foram realizados os testes enzimáticos. A atividade antileucêmica foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo UNIFESP, e Atividade antiproliferativa, este ensaio foi realizado em parceria com o Laboratório de Cultura Celular Avançado (LCCA) da Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade Federal de Matogrosso do Sul (UFMS), sob orientação da Professora Dr^a. Renata Trentin Perdomo. Na terceira etapa, foram realizados testes in vivo (em camundongos), na Universidade Federal do Amazonas (UFAM), sob autorização do Comitê de ética da UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, e aprovado sob o n° 014/2020.

4.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade farmacêutica. Kollicoat[®] Mae 100P, foi gentilmente doado pela BASF-SP (Brasil). A Poly- ϵ -caprolactona (PCL) foi comprada da Sigma (EUA), e a Eudragit[®] E100 foi comprada da Evonik (Brasil). Produtos químicos e soluções tampão foram adquiridos da Alphatec (Brasil).

O ativo usado neste trabalho é uma mistura isomérica de α,β -amirina com 98% de α,β -amirina. O ativo foi extraído e purificado segundo a metodologia de Florentino Neto e colaboradores (2018).

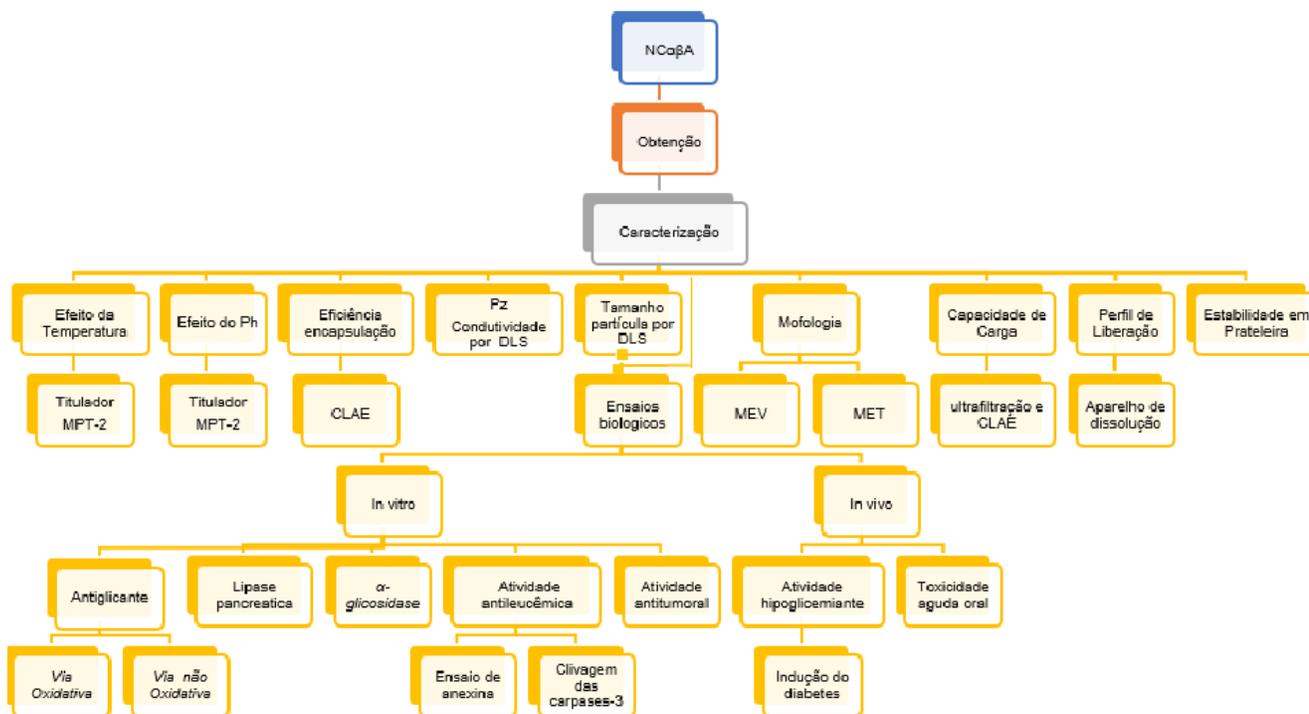


Figura 5. Fluxograma experimental

*NC $\alpha\beta$ A - Nanocápsulas de amirinas

4.3 Desenvolvimento das nanocápsulas contendo α , β -amirina

As nanocápsulas de amirinas foram preparadas (**Figura 6**) pelo método de deposição interfacial de polímero seguido de deslocamento do solvente (FESSI et al., 1989) segundo Florentino Neto e colaboradores (2018).

Preparação da fase orgânica: em um agitador magnético a 400 rpm (Fisatom, Brasil), foi preparada uma solução acetona (15 mL), Span 20 (500 mg), palmitato de isopropila (500 mg) e α , β -amirina (50mg). Posteriormente, foi adicionado o Kollicoat MAE (500 mg) previamente dissolvido em 5 mL de etanol 96% e a agitação foi mantida por 20 minutos. **Preparação da fase aquosa:** esta composta por água (50 mL) e Tween 80 (500

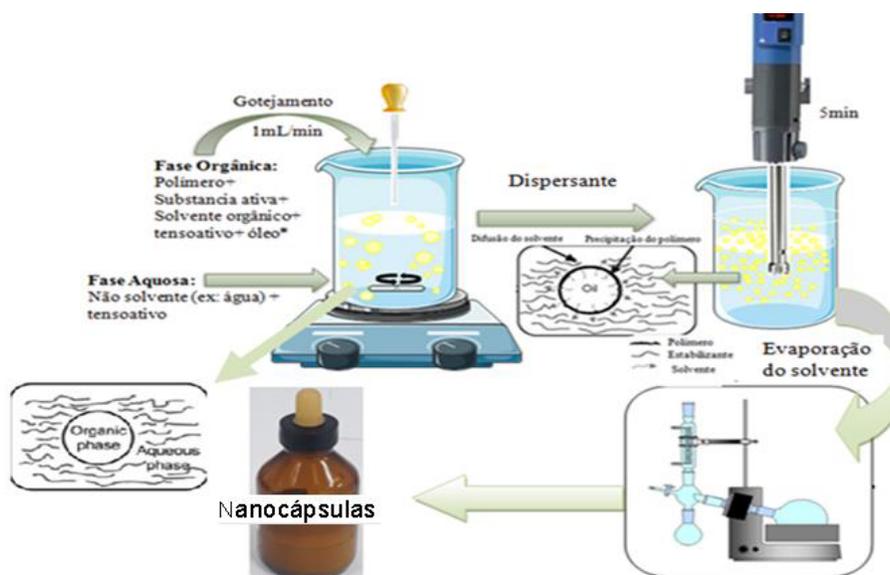


Figura 6. Esquema de preparação das nanocápsulas de amirinas.

mg), foi mantida em agitação a 400 rpm por 20 minutos, em temperatura ambiente. A fase orgânica foi adicionada à fase aquosa ($\approx 1\text{ mL/min}$) usando uma bureta e a mistura foi agitada por mais 15 minutos a 400 rpm. Posteriormente, a mistura foi homogeneizada por 5 min em agitador de alta cisalha Ultraturrax[®] (IKA, Suíça) a 10 mil rpm. Para formar as nanocápsulas de amirinas, o solvente foi eliminado em um evaporador rotativo a vácuo (IKA, Suíça) a 50°C (**Figura 6**).

4.4 Avaliação do tamanho das partículas e o índice de polidispersidade

O tamanho de partícula e o índice de polidispersidade foram medidos por PCS (espectroscopia de correlação de fótons) usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido). Foi usado um comprimento de onda de 633 nm, ângulo de dispersão de 173° e temperatura 25°C (RODRIGUEZ et al., 2017). Antes das medições, a solução de nanocápsulas de amirinas foi filtrada usando uma membrana Millipore[®] (0,45 mm). As medições foram feitas em triplicata, e foi reportada a média \pm desvio padrão.

4.5 Determinação do Potencial zeta

O potencial zeta e a condutividade foram medidos em um analisador de tamanho de partículas (Zetasizer, Malvern, UK), usando uma célula descartável de policarbonato. As medidas de mobilidade eletroforética foram automaticamente convertidas em potencial zeta

usando a aproximação de Smoluchowsky. As medições foram feitas a 25°C, utilizando uma tensão de 150V (RODRIGUEZ et al., 2017). Cada amostra foi medida em triplicado, e a média ± desvio padrão foi registrada.

4.6 Eficiência de encapsulamento

Uma alíquota de 400 µL da suspensão de nanocápsulas de amirinas foi colocada em um tubo de ultrafiltração de 1 mL (MS[®], EUA), que foi então centrifugado a 13 Krpm por 30 min, a 5°C. Em um tubo Eppendorf de 2 mL, foram colocados 200 µL do sobrenadante mais 12 µL de acetato de etila, e 96 µL de acetonitrila. A amostra foi filtrada usando uma membrana Millipore[®] (45 µm) e imediatamente, 20 µL foram injetados no sistema HPLC. O ensaio foi realizado em uma coluna Phenomenex Luna C18 de 5µm (25x5cm). Foi usada como fase móvel uma mistura acetonitrila: água (60:40 v:v). O tempo de execução foi de 15 min, a uma vazão de 0,8 mL/min. A detecção do sinal foi feita a 200 nm. O teor de amirinas presente no ativo (que foi isolado e purificado em um trabalho anterior, (FLORENTINO NETO e colaboradores 2018) foi quantificada pelo método da curva de calibração, utilizando um padrão amirina (Sigma, EUA). O método foi validado por Florentino Neto e colaboradores (2018), para avaliar a pureza das amirinas, determinar a eficiência da encapsulação e a capacidade de carga. A eficiência da encapsulação (EE) foi calculada usando a equação 1:

$$EE(\%) = 2 * (50 - ACL) \tag{1}$$

Onde: 50, é a massa de amirinas (em mg) usada para a preparação das nanocápsulas, e ACL é a massa de amirinas quantificada no líquido sobrenadante (mg).

4.7. Capacidade de carga

Para determinar a capacidade de carga, 250 mL de nanosuspensão foram liofilizados (Terroni, Brasil). Foi pesada uma massa de 50 mg das nanocápsulas de amirinas liofilizadas e dissolvidos em 2mL de PBS com agitação em Vortex. Um mL foi filtrado usando uma

membrana Millipore® (45 µm) e imediatamente, 20 µL foram injetados no sistema HPLC. O teor de amirinas na massa de nanocápsulas liofilizada foi calculado usando a equação 2:

$$\text{Capacidade de carga (\%)} = \frac{A_C}{W} * 100 \quad (2)$$

Onde: A_C , é o teor de amirinas determinado, em mg e W é a massa de nanocápsulas utilizadas para análise.

4.8 Perfil de liberação das nanocápsulas

O perfil de liberação foi avaliado, *in vitro*, em um aparelho de dissolução de pá (Nova Ética, Brasil) a 37 ± 1 °C utilizando 500 mL de tampão PBS (pH 7.4) como meio de dissolução. Uma massa de 250 mg das nanocápsulas de amirinas liofilizadas foi colocada no meio de dissolução e agitada a 75 rpm por 60 min. Alíquotas de 3 mL foram removidas a cada 5 minutos e substituídas pela mesma quantidade de solução PBS. Um mL da amostra foi utilizado para medir o tamanho das partículas e o índice de polidispersão. Os outros dois mililitros foram centrifugados às 14 Krpm por 25 min, a 4 °C. Um mL do líquido sobrenadante foi filtrado através de uma membrana Millipore® (0,45 µm), e 20 µL de líquido sobrenadante filtrado foi diretamente injetado no sistema HPLC (como descrito na Seção 4.6). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.9 Avaliação do efeito do pH sobre o tamanho das partículas

O efeito do pH sobre o tamanho das partículas de nanocápsulas de amirinas e no potencial zeta foi determinado usando um titulador MPT-2 (Malvern, Reino Unido) acoplado a um analisador de tamanho de partícula (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK). Hidróxido de sódio (0,1 mol/L) e ácido clorídrico (0,1 mol/L) foram utilizados como titulantes. O instrumento foi calibrado utilizando soluções tampão (pH 4, pH 7, pH 10; Alphatec, Brasil). As medidas foram realizadas em triplicatas a 25 °C.

4.10 Avaliação do efeito da temperatura sobre o tamanho das partículas

Foi avaliado o efeito da temperatura no tamanho das partículas e o índice de polidispersão das nanocápsulas de amirinas. A suspensão de Nanocápsulas de amirinas

foi aquecida de 20 a 70°C, em intervalos de 5°C. A amostra foi mantida por 5 minutos a cada temperatura antes da medição. O tamanho das partículas e o índice de polidispersão foram medidos em triplicata, e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

4.11 Avaliação da morfologia

Microscopia eletrônica de varredura (MEV): Foi avaliada a morfologia das nanocápsulas secadas por spray drying usando MEV. As micrografias foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura JEOL, MEV-JSM-IT500HR (USA). As amostras foram fixadas em fitas de carbono sobre os porta amostras e submetidas a 2 minutos de metalização com ouro usando um dispositivo metalizador Smart Coater (JEOL, USA). O equipamento foi operando a 5 kV sob alto vácuo, e diversas magnificações (370x e 6500x).

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): As nanocápsulas de amirinas em suspensão, foram microfotografadas usando um microscópio eletrônico de transmissão MET-JEM 1400 Flash (JEOL, USA). As amostras foram depositadas sobre grades de cobre de 200 mesh recobertas com filme para a formação do filme na superfície da lâmina. O equipamento foi operando a 5 kV sob alto vácuo. Magnificação (6500x).

4.12 Avaliação da estabilidade em prateleira

Amostras das nanocápsulas de amirinas (50 mL) foram mantidas em frascos âmbar por 18 meses a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e 65% de umidade relativa. O tamanho das partículas, o índice de polidispersão, o potencial zeta e o pH foram medidos nos dias 0, 7, 15, 30, 60, 90, 180, 360 e 540. Todas as medidas foram feitas em triplicata, e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

4.13 Avaliação da atividade biológica

4.13.1 Atividade antiglicante: Via Oxidativa

A atividade antiglicante foi avaliada de acordo com Kiho (2004) com ligeiras modificações. A reação foi efetuada em triplicata com as concentrações de: Albumina (BSA) 10 mg/mL, Glioxal 30 mM, e 1 mg/mL do MA3 (dissolvidos em DMSO). As soluções de glioxal e BSA foram preparadas em tampão fosfato (0,2 M, pH 7.4), contendo azide de sódio 3 mM como agente antimicrobiano. Resumindo, os 300 µL da mistura total da reação estão compostos por: BSA (135 µL), glioxal (135 µL) e DMSO ou MA3 (30 µL), A mistura foi incubada á 37°C durante 48 horas (em condições estéreis e no escuro). Após a incubação, cada amostra foi analisada no leitor de microplaca pela intensidade da fluorescência (emissão λ330nm e excitação λ420nm). A quercetina foi utilizada como padrão e o DMSO como controle negativo. A porcentagem de inibição foi calculada usando a equação 3. Os resultados foram expressos em porcentual de inibição e a CI₅₀ e foi calculado através do programa estatístico GraphPad Prisma 6.0.

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \frac{F_p}{F_c} * 100 \quad (3)$$

Onde: F_p = (Fluorescência do branco – Fluorescência da Amostra)

F_c = (Fluorescência do branco – Fluorescência do Controle)

4.13.2 Atividade antiglicante: Via não oxidativa

A atividade antiglicante via não oxidativa foi avaliada de acordo com Kiho (2004) com modificações. Foram seguidos os mesmos passos que para avaliação pela via oxidativa albumina-Frutose, mas foi usado como substrato frutose (0,1mM), tempo de incubação foi de 72 horas e o padrão utilizado foi a aminoguanidina.

