



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

ALLESSYA LARA DANTAS FORMIGA

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTITUMORAL EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO DERIVADOS DE ISATINA

João Pessoa - PB

2025

ALLESSYA LARA DANTAS FORMIGA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO
HUMANO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO DERIVADOS
DE ISATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves

João Pessoa - PB

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F725d Formiga, Allessya Lara Dantas.

Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antitumoral em células de adenocarcinoma mamário humano de nanocápsulas poliméricas contendo derivados de isatina / Allessya Lara Dantas Formiga. - João Pessoa, 2025.

136 f. : il.

Orientação: Francisco Humberto Xavier Júnior.

Coorientação: Juan Carlos Ramos Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Câncer de mama. 2. Isatina. 3. Nanopartícula polimérica. 4. Nanotecnologia. I. Xavier Júnior, Francisco Humberto. II. Gonçalves, Juan Carlos Ramos. III. Título.

UFPB/BC

CDU 618.19-006(043)

Elaborado por RUSTON SAMMEVILLE ALEXANDRE MARQUES DA SILVA -
CRB-15/0386

ALLESSYA LARA DANTAS FORMIGA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO
HUMANO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO DERIVADOS
DE ISATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica.

Aprovada em: 25/05/2025

COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 FRANCISCO HUMBERTO XAVIER JÚNIOR
Data: 27/02/2025 09:49:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior
Orientador/Presidente – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente
 JUAN CARLOS RAMOS GONCALVES
Data: 27/02/2025 09:51:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves
Coorientador – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente
 YURI MANGUEIRA DO NASCIMENTO
Data: 27/02/2025 10:57:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Yuri Manguiera do Nascimento
Membro interno – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente
 ELITON SOUTO DE MEDEIROS
Data: 27/02/2025 10:48:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros
Membro externo – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus e a Nossa Senhora, por intercederem por mim e iluminarem meu caminho em todos os momentos dessa jornada. Sem Sua graça e proteção, nada disso teria sido possível.

À minha família, em especial à minha mãe, que tem acompanhado todo o meu processo de formação desde o início, sendo minha base e meu maior exemplo de dedicação e amor incondicional. A minha madrinha e primos que choraram comigo desde a aprovação até celebrando a minha aprovação no doutorado, a vocês toda minha gratidão.

Ao meu noivo, minha fortaleza nos momentos de caos, por todo apoio, paciência e carinho, por acreditar em mim mesmo quando eu duvidava. Sua presença em cada conquista minha foi essencial para que eu chegasse até aqui.

Aos meus amigos que me acompanham desde a graduação e ingressaram comigo no mestrado (exceto Aninha, a única sensata). Vocês viveram cada momento dessa fase da minha vida, seja nos experimentos, na escrita ou quando nos reunimos para fofocar – porque fofoca também edifica. Obrigada por comemorarem minhas conquistas como se fossem suas e pela parceria que construímos desde o curso de farmácia, com você minha jornada acadêmica com certeza foi mais leve.

Aos amigos que me acompanharam na graduação, mas seguiram caminhos distintos ao meu, vocês me ouviram reclamar, vibraram por minhas aprovações e me proporcionaram os melhores momentos de reencontro. Assim como agradeço a todos os meus amigos, de curta e longa data, e de todos os laboratórios por todo o apoio e vivências que completam minha história.

Agradeço também aos meus amigos de fora da UFPB, pelas noites de vinho, conversas, jogos, idas à igreja e treinos na academia para oxigenar o cérebro. Cada momento com vocês estará guardado na memória com carinho.

Aos novos amigos adquiridos no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, que enfrentaram comigo noites, fins de semana e diárias de experimentos, e que, ao mesmo tempo, surtaram ao meu lado organizando

eventos, postagens no Instagram, escrevendo trabalhos, participando de eventos científicos e celebrando nossos primeiros artigos publicados. Cada desafio foi mais leve porque tive vocês ao meu lado.

Aos “meus alunos de iniciação científica”, que fizeram dessa experiência de mestrado algo único e me ajudaram a finalizar esse trabalho em tempo recorde. Obrigada por confiarem em mim, por me impulsionarem e por repetirem junto comigo 12 formulações diversas vezes para cada teste realizado, vocês são incríveis!

Ao laboratório Oncofar, parceiro durante o desenvolvimento deste trabalho, e em especial à minha amiga Karinne, que foi meu maior ponto de apoio em toda a fase de testes, eu sou imensamente grata por você realizar tantos experimentos e pegar todos os barquinhos e horários no fluxo para me ajudar a desenvolver essa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Cláudio Gabriel, por ter cedido as isatinas e sido um parceiro fundamental no desenvolvimento deste estudo. Ao laboratório de quimioinformática, pelas análises de docking molecular, em especial a Alan que cedeu parte do seu tempo para me auxiliar e me ensinar o processamento. E a cada laboratório que cedeu espaço para a realização da caracterização desses sistemas, meu muito obrigada.

À professora Leônia Batista, por ter me iniciado no caminho acadêmico e por ainda se lembrar de mim para colaborações. Você nunca será esquecida. Aproveito, para agradecer a todos os docentes que contribuíram para minha formação profissional e pessoal desde a graduação, no mestrado e agora no doutorado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Humberto Xavier, que viu potencial em mim na graduação e permanece estimulando esse potencial a cada ano de orientação. Sou eternamente grata, pelas conversas, confraternizações e sobretudo pela amizade que estamos construindo. Assim como agradeço ao meu coorientador, Prof. Dr. Juan Gonçalves, por abrir as portas do seu laboratório para que eu pudesse aprender tanto e aceitado vivenciar esse processo que apesar de corrido, foi muito gratificante.

À banca de defesa de dissertação de mestrado, composta pelos professores doutores Eliton Souto de Medeiros e Yuri Manguiera do Nascimento, assim como os suplentes professores doutores Elquio Eleamen Oliveira e Sócrates Golzio dos Santos. Obrigada por fazerem parte desse momento e contribuírem para minha formação continuada como profissional.

Minha gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelo crescimento e maturidade em mim desenvolvidos. À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), que tem sido minha casa há 7 anos e que continuará sendo também pelos 4 próximos. Aos servidores, em nome de Carlos e Anderson, que sempre foram solícitos às nossas necessidades e tornaram o dia a dia do laboratório mais fácil. Assim como agradeço ao povo brasileiro, que torna capaz o desenvolvimento dessa pesquisa e de tantas outras.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ-PB) pelo apoio financeiro.

RESUMO

O câncer de mama é um dos tipos de tumores mais comuns e letais em todo o mundo. Devido à alta heterogeneidade, as células tumorais apresentam capacidade de desenvolver mecanismos de resistência aos tratamentos oncológicos. Por isso, o uso de isatinas tem ganhado notoriedade devido a sua ação antiproliferativa, principalmente inseridas em nanossistemas tecnológicos que favorecem sua endocitose por tumores. Por isso, o presente estudo objetivou desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral frente a células de adenocarcinoma mamário de nanocápsulas poliméricas (NCPs) contendo derivados de isatina. As isatinas (ISA7d, ISA8d e ISA11d) foram caracterizadas quanto aos grupos funcionais por FTIR e determinada a região de maior absorbância por espectroscopia no ultravioleta. A validação dos métodos de quantificação das isatinas foi realizado por HPLC-UV, cujos resultados indicam que todos os métodos foram lineares, específicos, precisos, exatos e robustos. A solubilidade e o coeficiente de partição foram determinados, onde ISA8d ($\log P > 1,05$) apresentou maior coeficiente de partição em triglicerídeo de cadeia média (MCT) quando comparadas a ISA7d ($> 0,80$) e ISA11d ($> 0,78$) e a degradação dessas substâncias em matriz complexa ocorreu após 30 dias principalmente em temperaturas mais baixas (4°C). NCP foram produzidas por nanoprecipitação e otimizadas pelo design experimental Box-Behnken, considerando PCL (50, 100, 150mg), MCT (50, 175, 300mg) e Kolliphor®ELP (20, 60, 100mg) como variáveis independentes. A formulação otimizada apresentou tamanho de partícula de $239,8 \pm 1,3$ nm, Pdl de $0,12 \pm 0,02$ e potencial zeta de $-20,1 \pm 0,4$ mV. O Kolliphor reduziu significativamente o tamanho das partículas ($R^2 = 0,985$). Posteriormente, NCP foram funcionalizadas com quitosana (qNCP) e Lipoid-PEG (pNCP), onde houve a inversão de carga e neutralização dos sistemas, respectivamente, sem alterações significativas em seus tamanhos. A incorporação das isatinas não alteraram os parâmetros físico-químicos das NCPs, onde os espectros de infravermelho sugeriram a encapsulação das isatinas mantendo a forma esférica e uniforme das partículas em análise de superfície. A eficiência de encapsulação para todas as formulações foi acima de 97,2%, apesar de um baixo doseamento ($< 130,1$ $\mu\text{g/mL}$). Testes de estabilidade não mostraram mudança significativa nas amostras armazenadas a 4°C por 90 dias. As NCPs demonstraram boa estabilidade com albumina, se complexando independentemente da concentração, exceto pelas pNCP que necessitavam de um meio mais concentrado de albumina ($> 20\text{mg/mL}$). A partir de ensaios *in vitro* de citotoxicidade pelo MTT, as qNCPs foram as que exibiram maior toxicidade contra células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), onde ISA7d, ISA8d, ISA11d apresentaram IC_{50} superior a $7,34$ $\mu\text{g/mL}$, cuja a morte celular está atrelado à via da JNK. Assim, as NCPs funcionalizadas e estáveis foram produzidas, exibindo perfis variados de interação com albumina e alta eficácia anticancerígena, indicando seu potencial como sistema de entrega de fármacos.

Palavras-chave: Isatina. Nanopartícula polimérica. Nanotecnologia. Câncer de mama.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most common and lethal tumor types worldwide. Due to its high heterogeneity, tumor cells can develop resistance mechanisms against oncological treatments. Therefore, the use of isatins has gained prominence due to their antiproliferative activity, especially when incorporated into advanced nanocarrier systems that enhance tumor endocytosis. This study aimed to develop, characterize, and evaluate the antitumor activity of polymeric nanocapsules (PNCs) containing isatin derivatives against mammary adenocarcinoma cells. The isatins (ISA7d, ISA8d, and ISA11d) were characterized by FTIR spectroscopy to identify functional groups, and their maximum absorbance regions were determined by ultraviolet spectroscopy. The quantification methods were validated using HPLC-UV, demonstrating linearity, specificity, accuracy, precision, and robustness. Solubility and partition coefficient analyses indicated that ISA8d ($\log P > 1.05$) had a higher partition coefficient in medium-chain triglycerides (MCT) compared to ISA7d (> 0.80) and ISA11d (> 0.78), with degradation occurring after 30 days, especially at lower temperatures (4°C). PNCs were produced using the nanoprecipitation method and optimized through a Box-Behnken experimental design, considering PCL (50, 100, 150 mg), MCT (50, 175, 300 mg), and Kolliphor®ELP (20, 60, 100 mg) as independent variables. The optimized formulation exhibited a particle size of 239.8 ± 1.3 nm, a Pdl of 0.12 ± 0.02 , and a zeta potential of -20.1 ± 0.4 mV. Kolliphor®ELP significantly reduced particle size ($R^2 = 0.985$). Subsequently, PNCs were functionalized with chitosan (qPNCs) and Lipoid-PEG (pPNCs), leading to charge inversion and system neutralization, respectively, without significant changes in particle size. The incorporation of isatins did not alter the physicochemical parameters of the PNCs, with infrared spectra suggesting successful encapsulation while maintaining a spherical and uniform morphology, as confirmed by surface analysis. Encapsulation efficiency was above 97.2% for all formulations, despite low drug content (< 130.1 $\mu\text{g/mL}$). Stability tests revealed no significant changes in samples stored at 4°C for 90 days. The PNCs demonstrated good stability with albumin, forming complexes independent of concentration, except for pPNCs, which required a higher albumin concentration (> 20 mg/mL). In vitro cytotoxicity assays using MTT indicated that qPNCs exhibited the highest toxicity against human breast adenocarcinoma cells (MCF-7), with ISA7d, ISA8d, and ISA11d showing IC_{50} values above 7.34 $\mu\text{g/mL}$, with cell death associated with the JNK pathway. Thus, stable and functionalized PNCs were successfully developed, demonstrating distinct albumin interaction profiles and high anticancer efficacy, highlighting their potential as drug delivery systems.

Keywords: Isatin. Polymeric Nanoparticle. Nanotechnology. Breast Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias extrínsecas e intrínsecas da apoptose	25
Figura 2. Núcleo indolina-2,3-diona.....	28
Figura 3. Estrutura dos principais nanossistemas utilizados para entrega de fármacos.....	31
Figura 4. Diferenças estruturais entre nanocápsulas e nanoesferas	33
Figura 5. Produção de nanocápsulas poliméricas pela técnica de nanoprecipitação	35
Figura 6. Estrutura química da ISA7d (A), ISA8d (B) e ISA11d (C)	43
Figura 7. Espectros de infravermelho das ISA7d (A), ISA8d (B) e ISA11d (C)	57
Figura 8. Espectros de ultravioleta das isatinas solubilizadas em acetonitrila (20 µg/mL)	58
Figura 9. Cromatogramas da ISA7d (A), ISA8d (B) e ISA11d (C)	60
Figura 10. Curvas de calibração da ISA7d (A), ISA8d (B) e ISA11d (C)	61
Figura 11. Cromatograma da ISA7d (10µg/mL) referente à especificidade...	61
Figura 12. Cromatograma da formulação contendo ISA7d (10µg/mL) referente à especificidade.....	62
Figura 13. Cromatograma da ISA8d (10µg/mL) referente à especificidade...	62
Figura 14. Cromatograma da formulação contendo ISA8d (10µg/mL) referente à especificidade.....	62
Figura 15. Cromatograma da ISA11d (1µg/mL) referente à especificidade...	63
Figura 16. Cromatograma da formulação contendo ISA11d (1µg/mL) referente à especificidade.....	63
Figura 17. Análise comparativa do coeficiente angular das curvas de ISA7d (A), ISA8d (B) e ISA11d (C)	64

Figura 18. Avaliação das ISA7d (A), ISA8d(B) e ISA11d(C) em matriz oleosa sob diferentes temperaturas.....	72
Figura 19. Avaliação das ISA7d (A), ISA8d(B) e ISA11d(C) em matriz oleosa sob exposição a luz.....	72
Figura 20. Avaliação das ISA7d (A), ISA8d(B) e ISA11d(C) em matriz oleosa sob condições de umidade.....	73
Figura 21. Diagrama de Pareto obtido através do Box-Behnken	78
Figura 22. Superfície de resposta das variáveis independentes em função do tamanho das partículas	79
Figura 23. Tamanho (A) e potencial zeta (B) das nanopartículas funcionalizadas com quitosana em diferentes concentrações de ácido acético (0,1-1%).....	82
Figura 24. Tamanho (A) e potencial zeta (B) de nanopartículas funcionalizadas com Lipoid-PEG 5000 em PBS e água	83
Figura 25. NCPs otimizadas (A) e funcionalizadas com quitosana (B) e Lipoid-PEG (C) em superfície 3D.....	85
Figura 26. Análise comparativa dos espectros de FTIR dos componentes e formulações utilizados na produção de NCPs otimizado e funcionalizados...	87
Figura 27. TG e DSC das nanocápsulas poliméricas	89
Figura 28. Alterações no tamanho e zeta dos oNCPs quando submetidos a 4 (A), 25 (B) e 37°C (C).....	93
Figura 29. Alterações no tamanho e zeta dos qNCPs quando submetidos a 4 (A), 25 (B) e 37°C (C).....	94
Figura 30. Alterações no tamanho e zeta dos pNCPs quando submetidos a 4 (A), 25 (B) e 37°C (C).....	95
Figura 31. Tamanho e potencial zeta das NCPs após a formação da coroa proteica em diferentes concentrações (A) e ao longo do tempo em 5 mg/mL(B) e 20 mg/mL(C) de albumina	97

Figura 32. Citotoxicidade na linha celular MCF-7 após tratamento de 24 horas com NCP otimizadas e funcionalizadas sem fármaco.....	100
Figura 33. Citotoxicidade na linha celular MCF-7 após tratamento de 24 horas com NCP otimizadas e funcionalizadas e ISA7d.....	100
Figura 34. Citotoxicidade na linha celular MCF-7 após tratamento de 24 horas com NCPs e ISA8d	101
Figura 35. Citotoxicidade na linha celular MCF-7 após tratamento de 24 horas com NCPs e ISA11d.....	101
Figura 36. Interações intermoleculares formadas por caspase 3 e ligantes analisados	104
Figura 37. Interações intermoleculares formadas por caspase 7 e ligantes analisados	105
Figura 38. Interações intermoleculares formadas por caspase 8 e ligantes analisados	107
Figura 39. Interações intermoleculares formadas por JNK e ligantes analisados	108
Figura 40. Interações intermoleculares formadas por Erk1 e ligantes analisados	109
Figura 41. Interações intermoleculares formadas por Erk1/2 e ligantes analisados	111
Figura 42. Interações intermoleculares formadas por p38- α e ligantes analisados	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de robustez avaliados no método	47
Tabela 2. Composição geral das nanocápsulas e suas concentrações	50
Tabela 3. Alvos e ligantes utilizados em estudos de docking molecular	54
Tabela 4. Variação percentual do coeficiente angular derivado da análise do efeito matriz proveniente da adição de MCT	64
Tabela 5. Valores encontrados pelos analistas 1 e 2 para a ISA7d no teste de precisão (reprodutibilidade)	65
Tabela 6. Valores encontrados pelos analistas 1 e 2 para a ISA8d no teste de precisão (reprodutibilidade)	65
Tabela 7. Valores encontrados pelos analistas 1 e 2 para a ISA11d no teste de precisão (reprodutibilidade)	66
Tabela 8. Valores de p obtidos no test t e DPR para as diferentes concentrações de isatina entre os analistas.....	67
Tabela 9. Resultados encontrados através dos testes de exatidão nos três níveis.....	68
Tabela 10. Condições de robustez (fluxo e composição da fase móvel) do método HPLC para ISA7d (10 µg/mL) em fase móvel contendo 10 mg/mL de MCT	69
Tabela 11. Condições de robustez (fluxo e composição da fase móvel) do método HPLC para ISA8d (10 µg/mL) em fase móvel contendo 10 mg/mL de MCT	69
Tabela 12. Condições de robustez (fluxo e composição da fase móvel) do método HPLC para ISA11d (10 µg/mL) em fase móvel contendo 10 mg/mL de MCT	70
Tabela 13. Solubilidade das isatinas em MCT	70
Tabela 14. Coeficiente de partição das isatinas	71

Tabela 15. Composição e resultados das amostras na produção das NCPs	75
Tabela 16. Planejamento fatorial do tipo Box-Behnken	77
Tabela 17. Efeito da alteração da concentração de óleo e tensoativo nas formulações otimizadas de NCP	80
Tabela 18. Parâmetros físico-químicos das nanocápsulas poliméricas contendo derivados de isatina	84
Tabela 19. Doseamento e eficiência de encapsulação dos nanossistemas otimizados e funcionalizados.....	91
Tabela 20. IC ₅₀ na linhagem celular MCF-7 após tratamento com NCPs com e sem fármaco por 24 horas, utilizando o ensaio de MTT	99
Tabela 21. Valores de Moldock Score das substâncias analisadas e respectivos padrões	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - acetonitrila

AUC - área sob a curva

BID - proteína pró-apoptótica da família Bcl-2

BSA - albumina sérica bovina

CDCl₃ - clorofórmio deuterado

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

C_{max} - concentração máxima

DISC - complexo de sinalização indutor de morte

DLS - difusão dinâmica da luz

DNA - ácido desoxirribonucleico

DSC - calorimetria exploratória diferencial

EE% - Porcentagem da eficiência de encapsulação

ELS - dispersão de luz eletroforética

ERN - espécies reativas de nitrogênio

EROs - espécies reativas de oxigênio

FTIR - espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier

HER2 - receptor epidérmico humano 2

HPLC - high-performance liquid chromatography

IC₅₀ - concentração inibitória a 50%

ISA11d - (Z)-N'-(5-nitro-2-oxoindolin-3-ilideno) benzidrazida

ISA7d - (Z)- N'-(5,7-dicloro-2-oxoindolin-3-ilideno) benzidrazida

ISA8d - (Z)-N'-(5,7-dicloro-1-metil-2-oxoindolin-3-ilideno) benzidrazida

ISO - Organização Internacional de Normalização

JNK - janus quinase

MAPK - proteínas cinases ativadas por mitógeno

MCT - triglicerídeos de cadeia média

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo

NCP - nanocápsula polimérica

nm - nanômetros

NO₂ - Grupo nitro

OCDE - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

oNCP - nanocápsulas poliméricas otimizadas

PBS - solução tampão fosfato

PCL - policaprolactona

PdI - índice de polidispersão

PEG - polietilenoglicol

PLGA - poli(ácido lático-co-ácido glicólico)

pNCP - nanocápsulas poliméricas funcionalizadas com polietilenoglicol

PR - receptor de progesterona

qNCP - nanocápsulas poliméricas funcionalizadas com quitosana

R² - coeficiente de determinação da regressão linear

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RE - receptor de estrogênio

RMSD - Root-Mean-Square Deviation

TG- termogravimetria

t_{max} - tempo para atingir a concentração máxima

UV- ultravioleta

UV-Vis - ultravioleta-visível

λ_{max} - comprimento de onda máximo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1. Aspectos gerais do câncer.....	23
2.2. Câncer de mama.....	24
2.3. Moléculas-alvo no tratamento do câncer de mama	25
2.4. Plantas medicinais e seus derivados sintéticos como alternativa terapêutica no câncer	27
2.5. Isatinas.....	29
2.6. Nanotecnologia no tratamento oncológico	31
2.6.1. Nanocápsulas poliméricas	33
2.6.2. Funcionalização e complexação com proteínas.....	36
2.7. Nanossistemas contendo isatina para aplicação antitumoral	38
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo geral	41
3.2. Objetivos específicos	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Local da pesquisa	43
4.2. Materiais.....	43
4.3. Obtenção das isatinas	43
4.4. Caracterização das isatinas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN- ¹ H)	44
4.5. Caracterização físico-química das isatinas	44
4.5.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	44
4.5.2. Espectroscopia de Ultravioleta-visível (UV-vis).....	45
4.6. Validação das isatinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	45
4.6.1. Linearidade.....	46
4.6.2. Especificidade.....	46
4.6.3. Efeito matriz	46
4.6.4. Precisão.....	46
4.6.5. Exatidão.....	47
4.6.6. Limite de detecção e quantificação	48
4.6.7. Robustez	48
4.7. Estudo de solubilidade e coeficiente de partição (LogP)	49