4.13.3 Atividade inibitória da lipase pancreática

A avaliação foi feita de acordo com a metodologia de Slanc et al., (2009) com modificações. A lipase pancreática suína tipo II, foi diluída em tampão TRISMA-HCL 75mM pH 8,5. O substrato 4-Nitrophenyl palmitate (PNP) foi preparado sendo diluído primeiro em acetonitrila depois em etanol na proporção de 1:4 (v/v). Nos poços da microplaca (em triplicata) foi colocado 30µL das amostras, padrão e/ou controle (DMSO) e 250µL da enzima

(0,8 mg/mL). As placas foram incubadas no escuro por 5 minutos a 37°C. Após incubação, foi adicionado 20µL de PNP (4mg/mL), e incubou-se novamente por 10 minutos, até que a leitura do controle foi de 1,000 ± 0,1. Orlistat foi usado como padrão e as leituras foram feitas em um leitor de microplacas (Multimode Detetor DTX 800, Beckman, UK) à 450 nm.

Realizou-se os cálculos do porcentual de inibição usando a equação 4:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \frac{A(p)}{A_c} * 100 \quad (4)$$

Onde: A_p = (Absorbância de branco - absorbância da amostra) a 450 nm e

A_c = (Absorbância do Branco - Absorbância do Controle).

A IC_{50} foi determinada pela análise de probabilidade utilizando o *software* GraphPad (CA, EUA), com nível de significância de 0,05. As concentrações que apresentaram uma inibição maior de 50% foram usadas para fazer a determinação da IC_{50} .

4.13.4 Atividade inibitória da α -glicosidase

A atividade inibitória de α -glicosidase foi baseada na metodologia de ANDRADE-CETTO *et al.*, (2008) com modificações. Inicialmente, foi preparada a enzima numa concentração de 3 mg/mL, partindo do pó de intestino de rato. A mistura foi agitada por 5 minutos, centrifugada a 3600 rpm por 10 minutos. O sobrenadante que continha a enzima α -glicosidase e separado. O substrato 4-nitrofenil-D-glucopiranosídeo (4-NPGP) e a enzima foram diluídos em tampão fosfato 10 mM de pH 6,9. Em seguida foram colocados 30µL da amostra, 30µL do padrão e/ou controle (DMSO) nos diferentes poços da microplaca (em triplicata), e 170µL da enzima. A placa foi incubada durante 5 minutos a 37°C no escuro. Depois, à enzima foi adicionada de 100µL do 4-NPGP (5mg/mL), e incubada novamente por 20 minutos ou até que a leitura do controle à 405nm for de 1,000±0,1. Realizou-se os cálculos do porcentual de inibição usando a equação 5:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \frac{A(a/p)}{A_c} * 100 \quad (5)$$

Onde: $A(a/p)$ = Absorbância de branco - absorbância da amostra) a 450 nm,

A_c = (Absorbância do Branco - Absorbância do Controle).

A IC₅₀ foi determinada pela análise de probabilidade utilizando o *software* GraphPad (CA, EUA), com nível de significância de 0,05. As concentrações que apresentaram uma inibição maior de 50% foram condicionadas para fazer a determinação da IC₅₀.

4.13.5 Avaliação da atividade antileucêmica

Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) de doadores saudáveis foram coletadas após a obtenção do consentimento informado dos pacientes. A separação das células mononucleares foi realizada pelo método de gradiente de centrifugação utilizando o histopaque-1077 (Ficol, 1,077 g/cm³) (Sigma, USA) seguindo as instruções do fabricante, a 400 g por 30 min. O uso de amostras humanas foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo, sob o número de autorização 35853720.2.0000.0021.

As linhagens celulares Jurkat (leucemia linfocítica aguda humana), Molt (leucemia linfocítica aguda humana) e Kasumi-1 (leucemia mieloide aguda humana) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Merck, Alemanha). As células K562 (leucemia mieloide crônica humana) e C1498 (leucemia mieloide aguda do camundongo) foram cultivados em meio DMEM (Merck, Alemanha). O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), penicilina U/mL de 100 U/mL e 100 µg/mL de estreptomicina em atmosfera umidificada a 37°C, e 5% de atmosfera CO₂. A atividade citotóxica em células PBMC e linhagens de leucemia (10⁵ células/mL) foi avaliada em microplacas de 96 poços. O efeito citotóxico do nanocápsulas de amirinas foi comparado com o efeito de nanocápsulas branco (bNC) preparada nas mesmas condições descritas na seção 4.3, mas sem α,β-amirina (ASOU, 1991).

Após 48h de incubação com as substâncias testadas, o meio foi removido e adicionado 100 µL de solução de resazurina de 10%. Após 5h, a fluorescência foi lida em 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão) usando um leitor de microplaca (FlexStation 3, Molecular Devices, Alemanha). Cada experimento foi realizado em triplicata. Os valores

médios do metabolismo celular de todos os grupos foram comparados utilizando-se o teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste HSD (Diferença Honestamente Significante) de Tukey usando $p < 0,05$.

Ensaio de anexina V / 7- AAD

Suspensão de células (10^5 células/mL) foi estimulada com as nanocápsulas de amirinas por 24h. Após esse período, as células foram lavadas e suspensas na solução tampão (0,01 M HEPES, pH = 7,4, 0,14 M NaCl e 2,5 mM CaCl_2). A suspensão de células foi rotulada com isotiocianato de v-fluoresceína anexa (FITC) e 7-AAD (7-amino-actinomicina D) (Becton Dickinson, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas no escuro por 20 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente (ZEMBRUSKI, 2012), 10.000 eventos por amostra foram coletados em um citômetro de fluxo (Accuri C6, Becton Dickinson, EUA). A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software FlowJo, versão 10.7 (Becton Dickinson, EUA).

Clivagem das caspases-3

Uma suspensão das células Kasumi-1 (10^5 células/mL) foram estimuladas com uma solução nanocápsulas de amirinas 1,40 $\mu\text{g/mL}$ (EC_{50}) por 24h. Após o tratamento, as células foram fixadas com 2% de paraformaldeído por 30 min e depois permeabilizadas com 0,01% de saponina em PBS por 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas por uma hora com conjugado FITC de anticorpos caspase-3 (Becton Dickinson, EUA) à temperatura ambiente (LICHT, 2014). Posteriormente, 10.000 eventos por amostra foram coletados em um citômetro de fluxo (Accuri C6, Becton Dickinson, EUA). A análise dos dados foi realizada utilizando-se o *software* FlowJo, versão 10.7 (Becton Dickinson, EUA). A média geométrica (GM) de intensidade de fluorescência foi utilizada para quantificar as caspase-3 clivadas.

4.13.6 Avaliação da atividade antitumoral

As linhagens celulares HepG2, HFF-1 e NIH/3T3 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco-Invitrogen, Brasil) e as linhagens MCF-7, MDA-MB-231, PC-3 em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco-Invitrogen, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco-Invitrogen, Brasil) e foram mantidas em condições a 37°C em atmosfera de CO₂ de 5% até uma densidade celular de 5x10³ células/poço. Após 24h de adaptação, as células foram tratadas por 48h com concentrações de 0,25 a 250 µg/mL das nanocápsulas de amirinas e 0,025 a 25 µg/mL de doxorubicina. As células foram fixadas usando ácido tricloroacético 20% e após enxague e secagem, foram coradas com sulforrodamina B 0,1%. Os controles usados foram: controle da ação do DMSO; Controle positivo (doxorubicina), controle negativo, branco da amostra e leitura em tempo zero (antes do tratamento). A densidade óptica foi obtida a 540nm em leitor de microplacas de 96 poços (Spectramax 190) conforme metodologia de Skehan (1990). A porcentagem de crescimento de cada linhagem de células tumorais avaliadas foi calculada em programa Excel 2003/2007, utilizando as fórmulas de Monks e colaboradores (1991). Os resultados foram expressos como a média de três experimentos independentes (n=3) e a para calcular a GI₅₀ foi usado o *software Origin 6,0*.

O índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão entre a GI₅₀ da substância teste para a linhagem de células não-tumorais (NIH/3T3) e a GI₅₀ das células neoplásicas.

$$\text{Índice de Seletividade (IS)} = \frac{GI_{50} \text{ NIH/3T3}}{GI_{50} \text{ células neoplásicas}} \quad (6)$$

O critério de classificação de atividade de compostos segundo a GI₅₀ classifica a performance do bioensaio quando menor do que 100 µg/mL como uma boa atividade ou citotoxicidade muito forte. Acima de 100 µg/mL pode-se considerar atividade citotóxica de moderada a inativa (INDRAYANTO et al., 2021).

4.13.7 Avaliação da atividade hipoglicemiante das nanocápsulas de α,β-amirina

- **Animais**

Os animais passaram por um período de aclimação para adaptarem-se ao ambiente de laboratório (ANDRADE., PINTO., OLIVEIRA, 2002). Para este estudo foram utilizados a linhagem de camundongos da espécie BALB/c, albinos, machos, 6 semanas de idade, pesando 18 a 20 gramas, adquiridos na Universidade Estadual de Campinas - Unicamp - SP. Eles foram mantidos sobre condições padrão de laboratório (Ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 26 ± 2 °C e umidade relativa de 35% a 60%). Eles foram alimentados com ração para roedores e água já padronizados pela instituição. O projeto foi submetido à Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, e aprovado conforme protocolo N° 014/2020 (em anexo).

○ **Indução do diabetes**

Este teste foi realizado seguindo o método descrito por (RAMIREZ - ESPINOSA, 2011). Camundongos machos foram divididos em seis grupos de sete animais cada (RAMIREZ - ESPINOSA, 2011), conforme tabela 2. Para indução do diabetes, foi administrada uma dose única intraperitoneal de Nicotinamida (210 mg/kg; diluído em solução salina) e após 20 minutos foi administrado pela via intraperitoneal a estreptozotocina dose única (150 mg/kg; diluído em tampão citrato 0,1M-pH4,5).

Tabela 2. Distribuição dos grupos experimentais no ensaio de atividade hipoglicemiante.

| Grupo experimental | Descrição do tratamento |
|---------------------------|---|
| Grupo I | Controle normoglicêmico não tratado (GCNN) |
| Grupo II | Controle-hiperglicêmico não tratado (GCN) |
| Grupo III | Hiperglicêmico tratado com Acarbose 100 mg/kg (GP); |
| Grupo IV | Tratado com amirina pura 10 mg/kg (GAM10) |
| Grupo V | hiperglicêmico tratados com NCαβA 5mg/kg(GT5) |
| Grupo VI | hiperglicêmico tratados com NCαβA 10mg/kg(GT10) |

* NCαβA (Nanocápsulas de amirinas) (n=7)

Após 3 dias foram medidas a glicemia e os camundongos com concentração de glicose em jejum maior ou igual a 250 mg/dL, foram considerados diabéticos e utilizados para o estudo. A partir da confirmação do diabetes o tratamento diário por via oral foi iniciado em todos os animais durante um período de 30 dias. A dosagens da glicemia foi

feita cada 7 dias. Ao final do tratamento foram coletado o sangue por punção cardíaca, após serem anestesiados.

Os animais foram eutanasiados com uma overdose intramuscular de Cetamina e Xilazina (100 mg/kg de peso) para a coleta de sangue. A glicose no sangue foi dosada usando um glicômetro comercial (ALCON LABORATORIOS SAN DIEGO, USA).

4.13.8 Toxicidade aguda oral

Para o teste de toxicidade aguda foram usados dois grupos experimentais de 3 camundongos Balb/C cada (tratado e não tratado), segundo as recomendações do teste limite da guia da OECD (OCDE 423, 2008).

No primeiro dia, os camundongos ficaram em jejum durante 12h. O primeiro grupo recebeu 2000 mg/kg de nanocápsulas de amirinas por via oral. O segundo grupo recebeu um mililitro de solução salina. Os animais foram mantidos sob observação rigorosa durante 24 horas, para detectar possíveis alterações físicas ou comportamentais, prestando atenção especial durante as primeiras 24 horas. Essas observações seguiram por mais 14 dias para detectar possíveis sinais de toxicidade. O peso corporal, e o consumo de água e alimentos foi monitorado diariamente. Os animais foram eutanasiados com uma overdose intramuscular de Cetamina e Xilazina (100 mg/kg de peso) e foram submetidos a uma necroses grossa (OECD 423, 2008).

4.14 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas usando o pacote estatístico, *StatGraphics Centurion XV. 1* (Stat Ease Co, MA, USA). Foi utilizado um nível de significância de 0,05 em todos os testes. Para a comparação dos grupos experimentais foi usado o teste ANOVA (mais de dois grupos), seguido do teste HSD de Tukey, e provas t-Student para comparação de dois grupos. Valores de $p < 0,05$ indica diferença estatística significativa.

5.1 Caracterização das nanocápsulas carregadas com amirinas (NC $\alpha\beta$ A)

As nanocápsulas carregadas com amirinas, após 24h de preparação, apresentaram um aspecto amarelo translúcido, sem separação de fases. A formulação de nanocápsulas branco apresentou uma cor mais translúcida (**Figura 7**).

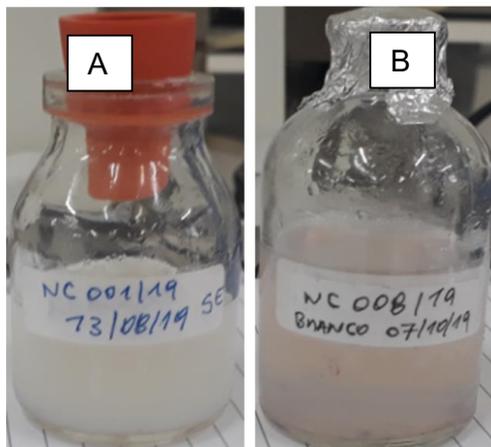


Figura 7. Formulações de nanocápsulas de amirinas desenvolvidas e caracterizadas neste trabalho (A, nanocápsula carregada com α,β -amirina; B, nanocápsula branco (sem α,β -amirina).

5.2 Tamanho de partícula e potencial zeta

A tabela 3 apresenta as características físicas das nanocápsulas carregadas com amirinas e das nanocápsulas branco, após 48 horas de preparadas. As nanocápsulas branco foram preparadas para ser usadas como controle nos ensaios de atividade biológica.

Tabela 3. Propriedades físicas das formulações de nanocápsulas carregadas com α, β - amirina e das nanocápsulas branco, após 48 h de preparação.

| Formulação | Tempo (h) | Tamanho das partículas (nm) | Índice de polidispersão | Potencial zeta (mV) | condutividade ($\mu\Omega / \text{cm}^{-1}$) |
|--------------------|-----------|-----------------------------|-------------------------|---------------------|--|
| NC $\alpha\beta$ A | 24 | 129,75 \pm 0,77 | 0,100 \pm 0,055 | -38,30 \pm 0,70 | 0,153 \pm 0,003 |
| | 48 | 130,18 \pm 1,28 | 0,101 \pm 0,052 | -38,65 \pm 1,22 | 0,60 \pm 0,018 |
| NC branco | 48 | 120,50 \pm 1,35 | 0,090 \pm 0,002 | -16,25 \pm 1,54 | 0,052 \pm 0,005 |

Fonte : Elaborada pelo autor

(n=3)

As nanocápsulas apresentaram o tamanho de partícula pequeno (130,18 \pm 1,28 nm) com uma boa homogeneidade (índice de polidispersão 0,101) (**Figura 8**). O potencial zeta das nanocápsulas foi de -38,65 mV, o que contribui para manter a estabilização das nanopartículas (MORA et al., 2010).

Estes resultados são similares ao trabalho de Lafourcade e colaboradores (2018) onde prepararam nanopartículas de *Cassia grandis*, um extrato vegetal, usando o Kollicoat MAE 100P como agente formador do recobrimento. Eles obtiveram um tamanho de partículas de 106 nm, e um potencial zeta de -19,55 mV. Em outro trabalho, Rodriguez e colaboradores (2017), prepararam nanocápsulas de loratadina usando este polímero e obtiveram tamanho de 43,49 nm e potencial zeta de -19,30 mV. A utilização de este polímero permite obter nanocápsulas usando ativos vegetais e ativos químico sintéticos, e, em todos os casos, são obtidas nanopartículas de tamanho menor de 130 nm, que são, além disso, gastroresistentes, e com boa estabilidade.