4.8. Cinética de degradação	49
4.9. Desenvolvimento das nanocápsulas poliméricas (NCPs).....	50
4.9.3. Otimização do nanossistema produzido	51
4.9.4. Funcionalização do nanossistema otimizado	51
4.9.5. Incorporação das isatinas nos nanossistemas produzidos ...	52
4.10. Caracterização das formulações	52
4.10.1. Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (Pdl)	52
4.10.2. Potencial zeta.....	52
4.10.3. Análise morfológica em perfilometria ótica	52
4.10.4. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier das NCPs	53
4.10.5. Análises térmicas das nanopartículas.....	53
4.11. Determinação do doseamento e eficiência de encapsulação (EE%) por HPLC	53
4.12. Estabilidade dos nanossistemas	54
4.13. Complexação com proteínas plasmáticas	54
4.14. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	54
4.15. Docking molecular do mecanismo de ação	55
4.16. Análise estatística	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. Caracterização físico-química das isatina	58
5.1.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) 58	
5.1.2. Espectroscopia de ultravioleta (UV-Vis)	59
5.1.3. Validação de metodologia analítica das isatinas desenvolvida por HPLC	60
5.1.4. Estudo de solubilidade e coeficiente de partição (LogP)	71
5.1.5. Cinética de degradação	73
5.2. Desenvolvimento e caracterização das nanocápsulas poliméricas (NCPs)	75
5.2.1. Estudo de pré-formulação	75
5.2.2. Otimização do nanossistema	77
5.2.3. Funcionalização do nanossistema otimizado	82
5.2.4. Incorporação das isatinas nos nanossistemas produzidos ...	85
5.2.5. Análise morfológica	86
5.2.6. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier da NCPs	87

5.2.7. Análises térmicas	89
5.3. Doseamento e eficiência de encapsulação (EE%)	92
5.3.1. Estabilidade dos nanossistemas	93
5.3.2. Complexação com proteínas	97
5.4. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	99
5.5. Docking molecular	104
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
7. REFERÊNCIAS	118
ANEXOS	136

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O câncer corresponde a um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células que podem promover metástase invadindo partes do corpo, representando assim, a segunda causa de morte no mundo (Opas, 2022). Os tumores podem existir devido a fatores hereditários, ambientais ou pela associação de ambos, mas para desenvolvê-lo é necessário que ocorra o acúmulo de mutações celulares (Vaghari-Tabari *et al.*, 2021).

Dentre eles, o câncer de mama apresenta alta incidência, principalmente em mulheres, representando um grande desafio para a saúde pública devido à dificuldade de tratamento e o índice de sobrevivência inferior a 30% (Kashyap *et al.*, 2022). Atualmente, não existem tratamentos seletivos para o adenocarcinoma mamário que sejam isentos de toxicidade celular. Os medicamentos disponíveis no mercado possuem baixa solubilidade, estabilidade e biodistribuição. Nesse sentido, a prospecção de novos bioativos com potencial anticâncer se faz necessária (Navya *et al.*, 2019).

Os estudos com produtos naturais aplicados ao câncer têm se tornado cada vez mais frequentes, devido esses novos agentes apresentarem capacidade antioxidantes e antimutagênicas (Chekroun *et al.*, 2015). No entanto, a obtenção desses isolados se dá de forma lenta e em baixas concentrações. Assim, as substâncias sintéticas bioativas passaram a ser candidatas a fármacos, em virtude da velocidade de produção, mantendo a eficácia e segurança das moléculas (Sangi, 2016).

Diante disso, os derivados de isatina são estudados com diversas finalidades, dentre elas destaca-se a sua aplicação antitumoral. As adições de grupos funcionais na estrutura dessa molécula proporcionam uma maior especificidade fármaco-receptor, ao passo que podem interferir nas suas propriedades físico-químicas. Neste contexto, são utilizadas determinadas estratégias para melhorar sua eficiência e seletividade, como a complexação com metais e aplicação em sistemas de liberação, por exemplo (Ferraz de Paiva *et al.*, 2021).

Dessa forma, os sistemas nanoparticulados de liberação de fármacos são abordagens adotadas na terapia contra o câncer por permitirem melhoria

farmacológica na resposta dos antitumorais e menores efeitos tóxicos no paciente, uma vez que são formulações eficazes, seletivas e sem danos significativos a tecidos saudáveis (Abdolmaleki *et al.*, 2021).

São representantes dessa classe, as nanocápsulas poliméricas que têm sido consideradas promissoras para o tratamento dessa morbidade, por apresentar biocompatibilidade com os tecidos, biodegradabilidade e segurança, demonstrando vantagens quando comparados aos sistemas de liberação convencionais, melhorando assim, a farmacocinética e farmacodinâmica das substâncias (Venditti, 2019). Além disso, a modificação da superfície dessas nanopartículas com polímeros, proteínas, ligantes ou anticorpos pode melhorar a estabilidade em fluidos biológicos, aumentar a biodisponibilidade e facilitar a liberação controlada dos fármacos (Valencia *et al.*, 2021).

Todavia, apesar de existirem estudos sobre a atividade antitumoral das isatinas em nanocarreadores, estes ainda se limitam a nanopartículas metálicas (Krishna *et al.*, 2024). Por isso, o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo derivados de isatina surge como uma inovação, dada a escassez de estudos sobre a entrega avançada dessas moléculas em células tumorais de mama.

Diante do que foi exposto, o presente estudo visou desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral de nanocápsulas poliméricas contendo derivados de isatina frente a células de adenocarcinoma mamário humano. Para tanto, foi realizada a caracterização das isatinas, assim como a validação do método de quantificação e seus estudos de solubilidade, coeficiente de partição e cinética de degradação, para posteriormente serem inseridas nas nanopartículas. Estas foram produzidas a partir de estudos de pré-formulação e otimização pelo delineamento experimental Box-Behnken e a partícula otimizada foi funcionalizada com quitosana e polietilenoglicol. Foi avaliada a estabilidade em diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C) ao longo de 90 dias, bem como sua interação com albumina sérica e por fim citotoxicidade dos sistemas em células MCF-7, uma linha celular representativa do câncer de mama, para validar a eficácia dos sistemas propostos.

Referencial teórico

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Aspectos gerais do câncer

O câncer, também conhecido como tumor, consiste em um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células além dos limites habituais, podendo invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar por outros órgãos, desestabilizando de forma inespecífica múltiplas vias moleculares que estão associadas à sua disseminação (Brown *et al.*, 2023).

A progressão desses tumores está relacionada à reprogramação dos mecanismos celulares fundamentais para a sobrevivência da célula, refletindo em mutações de alta complexidade genética, que alteram mecanismos de replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA) no processo de divisão celular. Todavia, sua capacidade adaptativa e evolutiva está atrelada a fatores epigenéticos, que podem resultar em fenótipos potencialmente letais, variando de acordo com a genética individual, a qual determinará a prevalência e desfecho da doença (Berko; Funmilola; Akala, 2021; Brown *et al.*, 2023).

Estimativas sugerem que, em 2022, ocorreram 20 milhões de novos casos de câncer no mundo, gerando mais de 9,7 milhões de mortes, havendo uma diversidade dos tipos de câncer que afetam as diferentes regiões do mundo. Porém, é mútuo que o câncer de pulmão é o mais diagnosticado por todo o mundo, sendo responsável por quase 2,5 milhões de novos casos com 18,7% de mortalidade (Bray *et al.*, 2024).

No Brasil, são estimados 704 mil diagnósticos para o triênio de 2023 a 2025, dos quais 220 mil correspondem ao câncer de pele não melanoma, seguido do câncer de mama (74 mil), próstata (72 mil), cólon e reto (46 mil), pulmão (32 mil) e estômago (21 mil), todos associados a uma rápida progressão e redução da taxa de sobrevivência dos indivíduos (Brasil, 2023a). Entretanto, o câncer de mama apresenta o maior índice de morbimortalidade entre as mulheres adultas, o que o torna alvo de estudos para o controle e prevenção do desenvolvimento da doença (Farahani *et al.*, 2023).

2.2. Câncer de mama

O câncer de mama é um dos tipos de tumores mais comuns e letais em todo o mundo, com taxas de sobrevivência para casos metastáticos inferiores a 30% (Kashyap *et al.*, 2022). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (2023b), foram registrados mais de 17 mil óbitos por essa doença em 2020. A alta incidência nos países em desenvolvimento está associada à baixa conscientização e ao diagnóstico tardio, o que compromete a eficácia do tratamento (Kashyap *et al.*, 2022).

Por ser uma doença heterogênea, apresenta variabilidade em suas características biológicas, incluindo mutações genéticas e diversidade molecular, o que reflete na sua gravidade. Dessa forma, os tumores de mama podem se dividir nos estágios carcinoma *in situ* (não invasivo) e carcinoma invasivo, com subclassificações a depender do local atingido (Nolan; Lindeman; Visvader, 2023).

Os adenocarcinomas são subtipos de carcinomas originados nas células glandulares da mama que podem surgir em ambos estágios. São conhecidos como o tipo mais comum de carcinoma, pois atingem a região lobular e ductal, que são as principais estruturas que compõem a mama. Podem ser agressivos, visto que sua localização permite a disseminação por outras partes do corpo através do sistema linfático e sanguíneo (Kashyap *et al.*, 2022).

Quanto a classificação molecular desse tipo de câncer, baseia-se na expressão de receptores hormonais estrogênio (RE) e progesterona (PR) e do receptor epidérmico humano 2 (HER2). Os principais subtipos são o Luminal A e B (RE+ ou PR+), sendo o B mais agressivo, HER2+ (superexpressão de HER2) e triplo negativo (sem expressão de nenhum receptor). O subtipo Luminal A corresponde a 70% dos casos, enquanto os demais representam 15% dos quadros cada (Barzaman *et al.*, 2020; Brasil, 2023b)

Por isso, o tratamento do câncer de mama é individualizado e depende do estágio da doença e das características moleculares do tumor. As opções terapêuticas incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia alvo e hormonal, transplantes e imunoterapia. Quando os quadros não envolvem

metástase, o principal objetivo consiste na erradicação do tumor por cirurgia associada a radioterapia (Pajuelo-Lozano *et al.*, 2018).

No entanto, a terapia sistêmica é a mais indicada, onde se utiliza medicamentos antineoplásicos que apresentam alta toxicidade e baixa especificidade para células tumorais (Kashyap *et al.*, 2022; Tagde *et al.*, 2022). Portanto, a eficácia clínica desse tratamento ainda é limitada, uma vez que gera reações adversas graves em órgãos secundários (Rodrigues *et al.*, 2021; Castillo-Tobías *et al.*, 2023).

Devido à alta heterogeneidade, as células tumorais apresentam capacidade de desenvolver mecanismos de resistência aos tratamentos oncológicos, por meio da diminuição da absorção, aumento do efluxo do fármaco, alteração da proteína alvo, aumento do reparo do DNA, inibição de apoptose e aumento do seu metabolismo (Bukowski; Kciuk; Kontek, 2020).

Assim, a busca por novas estratégias terapêuticas mais seletivas e menos tóxicas torna-se uma necessidade emergente, tendo como alvos biológicos medicamentos que atuem em nas vias de apoptose e estresse oxidativo. Essas abordagens focam em induzir a morte de células cancerígenas enquanto poupam células normais, tornando-as alternativas promissoras às terapias convencionais (Hanikoglu *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2024).