A **figura 8** apresenta os gráficos de distribuição do tamanho de partícula e do potencial zeta das nanocápsulas de amirinas. Uma elevada condutividade, significa alta mobilidade de íons livres na solução, o que comumente provoca instabilidade devido a interação das cargas dos íons com a dupla camada elétrica das nanopartículas poliméricas (RODRIGUEZ *et al.*, 2017). A formulação apresentou uma condutividade muito baixa, o que também contribui para uma boa estabilização desse sistema coloidal (**tabela 3**).

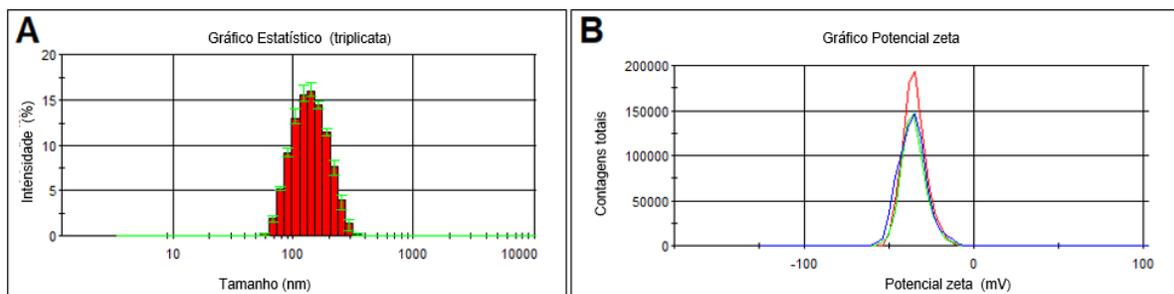


Figura 8. Distribuição de tamanho de partícula (**A**), potencial zeta (**B**) das nanocápsulas de amirinas, 48h após sua preparação.

5.3 Morfologia das nanocápsulas

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) são usadas para obtenção de informações referente a forma e tamanho das nanopartículas. A técnica da MEV é frequentemente utilizada no processo de caracterização morfológica e aspectos físicos das partículas sólidas dispersas. A MET é mais utilizada para diferenciar estrutura, entre outras finalidades. Em este trabalho foi usada para observar a forma das partículas

em suspensão. (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A aplicação destas técnicas é de elevada importância, pois, a morfologia e tamanho de partícula são fatores críticos em diversos processos farmacêuticos (FU *et al.*, 2012; DEDAVID, 2007).

Na micrografia da amirina (**Figura 9a**), as estruturas apresentaram-se como partículas aciculares, bem definidas, com formas regulares de aspecto fibroso e formato tridimensional, que é uma particularidade desses cristais (SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2017). A cristalinidade foi confirmada por difração de RX (Florentino Neto e colaboradores, 2018). Nas nanocápsulas secas por spray drying observadas por MEV (**Figura 9b**) mostraram partículas redondas, bem estruturadas, com tamanho levemente aumentado em decorrência do processo de secagem por aspersão que provoca uma dilatação da parede elevando seu volume. As análises por MET (**Figura 9c**) mostra nanocápsulas dispersas na

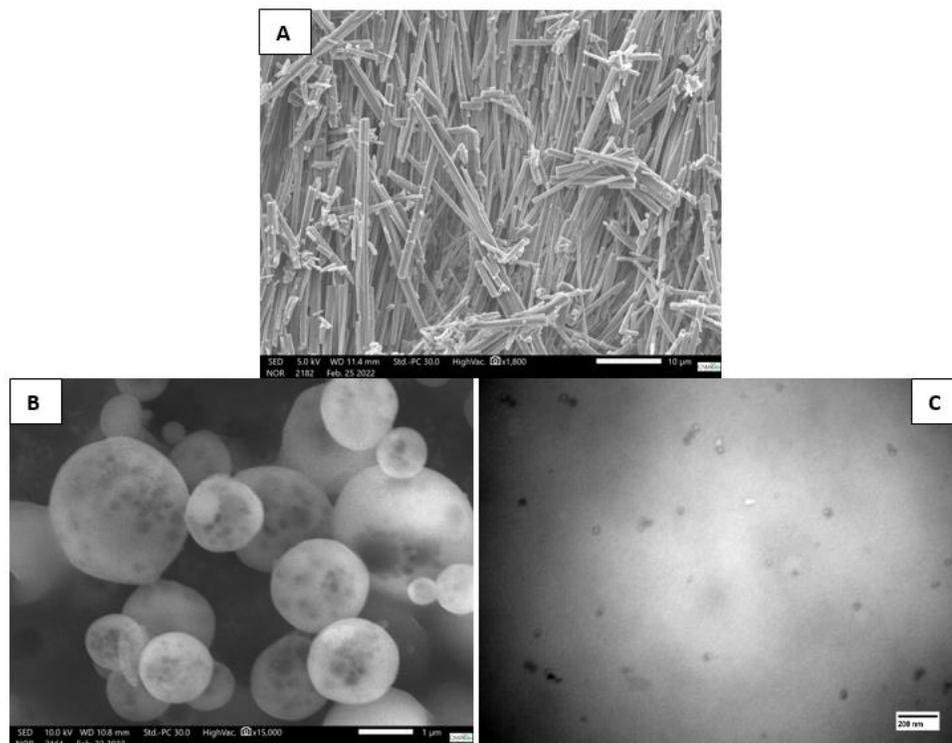


Figura 9. Morfologia da amirina princípio ativo, e das nanocápsulas carregadas com amirina secas por spray drying e em solução. A: Microfotografia da amirina obtida e purificada. B: Microfotografia de nanocápsulas de amirinas seca por *spray drying* (por MEV). C: Microfotografia de nanocápsulas de amirinas em suspensão aquosa (por MET).

suspensão aquosa, podendo se observar claramente a forma redonda nas nanocápsulas. Este é o primeiro relato sobre a preparação de nanocápsulas poliméricas carregadas com amirinas.

5.4 Eficiência de encapsulação e capacidade de carga

A eficiência de encapsulação do processo de formulação indica a quantidade de fármaco que conseguiu ser encapsulado no núcleo das nanocápsulas durante o processo de formulação. A quantidade de fármaco carregado nas nanopartículas pode alterar o efeito farmacológico, o perfil de liberação e a estabilidade (STELLA et al. 2007). A alta eficiência de encapsulamento é uma das características mais importantes das nanocápsulas preparadas com Kollicoat® Mae 100P como um formador da camada de recobrimento, podendo conseguir valores acima de 90% (RODRIGUEZ et al. 2017, LAFOURCADE et al., 2018). Neste estudo, a eficiência de encapsulamento foi de 65,47%, que pode ser considerada baixa, se comparada os resultados de Rodriguez et al., (2017) e Lafourcade et al., (2018). No entanto, valores de eficiência de encapsulação acima de 60% podem ser considerados bons (YEO e PARK, 2004).

A capacidade de carga é outro parâmetro importante do processo de preparação da nanopartícula. Representa a quantidade de fármaco disponível por unidade de peso de nanocápsulas secas (por alguma metodologia de secagem como liofilização ou *spray drying*). Uma vez secadas por *spray drying*, a capacidade de carga das nanopartículas foi determinada indicando um valor de 2,40%, ou seja 2,4 g por cada 100g de nanocápsulas de amirinas seca. Um valor adequado para os processos de dosagem.

5.5 Perfil de liberação

O perfil de liberação das nanocápsulas carregadas com amirinas foi realizado em solução tampão PBS (pH 7.4) como meio de dissolução (**Figura 10**). A porcentagem de amirinas liberada, o tamanho das partículas e o índice de polidispersão foram medidos a cada cinco minutos. Após 30 minutos, as nanocápsulas liberaram 90% do conteúdo de

amirinas. Após esse tempo, o tamanho das partículas havia aumentado para 1100 nm, 8 vezes o tamanho da partícula no tempo zero (131nm), com um índice de polidispersão de 1.000 (sistema totalmente disperso). O aumento do tamanho das partículas correlaciona-se com a quantidade de amirinas liberada ($R^2= 0,9720$, $F= 279,30$, $p=0,0001$).

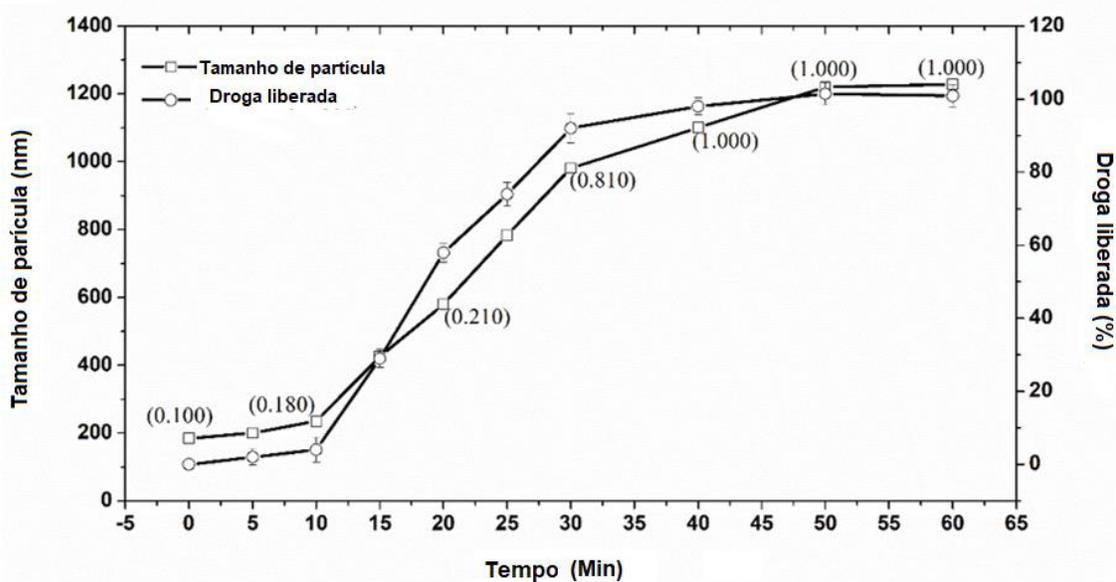


Figura 10. Perfil de liberação das nanocápsulas carregadas de amirinas no buffer PBS (pH 7.4). O gráfico também apresenta o efeito do tempo sobre o tamanho das partículas das nanocápsulas e o índice de polidispersão (em parênteses) no meio de dissolução.

5.6 Efeito do pH

O efeito do pH sobre o tamanho das partículas e o potencial zeta é apresentado na **figura 11**. O potencial zeta permaneceu entre -0,10 mV no pH1 e -4,5 mV no pH 5. A partir do pH 5 para cima, potencial zeta diminuiu para -22 mV no pH7, aumentando para -16 mV pH 5 para cima, o tamanho era praticamente constante até pH 9. O índice de polidispersão (entre parênteses) também aumentou para 0,586 no pH 9.

As propriedades físicas das nanopartículas, como tamanho de partículas, potencial zeta e as farmacocinéticas, como o perfil de liberação, podem ser afetadas por fatores externos como pH e temperatura, entre outros (SADAT et al., 2016). Foi avaliado o efeito do pH e da temperatura no tamanho das partículas e potencial zeta. A mudança no pH de 1 para 5 teve um efeito trivial sobre

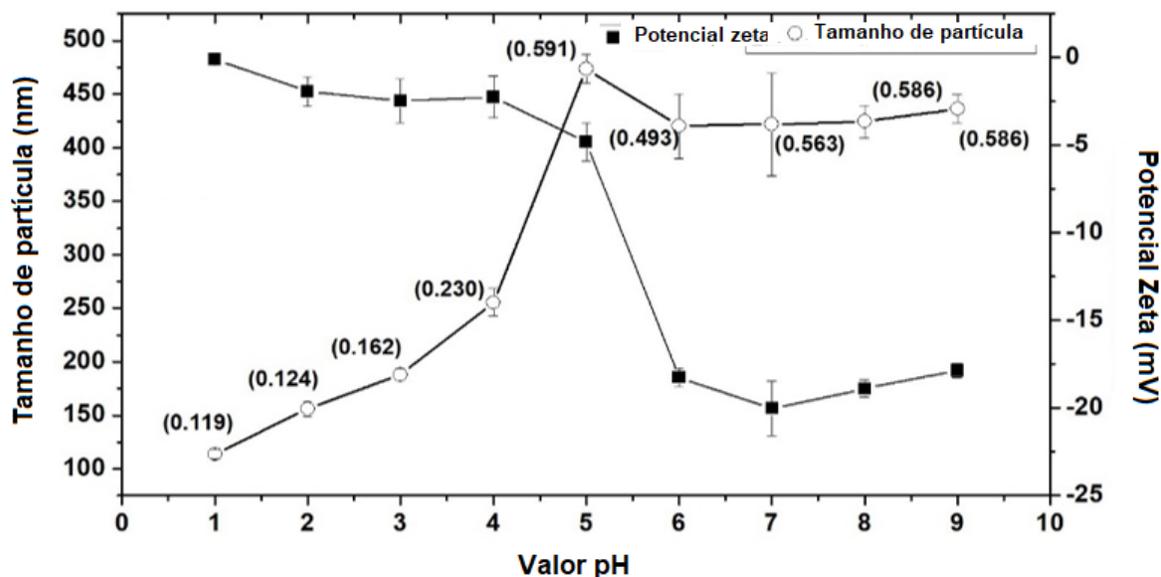


Figura 11. Efeito do pH no tamanho das partículas e potencial zeta das nanocápsulas carregadas de α -amirina.

no pH 9. O tamanho das partículas aumentou de 118 nm no pH 1 para 473 nm no pH 5. Do potencial zeta, que manteve valores entre -0,10 e -4,50 mV. A partir do pH 5 para cima, o potencial zeta diminuiu (aumentou o módulo) com poucas variações além do pH 7. Provavelmente, o aumento de íons -OH em solução, devido à adição de NaOH, ajuda a formar uma camada aniônica em torno das nanocápsulas, e contribui para produzir o potencial zeta negativo. Este resultado concorda com RODRIGUEZ et. al., (2017), que preparou nanocápsulas carregadas de loratadina usando Kollicoat® Mae 100P como um polímero formador de filme. Em seu estudo, o potencial zeta mostrou o mesmo comportamento observado nas nanocápsulas carregadas de amirinas.

Da mesma forma, o tamanho das partículas aumentou de 118 nm no pH 1 para 473 nm no pH 5 e mostrou correlação positiva. Em pH de 6 a 9, o tamanho das partículas aumenta para 430 nm, mas com um aumento notável no índice de polidispersão. Isso significa que em pH acima de 5,5, as partículas são instáveis, o que provavelmente se deve a processos de agregação e desagregação e/ou ao aumento do volume da partícula (RODRIGUEZ et. al., 2017). Comportamento semelhante foi relatado em outras nanopartículas preparadas com Kollicoat® Mae 100P (RODRIGUEZ et al., 2017;

LAFOURCADE et al., 2018). Os copolímeros de ácido metacrílicos permitem a preparação de nanocápsulas resistentes e mantêm o tamanho e o volume praticamente intactos em pH <5. No entanto, em pH acima de 5,5, o tamanho das partículas aumenta para quebrar a cobertura e liberar o conteúdo. O mesmo comportamento foi observado em nanopartículas preparadas com o extrato de *Cássia grandis* (LAFOURCADE et al., 2018), e em nanocápsulas carregadas com loratadina (RODRIGUEZ et al. 2017). Em ambos os sistemas, a camada de revestimento foi produzida usando Kollicoat® Mae 100P, combinado com Tween 80 como o plastificador. Este resultado sugere que nanocápsulas carregadas de amirinas podem permanecer intactas no ambiente ácido do estômago (pH 1.5-2.5).

5.7 Efeito da temperatura

Figura 12 apresenta o efeito da temperatura (de 10 a 70°C) no tamanho da partícula de nanocápsula e no índice de polidispersão. O tamanho não apresentou praticamente nenhuma alteração, e permaneceu entre 99 e 103 nm na faixa de temperaturas. Em contrapartida, o índice de polidispersão diminuiu de 0,120 a 10°C para 0,070 a 60 °C.

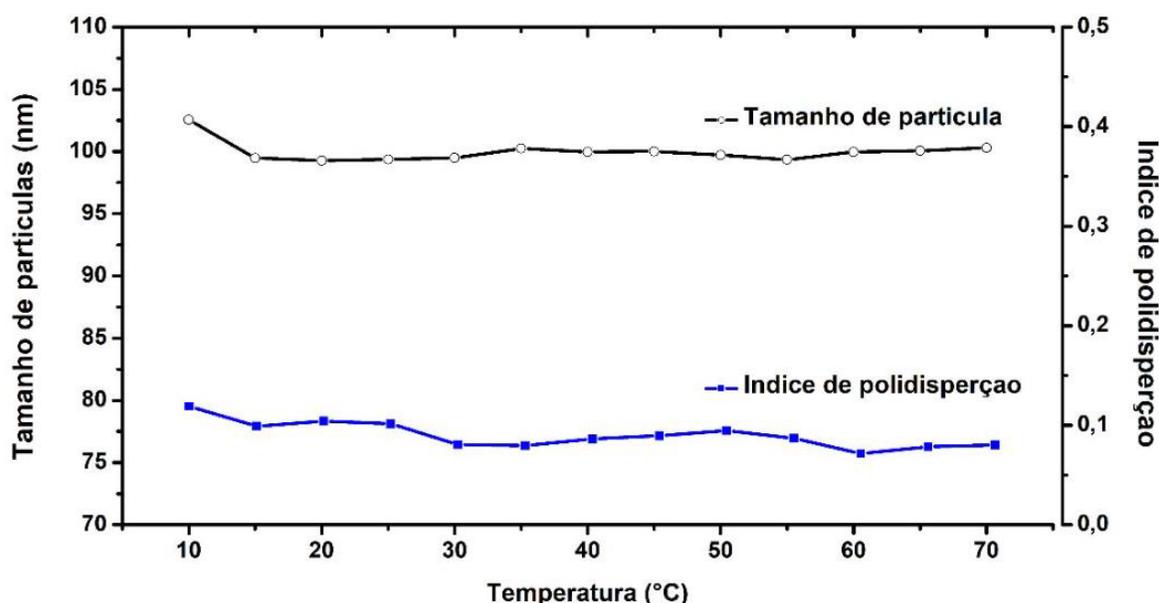


Figura 12. Efeito da temperatura (de 10 a 70 °C) no tamanho da partícula e índice de polidispersidade de nanocápsulas carregadas de α,β -amirina.

Na indústria farmacêutica, algumas operações e processos promovem a transferência de calor e massa, que afetam a estabilidade do excipiente e do fármaco. O efeito da

temperatura nas principais propriedades da nanocápsula foi avaliado. O tamanho da partícula permanece entre 99 e 103 nm a temperaturas entre 10 e 70°C. A distribuição de tamanho foi mais estreita à medida que a temperatura aumentou, e mostrou um índice de polidispersão de 0,120 a 10°C e 0,070 a 70°C. Este comportamento sugere excelente estabilidade térmica de 10 a 70 °C, o que é crucial para um aumento ainda maior dos processos. Este resultado concorda com os relatados por Rodriguez et al.,(2017) e LAFOURCADE et al., (2018). Kollicoat® Mae 100P é um polímero que forma um revestimento elástico capaz de expandir o volume até 8 vezes sem quebrar (BAJDIK e PINTYE 2006), o que poderia explicar a boa estabilidade térmica de nanocápsulas carregadas com amirinas.

5.8 Estabilidade em prateleira

A **tabela 4** mostra o tamanho das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta das NC $\alpha\beta$ A, medido nos dias 0, 7, 15, 30, 60, 90, 180, 360 e 540 após a preparação.

O tamanho diminuiu de 128 nm no tempo “0” para 122 nm após 540 dias (**tabela 4**). A largura da distribuição do tamanho foi mais estreita ao longo do tempo, com um índice de polidispersão de 0,095, 18 meses após a preparação. Da mesma forma, potencial zeta diminuiu (aumentando em modulo) para atingir -45,23 mV após 360 dias, e contribuiu para a estabilização do sistema. O pH permaneceu praticamente constante ao longo do tempo (valores entre 5,11 e 5,13).

Os produtos farmacêuticos precisam preservar sua estabilidade física, química, farmacológica e biofarmacêutica ao longo de sua vida. A estabilidade implica manter (dentro de certos limites) as propriedades do produto sem danos sob o armazenamento padrão ou certas condições de estresse (USP, 2014). Estudos de estabilidade permitem avaliar os efeitos do tempo e/ou fatores externos (por exemplo, temperatura, luz, umidade, absorção de oxigênio) nas propriedades da formulação. Além disso, os estudos de estabilidade permitem definir a melhor forma de embalagem e armazenamento do produto

Tabela 4. Tamanho de partículas, índice de polidispersão, z potencial e pH da formulação de nanocápsulas de amirinas de acordo com o tempo decorrido.

| Hora (dias) | Tamanho das partículas (nm) | Índice de polidispersão | potencial zeta(mV) | Ph |
|-------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------|-------------|
| 0 | 128,80 ± 1,89 | 0,107 ± 0,011 | -35,63 ± 0,55 | 5,12 ± 0,08 |
| 7 | 129,20 ± 0,40 | 0,108 ± 0,014 | -34,56 ± 0,55 | 5,11 ± 0,05 |
| 15 | 127,38 ± 1,62 | 0,081 ± 0,017 | -32,96 ± 1,06 | 5,11 ± 0,07 |
| 30 | 128,60 ± 1,68 | 0,128 ± 0,013 | -35,93 ± 1,90 | 5,12 ± 0,08 |
| 60 | 129,38 ± 1,22 | 0,128 ± 0,013 | -38,60 ± 1,01 | 5,12 ± 0,09 |
| 90 | 123,36 ± 0,32 | 0,111 ± 0,015 | -36,70 ± 1,57 | 5,11 ± 0,05 |
| 180 | 122,70 ± 0,55 | 0,094 ± 0,017 | -43,20 ± 0,35 | 5,12 ± 0,07 |
| 360 | 121,00 ± 0,15 | 0,090 ± 0,007 | -43,55 ± 0,41 | 5,13 ± 0,12 |
| 540 | 122,00 ± 0,14 | 0,095 ± 0,005 | -45,23 ± 0,41 | 5,11 ± 0,18 |

Fonte: Elaborada pelo autor (Nº 5)

(BAJDIK e PINTYE 2006). Neste estudo, a estabilidade das nanocápsulas carregadas de amirinas foi avaliada durante um ano e meio, em condições de prateleira, quando mantida em frascos âmbar, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e em condições normais de umidade e iluminação (tabela 4).

Após 18 meses, o tamanho das partículas das nanocápsulas foi de 122 nm, com baixo índice de polidispersão (0,095). Por outro lado, o potencial zeta foi praticamente constante durante os três primeiros meses, embora tenha diminuído para -45,23 mV após 18 meses. O alto valor modular do potencial zeta contribui para a estabilização do sistema (MORA et al., 2010). A excelente estabilidade observada provavelmente está associada ao equilíbrio dinâmico alcançado pelo sistema de nanocápsulas. A última declaração pode ser validada pela base de estreitamento da distribuição de tamanho (menor índice de polidispersão) devido à redução do tamanho e um potencial zeta alto e estável durante o período do estudo (MORA et al., 2010; RODRIGUEZ et al., 2017; LAFOURCADE et al., 2018). Além disso, o uso de surfactantes não iônicos (Tween 80, Span 20) interfere na agregação de partículas na solução devido a um efeito estérico, o que melhora a estabilização do sistema (GUTERRES, 1995). O comportamento do pH durante o período (praticamente constante) também reflete a excelente estabilidade das nanocápsulas carregadas de amirinas.

5.9 Atividade antiglicante

A formação de produtos da glicação avançadas (AGEs), apresenta-se como um importante mecanismo desencadeador das complicações do diabetes, estes produtos são formados durante o processo hiperglicêmico (MATSUDA et al., 2003). Segundo Reis, et al., (2008) estas complicações têm relação direta com estresse oxidativo, que provoca uma elevação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que interage com proteínas, lipídios e o DNA.

O fármaco aminoguanidina é um importante inibidor da geração AGEs, produzindo atividades biológicas benéficas e contribuindo na prevenção de complicações decorrentes do diabetes como: retinopatia e nefropatia diabética, além de possuir atividade antioxidante (DI NASO et al., 2010; IHM et al., 1999; THORNALLEY, 2003). Contudo, não é isento de efeitos colaterais em pacientes diabéticos. Os dados da tabela 5 sugerem que as nanocápsulas de amirinas não atuam efetivamente sobre a via da glicação a ponto de produzir inibição suficiente para que seja calculada a IC₅₀ (**tabela 5**).

Tabela 5. Efeito da atividade antiglicante das Nanocápsulas de amirinas

| Substâncias | Glicação Oxidativa | | Glicação não Oxidativa | |
|--------------------------|--------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| | Inibição (%) | IC ₅₀ (µg/ml) | Inibição (%) | IC ₅₀ (µg/ml) |
| α,β amirina | 13,0 ± 2,90 | - | 15,8 ± 5,1 | - |
| Nanocápsulas de amirinas | 44,30 ± 0,8 | - | 34,9 ± 1,40 | - |
| Quercetina* | 85,0 ± 0,3 | - | - | - |
| Aminoguanidina * | - | - | 77,4 ± 2,10 | - |
| Nanocápsulas branco | 46,80 ± 3,60 | ⊕ | 39,2 ± 5,8 | ⊕ |

Fonte: elaborada pelo autor

⊕, sem atividade * Fármaco padrão

5.10 Atividade inibitória de lipase pancreática e de α-glicosidase

O ensaio de inibição da lipase pancreática produzido pelas nanocápsulas de amirinas e pela amirina pura, mostrou uma forte atividade inibidora das nanocápsulas de amirinas (IC₅₀ 15,40 ± 0,7 µg/mL, **tabela 6**), que foi menor que a atividade produzida pela substância de referência (Orlistat, 0,29 ± 0,01 µg/mL). No entanto, a atividade das nanocápsulas foi maior que a amirina pura que, na concentração de 100µg/mL, inibiu apenas 16,41% da atividade enzimática.

Os fármacos inibidores da lipase pancreática têm potencial aplicação no tratamento de pacientes com diabetes tipo II que desenvolveram obesidade (KIM *et al.*, 2007; MEENATCHI *et al.*, 2017). Esses fármacos são escassos na terapêutica e apresentam pouco uso clínico. Também é importante salientar o fato que, além do Orlistat, não é observado na literatura o estudo de novas moléculas inibidoras de lipase desde 2014 (LUNAGARIYA *et al.*, 2014). O Orlistat® e outros inibidores de lipase produzem efeitos gastrointestinais adversos como a incontinência fecal, flatulência e esteatorreia (BIRARI; BHUTANI, 2007). Daí a importância de descobrir novas alternativas terapêuticas que evitem aqueles efeitos indesejados.

A formulação de nanocápsulas de amirinas, apresentou um moderado efeito inibidor α -glicosidase com IC_{50} de $44,40 \pm 1,90 \mu\text{g/mL}$ (**tabela 6**). O efeito foi superior ao padrão de referência utilizado (Acarbose, IC_{50} $62,30 \pm 1,30\mu\text{g/mL}$). Uma explicação para este fato é que os triterpenos, como as amirinas, podem competir com os hidratos de carbono na corrente sanguínea, retardando a ligação destes a α -glicosidase, produzindo uma inibição da enzima. Esse resultado sugere uma lenta liberação de amirinas das nanocápsulas, mas esse efeito terá de ser comprovado posteriormente. É importante destacar que, a molécula de amirinas pura em concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ apresentou uma baixa atividade inibitória desta enzima ($1,59 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$), indicando que o uso da nanoformulação poderia ser uma opção viável para a utilização da α,β -amirina no controle do diabetes.

A enzima α -glicosidase tem a função de converter os hidratos de carbono complexos em monossacarídeos para facilitar o seu metabolismo. Os inibidores de α -glicosidase (por exemplo, Acarbose, Voglibose e Miglitol) ajudam a manter a glicose no sangue dentro dos valores normais, reduzindo a taxa de conversão. Assim a acumulação desses monossacáridos se faz demoradamente sendo fácil o seu controle pelo fármaco hipoglicemiante (LI *et al.*, 2005). Por essa razão, as substâncias inibidoras de α -glicosidase hipoglicemiante (LI *et al.*, 2005). Por essa razão, as substâncias inibidoras de α -glicosidase

Tabela 6. Efeito inibidor da lipase pancreática, α -glicosidase da amirina e das nanocápsulas de amirinas.

| Substância | Lipase pancreática | | α -glicosidase | |
|--------------------|--------------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| | % Inibição | IC ₅₀ (μ g/ml) | % Inibição | IC ₅₀ (μ g/ml) |
| Amirinas | 16,41 \pm 2,42 | - | 1,59 \pm 0,57 | - |
| NC branco | - | - | - | - |
| NC $\alpha\beta$ A | 95,30 \pm 2,00 | 15,40 \pm 0,7 | 72,7 \pm 1,4 | 44,4 \pm 1,9 |
| Acarbose* | ⊕ | ⊕ | 65,3 \pm 0,6 | 62,3 \pm 1,3 |
| Orlistat * | 93,20 \pm 1,10 | 0,29 \pm 0,01 | ⊕ | ⊕ |

Fonte: elaborada pelo autor - sem atividade; * padrão, ⊕ não avaliado

são excelentes candidatos para o tratamento complementar da diabetes (TUNDIS et al., 2010).

5.11 Atividade antileucêmica

A citotoxicidade das nanocápsulas de amirinas nas concentrações 10 e 50 μ g/mL foram avaliadas em linhagens celulares leucêmicas (**Figura 13**). As nanocápsulas branco nas concentrações 10 e 50 μ g/mL não reduziram a atividade metabólica das células de leucemia mieloide K562, Kasumi-1 e C-1498 (leucemia mieloide aguda de camundongo), no entanto, concentrações de 50 μ g/mL reduziram o metabolismo celular de Jurkat (linfoblasto T celular leucêmico) e Molt 4 (leucemia T celular aguda humana) para menos de 20%. O metabolismo celular de células Jurkat, Molt 4 e K562 (leucemia mieloide crônica humana) foi reduzido quando tratado com NC $\alpha\beta$ A com 50 μ g/mL. Além disso, As nanocápsulas de amirinas na concentração 10 μ g/mL reduziu a atividade metabólica das células Kasumi-1 e C1498 para seis e cinco por cento, respectivamente, embora essas linhagens não tenham sido afetadas pelas nanocápsulas branco (bNC), em nenhuma concentração (**Figura 13**). Assim, as linhagens celulares Kasumi-1 e C1498 foram selecionadas para realizar curvas de citotoxicidade por 24 horas (**Figura 14**).

A **figura 14** apresenta as curvas de citotoxicidade das nanocápsulas de amirinas nas linhagens celulares Kasumi-1 e C1498. Estas células foram incubadas com soluções de nanocápsulas (10 e 50 μ g/mL) por 48 horas. Soluções de nanocápsulas branco (bNC), na mesma concentração (10 e 50 μ g/mL), foram usadas como controles negativos.