Para isso, são realizados ensaios *in vitro* para avaliar novos fármacos anticancerígenos. Modelos celulares bidimensionais e tridimensionais, como organoides, permitem avaliar a eficácia e a toxicidade de compostos candidatos em um ambiente controlado. Linhagens celulares como MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário triplo-negativo) são amplamente utilizadas, permitindo a investigação de terapias mais eficazes e personalizadas (Neve *et al.*, 2006).

2.3. Moléculas-alvo no tratamento do câncer de mama

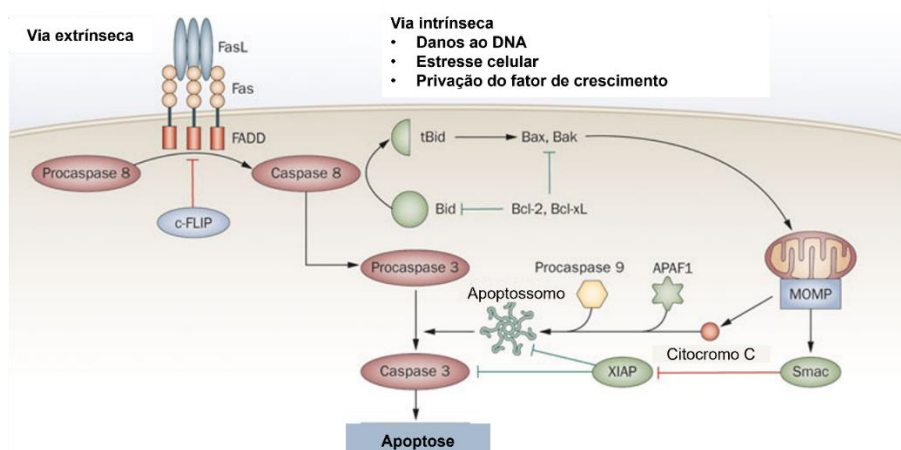
A apoptose é um processo de morte celular programada essencial para a manutenção da homeostase e desempenha um papel crucial na eliminação de células danificadas, bem como na prevenção do desenvolvimento de tumores (Yan, Elbadawi; Efferth, 2020). Em condições normais, a apoptose atua como

um mecanismo de defesa, eliminando células com danos no DNA e prevenindo a formação de tumores. No entanto, em células cancerígenas, os mecanismos de apoptose são frequentemente inativados, permitindo a proliferação celular descontrolada (Morana; Wood; Gregory, 2022).

O processo apoptótico é mediado por uma família de proteases, as caspases, que clivam proteínas específicas em sequências precisas. A ativação dessas proteases é um evento central e depende do equilíbrio entre proteínas que promovem e inibem a morte celular. As caspases iniciadoras, como a caspase 8 e 9, são ativadas por diferentes estímulos que, por sua vez, ativam as caspases executoras, como a 3, 6 e 7, promovendo a degradação de proteínas estruturais e do DNA, levando à morte celular (Bock; Tait, 2020).

Assim, a apoptose pode ser iniciada por uma via extrínseca, ativada por receptores de morte, ou pela via intrínseca, desencadeada por danos mitocondriais. Todavia, ambas convergem para a ativação das caspases, culminando na morte celular (Figura 1) (Boice; Bouchier-Hayes, 2020). Devido a essa versatilidade, as caspases são alvos para novos tratamentos frente a linhagens tumorais, visto que sensibilizam essas células e superam a resistência associada ao tratamento (Oliver Metzsig *et al.*, 2016).

Figura 1. Vias extrínsecas e intrínsecas da apoptose.



A via extrínseca da apoptose é iniciada pela ligação de ligantes a receptores de morte, formando o complexo DISC. A caspase 8, ativada no DISC, pode diretamente ativar a caspase 3 ou clivar o BID, amplificando a via intrínseca. A via intrínseca envolve a permeabilização da mitocôndria, liberação do citocromo c e formação do apoptossomo, que ativa a caspase 9. Ambas as vias convergem para a ativação das caspases executoras, como a caspase 3, levando à morte celular.

Fonte: adaptado de Ramaswamy; Deng; Siegel, 2011

Outra forma de induzir morte celular é através do estresse oxidativo, que é um estado de desequilíbrio causado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN) (Kruk *et al.*, 2019). Essas moléculas são altamente reativas, devido aos seus elétrons desemparelhados, e capazes de oxidar proteínas, lipídios e o próprio DNA. Essa oxidação desencadeia uma série de reações em cadeia que podem danificar as células e contribuir para o desenvolvimento do câncer (Liguori *et al.*, 2018).

As espécies reativas são geradas, principalmente, nas mitocôndrias durante o metabolismo celular e podem ser amplificadas por fatores externos como radiação ultravioleta (UV) e poluentes. Para manter a homeostasia, as células possuem um sistema de defesa antioxidante composto por enzimas, como a catalase e a superóxido dismutase, e moléculas não enzimáticas como a glutathione (metabólito produzido pelas células) que, por sua vez, neutralizam os radicais livres e protegem as células contra danos oxidativos (Lu *et al.*, 2020).

Embora os EROs possam induzir a morte celular, em concentrações mais baixas elas atuam como segundos mensageiros, estimulando a proliferação celular e a sobrevivência através da ativação de vias de sinalização como as proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK/ERK1/2). Além disso, essas espécies promovem a angiogênese e metástase, contribuindo para a progressão tumoral (Moloney; Cotter, 2018).

Já em níveis tóxicos, os EROs induzem a parada do ciclo celular e apoptose pela ativação de vias como a Janus quinase (JNK), que está inativa em células tumorais, promovendo a sinalização para ativação das vias intrínsecas ou extrínsecas da apoptose (Lu *et al.*, 2020). Por isso, compostos que levam ao aumento do estresse oxidativo nas células tumorais são promissores no tratamento do câncer.

2.4. Plantas medicinais e seus derivados sintéticos como alternativa terapêutica no câncer

A humanidade utiliza de plantas medicinais como cura alternativa de diversas enfermidades ao longo de toda sua história, e, com o avançar da tecnologia e ciência, foram evidenciados e isolados os princípios ativos extraídos dessas espécies, capazes de melhorar e reverter quadros clínicos, devido as

suas propriedades anti-inflamatória, antitumoral, anestésica, analgésica e neuroprotetora, tornando-se alvos de pesquisa fitoterápica (Singh *et al.*, 2023).

Diante disso, os produtos naturais são amplamente estudados na aplicação antitumoral, tendo em vista que são fontes de uma diversidade de compostos químicos com atividade biológica (Kooti *et al.*, 2017). A vincristina e vimblastina são exemplos de fármacos antineoplásicos isolados de espécies medicinais (*Catharanthus roseus*), e além deles 80% dos fármacos anticâncer, atualmente, são derivados ou análogos de produtos naturais, o que destaca a relevância da biodiversidade como fonte de novos medicamentos (Newman; Gragg, 2020). (Cragg; Newman, 2013).

Uma das vantagens de se utilizar plantas medicinais no tratamento do câncer é a capacidade de superar a resistência tumoral, de forma que esses compostos podem agir aumentando a concentração intracelular de outros quimioterápicos ou induzindo mecanismos alternativos de morte celular. Essa multifuncionalidade é uma estratégia para combater a heterogeneidade tumoral e a resistência aos tratamentos convencionais (Yuan *et al.*, 2017).

Todavia, o isolamento dos metabólitos que desempenham essa atividade ocorre de maneira lenta e em baixa quantidade, dificultando sua obtenção. Por isso, os métodos de síntese orgânica usando moléculas naturais têm se tornado aliados no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (Sangi, 2016), visto que há demanda de um menor tempo para obtenção do composto mantendo sua eficácia e segurança (Prajapat *et al.*, 2017).

Além disso, a síntese de novos compostos permite o desenvolvimento de candidatos a fármacos mais específicos para as células tumorais, pois podem ser adicionados grupos funcionais que interajam melhor com seus receptores ou proteínas que participam do processo de morte celular. Derivados sintéticos de pirimidina, por exemplo, foram capazes de inibir a replicação de células tumorais em diferentes linhagens de carcinoma mamário, induzindo apoptose pelo bloqueio do ciclo celular (Taglieri *et al.*, 2020).

Compostos derivados de plantas têm desempenhado um papel crucial no desenvolvimento de medicamentos anticâncer. Originalmente isolado da espécie vegetal *Taxus brevifolia*, o paclitaxel passou a ser sintetizado para produzir

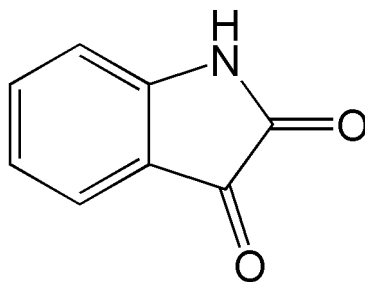
medicamentos em larga escala, tendo em vista a atividade antimitótica deste terpenóide em tumores de mama e ovário (Buyel, 2018).

Outros derivados sintéticos de metabólitos secundários já apresentaram ação frente a tumores. No entanto, os alcaloides têm se destacado em virtude da diversidade de núcleos que possui, possibilitando alterações estruturais que podem ser aplicadas a diferentes tipos de tumores (Dembitsky; Gloriová; Poroikov, 2005). São exemplos desta classe, as securininas (Klochkov; Neganova, 2021), fagaroninas e nitidinas (Tillequin, 2007), assim como as isatinas que demonstraram potencial antitumoral promissor, especialmente na superação da resistência a múltiplos fármacos (Gupta *et al.*, 2019).

2.5. Isatinas

A isatina (ou 1H-indole-2,3-diona) (Figura 2) é um composto heterocíclico que possui em sua estrutura molecular uma porção lactâmica (Nath *et al.*, 2021), um substrato versátil para diversas reações, sendo capaz de gerar modificações em sua configuração potencializando suas atividades biológicas (Kaur; Chimni, 2018).

Figura 2. Núcleo indolina-2,3-diona



Fonte: Formiga, 2025

Essa molécula foi descoberta a partir do produto da oxidação do índigo usando ácido nítrico e crômico (Nunes, 2023). Ela se cristaliza a partir de água, álcool ou ácido acético na forma de cristais de coloração laranja-avermelhado que apresentam ponto de fusão a 200 °C (Varun; Sonam; Kakkar, 2019). Sua obtenção de fontes naturais advém das flores presentes nas espécies *Couroupita guianensis*, *Isatis tinctoria* e *Calanthe discolor*, (Nath *et al.*, 2021) e na secreção da glândula parótida de sapos do gênero *Bufo* (Al-Khuzai; Fahad; Al-Safi, 2022).

A solubilidade da isatina em água é baixa, mas é ligeiramente solúvel em solventes orgânicos como etanol (solubilidade da fração molar: $5,138 \cdot 10^{-5}$) e acetato de etila (solubilidade da fração molar: $4,000 \cdot 10^{-3}$) (Shakeel *et al.*, 2015). Já a estabilidade é influenciada por fatores estruturais e ambientais, podendo sofrer hidrólise nas suas porções nitrogenadas. Por isso, modificações estruturais podem aumentar sua estabilidade e melhorar o direcionamento para aplicações biológicas (Orlova *et al.*, 2018).

Assim, as isatinas podem ser facilmente sintetizadas em laboratório, diminuindo seu custo de produção, tornando-o um produto mais acessível para o desenvolvimento de um medicamento (Banerjee *et al.*, 2025).

Por apresentar grupos funcionais como aminas na posição um e carbonilas na posição dois e três, o desenho de análogos bioativos é facilitado (Cheke *et al.*, 2022) e a adição de grupos farmacofóricos favorece utilização como agentes antibacterianos (Guo, 2019), antioxidantes (Nath *et al.*, 2021), anti-inflamatórios (Fonseca *et al.*, 2021) e anticancerígenos (Aneja *et al.*, 2019).

Se tratando da síntese de derivados de N'-(2-oxoindolin-3-ilideno) benzohidrazida, moléculas utilizadas no presente estudo, sua formação envolve a condensação de benzidrazida e isatina sob condições ácidas e aquecimento em solventes orgânicos. Contudo, como forma de obter as isatinas através de uma abordagem sustentável, utilizou-se bentonita, uma argila rica em aluminossilicatos, que apresenta propriedades ácidas de Lewis, tornando-a um catalisador eficiente para diversas reações orgânicas, diminuindo assim o uso de solvente (Silva, da *et al.*, 2022).

Essa classe de moléculas também participa de processos biológicos como inibidor de enzimas e receptores, como a anidrase carbônica, histona desacetilase e a tirosina quinase, que são responsáveis por causar apoptose em várias linhagens celulares que dão origem a tumores malignos (Hou *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2020).

No entanto, quando avaliada a atividade antiproliferativa foi possível observar que a depender das substituições no núcleo das isatinas, os grupos funcionais podem alterar o tamanho e polaridade da molécula, interferindo assim, na sua atividade biológica direcionada (Andrade, 2022). Associado a isso,

os sistemas convencionais de liberação de fármacos apresentam eficácia limitada, falta de seletividade e baixa distribuição nos tecidos, tornando-se uma problemática para o tratamento do câncer (Dang; Guan, 2020).

2.6. Nanotecnologia no tratamento oncológico

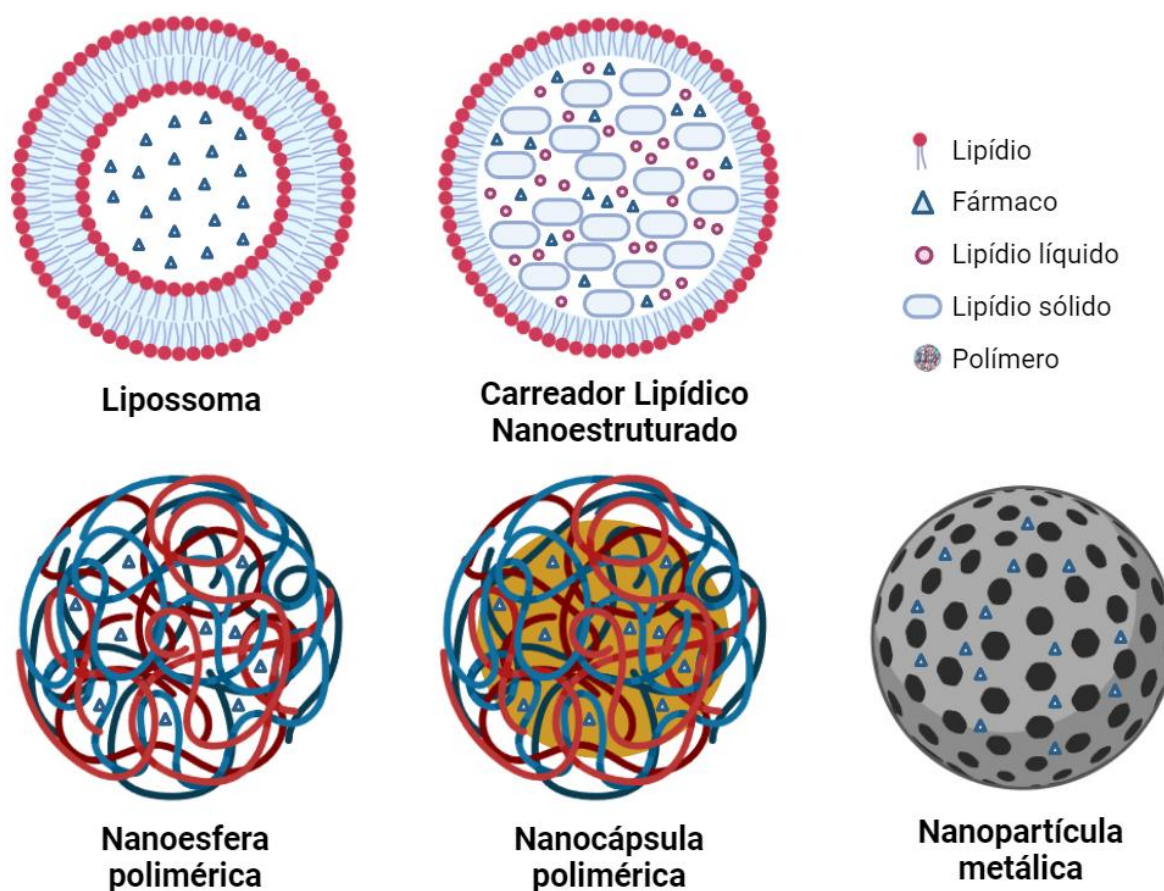
A nanotecnologia é um importante campo multidisciplinar que oferece aplicações promissoras na medicina através do desenvolvimento de nanobiossensores, proporcionando diagnósticos avançados e terapias personalizadas, aumentando significativamente a eficácia do tratamento e melhorando a qualidade de vida do paciente. Dentre as áreas que podem ser empregadas, a que mais se destaca são as inovações na entrega de medicamentos por meio de nanopartículas (Veg *et al.*, 2025).

Esses sistemas, fornecem benefícios como a redução da toxicidade do medicamento, melhora a biodisponibilidade, aumenta a estabilidade, além de possuir seletividade determinada às células e tecidos, sendo assim, a dose terapêutica para garantir sua eficácia é reduzida, minimizando as reações adversas (Lu *et al.*, 2021; Karnwal *et al.*, 2024).

No câncer, a nanotecnologia tem potencial de manipular a interface do microambiente tumoral, oferecendo novas estratégias para modular a progressão do tumor e melhorar a resposta ao tratamento (Zhao *et al.*, 2018). Além disso, as nanopartículas produzidas com fármaco podem ser utilizadas com propriedades teranósticas, permitindo a identificação precisa das lesões tumorais e a administração de tratamentos direcionados, otimizando a eficácia terapêutica e minimizando os efeitos colaterais (Gavas; Quazi; Karpiński, 2021).

Dessa forma, diversos tipos de nanossistemas podem ser utilizados com aplicação antitumoral, incluindo lipossomas, nanopartículas inorgânicas, lipídicas e poliméricas (Figura 3), uma vez que seu tamanho nanométrico permite a endocitose por tumores, reduzindo danos aos tecidos e células normais (Alrushaid *et al.*, 2023).

Figura 3. Estrutura dos principais nanossistemas utilizados para entrega de fármacos



Fonte: adaptado de Silva *et al.*, 2023

Apesar de finalidades semelhantes, esses sistemas se diferenciam quanto a sua composição e aplicação biológica. Os lipossomas são vesículas esféricas compostas por uma bicamada fosfolipídica, capazes de encapsular tanto moléculas hidrofílicas em seu núcleo aquoso quanto moléculas lipofílicas na bicamada lipídica (Lombardo; Kiselev; Caccamo, 2019). Todavia, sua capacidade de encapsulação relativamente baixa e sua dificuldade em controlar a cinética de liberação do fármaco pode comprometer a eficácia terapêutica, sendo mais utilizado para o transporte de proteínas e DNA (Silva *et al.*, 2023).

Enquanto que as nanopartículas inorgânicas são utilizadas tradicionalmente para diagnóstico, tendo em vista que sua composição (metais como ouro, prata e cobre) potencializa uma ação tóxica em células saudáveis. No entanto, suas propriedades, como alta estabilidade e facilidade de funcionalização, as tornam atrativas para terapêutica, fazendo com que seja

investigada essa liberação de íons metálicos em ambientes tumorais (Burlec *et al.*, 2023).

Os sistemas lipídicos oferecem vantagens significativas em relação a outros sistemas de entrega, como maior estabilidade, capacidade de carga e controle de liberação. A presença de lipídios líquidos e sólidos na formulação dessas partículas proporciona uma matriz desordenada, dificultando a cristalização e permitindo um armazenamento mais eficiente do fármaco (Salvi; Pawar, 2019). Entretanto, sua composição favorece uma aplicação tópica devido à biocompatibilidade com membranas biológicas, que vão permitir a incorporação do fármaco no local de aplicação (Khosa; Reddi; Saha, 2018).

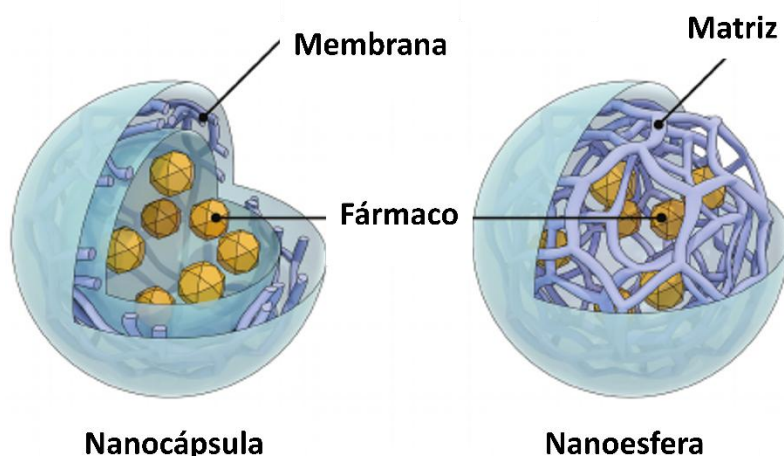
Já as nanopartículas poliméricas são sistemas protegidos por um invólucro polimérico, podendo assumir a forma de nanocápsula ou nanoesfera, o que as tornam altamente versáteis para aplicação biológica. Devido a essa composição, o fármaco fica protegido da degradação, reduzindo efeitos adversos e facilitando sua liberação controlada, além de melhorar a biodisponibilidade e solubilidade no meio (Silva *et al.*, 2023).

Estes sistemas apresentam vantagens quando comparados aos sistemas terapêuticos convencionais, melhorando a farmacocinética, farmacodinâmica e reduzindo toxicidade das substâncias com atividade contra tumores, sendo assim indicados para aplicação de novos candidatos a fármacos sintéticos bioativos (Mangas-Sanjuan *et al.*, 2013).

2.6.1. Nanocápsulas poliméricas

As nanocápsulas poliméricas (NCPs) são dispersões coloidais, com tamanhos na faixa de 10 a 1.000 nm, caracterizadas por apresentar um núcleo oleoso, estabilizado por surfactantes e envolto por um polímero. De forma semelhante, as nanoesferas também apresentam composição polimérica, no entanto, não possui um núcleo oleoso, então seu fármaco fica adsorvido na matriz (Yu *et al.*, 2023) (Figura 4).