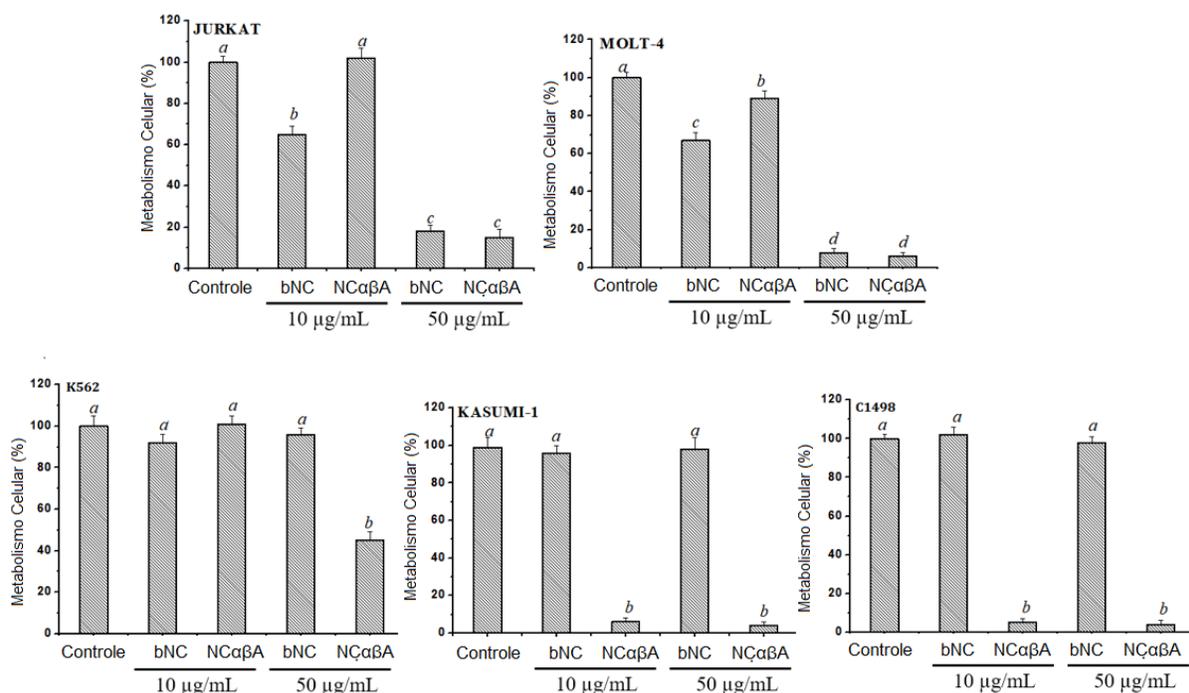


Figura 13. Seleção de linhagem leucêmica suscetível a nanocápsulas carregadas de amirinas (NCαβA).

As nanocápsulas de amirinas apresentaram uma citotoxicidade potente contra ambas as linhagens celulares. No entanto, a citotoxicidade foi mais potente contra as células Kasumi-1 (EC_{50} 1,40 µg/mL) do que contra as células C1498 (EC_{50} 9,00 µg/mL). A

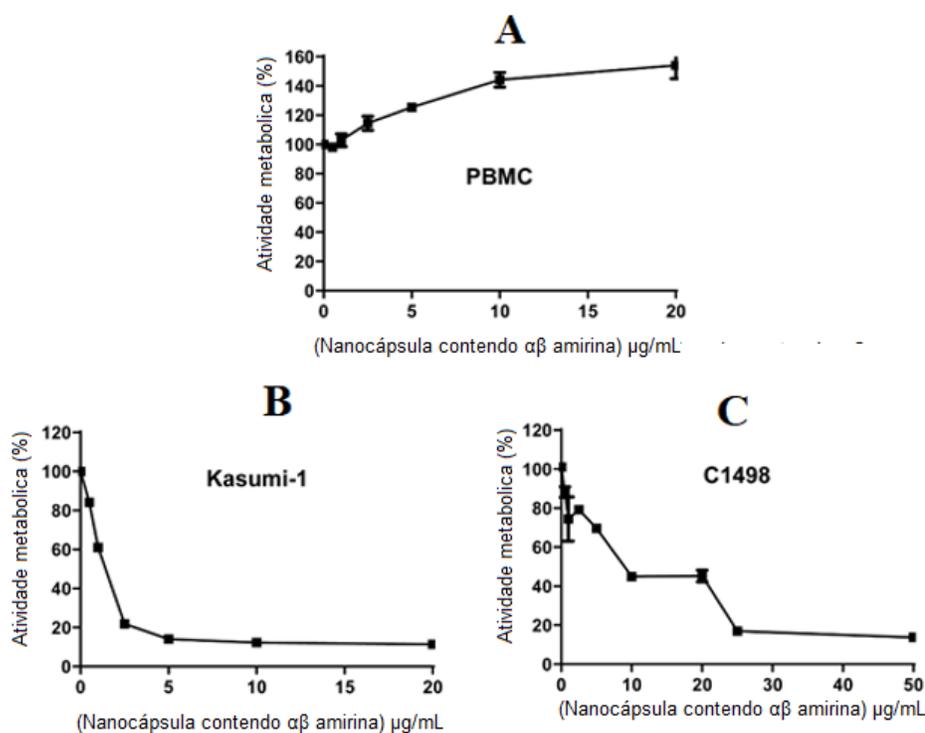


Figura 14. Curvas de Citotoxicidade de Nanocápsulas de amirinas contra células leucêmicas: **A**, células mononucleares de sangue periférico humano (controle celular normal); **B**, Kasumi-1; e **C**, C1498. As células foram incubadas com as nanocápsulas de amirina por 24 h.

potência (EC_{50}) e a eficácia (E_{max}) são dois parâmetros estimados a partir da curva citotoxicidade (**Tabela 7**). EC_{50} é a concentração de fármaco que produz 50% de sua resposta máxima. E_{max} é a maior resposta produzida pelo fármaco. Em outras palavras, em uma concentração superior a E_{max} , o fármaco não apresentará nenhum efeito adicional (PRATT e TAYLOR 1990).

Tabela 7. Concentração de nanocápsulas de amirinas que produz 50% de sua resposta máxima em celulares de leucemia C1498 e Kasumi-1.

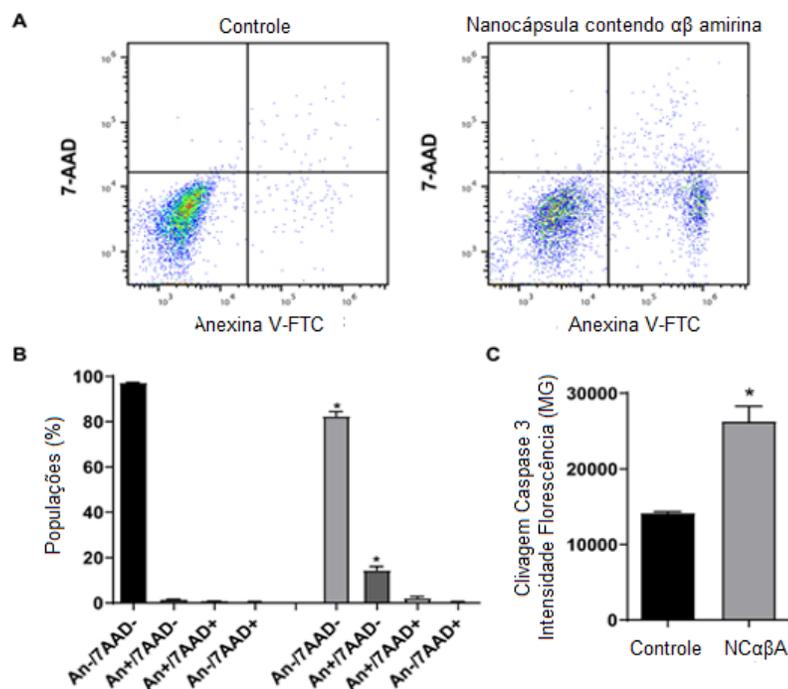
| Linhagem celular | EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | E_{max} ($\mu\text{g/mL}$) |
|-------------------------|---|---|
| C1498 | 9.00 ± 0.20^a | $89,00 \pm 0,50^a$ |
| Kasumi-1 | $1,40 \pm 0,09^b$ | $87,00 \pm 0,30^b$ |
| t-Test, p-valor | 9.12, 0.0001 | 4.89, 0.0080 |

Fonte: elaborada pelo autor (n=5).

O mecanismo de morte celular induzido pelas nanocápsulas de amirinas nas células Kasumi-1 foi avaliado. As nanocápsulas de amirinas não produziram morte celular em células mononucleares normais de sangue periférico humano (PBMC), que foram usadas como controle de células não tumorais. A cultura de células foi tratada com uma solução de nanocápsulas de amirinas na EC_{50} (1,40 $\mu\text{g/mL}$). O ensaio de anexina V e 7-ADD menor eficácia do que o mostrado no ensaio de resazurina. A morte celular por apoptose foi confirmada por meio da quantificação de Caspase-3 clivada (**Figura 15C**).

O mecanismo de morte celular induzido por nanocápsulas de amirinas em células Kasumi-1 (leucemia mieloide aguda) foi avaliado na concentração de EC_{50} (1,40 $\mu\text{g/mL}$). Os ensaios anexina V e 7-ADD mostraram que aproximadamente 20% da população celular estava passando por uma fase inicial de apoptose após 24h de tratamento (**Figura 15A e 15B**). A morte celular por apoptose foi confirmada pela quantização do Caspase-3 (**Figura 15C**). Portanto, espera-se que um número crescente de células se submeta às próximas fases da apoptose entre 24h e 48h de tratamento.

Os resultados observados neste trabalho, são semelhantes aos resultados dos trabalhos de BARROS et al., (2011) e MISHRA et al., (2016). Esses autores observaram que os ésteres de amirina desencadeiam a morte celular por apoptose em células de



leucemia humana (HL-60) e células de câncer de mama humano (MCF-7). É o caso também de triterpenos pentacíclicos como α , β -amirina, que exercem efeitos benéficos em distúrbios metabólicos (SANTOS et al., 2012). Não surpreende que nanocápsulas carregadas com amirinas não causaram a morte de células mononucleares de sangue periféricos (PBMC) (**Figura 14A**), o que sugere uma citotoxicidade seletiva contra células leucêmicas (**Figura 13**). Outros autores encontraram evidências da seletividade de α , β -amirinas contra células tumorais HL-60 (BARROS et al., 2011) mediada por apoptose, em até 48h de tratamento. No entanto, mais estudos são necessários para entender melhor e aproveitar essa aparente seletividade.

5.12 Atividade antiproliferativa de células tumorais

O câncer é a segunda causa de morte no Brasil (INCA, 2022), onde causa uns 232 mil falecimentos cada ano. O câncer de próstata é o tipo mais comum entre os brasileiros (29% dos diagnósticos), sendo que os homens maiores de 55 anos, obesos são os mais

propensos. O câncer de mama ocupa a primeira posição em mortalidade por câncer entre as brasileiras. Em 2022, foram diagnosticados 66.280 casos novos de câncer de mama no Brasil. As maiores taxas de incidência e de mortalidade estão nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (INCA, 2022). Assim, pesquisas orientadas a descoberta de novos ativos e novos tratamentos contra os diversos tipos de câncer são imprescindíveis.

A doxorubicina tem sido o fármaco de primeira escolha para o tratamento de câncer de mama, apesar de sua marcante atividade antiproliferativa, ele provoca efeitos adversos muito incômodos aos pacientes, devido uma baixa seletividade (REN et al., 2019; MENNA et al., 2012).

Na **tabela 8** se apresenta o resultado da avaliação da atividade antiproliferativa que produzem as nanocápsulas carregadas com amirinas (expressados como GI_{50}) sobre diversas linhagens de células tumorais. A **tabela 8** também indica o índice de seletividade das nanocápsulas sobre cada linhagem. Estudos sobre o efeito antineoplásico da amirina, contra o câncer, são escassos (BARROS, et al., 2011).

As nanocápsulas de amirinas mostraram um forte efeito antiproliferativo das células tumorais prostáticas PC-3, com um índice de seletividade de 3,51. Também inibiram o crescimento das células de câncer de mama MCF-7 com um menor índice de seletividade (1,46) e das células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231) com um índice de seletividade de 0,88. As linhagens de câncer de fígado (HepG2) e adenocarcinoma renal também foram inibidas pelas nanocápsulas com valores de GI_{50} acima de 58 $\mu\text{g/mL}$, e índices de seletividade menores de 0,45 (**tabela 8**).

Não existe consenso na literatura sobre o valor ideal de índice de seletividade (SI). Awouafack e colaboradores (2013) e Peña e colaboradores (2016) consideram boas candidatas a fármacos substâncias com $SI > 10$, porém, devem ser consideradas como viáveis e ser mais investigadas. Por outra parte, Weerapreeyakul e colaboradores (2012) consideram que uma substância com $SI > 3$ pode ser considerada como viáveis

Tabela 8. atividade antiproliferativa que produzem as nanocápsulas carregadas com amirinas sobre diversas linhagens de células tumorais.

| Linhagens | Doxorrubicina | NCβαA | Índice de |
|------------|--------------------------|--------------------------|--------------|
| | GI ₅₀ (µg/mL) | GI ₅₀ (µg/mL) | Seletividade |
| NHI/3T3 | 3,89 ± 0,95 | 24,58 ± 2,24 | - |
| HFF1 | 2,45 ± 0,12 | 7,50 ± 0,25 | - |
| MCF-7 | 0,19 ± 0,08 | 16,76 ± 0,45 | 1,46 |
| MDA-MB-231 | 1,51 ± 0,03 | 27,98 ± 0,41 | 0,88 |
| PC-3 | 0,28 ± 0,10 | 7,00 ± 0,83 | 3,51 |
| 786-0 | 0,26 ± 0,10 | 82,38 ± 5,52 | 0,29 |
| HepG2 | 0,25 ± 0,10 | 58,84 ± 1,25 | 0,42 |

Fonte: elaborada pelo autor

PC-3, células de câncer de próstata; 786-0, células de adenocarcinoma renal; HepG2, células de câncer hepático; NIH/3T3, fibroblastos normais de murino; HFF-1, fibroblastos normais de prepúcio humano; MCF-7, células tumorais de câncer de mama; MDA-MB-231, câncer de mama triplo negativo; HepG2, células de carcinoma hepático, câncer de próstata (PC-3), renal (786-0), hepático (HepG2) e de mama (MCF-7 e

e deve-se continuar investigando. Todos esses autores coincidem em que, quanto maior o índice de seletividade mais ativa é a substância testada sobre células cancerígenas do que sobre as células normais. Isso sugere ausência de toxicidade nas células normais e uma possível diminuição de efeitos colaterais (INDRAYANTO et al., 2021).

Os triterpenos, grupo estrutural ao que pertence a amirina, inibem a proliferação de células de câncer de mama por indução de apoptose via COX-2/PGE2 (HAN et al., 2013). Esse poderia ser o mecanismo associado a boa atividade antiproliferativa de células de câncer prostático observada nas nanocápsulas carregadas com amirinas. Do mesmo modo, os triterpenos, possuem um forte efeito antioxidante, anti-inflamatório, imunomodulador (BARROS, et al., 2011, NETO, et al., 2021), que poderia estar associado a boa atividade inibitória do crescimento das células tumorais prostáticas.

Além desses efeitos, o fato das amirinas estarem nanoencapsulada, poderia estar melhorando a permeabilidade, por uma liberação mais lenta, e conseguindo um melhor efeito antiproliferativo.

Resulta interessante o fato que, as células MDA-MB-231, também conhecidas como TNBC (do inglês, células de câncer de mama triplo negativo), que são células muito

agressivas e invasivas (ZHENG N, ZHANG P, HUANG H, et al., 2015), e que tem a capacidade de induzir resistência contra fármacos antineoplásicos (GEST, C. et al., 2013) foram inibidas pelas nanocápsulas de amirinas com uma GI_{50} de $27,98 \pm 0,41$, mas com um baixo índice de seletividade de 0,88. Esse fato sugere que, as nanocápsulas de amirinas poderia ser viável para o tratamento do câncer de mama, apesar do baixo índice de seletividade. Muitos antineoplásicos possuem efeitos adversos fortes, mas, calculando o risco-benefício para os pacientes, estes são usados na terapêutica de forma rotineira, como por exemplo a doxorrubicina. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados para comprovar os mecanismos que mediam o efeito antiproliferativo das nanocápsulas de amirinas sobre estas células.