Figura 4. Diferenças estruturais entre nanocápsulas e nanoesferas



Fonte: adaptado de Suffredini; East; Levy, 2014

A escolha dos materiais para a produção das NCPs é essencial para sua estabilidade e eficiência, uma vez que, o tamanho das nanopartículas é um fator crítico para sua eficácia como sistemas de entrega de fármacos. Partículas muito pequenas podem ser rapidamente eliminadas pelos rins, enquanto partículas muito grandes podem ser capturadas pelo sistema retículo endotelial. O intervalo de tamanho ideal para a entrega de fármacos em fluídos biológicos está geralmente entre 100 e 500 nm. A otimização do processo de produção permite controlar o tamanho das nanopartículas e ajustar suas propriedades para diferentes aplicações (Romio *et al.*, 2009).

Nesse sentido, polímeros como policaprolactona (PCL) e poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) são conhecidos por sua versatilidade, biocompatibilidade e ação não mutagênica, apresentando excelentes propriedades mecânicas e alta permeabilidade a muitos fármacos. Por terem características hidrofóbicas, estes polímeros conferem uma estabilidade para as nanopartículas quando administrado na corrente sanguínea, acarretando no aumento do tempo de circulação, concomitante com o aumento da eficácia do tratamento (Mohammadian *et al.*, 2023).

O tamanho da cadeia poliméricas, principalmente do PCL, interfere nas propriedades físico-químicas do sistema. Assim, quanto maior seu peso molecular, maior será o tamanho da partícula, a estabilidade e a porcentagem de fármaco que será carregado nas NCPs (Woodruff; Hutmacher, 2010).

Nesse ínterim, o óleo também deve cumprir requisitos para sua escolha. Primordialmente, ele precisa ser adequado para o princípio ativo de modo a evitar a sua difusão e cristalização na fase externa aquosa. Além disso, deve possuir resistência às tensões de cisalhamento aplicadas durante a emulsificação, para que resultem nanocápsulas menores. Por fim, a fase oleosa deve possuir miscibilidade com o polímero escolhido, de modo a garantir a tensão superficial do sistema (Dong *et al.*, 2009).

O surfactante desempenha um papel fundamental na formação e estabilidade das NCPs, influenciando diretamente no tamanho das partículas (Zyl *et al.*, 2004). Geralmente, concentrações mais altas levam à formação de partículas menores por formar uma barreira interfacial que previne a coalescência das gotículas da emulsão e confere uma carga superficial que repele as partículas. Por isso, a escolha do surfactante adequado é crucial para garantir a obtenção de nanopartículas com as características desejadas para cada aplicação (Szczepanowicz *et al.*, 2017).

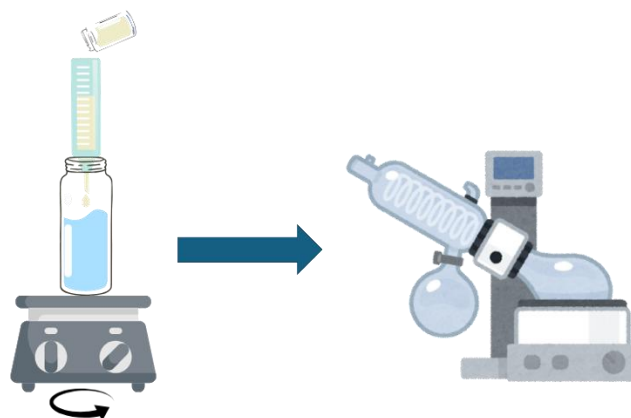
A produção dessas nanopartículas pode ser realizada através de técnicas rápidas e com pouco gasto de energia, como emulsificação-evaporação do solvente, por deslocamento do solvente, por salting-out ou por emulsificação-difusão do solvente. A montagem dos componentes é uma etapa crucial em sua produção, baseando-se primordialmente em forças físico-químicas e físicas, que se relacionam com a solubilidade das moléculas no meio e com as interações iônicas e/ou hidrofóbicas entre os diferentes compostos (Berrecoso; Crecente-Campo; Alonso, 2022).

Nesse sentido, a nanoprecipitação é uma técnica simples, direta e de baixo custo energético de encapsulamento para produção de nanopartículas. Esse método consiste na supersaturação do soluto ao misturar um solvente orgânico polar com um polímero e surfactantes, concomitante a aplicação de uma grande força motriz ao sistema para que ocorra a precipitação do soluto (Shin; Lee; Kim, 2022).

A técnica resulta em uma mistura simples após a fase orgânica ser vertida na fase aquosa gota a gota sob agitação constante, no qual, o tempo de reação é extremamente rápido; ocorrendo a formação instantânea de esferas. Por fim,

o solvente é removido do sistema utilizando sistemas de pressão reduzida (Figura 5), como o rotaevaporador (Bandyopadhyay; Mani, 2023).

Figura 5. Produção de nanocápsulas poliméricas pela técnica de nanoprecipitação



Fonte: Formiga, 2025

Esse sistema de produção é compatível com solutos hidrofóbicos e hidrofílicos, sendo necessário apenas que o solvente e o polímero sejam totalmente miscíveis. Por meio dele é possível produzir nanopartículas poliméricas homogêneas com dimensões ajustáveis de forma controlada e reproduzível, criando um nanossistema com estabilidade prolongada para sua caracterização (Yan; Bernard; Ganachaud, 2021).

2.6.2. Funcionalização e complexação com proteínas

A funcionalização de nanopartículas é uma estratégia essencial para garantir a eficácia e segurança de nanossistemas em aplicações biológicas. Esse processo envolve a modificação da superfície das partículas com moléculas como polímeros, proteínas, ligantes e anticorpos que irão melhorar sua interação com o meio biológico e torna-las mais seletivas para o tratamento de interesse (Yuan *et al.*, 2017; Valencia *et al.*, 2021).

Essas modificações podem influenciar na estabilidade das nanopartículas em fluídos biológicos, aumentando sua biodisponibilidade e a interação com as membranas celulares, o que permite um maior controle sobre a liberação dos fármacos. Entretanto, a depender do agente funcionalizantes, as NCPs podem

ser projetadas para uma entrega guiada ou com características furtivas, que impedirão a sua opsonização por células circulantes (Kumar *et al.*, 2023).

A conjugação de anticorpos, por exemplo, permite direcionar os nanocarreadores para células tumorais que expressam marcadores moleculares específicos, como HER2 (Silva *et al.*, 2023). Essa estratégia aumenta a especificidade da terapia, e reduz os efeitos colaterais. Já a adição de moléculas funcionalizantes, como a quitosana e o polietilenoglicol (PEG) vão alterar propriedades físico-químicas do sistema, como seu potencial zeta (ζ). Este parâmetro indica a carga superficial das partículas, que na presença desses polímeros serão catiônicas e neutras (Raval *et al.*, 2019).

Quando as nanopartículas possuem cargas negativas elas tendem a apresentar maior tempo de circulação sanguínea, devido à menor interação com proteínas plasmáticas. Já partículas catiônicas são mais atraídas por células tumorais, enquanto partículas neutras tendem a atravessar mais facilmente as membranas sem ser reconhecidas pelo sistema imune (Zaky *et al.*, 2023).

Ao entrar em contato com fluidos biológicos, as nanopartículas interagem com proteínas formando uma coroa proteica. A camada proteica pode ser formada ligada diretamente à superfície (coroa dura) ou ao redor do sistema sendo sensíveis as alterações no ambiente (coroa suave). Essa caracterização é fundamental para a compreensão da biodistribuição, estabilidade e interação dessas NCPs com o sistema imune (Coglitore; Janot; Balme, 2019).

Essa formação é diretamente influenciada pelas propriedades físico-químicas das nanopartículas como tamanho e carga superficial e por isso, a coroa proteica é considerada um dos principais fatores que afetam as interações biológicas das NCPs, incluindo citotoxicidade, captação e transporte (Abdelkhaliq *et al.*, 2018).

Polímeros como o PEG, por exemplo, podem reduzir a adsorção de proteínas, formando uma coroa proteica menos densa e mais estável. Por outro lado, a adsorção de proteínas específicas, como a albumina, pode direcionar as nanopartículas para tumores que expressam receptores para essa proteína (Abesekara; Chau, 2022).

Essa complexação auxilia em diversos processos farmacocinéticos, como a prolongação do tempo de meia-vida no sangue que ocorre devido a redução da capacidade de captação precoce por células fagocíticas. Associado a isso, as proteínas adsorvidas podem estabilizar a dispersão das nanopartículas, diminuindo a agregação e aumentando a solubilidade no meio. Essas características, melhoram a biodistribuição e reduzem os riscos de reações adversas, possibilitando a aplicação prolongada de fármacos em doenças crônicas (Li *et al.*, 2015).

Além disso, a formação da coroa proteica reduz o efeito de bioacumulação das nanopartículas no fígado, pois essas proteínas apresentam receptores específicos em tecidos hepáticos. Entretanto, sistemas projetados com anticorpos e ligantes podem ter sua atividade diminuída, uma vez que eles perderam a capacidade de serem reconhecidos pelos receptores presentes nas células (Jin *et al.*, 2024).

Atualmente, é avaliada a possibilidade de modular a composição dessa coroa para favorecer a interação das nanopartículas com células e tecidos específicos. Para isso, esses sistemas são pré-incubados com proteínas específicas criando partículas que simulam vesículas naturais que, por sua vez, são facilmente aceitas no organismo e diminuem a captação por células imunológicas (Simon *et al.*, 2018).

Dada a influência da funcionalização nessa complexação, são utilizadas estratégias para guiar a formação da coroa proteica de forma que beneficie a atividade biológica, utilizando partículas catiônicas quando necessitar de uma coroa dura ou partículas negativas e neutras quando essa formação da coroa precisar ser mais controlada (Abesekara; Chau, 2022).

2.7. Nanossistemas contendo isatina para aplicação antitumoral

Nanossistemas contendo isatinas têm sido investigados em aplicações antibacterianas, antioxidantes e antitumorais. Com relação a sua atividade anticâncer, um estudo *in vitro* de nanopartículas de cobre contendo chalconas à base de isatina demonstrou que das 6 moléculas sintetizadas, 2 obtiveram atividade contra câncer de mama (MCF-7), sendo significativa quando no nanossistema, com IC₅₀ de 0,00157 e 25,4 µg/mL (Cahyana *et al.*, 2023).

De forma semelhante, Maddela, Makula e Jayarambabu (2017) investigaram a ação citotóxica de nanopartículas de ferro com moléculas híbridas de isatina, onde observaram que essas partículas apresentaram atividade antitumoral frente a linhagens celulares MCF-7, HeLa (derivada de carcinoma cervical) e IMR-32 (derivada de neuroblastoma) com valores de IC₅₀ de 22,13 µM, 25,68 µM e 35,59 µM, respectivamente.

Entretanto, apesar de existir diversos estudos que avaliam a atividade antitumoral das isatinas e seus derivados, a utilização dessas moléculas em nanocreadores ainda se restringe a nanopartículas metálicas cuja a eficiência na entrega de fármacos é reduzida, além de possuir alta toxicidade e baixa seletividade às células tumorais (Krishna *et al.*, 2024).