As nanocápsulas carregadas com amirinas, produziram uma moderada atividade antiproliferativa ($10 < GI < 100 \mu\text{g/mL}$) (INDRAYANTO et al., 2021) das células de adenocarcinoma renal 786-0 ($GI_{50} 82,38 \mu\text{g/mL}$) e sobre as células de câncer de fígado HepG2 ($GI_{50} 58,84 \mu\text{g/mL}$). Em ambos os casos o índice de seletividade foi menor que 0,45 (**Tabela 8**), o que sugere que podem afetar tanto as células cancerígenas como as células normais. Este resultado, é similar ao obtido por YANG (2017) que observou que, as estruturas triterpenoide das amirinas tiveram efeito antiproliferativo moderado contra células de câncer de fígado HepG2. MENG e colaboradores (2009) observaram que, a atividade antiproliferativa dos triterpenos contra células cancerígenas é influenciada pela estrutura aromática básica e pela quantidade e posição dos derivados carboxila, alquila, hidroxila presentes na molécula.

Considerando que os quatro tipos de câncer avaliados neste trabalho têm uma alta prevalência e uma alta mortalidade na população adulta do Brasil e do mundo (INCA 2022), e as poucas opções de tratamentos existentes, as nanocápsulas carregadas com amirinas, são uma opção que deveria ser estudada com maior profundidade com intuito de conferir uma real possibilidade de utilização para o tratamento destes tipos de câncer.

5.13 Atividade hipoglicemiante

Diversos produtos de origem natural têm sido testados, com maior ou menor sucesso, para o tratamento do DM tipo 2. A **tabela 9** apresenta os resultados de controle de glicemia dos animais tratados com as nanocápsulas de amirinas (5 e 10 mg/kg), com amirinas (10 mg/kg), e com acarbose (100 mg/kg) durante 30 dias.

Tabela 9. Comportamento da glicemia dos grupos experimentais durante a avaliação da atividade hipoglicemiante.

| Semanas | G. normal | G.Controle (-) | G.Controle (+) | G. Amirina | NC 5 | NC 10 |
|---------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 0 | 89,30 ± 9,50a | 287,30 ± 60,00b | 310,80 ± 71,90b | 315,70 ± 59,00b | 370,50 ± 13,70b | 315,50 ± 62,10b |
| 1 | 107,20 ± 9,50a | 393,00 ± 51,50b | 184,50 ± 41,90a | 398,80 ± 84,90b | 94,70 ± 29,10b | 308,20 ± 170,10b |
| 2 | 114,30 ± 7,50a | 374,70 ± 96,00b | 201,50 ± 55,70ac | 291,50 ± 41,50bc | 213,50 ± 99,70ac | 302,50 ± 65,90bc |
| 3 | 112,30 ± 6,10a | 442,80 ± 127,60b | 177,80 ± 72,20a | 334,70 ± 24,30b | 169,00 ± 64,00a | 326,20 ± 41,80b |
| 4 | 116,30 ± 6,80a | 413,7 ± 88,80b | 153,70 ± 60,40a | 320,50 ± 32,70b | 171,20 ± 58,80a | 213,70 ± 74,50b |

Fonte: elaborada pelo autor

Letras diferentes na mesma linha, indicam diferencia estatística significativa ($p > 0,05$); G. normal (controle normal sem indução e sem tratamento), G controle (-) (Grupo controle diabético não tratado), G controle (+) (Grupo controle diabético tratado com acarbose 100mg/kg, fármaco padrão), G. Amirina (grupo tratado com amirinas 10mg/kg), NC 5 (grupo tratado com nanocápsulas de amirinas 5mg/kg) NC 10 (grupo tratado com nanocápsulas de amirinas 10mg/kg).

O controle normal, que não recebeu tratamento nenhum manteve o tempo todo níveis de glicose no sangue abaixo de 120 mg/dL. Esse é um resultado esperado pois foram usados neste experimento animais saudáveis, provenientes de um laboratório de referência (Universidade Estadual de Campinas - Unicamp - SP) nacional, e mantidos em condições climáticas ótimas sugeridas por esse laboratório. Contrariamente, o grupo diabético não tratado (controle negativo) apresentou níveis crescentes de glicose no sangue ao longo do tempo, chegando acima de 400 mg/dL, a partir da terceira semana.

No grupo controle positivo, tratado com acarbose 100 mg/kg, observou-se o efeito hipoglicemiante deste fármaco, que reduziu os níveis de glicose ao longo das 4 semanas até 153,70 mg/dL. No entanto, nunca atingiu os valores observados no grupo controle normal (<120 mg/dL). A Acarbose inibe as enzimas α -glicosidase intestinais, que estão envolvidas na degradação de carboidratos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Este fármaco retarda a digestão dos carboidratos ingeridos, resultando em um menor aumento da concentração de glicose no sangue (GOODMAN & GILMAN, 2012). No entanto, nem sempre o tratamento com este único fármaco consegue reduzir os níveis plasmáticos de

glicose em paciente com diabetes tipo 2, precisando-se de outros fármacos que atuem por outros mecanismos, como por exemplo, fármacos análogos do GLP-1 como a Exenatida, que é indicado como terapia adjuvante em pacientes diabéticos que estejam tomando metformina ou acarbose (DIANA SHERIFALI et al., 2010).

No grupo tratado com amirinas na dose 10 mg/kg não se observou redução da glicose (valores >300 mg/dL), apresentando, todas as semanas, níveis acima do valor normal de glicose para camundongos (120 mg/kg). Do mesmo modo que o grupo tratado com amirina, o grupo tratado com nanocápsulas de amirinas na dose 10 mg/kg manteve o tempo todo valores de glicose no sangue superiores a 200 mg/dL. Esse resultado poderia ser justificado pelo fato que, no modelo de diabetes induzida por aloxano, o principal mecanismo de dano pancreático que inibe a secreção de insulina e a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO)(BARBOSA, et al., 2016). A amirina, não possui efeito inibidor da glicação (produtos da glicação avançada, AGEs, geram mais espécies reativas do oxigênio), e também não mostrou atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS (NETO e colaboradores 2018). Assim, esta formulação de nanocápsulas (dose 10 mg/kg) e a amirina pura, não são capazes de evitar esses mecanismos, e não apresentam atividade hipoglicemiante significativa.

Como tem acontecido muitas vezes, ativos nanoparticulado apresentam uma atividade farmacológica que não é observada na substância *in natura* (Rodriguez et al., 2017, Lafourcade et al., 2019). Contrário dos grupos tratados com amirinas e com as nanocápsulas de amirinas, na dose de 10 mg/kg, o grupo tratado com nanocápsulas na dose 5 mg/kg diminuiu a glicemia para um nível de glicose (94,70 mg/dL) estatisticamente igual ao grupo controle normal (na primeira semana de tratamento), e estatisticamente diferente e menor que o grupo controle positivo (acarbose 100 mg/kg).

O fato de que, as nanocápsulas de amirinas na dose de 5 mg/kg tivesse atividade hipoglicemiante e que, na dose de 10 mg/kg não se observara essa atividade, poderia estar

relacionado com alguns destes dois fatos. Primeiro, a dose maior, poderia causar saturação de receptores, evitando que outras moléculas de α,β -amirina, que possuem alta lipofilicidade (Log P 8.08, valor teórico: Calculation of molecular properties and bioactivity score molinspiration.com), possam ser absorvidas e não ser capazes de exercer seu efeito (RANG & DALE, 2016). Se for o caso, a dose mais baixa pode se ligar a menos receptores sem causar saturação. Em segundo lugar, poderia acontecer um efeitos paradoxal, o que significa que uma dose baixa do medicamento pode ter um efeito diferente de uma dose alta, como tem acontecido com a metformina (GOODMAN & GILMAN, 2012). Foi reportado que, doses de metformina (biguanidina) de 500mg/dia reduzem os níveis de glicose em jejum e pós-prandial em pacientes com diabetes tipo 2, mas, doses de 2000 mg/dia aumentaram os níveis de glicose no sangue em jejum e pós-prandial (FREED, 2020).

Tendo em conta os resultados obtidos, pode se sugerir que as nanocápsulas carregadas com amirinas na concentração 5mg/kg produz, na primeira semana de tratamento, efeito hipoglicemiante que não é, estatisticamente diferente, da acarbose. Isso ocorre, provavelmente, porque ambas as substâncias atuam pelo mesmo tipo de mecanismo, inibição de enzimas que degradam carboidratos.

5.14 Toxicidade aguda oral

Nas primeiras 24 horas do experimento é crucial observar os animais para detectar possíveis sinais de toxicidade que possam ser induzidas pela substância teste. Sinais como letargia, piloereção, queda de pelos, perda de cor e sequidade das mucosas bucais e oculares, tonturas, assim redução do consumo de alimento e água, ou a ocorrência de morte animal (OECD 423, 2008).

Nas primeiras 48h, ocorreu um óbito do grupo tratado com as nanocápsulas de amirinas. O animal perdeu o apetite e apenas bebia água, ocasionalmente. A necropsia grossa realizada mostrou danos na traqueia e no esófago, que poderia ser decorrente de

erros de manipulação. O resto dos animais tratados, não apresentou qualquer manifestação de toxicidade ao longo do experimento.

Os animais de ambos os grupos experimentais consumiram água e alimento normalmente (**tabela 10**), durante o experimento, sem mudar a frequência nem as quantidades medias consumidas. Do mesmo modo, urinaram e defecaram de forma normal, sem mudanças na cor o aspecto desses fluidos.

Tabela 10. Consumo de água e alimentos dos animais durante o estudo de toxicidade aguda oral

| Grupos | Consumo de água (ml) | | | Consumo de alimento (g) | | |
|-----------------|----------------------|---------------|---------------|-------------------------|---------------|---------------|
| | Dia 0-4 | Dia 5-10 | Dia 11-14 | Dia 0-4 | Dia 5-10 | Dia 11-14 |
| Controle | 25,40 ± 2,00a | 28,03 ± 3,12a | 22,23 ± 1,82a | 26,20 ± 3,1a | 25,37 ± 4,16a | 21,60 ± 2,25a |
| Teste | 27,80 ± 1,13a | 29,50 ± 0,71a | 24,5 ± 0,71a | 27,80 ± 0,71a | 27,15 ± 0,07a | 27,00 ± 1,41a |

Letras diferentes na mesma coluna indica diferencia estatistica significativa (p>0,05)

Fonte: Elaborada pelo autor

O peso corporal é um parâmetro usado como um indicador da saúde geral dos animais e sua capacidade de tolerar o estresse induzido por procedimentos experimentais, como coleta de sangue e administração de substâncias químicas etc. (OECD 423, 2008). Neste estudo, tanto os animais do grupo controle como os animais tratados com nanocápsulas de amirinas na dose 2000mg/kg de peso corporal, ganharam peso normalmente ao longo do experimento (**Tabela 11**).

O peso corporal dos animais é uma medida importante nos ensaios de toxicidade aguda oral. Variações de peso podem afetar a resposta dos animais aos agentes tóxicos (OECD 423, 2008, NALIMU et al., 2022). Animais com peso baixo são mais sensíveis aos efeitos tóxicos das substâncias químicas, enquanto, se fossem obesos podem metabolizar

Tabela 11. Comportamento do peso corporal dos animais durante o ensaio de toxicidade aguda oral das nanocápsulas de amirinas.

| Grupos | Peso corporal (g) | | |
|----------|-------------------|--------------|--------------|
| | Dia 0-4 | Dia 5-10 | Dia 11-14 |
| Controle | 30,20 ± 2,46 | 34,29 ± 3,46 | 37,45 ± 2,15 |
| Teste | 35,54 ± 3,07 | 38,25 ± 3,91 | 39,55 ± 3,84 |

Fonte: Elaborada pelo autor

as substâncias de forma diferente (NALIMU et al., 2022). Quanto uma substância química causa efeitos tóxicos sistêmicos nos animais de experimentação, em seguida se observa

uma diminuição do peso dos animais, é, porém, que resposta dos animais aos agentes tóxicos e considerado um parâmetro sensível como indicador de toxicidade (OECD 423, 2008).

Considerando que não foram observados sinais de efeitos tóxicos no comportamento dos animais de ambos os grupos experimentais. Considerando que os animais consumiram água e alimento normalmente, o que permitiu-lhes aumentar de peso normalmente, ao longo do experimento, e que na necropsia grossa não mostrou alterações morfológicas, nem na cor dos órgãos e membranas internas dos animais; as nanocápsulas carregadas com amirinas foram classificadas como “*Não Classifica*” segundo a classificação das classes de toxicidade aguda oral (OECD, 423, 2008).

6 CONCLUSÃO

1. Foi obtida uma formulação de nanocápsulas poliméricas contendo amirinas com um tamanho de partícula de 122,80 nm, uma excelente homogeneidade de tamanho com índice de polidispersão 0,095, e um potencial zeta de -45,23 mV. O processo de preparação teve uma eficiência de 65,47%. As nanocápsulas liberam 90% de amirinas em 30 minutos, em meio Buffer PBS (pH 7,4).
2. A formulação de nanocápsulas se mantém estável, em prateleira, durante um ano e meio, conservando intactas suas propriedades físico-químicas.
3. As nanocápsulas de amirinas mostraram excelente atividade antileucêmica frente as células de leucemia mieloide aguda Kasumi-1 (EC_{50} 1,40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), causando a morte celular das células Kasumi-1 por apoptose.
4. As nanocápsulas de amirinas mostraram excelente atividade antiproliferativa de células tumorais prostáticas PC-3 (G_{150} 7,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e com bom índice de seletividade (3,51). Também mostraram atividade antiproliferativa de células de câncer de mama MCF-7 com G_{150} 16,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mas um baixo índice de seletividade (1,46).
5. O ensaio de atividade hipoglicemiante mostrou que, as amirinas pura não possui efeito hipoglicemiante, mas, as nanocápsulas carregadas com amirinas, na doses 5 mg/kg mostraram uma atividade hipoglicemiante estatisticamente igual a acarbose na dose 100 mg/kg e ainda o efeito hipoglicemiante das nanocápsulas não é pela via da glicação e sim pela inibição enzimática.
6. as nanocápsulas carregadas com amirinas, na dose 2000 mg/kg, não apresentaram toxicidade em camundongos Balb/c e foram classificadas como “Não Classifica” segundo a classificação das classes de toxicidade aguda oral da OECD 423.

Com base nos resultados obtidos, as perspectivas futuras para as nanocápsulas poliméricas contendo amirinas parecem promissoras. A capacidade dessas nanocápsulas de liberar uma quantidade significativa de amirinas em um curto período, juntamente com sua estabilidade em prateleira por um longo período, é muito favorável, em termos de desenvolvimento de medicamentos. Além disso, a excelente atividade antileucêmica e antiproliferativa de células tumorais prostáticas observadas é muito encorajadora, e posteriormente serão realizadas pesquisas orientadas a avaliar essas atividades *ex situ*, usando células extraídas de pacientes com essas doenças, para avaliar a resposta aos tratamentos com maior precisão.

Por outro lado, a capacidade de ter um bom índice de seletividade é particularmente importante, pois indica que as nanocápsulas podem ter efeitos terapêuticos potentes, mas com baixa toxicidade em células saudáveis, o que poderia ser comprovado no experimento *ex situ*. Embora a seletividade das nanocápsulas tenha sido um pouco menor no câncer de mama, a atividade antiproliferativa ainda é encorajadora e poderia fornecer uma base para futuras pesquisas sobre o potencial uso das nanocápsulas nessa indicação.

O efeito hipoglicemiante observado nas doses de 5 mg/kg abre possibilidades interessantes para o uso dessas nanocápsulas como coadjuvante em tratamentos antidiabéticos. Além disso, a ausência de toxicidade oral aguda em camundongos é um indicativo muito positivo de sua segurança.

Finalmente, é um fato que a formulação de nanocápsulas de amirinas possui um grande potencial terapêutico, o que justifica a realização de mais pesquisas sobre seu uso em diferentes condições clínicas. Nesse sentido, o trabalho realizado nesta tese, tem sido avaliado para um possível aumento de escala, previa avaliação de sua segurança em outras espécies de mamíferos.

- AKTUNA, A. Y. (2018). Tendency of K562 chronic myeloid leukemia cells towards cell reprogramming. *Turkish Journal of Hematology*, 35(4), 260
- AMADI, J. A. C.; IHEMEJE, A.; AFAM-ANENE, O. C., 2018. Nutrient and phytochemical composition of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) pulp, seeds and leaves. *Int. J. Innov. Food, Nutr. Sustain. Agric.*, 6 (3): 27-32 (2018).
- ANDRADE, A., PINTO, SC., OLIVEIRA, R.S., *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p 388, 2002.
- ANDRADE-CETTO, A. Alpha glycosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, p.27-32, 2008.
- AQUINO VM. Acute myelogenous leukemia. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2002;32(2):50-8
- ASOU, H., TASHIRO, S., HAMAMOTO, K., OTSUJI, A., KITA, K., & KAMADA, N. (1991). Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8; 21 chromosome translocations. *Blood*, 77(9), 2031-2036.
- AWOUAFACK, MD, L.J. MCGAW, S. GOTTFRIED, R. MBOUANGOUERE, P. TANE, M. SPITELLER, J.N. ELOFF, Antimicrobial activity and cytotoxicity of the ethanol extract, fractions and eight compounds isolated from *Eriosema robustum* (Fabaceae). *BMC Complement. Altern. Med.* 13 (2013) 289. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-289>.
- BARBOSA, Júnia H. Porto et al . A DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS AVANÇADOS DE GLICAÇÃO (AGES) E DE LIPOXIDAÇÃO (ALES) EM ALIMENTOS E EM SISTEMAS BIOLÓGICOS: AVANÇOS, DESAFIOS E PERSPECTIVAS. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 39, n. 5, p. 608-620, jun. 2016 . Disponível em <http://old.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422016000500608&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 07 mar. 2023. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160048>.
- BARROS, F.W.A.N.B. PAULO, D.J.B. LIMA, A.S. MEIRA, S.S. DE FARIAS, M. ROSE, J. R. ALBUQUERQUE, H.S. DOS SANTOS, T.L.G. LEMOS, M. ODORICO DE MORAIS, L. VERAS COSTA-LOTUFO, CLAUDIA DO O ´ PESSOA. Amyrin esters

- induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 1268–1276.
- BELOSLUDTSEV KN, ILZORKINA AI, BELOSLUDTSEVA NV, et al. Comparative Study of Cytotoxic and Membranotropic Properties of Betulinic Acid-F16 Conjugate on Breast Adenocarcinoma Cells (MCF-7) and Primary Human Fibroblasts. *Biomedicines*. 2022;10(11):2903.
- BOSCH F, DALLA-FAVERA R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(11):684-701.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Resolução RE 90/04 Brasília, ANVISA: 2004.
- BRASIL. FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ª ed. São Paulo: Atheneu; 2010. v. 1-2.
- BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL RL, TORRE LA AND JEMAL A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68: 394-424, 2018
- BUTI S, BERSANELLI M, SIKOKIS A, MAINES F, FACCHINETTI F, BRIA E, ARDIZZONI A, TORTORA G, MASSARI F. Chemotherapy in metastatic renal cell carcinoma today? A systematic review. *Anticancer rugs* 2013;24(6):535–54. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- CARVALHO, K.M., DE MELO, T.S., DE MELO, K.M., QUINDERÉ, A.L., DE OLIVEIRA, F.T., VIANA, A.F., NUNES, P.I., QUETZ, J.D., VIANA, D.A., DA SILVA, A.A., HAVT, A., FONSECA, S.G., CHAVES, M.H., RAO, V.S., SANTOS, F.A. 2017. Amyrins from *Protium heptaphyllum* Reduce High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice via Modulation of Enzymatic, Hormonal and Inflammatory Responses. *Planta Médica*, v.83, n 3-04, p. 285-291.
- CESARETTI, M.L. R; KOHLMANN JUNIOR, O. Modelos Experimentais de Resistência à Insulina e Obesidade: Lições Aprendidas. *Arquivos Brasileiros Endocrinologia e Metabologia* v.50 n. 2, 2006. doi: 10.1590/S0004-27302006000200005.
- CHEN W, ZHENG R, BAADE PD et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA: Cancer J Clin* 2016;66:115-32.
- COLMAN A, DREESEN O. Pluripotent stem cells and disease modeling. *Cell Stem Cell* 2009;5:244-247.
- DEDAVID, B. A. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

- DEHELEAN, C.A.; MARCOVICI, I.; SOICA, C.; MIOC, M.; CORICOVAC, D.; IURCIUC, S.; CRETU, O.M.; PINZARU, I. Plant-Derived Anticancer Compounds as New Perspectives in Drug Discovery and Alternative Therapy. *Molecules* 2021, 26, 1109. [CrossRef] [PubMed]
- DI NASO, F.C., FORGIARINI, L.A., FORGIARINI, L.F., PORAWSKI, M., DIAS, A.S., MARRONI, N.A.P., 2010. Aminoguanidine reduces oxidative stress and structural lung changes in experimental diabetes mellitus. *J. Bras. Pneumol.* 36, 485–489. <https://doi.org/10.1590/s1806-37132010000400014>.
- DIANA SHERIFALI, KARA NERENBERG, ELEANOR PULLENAYEGUM, JI EMMY CHENG, HERTZEL C. GERSTEIN; The Effect of Oral Antidiabetic Agents on A1C Levels: **A systematic review and meta-analysis**. *Diabetes Care* 1 August 2010; 33 (8): 1859–1864.
- DIMER, F. A. *et al.* Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. *Química Nova*, v. 36, n.10, p. 1520–1526, 2013.
- DÖHNER H, ESTEY E, GRIMWADE D, AMADORI S, APPELBAUM FR, BÜCHNER T, *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.
- EBERT EC, HAGSPIEL KD. Gastrointestinal manifestations of leukemia. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(3):458-63
- ENRIGHT H, MCGLAVE PB. Chronic myelogenous leukemia. *Curr Opin Hematol.* 1996;3(4):303-9.
- FADERL S, TALPAZ M, ESTROV Z, KANTARJIAN HM. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med.* 1999;131(3):207-19
- FAGUNDES, D. J.; TAHA, M.O. O modelo animal de doença: critério de escolha e espécie de animais de uso corrente. *Acta Cirurgica Brasileira*, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.
- FATTAL, E.; VAUTHIER, C. Nanoparticles as drug delivery systems. In: Swarbrick, J., Boylan, J.C. (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Marcel Dekker, New York, pp. 1864–1882, 2002.
- FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359–86. [PubMed] [Google Scholar]

- FERNANDES JR, OGURTSOVA K, LINNENKAMP U, GUARIGUATA L, SEURING T, ZHANG P et al. IDF Diabetes Atlas estimates of 2014 global health expenditures on diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016; 117:48-54.
- FERREIRA, R.G.S., SILVA, J.W.F., VEIGA J. W.F., LIMA, A.N.N., LIMA, E.S. 2017. Physicochemical Characterization and Biological Activities of the Triterpenic Mixture α,β -Amyrenone. *Molecules*, 22, 298.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, v. 55, p. R1–R4, 1989.
- FLORENTINO, N.S. Desenvolvimento e caracterização físico, química e biológica *in vitro* de nanopartículas poliméricas contendo α - β amirina. 2018. 91f. Dissertação (Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêutica). Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- FROTA, J. T. Avaliação das atividades hipoglicemiante e hiperlipidêmica da mistura de α , β -amirina, triterpenos pentacíclicos isolados do *Protium heptaphyllum*, em camundongos. f 41-92. 2011. Dissertação (mestrado em farmacologia). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.
- FU, X., HUCK, D., MAKEIN, L., ARMSTRONG, B., WILLEN, U., & FREEMAN, T. (2012). Effect of particle shape and size on flow properties of lactose powders. *Particuology*, 10(2), 203-208.
- GEST, C. et al. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer* 13, 63 (2013).
- GOODMAN & GILMAN: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12ª edição. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2012, 2112 p. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson G.
- GRADISHAR WJ, ANDERSON BO, ABRAHAM J, AFT R, AGNESE D, ALLISON KH, BLAIR SL, BURSTEIN HJ, DANG C, ELIAS AD, et al: Breast cancer, version 3.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 18: 452-478, 2020.
- GUILHON-SIMPLICIO, F. Estudo químico e farmacológico Byrsonima (Malpighiaceae) para o desenvolvimento de novos anti-inflamatórios e antimicrobianos. 2017. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

- GUTERRES, S. S.; *et al.* Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug target insights*, v. 2, n. 2, p. 147–157, 2007.
- HALDAR, S. *et al.* Lipase mediated separation of triterpene structural isomers, α - and β -amyrin. *Tetrahedron Letters*, v. 55, n.19, p. 3122–3125, 2014.
- HANNA J, WERNIG M, MARKOULAKI S, SUN CW, MEISSNER A, CASSADY JP, BEARD C, BRAMBRINK T, WU LC, TOWNES TM, JAENISCH R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007;318:1920-1923
- Han, L. T., Fang, Y., Li, M. M., Yang, H. B., & Huang, F. (2013). The antitumor effects of triterpenoid saponins from the *Anemone flaccida* and the underlying mechanism. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/517931>
- HEIDENREICH, A.; BASTIAN, P.J.; BELLMUNT, J.; BOLLA, M.; JONIAU, S.; VAN DER KWAST, T.; MASON, M.; MATVEEV, V.; WIEGEL, T.; ZATTONI, F.; *et al.* EAU guidelines on prostate cancer. part 1: Screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur. Urol.* 2014, 65, 124–137. [CrossRef] [PubMed]
- IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4.ed. São Paulo: IAL, 2008.
- INABA H, GREAVES M, MULLIGHAN CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2013;381(9881):1943- 55
- INCA.INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. 2016 [cited 2016 April 21]. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>»<http://www2.inca.gov.br/connect/inca/portal/home>. Acesso em 23/05/2021.
- INDRAYANTO G, PUTRA GS, SUHUD F. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* 2021; 46: 273-307. doi: 10.1016/bs.podrm.2020.07.005.
- INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. INCA. (2022). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Atlas de Mortalidade por Câncer. Instituto Nacional de Câncer do Brasil. Brasília
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes atlas*. 6. ed. Brussels, Belgium: IDF, 2013.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes Atlas*, 6. ed. Brussels, Belgium: IDF, 2019.

- ISHII, M. *et al.* β - Amyrin induces angiogenesis in vascular endothelial cells through the Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 467, n. 4, p. 676–682, 2015.
- JIN L, HOPE KJ, ZHAI Q, SMADJA-JOFFE F, DICK JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*. 2006;12(10):1167-74.
- JULIUSSON G, LAZAREVIC V, HÖRSTEDT AS, HAGBERG O, HÖGLUND M. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood*. 2012;119(17):3890-9.
- KHOEE, S., YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *Eur. J. Med. Chem.*, 2008. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.09.045.
- KIHO, T.; USUI, S.; HIRANO, K.; AIZAWA, K.; INAKUMA, T. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 68, n. 1, p. 200-5, Jan 2004.
- KRUEGER H, MCLEAN D, WILLIAMS D. Leukemias. *Prog Exp Tumor Res*. 2008;40:45-50.
- LAFOURCADE, P.A., H. KEITA, S.T. PEREIRA, S.E. LIMA, A.L.D. ROSALES, S.M.J. AMAZONAS, C.J.C. TAVARES, A.J.R. RODRIGUEZ, *Cassia grandis* Lf nanodispersion is a hypoglycemic product with a potent α -glycosidase and pancreatic lipase inhibitor effect, *Saudi Pharm. J.* 27 (2) (2018) 191-199.
- LAZARE SS, DÉsirÉ S, JOEL EBENEZER DT, et al. Antiproliferative and cytotoxic secondary metabolites from fruits of *Leplaea mayombensis*. *Nat Prod Res*. 2019;33(5):635-641. doi:10.1080/14786419.2017.1402321.
- LÁZARO de I, YILMAZER A, KOSTARELOS K. Induced pluripotent stem (iPS) cells: a new source for cell-based therapeutics? *J Control Release* 2014;185:37-44.
- LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 65, p. 259– 269, 2007.
- LICHT V, NOACK K, SCHLOTT B, FÖRSTER M, SCHLENKER Y, LICHT A, KRÄMER OH, HEINZEL T. Caspase-3 and caspase-6 cleave STAT1 in leukemic cells. *Oncotarget*. 2014 Apr 30;5(8):2305-17. doi: 10.18632/oncotarget.1911. PMID: 24810717; PMCID: PMC4039164.
- LI J, DAI L, LEI N et al (2016) Evaluation and characterization of anti-RalA autoantibody as a potential serum biomarker in human prostate cancer. *Oncotarget* 7:43546–43556
- LIM KL, TEOH HK, CHOONG PF, TEH HX, CHEONG SK, KAMARUL T. Reprogramming cancer cells: overview & current progress. *Expert Opin Biol Ther* 2016;16:941- 951.

- LIN K, QIN Z, QU C, CHEN X, JIANG Q, LI M, ZHENG Q AND LI D. Hydroxyl safflower yellow B combined with doxorubicin inhibits the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells. **Oncology letters**, v. 21, n. 5, p. 1-9, 2021.
- LISSONI P, SORMANI AL, TANCINI G, CATTANEO G, ARCHILI C, MANDELLI D, CRISPINO S, PAOLOROSSO F AND BARNI S: Postoperative hyperprolactinaemia and early recurrence rate in breast cancer. *Eur J Cancer* 26: 953-956, 1990.
- MAHATO, A. P.; KUNDU, S. B. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids-a and Some Salient Features. *Phytochemistry*, v. 37, n. 6, p. 1517 - 1575, 1994.
- MALLAVADHANI, U. V., *et al.* Antimicrobial Activity of Some Pentacyclic Triterpenes and Their Synthesized 3-O-Lipophilic Chains. *Biol. Pharm. Bull.* v. 27, n.10, p. 1576—1579 2004.
- MATSUDA, H., WANG, T., MANAGI, H., YOSHIKAWA, M., 2003. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 5317–5323. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.09.045>.
- MEDINGER M, HEIM D, LENGERKE C, HALTER JP, PASSWEG JR. [Acute lymphoblastic leukemia - diagnosis and therapy]. *Ther Umsch.* 2019;76(9):510-5.
- MENG YQ, LIU D, CAI LL, CHEN H, CAO B, WANG YZ. The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action. *Bioorg Med Chem* 2009;17:848-54.
- MENNA P, PAZ OG, CHELLO M, COVINO E, SALVATORELLI E AND MINOTTI G: Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 11 (Suppl 1): S21-S36, 2012.
- MISHRA, T. R.K. ARYA, S. MEENA, P. JOSHI, M. PAL, B. MEENA, D.K. UPRETI, T.S. RANA, D. DATTA, Isolation, characterization, and anticancer potential of cytotoxic triterpenes from *Betula utilis* Bark, *PLoS One* 11 (7) (2016), 0159430
- MONKS A, SCUDIERO D, SKEHAN P, SHOEMAKER R, PAULL K, VISTICA D, HOSE C, LANGLEY J, CRONISE P, VAIGRO-WOLFF A. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 83, no 11, p. 757–766, 5 jun. 1991. DOI 10.1093/JNCI/83.11.757.
- MORAES, M.M.; CAMARA, C.A.G.; RAMOS, C.S. Seasonal variation in the essential oil of *Protium bahianum* Daly (Burseraceae). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, Abingdon, v.16, p.300-307, 2013.
- MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm.*, v.385, n.1-2, p.113-142, 2010.