Por isso, o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo derivados de isatina para aplicação antitumoral representa uma inovação, haja vista a ausência de estudos para a entrega avançada desse fármaco em nanossistemas. Além disso, as NCPs vão favorecer o aumento da solubilidade, biodisponibilidade e tempo de meia-vida das isatinas, fazendo com que sejam entregues de forma personalizada, a partir da modificação de sua superfície, para diferentes tipos de tumores. Essas características irão contribuir para a redução da toxicidade e aumento da seletividade do tratamento de tumores, principalmente do câncer de mama que possui alta heterogeneidade e rápida progressão.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver e avaliar a atividade antitumoral frente a células de adenocarcinoma mamário de nanocápsulas poliméricas contendo derivados de isatina.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar os derivados de isatina quanto as suas propriedades físico-químicas;
- Validar métodos analíticos para quantificação das isatinas;
- Realizar estudo de solubilidade, coeficiente de partição e cinética de degradação das isatinas;
- Desenvolver nanocápsulas poliméricas para o transporte de isatinas utilizando componentes biocompatíveis;
- Otimizar a produção através da utilização de um planejamento experimental do tipo Box-Behnken;
- Realizar a funcionalização da superfície dos carreadores com componentes biocompatíveis (quitosana e polietilenoglicol);
- Caracterizar os nanossistemas através de análises de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia, espectroscopia de infravermelho e análises térmicas;
- Realizar doseamento e eficiência de encapsulação das isatinas em cada um dos nanossistemas;
- Determinar a estabilidade dos nanossistemas otimizados sob diferentes temperaturas;
- Avaliar a interação com a proteína albumina e formação de coroa proteica;
- Avaliar a citotoxicidade das nanocápsulas frente a células MCF-7;
- Efetuar um estudo de docking molecular sobre o mecanismo de ação das isatinas no câncer de mama.

Materiais e métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local da pesquisa

A obtenção e a caracterização das nanopartículas contendo derivados de isatina foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica (BioTecFarm), localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB). As análises dos espectros de RMN unidimensionais de hidrogênio foram realizados no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB. As análises térmicas foram realizadas no Laboratório de Síntese e Caracterização de Polímeros (LSCP) e no Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC), localizados no Departamento de Engenharia de Materiais (DEM/UFPB) e no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CSS/UFPE), respectivamente. A morfologia da partícula por perfilômetro foi realizada no Laboratório Integrado de Biomateriais (LABIO), localizado no CCS/UFPB. Por fim, a avaliação da atividade antitumoral *in vitro* das nanopartículas foi realizada no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar), localizado no IPeFarM/UFPB.

4.2. Materiais

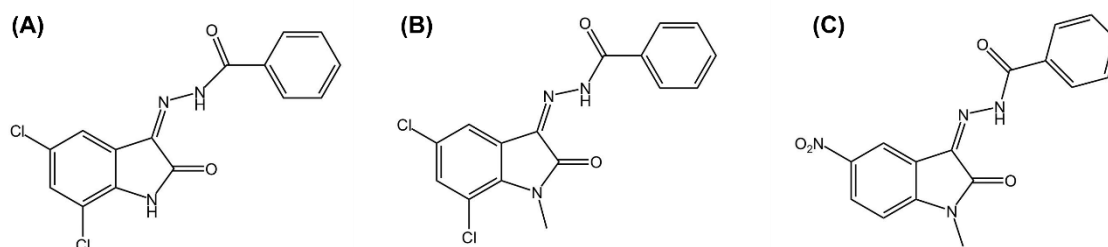
Os materiais utilizados para o desenvolvimento do estudo foram: acetonitrila para cromatografia líquida (LiChrosolv®, MERCK, Alemanha), clorofórmio deuterado (Cambridge Isotope Laboratories), Triglicerídeo de Cadeia Média (MCT- MIGLYOL® 810 N, IOI OLEOCHEMICAL, Alemanha), álcool n-octílico P.A. e Acetona P.A. (Dinâmica – Química contemporânea LTDA, Brasil), Lipoid®S100, Lipoid®Phosal50, Lipoid-PEG® 5000 (Lipoid GmbH, Alemanha), Policaprolactona 80.000 e 10.000 kDa, Span®60, Albumina Sérica Bovina (BSA) em pó liofilizado, comprimidos de tampão fosfato salino (PBS), Tween80 e 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT) (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), Kolliphor®ELP (BASF, Alemanha) e Quitosana 15 kDa (Polysciences, Inc., Pensilvânia, Estados Unidos).

4.3. Obtenção das isatinas

Três isatinas foram sintetizadas no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB) e cedidas, gentilmente, pelo Prof. Dr. Cláudio

Gabriel Lima Junior para análises físico-químicas e produção das nanopartículas. A síntese desses produtos foi realizada pela produção de bases de Schiff usando benzidrazida e derivados da isatina. Para as moléculas dicloradas foram utilizados como catalisador a bentonita assistida por micro-ondas, enquanto que para as moléculas nitradas o catalisador foi o ácido acético (Silva *et al.*, 2022). Os produtos obtidos foram nomeados no trabalho como **ISA7d** para a (Z)- N'-(5,7-dicloro-2-oxoindolin-3-ilideno) benzidrazida, **ISA8d** para (Z)-N'-(5,7-dicloro-1-metil-2-oxoindolin-3-ilideno) benzidrazida e a **ISA11d** para (Z)-N'-(5-nitro-2-oxoindolin-3-ilideno) benzidrazida (Figura 6).

Figura 6. Estrutura química da ISA7d (A), ISA8d (B) e ISA11d (C)



Fonte: adaptado de Silva *et al.*, 2022

4.4. Caracterização das isatinas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-¹H)

Os espectros de RMN de hidrogênio foram obtidos em espectrômetros Avance NEO 500 MHz (Bruker®) operados a 500 MHz para o núcleo do hidrogênio. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl₃). Os espectros foram comparados com aqueles descritos na literatura (Silva *et al.*, 2022) e confirmaram que as moléculas foram sintetizadas de forma correta, minimizando resíduos e garantindo sua aplicação biológica.

4.5. Caracterização físico-química das isatinas

4.5.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho das isatinas foram registrados num espectrofotômetro com transformada de Fourier (FTIR-ATR, Shimadzu® Cary 630) para a determinação dos grupos funcionais, analisados a uma varredura de

comprimento de onda de 400-4000 cm^{-1} , com 32 scans. As amostras encontravam-se na forma sólida e foram adicionadas ao cristal e prensadas para análise do espectro.

4.5.2. Espectroscopia de Ultravioleta-visível (UV-vis)

Os espectros de ultravioleta-visível (UV-vis) foram registrados num Espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis Agilent Technologies®. A faixa espectral de comprimento de onda (λ) foi de 200 a 800 nm, com temperatura de 25°C e caminho ótico constante de 1 cm. Os espectros processados foram plotados em gráficos utilizando o software Origin Pro 8.5 e seus dados foram submetidos a análise.

4.6. Validação das isatinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O método analítico foi validado seguindo os procedimentos da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de julho de 2017 (dispõe da validação de métodos analíticos). Foram avaliados os parâmetros de linearidade, especificidade, efeito matriz, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez (Brasil, 2017) pelo High-Performance Liquid Chromatography (Shimadzu HPLC system LC 10AT.) acoplado a detector UV-Vis SPD-20A, coluna C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) e uma pré-coluna C18 (40mm x 4.6 mm, 5 μm).

Para a análise, foi utilizada como fase móvel A, a água ultrapurificada e como fase móvel B, o solvente acetonitrila puro. Todos os solventes foram filtrados e degaseificados antes do uso para garantir pureza e evitar a formação de bolhas no sistema.

Assim, as proporções de ACN:água foram de 75:25 (ISA7d), 70:30 (ISA8d) e 45:55 (ISA11d) v/v. As taxas de fluxo foram ajustadas para 1,6 mL/min (ISA7d e ISA11d) e 1,5 mL/min (ISA8d) e volume de injeção no aparelho foi de 20 μL . Uma coluna C18 foi usada, e o detector UV foi configurado para um comprimento de onda determinado pelos parâmetros do UV-vis.

Foram preparadas soluções-mãe contendo 1mg de isatina (ISA7d, ISA8d e ISA11d) em 1 mL de acetonitrila e dela foram feitas diluições de 20 $\mu\text{g/mL}$. Os

cromatogramas resultantes foram integrados com base no tempo de retenção, sendo analisada as áreas sob os picos e resolução entre eles.

4.6.1. Linearidade

Segundo Brasil (2017), a linearidade mostra a capacidade do método de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra. O preparo foi feito a partir de soluções mãe (1mg/mL) de cada isatina (ISA7d, ISA8d e ISA11d) diluídas nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 µg/mL e replicadas três vezes. Os cromatogramas obtidos foram analisados para obter as áreas dos picos correspondentes a cada concentração.

4.6.2. Especificidade

Este parâmetro demonstra a capacidade que o método possui de analisar especificamente o analito de interesse na presença de impurezas. Para esse teste, as isatinas foram inseridas em formulações contendo componentes como polímeros, tensoativos e triglicerídeos de cadeia média (MCT), que atuaram como interferentes. Foram produzidas soluções de 1 e 10 µg/mL, injetados no sistema e submetidas a análise por HPLC.

4.6.3. Efeito matriz

É fundamental garantir que a presença de outros componentes na amostra não comprometa a quantificação do analito e afete a precisão do método analítico. Por isso, são realizados testes de efeito matriz determinados por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas.

As soluções de isatina (ISA7d, ISA8d e ISA11d) foram preparadas nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 µg/mL, contendo 10 mg de MCT, e analisados de acordo com os métodos pré-determinados. As análises foram feitas em triplicata e os resultados foram comparados de acordo com o paralelismo da reta cujo coeficiente angular deve ter um nível de até 5% de significância.

4.6.4. Precisão

Este avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas, podendo ser realizado por teste de repetibilidade, da

precisão intermediária ou da reprodutibilidade. Para isso, dois analistas, em dias consecutivos e no mesmo equipamento realizaram determinações, de acordo com o intervalo linear do método, em concentrações: baixas, médias e altas, onde cada análise foi feita em triplicata.

Para o preparo das amostras foram produzidas soluções mãe de 1 mg/mL das isatinas. A partir delas, foram feitas diluições nas concentrações de 1 µg/mL (baixa), 5 µg/mL (média) e 15 µg/mL (alta) e analisadas no método proposto.

Segundo a RDC, a precisão é expressa como sendo desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. Ela pode ser calculada segundo a equação 1 abaixo, no qual o valor máximo de desvio padrão relativo não pode ser maior que 5%.

Equação 1. Fórmula para o cálculo do desvio padrão relativo.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

*DPR = desvio padrão relativo. DP = desvio padrão. CMD = concentração média determinada

4.6.5. Exatidão

Na exatidão se avalia a proximidade dos dados encontrados utilizando-se método estudado em relação ao valor verdadeiro, sendo verificada por no mínimo 9 determinações com 3 concentrações diferentes, baixa, média e alta, de modo que todas sejam realizadas em triplicata.

Assim, foram produzidas concentrações das isatinas (variando de 1, 5 e 15 µg/mL) em 1 mL de ACN e analisadas no método proposto. Os resultados foram comparados com os da curva de calibração. O valor da exatidão foi expresso pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme descrito na equação 2.

Equação 2. Fórmula do cálculo da exatidão

$$Exatidão = \frac{Concentração\ média\ experimental}{Concentração\ teórica} \times 100$$

4.6.6. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção indica a menor quantidade do padrão que um método consegue identificar em uma amostra, embora não seja quantificada. Já o limite de quantificação define a menor quantidade que pode ser medida, com precisão e confiança, pelo método testado (Brasil, 2017). A determinação se baseia em parâmetros da curva analítica expressos na estimativa do limite de detecção (equação 3) e de quantificação (equação 4).