- MURTHY BL, THOMSON CS, DODWELL D, SHENOY H, MIKELJEVIC JS, FORMAN D AND HORGAN K: Postoperative wound complications and systemic recurrence in breast cancer. *Br J Cancer* 97: 1211-1217, 2007
- NALIMU, F., OOLORO, J., PETER, E.L. *et al.* Acute and sub-acute oral toxicity of aqueous whole leaf and green rind extracts of *Aloe vera* in Wistar rats. *BMC Complement Med Ther* **22**, 16 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03470-4>
- NEGRI, G. Diabetes mellitus: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes, *Braz. J. Pharm. Sci.* 2005, 41 (2), 121–142.
- NETO, S. F., PRADA, A. L., ACHOD, L. D. R., TORQUATO, H. F. V., LIMA, C. S., PAREDES-GAMERO, E. J., T.P. SOUZA. AMADO, J. R. R. (2021). α -amyrin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111656.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N. YAGI, KUNIO.; Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. Volume 95, Issue 2, June 1979, Pages 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. A Normatização de fitoterápicos no Brazil/ Brazilian phytotherapeutic 131 regulamentation. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPR. p. 1-13, 2007.
- OLIVEIRA, F. A., *et al.* Protective effect of α - And β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, n. 1–2, p. 103–108, 2005.
- OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; FLORÊNCIO, M.G.; LIMA-JUNIOR, R.C.P.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacol. Res.* 49, 105–111.
- OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: OECD, 2008.
- OTUKI, M.F., VIEIRA-LIMA, F., MALHEIROS, A., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. *Eur. J. Pharmacol.* Vol. 507, (2005b), pp. 253–259.
- PEÑA MOA, M.L. VILLARREAL, L. ÁLVAREZ-BERBER, A. MENESES-ACOSTA, V. RODRÍGUEZ-LÓP, Cytotoxicity, post-treatment recovery, and selectivity analysis of naturally occurring podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on breast Cancer cell lines. *Molecules* 21 (2016) 1013

- PIMENTA, M.; MELO, C. D. P. Nanociências e nanotecnologia. Parcerias estratégicas, v. 18, p. 9–21, 2004.
- PLAPIED, L.; DUHEM, N.; DES RIEUX, A.; PRÉAT, V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci.*, v.16, n.3, p.228-237, 2011.
- PUNTHAKEE Z., GOLDENBERG R., KATZ P. Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome, *Can. J. Diabetes* 42 (2018) S10–S15.
- QUINTANAR, D.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification–diffusion technique. *Pharm. Res.* v. 15, p. 1056–1062, 1998b.
- QUINTANAR, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* v. 24, p.1113–1128, 1998a.
- RAKIETEN N, RAKIETEN ML, Nadkarni MR. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep.* 1963; 29:91–8.
- RAMIREZ-ESPINOSA, J.J. *et al.* Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTPe1B: in vitro, in silico, and in vivo approaches. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, p. 2243-2251, 2011.
- RANG, H.P; DALE, M.M. Editora Elsevier, 8ªedição, 2016. *Farmacologia Clínica*. Fuchs, F.D.; Wannmacher, L.
- RAWAT M., *et al.* Nanocarriers: Promising Vehiclefor Bioactive Drugs. *Pharmaceutical Society of Japan*, v. 29, p. 790-798, 2006.
- RAYBURN WF. Diagnosis and classification of diabetes mellitus: highlights from the American Diabetes Association. *J Reprod Med.* 1997 Sep;42(9):585-6. PMID: 9336756.
- REIS, J.S., VELOSO, C.A., MATTOS, R.T., PURISH, S., NOGUEIRA-MACHADO, J.A., 2008. Oxidative stress: A review on metabolic signaling in type 1 diabetes. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 52, 1096–1105. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302008000700005>.
- REN B, YE L, GONG J, REN H, DING Y, CHEN X, LIU X, LU P, WEI F, XU W, *et al:* Alteronol enhances the anti-tumor activity and reduces the toxicity of high-dose adriamycin in breast cancer. *Front Pharmacol* 10: 285, 2019.
- RERUP CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev.* 1970;22(4):485–518.

- RODRIGUEZ A, J. R. *et al.* Development, stability and in vitro delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v.25, n.8, p. 1158–1168, 2017.
- RYERSON AB, EHEMAN CR, ALTEKRUSE SF *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer. *Cancer* 2016;122:1312-37.
- SANTOS, F. A. *et al.* Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in health and disease*, v.1, p.98, 2012.
- SANTOS, F.A., FROTA, J.T., ARRUDA, B.R., DE MELO, T.S., DA SILVA, A.A., BRITO, G.A., CHAVES, M.H., RAO, V.S. 2012. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in health and disease*, 11, 98.
- SCARFÒ L, FERRERI AJ, GHIA P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;104:169-82
- SCHAFFAZICK, S. R., *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulado para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.
- SHENG Y, NG CP, LOURIE R, SHAH ET, HE Y, WONG KY, SEIM I, OANCEA I, MORAIS C, JEFFERY PL, HOOPER J, GOBE GC, MCGUCKIN MA. MUC13 overexpression in renal cell carcinoma plays a central role in tumor progression and drug resistance. *Int J Cancer* 2017;140(10):2351–63. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- SHUCH B, AMIN A, ARMSTRONG AJ, EBLE JN, FICARRA V, LOPEZ-BELTRAN A, MARTIGNONI G, RINI BI, KUTIKOV A. Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: Distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. *Eur Urol*. 2015;67(1):85–97. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2016. *CA: Cancer J Clin* 2016;66:7-30.
- SILVA JÚNIOR, W.F., PINHEIRO, J.G.D., MOREIRA, C.D.L.D.A. *et al.* Thermal behavior and thermal degradation kinetic parameters of triterpene α , β amyirin. *J Therm Anal Calorim* 127, 1757–1766 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10973-016-6046-x>
- SIPKINS DA, WEI X, WU JW, RUNNELS JM, CÔTÉ D, MEANS TK, *et al.* In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature*. 2005;435(7044):969-73

- SLANC, P.; DOLJAK, B.; KREF T,S.; LUNDER, M.; JANES, D. STRUKELJ, B. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. *Phytother. Res.* 2009, v.23, 874–877
- SUBRAMANIAN, R *et al.* In vitro alfa-glucosidase and alfa-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta Biochimica Polonica*, v. 55, n.2, p. 391-398, 2008.
- THORNALLEY, P.J., 2003. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* 419, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.013>.
- TUNDIS, R., LOIZZO, M.R., MENICHINI, F., 2010. Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Rev. Med. Chem.* 10, 315–331. <https://doi.org/10.2174/138955710791331007>.
- TURAJLIC S, LARKIN J, SWANTON C. SNAPSHOT: Renal cell carcinoma. *Cell* 2015;163(6):1556 e1. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].
- UNITED NATIONS POLITICAL DECLARATION of the High-Level of the General Assembly on the Prevention and Control of Non- -Communicable Diseases A/66/L.1. Nova Iorque; 2011.
- UNITED States Pharmacopeia USP. National Formulary. 37^a edição. volume 2. Rockville, 2014. página 2272.
- WEERAPREEYAKUL N, A. NONPUNYA, S. BARUSRUX, T. THITIMETHAROCH, B. SRIPANIDKULCHAI, Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatoma cell line. *Chin. Med.* 7 (2012) 15
- WEN, SONG *et al.* “Antitumor effects of beta-amyrin in Hep-G2 liver carcinoma cells are mediated via apoptosis induction, cell cycle disruption and activation of JNK and P38 signalling pathways.” *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology* 23 4 (2018): 965-970.
- WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. WHO technical report series 894. Geneva, Switzerland: WHO, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. (2023) [cited 2023 January 15]. Available from https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
- XU J, SUN L, SUN W, TIAN J, GUO H. Targeted Silencing of *Kim-1* Inhibits the Growth of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Cell Line 786-0 In Vitro and In Vivo. *Oncol Res.* 2018 Aug 23;26(7):997-1003. doi: 10.3727/096504017X15140544654946.

- YAHYA D, HACHMERYAN M, MICHEVA I, CHERVENKOV T. Acute myelogenous leukemia - current recommendations and approaches in molecular-genetic assessment. *Rom J Intern Med.* 2022;60(2):103-14.
- YAMANAKA S. The winding road to pluripotency (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2013;52:13900-13909.
- YANG H, KIM HW, KIM YC, SUNG SH. Cytotoxic activities of naturally occurring oleanane-, ursane-, and lupane-type triterpenes on HepG2 and AGS cells. *Pharmacogn Mag.* 2017 Jan-Mar;13(49):118-122. doi: 10.4103/0973-1296.196308. PMID: 28216894; PMCID: PMC5307894.
- YEO, Y., PARK, K., 2004. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch. Pharm. Res.* 27 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/BF02980037>.
- YILMAZER A, DE LÁZARO I, TAHERI H. Reprogramming cancer cells: a novel approach for cancer therapy or a tool for disease-modeling? *Cancer Lett* 2015;369:1-8.
- ZEMBRUSKI NC, STACHE V, HAEFELI WE, WEISS J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem.* 2012 Oct 1;429(1):79-81. doi: 10.1016/j.ab.2012.07.005. Epub 2012 Jul 14. PMID: 22796502.
- ZHENG N, ZHANG P, HUANG H, et al. ER α down-regulation plays a key role in silibinin-induced autophagy and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. *J Pharmacol Sci.* 2015;128(3):97-107. doi:10.1016/j.jphs.2015.05.001.
- ZHENG, N. et al. ER α down-regulation plays a key role in silibinin-induced autophagy and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Pharmacol. Sci.* 128, 97–107 (2015).

Parecer do Comitê de Ética.



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOGLUCEMIANTE E ANTI-OBESIDADE DE NANOCÁPSULAS CONTENDO α AMIRINA (NC α A)", sob a responsabilidade da pesquisadora Doutora Tatiane Pereira de Souza (docente FCF/UFAM) – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – e por encontrar-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após análise pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, foi aprovada *ad hoc* sob o N. 014/2020.

| | |
|---|---|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | De Outubro/2020 à Maio/2021 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongos BalbC e Mus musculus (C57BL/6) |
| N. de animais | 51 e 49, respectivamente |
| Peso/idade | 18 \pm 2g / 6 semanas |
| Sexo | Machos |
| Origem | Biotério da Universidade Estadual de Campinas - SP |
| Atividade(s) a ser(em) realizada(s): captura, coleta de espécimes, marcação e/ou outras (neste caso, é necessário especificar). | Indução do Diabetes Mellitus - método descrito por SUN (2015); Indução experimental da obesidade com dieta hipercalórica e hiperlipídica (ração modificada); Teste de toxicidade aguda – seguindo recomendações da Guideline for the testing of chemicals (OCDE, 2001). |

Manaus, 08 de outubro de 2020.

Profa. Dra. Cinthya Jamile Fritts Brandão de Oliveira
Presidente do CEUA-UFAM

Av. G11 Rodrigo Otaviano Landi Barrios, 2000, Canoas, Campus Universitário, Senar Sul, IGB Bloco 1, necelha andr, 69077-000 –Manaus/AM

ANEXO I

Composições farmacêuticas contendo nanopartículas de α , β amirina: síntese e utilidade farmacológica.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

EXAME PRELIMINAR

N.º do Pedido: BR102020015154-1 N.º de Depósito PCT:

Data de Depósito: 24/07/2020

O pedido atende formalmente as disposições legais, especialmente quanto ao Art. 19 da Lei Nº 9.279, de 14 de maio de 1996 (Lei da Propriedade Industrial) e o Instrução Normativa nº 31/2013, estando apto a ser protocolado.

| Condições do Pedido | S | N |
|---|----------|----------|
| Requerimento de depósito com os campos obrigatórios preenchidos | X | |
| Idioma Português | X | |
| Relatório Descritivo | X | |
| Reivindicações | X | |
| PI e C – Apresenta desenhos citados ou não cita nem apresenta desenhos. MU – Apresenta desenhos. | X | |
| Resumo | X | |
| Formatado no padrão exigido | X | |
| Valor correto de Recolhimento | X | |

Rio de Janeiro, 30 de julho de 2021.

Armando dos Santos Alvarez
Mat.Nº1535475DIRPA/
COSAP/SEFOR



Revista da Propriedade Industrial

Nº 2640
10 de Agosto de 2021

Patentes – RPI 2640 de 10 de Agosto de 2021

265/1578

Código Depósito

Código 2.1 - Pedido de Patente ou Certificado de Adição de Invenção depositado

Pedido de Patente ou Certificado de adição de invenção protocolizado. O pedido será mantido em sigilo durante 18 (dezoito) meses a contar da data da prioridade mais antiga. Decorrido esse prazo, será publicado para conhecimento público. O depositante pode, porém, requerer a antecipação da publicação. O prazo de sigilo de 18 (dezoito) meses para o pedido de Certificado de Adição de Invenção é contado da data do depósito do pedido principal. Quando houver ocorrido a publicação do pedido principal, o pedido de Certificado de Adição de Invenção será imediatamente publicado. Os depósitos são designados de acordo com a natureza requerida: Invenção, Modelo de Utilidade e Certificado de Adição de Invenção. Os pedidos depositados através do PCT são notificados no subitem 1.1.

(21) BR 10 2020 015154-1

Código 2.1 - Pedido de Patente ou Certificado de Adição de Invenção depositado

(22) 24/07/2020

(71) SERAFIM FLORENTINO NETO (BR/AM)

O pedido foi publicado na revista da propriedade Industrial (RPI) 2640 de agosto de 2021, do Instituto Nacional da Propriedade Industrial

* A formatação deste capítulo segue as normas da revista da propriedade Industrial.

Composições farmacêuticas contendo nanopartículas de α , β amirina: síntese e utilidade farmacológica.

Inventores: Serafim Florentino Neto^a, Tatiane Pereira de Souza^b, Jesus Rafael Rodriguez Amado^c, Ariadna Lafourcade Prada^d, Fernanda Guilhon-Simplicio^b, Emerson Silva Lima^b.

^aPrograma de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, vinculado a Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Otavio Ramos, 6200 - Coroado. Manaus – AM, Brasil CEP: 69077-000

^bUniversidade Federal do Amazonas - Av. Rodrigo Otavio Ramos 6200, Coroado. Manaus- AM, Brasil. CEP 69077-000

^cLaboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) - Faculdade de Farmácia, Alimentos e Nutrição (FACFAN) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Rua UFMS, Vila Olinda. Campo Grande - MS, Brasil. CEP - 79050-010,

^dUniversidade Federal do Amapá - Rod. Juscelino Kubitschek, km 02 - Jardim Marco Zero. Macapá - AP, 68903-419

α -amyrin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Biomedicine & Pharmacotherapy

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





α -amyrin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells

Serafim Florentino Neto^a, Ariadna Lafourcade Prada^a, Leonardo Domingo Rosales Achod^a, Heron Fernandes Vieira Torquato^b, Cauê Santos Lima^b, Edgar Julian Paredes-Gamero^{b,c}, Maria Oneide Silva de Moraes^d, Emerson Silva Lima^a, Edgar Hernandez Sosa^c, Tatiane Pereira de Souza^a, Jesus Rafael Rodriguez Amado^{f,1,*}

^a *Laboratory of Innovation and Development in Pharmaceutical Technology (LIDETEF), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Octavio Ramos, 6200, Coroado, Manaus, AM CEP 69077-000, Brazil*
^b *Biochemistry Department, Universidade Federal de São Paulo, Rua Três de Maio 100, São Paulo, SP, CEP 04044-020, Brazil*
^c *Pharmaceutical Sciences Post-Graduation Program, Faculty of Pharmacy, Food and Nutrition, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva, Pioneiros, Campo Grande, MS CEP 79070-900, Brazil*
^d *Thematic Microscopy and Nanotechnology Laboratory (LTMN), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Av. Bem Te vi, 8-406. Petrópolis, Manaus, AM 69067-001, Brazil*
^e *Department of Biochemistry & Molecular Biology, Dalhousie University, Sir Charles Tupper Medical Building, 5850 College Street, Halifax, Nova Scotia B3H 4R2, Canada*
^f *Laboratory of Pharmaceutical Technology (LTF), Faculty of Pharmacy, Food and Nutrition, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva, Pioneiros, Campo Grande, MS CEP 79070-900, Brazil*

Artigo publicado no periódico Biomedicine & Pharmacotherapy*

* A formatação deste capítulo segue as normas da Revista Biomedicine & Pharmacotherapy.