Equação 3. Fórmula para o cálculo do limite de detecção

$$\text{Limite de detecção} = \frac{3 \times \text{desvio padrão (eq. linha de regressão)}}{\text{Inclinação da reta obtida}}$$

Equação 4. Fórmula para o cálculo de limite de quantificação

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{10 \times \text{desvio padrão (eq. linha de regressão)}}{\text{Inclinação da reta obtida}}$$

4.6.7. Robustez

A robustez de um método é definida como sendo sua capacidade de resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Os parâmetros utilizados para avaliar a robustez do método: fluxo e composição da fase móvel, descritos na tabela 1. A robustez do método foi determinada por triplicatas das isatinas (10 µg/mL) em 1 mL de fase móvel com 10 mg de MCT. Posteriormente, os efeitos estimados foram calculados pela readequação das razões de resposta de pico da concentração encontrada em uma equação de regressão derivada da curva de calibração e o %DPR foi calculado.

Tabela 1. Parâmetros de robustez avaliados no método

Isatina	Parâmetro	Variação
ISA7d	Fase móvel B	62%
		68%
	Fluxo	1,52 mL/min
		1,68 mL/min
ISA8d	Fase móvel B	67%
		73%
	Fluxo	1,43 mL/min
		1,57 mL/min
ISA11d	Fase móvel B	43%
		47%
	Fluxo	1,52 mL/min
		1,68 mL/min

Fonte: Formiga, 2025

4.7. Estudo de solubilidade e coeficiente de partição (LogP)

O estudo de solubilidade de cada molécula foi determinado em MCT, onde em microtubos eppendorf, as isatinas foram submetidas a saturação (1mg/mL). Para solubilização, as amostras foram colocadas em banho ultrassônico por 3 horas e ao identificar formação de precipitado, centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. Por fim, retirou-se o sobrenadante, diluindo na proporção 980:20 (ACN: amostra) e inserindo no HPLC para quantificação.

O coeficiente partição decorreu de um processo semelhante ao estudo de solubilidade. Em microtubos eppendorf foram inseridos 1mL de soluções contendo água/octanol e água/MCT, assim estabelecendo soluções com compostos de diferentes polaridades. As soluções inicialmente foram submetidas a banho ultrassônico por 1 hora para promover a separação das fases. Posteriormente, 1 mg de cada molécula foram inseridos nas soluções e em seguida submetidas a mais 2 horas de banho ultrassônico para solubilização dos compostos no meio. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 14.000rpm por 5 minutos, as fases foram separadas em diferentes frascos e diluídas para análise no HPLC.

4.8. Cinética de degradação

A cinética de degradação consistiu numa análise de estabilidade das moléculas sintéticas em MCT em diferentes condições ambientais (temperatura, umidade e exposição a luz). Apesar das isatinas não serem completamente solúveis em MCT, foram realizadas soluções de 1 mg/mL de modo a saturar o sistema. Estas foram solubilizadas em banho ultrassônico por 3 h, centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min e coletadas o sobrenadante onde estava a fração solubilizada.

Para a análise de degradação em diferentes temperaturas as soluções de isatina foram armazenadas em frascos âmbar fechado sob 4, 25 e 37°C. Com relação a umidade, as isatinas foram armazenadas em frascos âmbar fechado e aberto sob temperatura ambiente. E para a avaliação da exposição a luz, as soluções foram colocadas em temperatura ambiente nos frascos fechados de cor âmbar e transparente em locais que haviam contato direto da luz.

As amostras foram diluídas na proporção 980:20 (ACN: amostra) e quantificadas por HPLC. O cálculo da concentração foi realizado com base no estudo de solubilidade das moléculas e da curva de calibração.

4.9. Desenvolvimento das nanocápsulas poliméricas (NCPs)

4.9.1. Produção das nanocápsulas poliméricas

A produção das nanocápsulas seguiu o método de nanoprecipitação de (Xavier-Junior *et al.*, 2018) com adaptações, no qual foram preparadas as fases orgânicas contendo as variáveis polímero, óleo e tensoativo lipofílico, dissolvidos em 6 mL de acetona. Esta fase orgânica foi injetada gota a gota em 12 mL de uma solução aquosa contendo o tensoativo hidrofílico. A dispersão formada foi homogeneizada por agitação magnética 700 rpm em temperatura ambiente. Posteriormente, a formulação foi concentrada para 5mL em rotaevaporador (modelo R-250 acoplado a bomba de vácuo V-855 e resfriador Chiller F-105 Buchi) de forma a extrair o solvente e obter o nanossistema concentrado.

4.9.2. Estudo de pré-formulação

Foi realizado um estudo de pré-formulação dos componentes que podem integrar esse sistema. Nesse sentido, foram avaliados diferentes polímeros e tensoativos (hidrofílicos e lipofílicos), mantendo-se constante sua concentração (Tabela 2), de forma a determinar qual seria a melhor formulação do ponto de vista físico-químico.

Como polímeros utilizados para o desenvolvimento das NCP, optou-se pelo policaprolactona (PCL) de 80.000 e 10.000 kDa. Já como tensoativos lipofílicos foram comparados o Span®60, Lipoid® s100 e Lipoid® Phosal, e como tensoativos hidrofílicos o Tween®80 e Kolliphor®ELP. Os sistemas produzidos foram armazenados e mantidos refrigerados a 4°C até as análises de caracterização.

Tabela 2. Composição geral das nanocápsulas e suas concentrações

Fase orgânica	
Substância	Quantidade
Polímero	40 mg
Acetona	6mL
MCT	50 mg
Tensoativo lipofílico	15 mg
Fase aquosa	
Tensoativo hidrofílico	24 mg
Água	12 mL

Fonte: Formiga, 2025

4.9.3. Otimização do nanossistema produzido

Foi utilizado o delineamento experimental de Box-Behnken para otimizar a produção de nanopartículas. Foram avaliadas as concentrações de óleo (MCT - 50, 175 e 300 mg), polímero (PCL - 50, 100 e 150 mg) e surfactante hidrofílico (Kolliphor®ELP – 20, 60 e 100 mg) como variáveis independentes, enquanto o diâmetro hidrodinâmico foi aplicado como variável dependente. A concentração do surfactante lipofílico (Lipoid S-100®) foi mantida constante (20 mg). As nanopartículas otimizadas (oNCPs) foram produzidas pelo método de nanoprecipitação. O software Statistica® foi empregado para análise dos dados e geração de gráficos 3D.

4.9.4. Funcionalização do nanossistema otimizado

A fim de modular a interação com albumina e células, os nanossistemas otimizados foram funcionalizados. Inicialmente foram produzidas nanopartículas contendo diferentes concentrações de quitosana (0,005 a 0,2%) em concentrações distintas de ácido acético (0,1 a 1%). Este polímero foi adicionado a fase aquosa e homogeneizado a temperatura ambiente. Também foram realizadas funcionalizações com Lipoid®-PEG 5000 em diferentes proporções com o Lipoid®s100 (20:0, 15:5, 10:10, 5:15, 0:20 mg) na fase orgânica. Além disso, foi comparada a produção dos sistemas em água e em solução tampão fosfato (PBS). O efeito dessas substâncias no tamanho das partículas foi avaliado e estas foram nomeadas de qNCP e pNCP, respectivamente. Todos os

nanossistemas produzidos foram armazenados em recipientes de vidro e mantidos refrigerados a 4°C até as análises de caracterização.

4.9.5. Incorporação das isatinas nos nanossistemas produzidos

1 mg das ISA7d, ISA8d e ISA11d foram pesados junto a fase orgânica de cada uma das NCPs, no intuito de aumentar a solubilidade dessas moléculas pela interação com outros componentes do sistema. A produção se deu pelos métodos descritos anteriormente, sendo adicionada uma etapa de centrifugação (5.000 rpm por 10 minutos) para a separar as isatinas não encapsuladas dos nanossistemas formados. Dessa forma, 9 formulações foram obtidas e armazenadas para análises de caracterização, sendo nomeadas de oNCP7d, qNCP7d e pNCP7d (**ISA7d**), oNCP8d, qNCP8d e pNCP8d (**ISA8d**), e oNCP11d, qNCP11d e pNCP11d (**ISA11d**).

4.10. Caracterização das formulações

4.10.1. Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (Pdl)

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão da partícula foram determinados pela técnica de dispersão de luz dinâmica, por meio do aparelho Zetasizer Lab® (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). As amostras foram diluídas em água Milli®Q na proporção 1:100 e analisadas sob 25°C com ângulo de detecção fixado em 90°.

4.10.2. Potencial zeta

O potencial zeta (ζ) é um indicador de carga de superfície das partículas, e foi determinado a partir da técnica de dispersão de luz eletroforética, ou *Electrophoretic Light Scattering* (ELS), usando o Zetasizer Lab®. As amostras foram diluídas em solução de NaCl à 1 mmol/L na proporção 1:100 e analisadas à 25°C.

4.10.3. Análise morfológica em perfilometria ótica

Para confirmar o tamanho e avaliar a morfologia das nanopartículas, foi utilizada a técnica de análise morfológica em superfície através de um Perfilômetro Talysurf CCI MP-Lite (Taylor Hobson, Inglaterra). Foram preparadas lâminas, contendo um esfregaço das nanopartículas, que foram analisadas sob

uma lente 50x com resolução de 1024x1024 pixel, no método de amostras de baixa refletância. Os resultados foram plotados em gráficos de superfície 3D pelo software TalyMap Lite 7.2.7481 acoplado ao equipamento.

4.10.4. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier das NCPs

Os espectros de infravermelho das formulações e dos seus componentes foram registrados num FTIR-ATR (Shimadzu® Cary 630) para a determinação dos grupos funcionais, analisados a uma varredura de comprimento de onda de 400-4000 cm^{-1} . As amostras sólidas foram adicionadas diretamente ao cristal e prensadas para análises. Para as formulações, foram adicionados 20 μL ao cristal e aguardou a evaporação de toda água do sistema para avaliar os espectros formados.

4.10.5. Análises térmicas das nanopartículas

A estabilidade térmica das NCPs foi avaliada por termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). As análises foram realizadas em cadinhos de platina e submetidas a um protocolo de aquecimento controlado em uma termobalança Hitachi STA7300 (Chiyoda, Tóquio, Japão) e em um DSC25 da TA Instruments (New Castle, Delaware, EUA), respectivamente, sob atmosfera de nitrogênio e taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, na faixa de temperatura de 25 a 300 $^{\circ}\text{C}$.

4.11. Determinação do doseamento e eficiência de encapsulação (EE%) por HPLC

O doseamento das isatinas foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência utilizado método previamente validado. A análise foi realizada sob fluxo isocrático de 1,6 mL/min na proporção ACN:água de 65:35 e λ 278nm (ISA7d), 1,5 mL/min na proporção ACN:água de 70:30 e λ 285nm (ISA8d) e 1,6 mL/min na proporção ACN:água de 45:55 e λ 320nm (ISA11d).

A determinação do doseamento da formulação foi realizada por meio de 10 μL das nanopartículas em 990 μL de ACN, agitadas em banho ultrassônico e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min. Posteriormente, uma diluição utilizando do sobrenadante para uma concentração no intervalo da curva de calibração foi realizada e em seguida analisado por HPLC.

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada pela ultrafiltração da formulação, utilizando-se filtro Amicon® Ultra 0,5 mL submetidos à centrifugação (5.000 rpm/15 minutos). O filtrado foi diluído em ACN e analisado no HPLC. A EE% foi calculada pela equação descrita abaixo.

Equação 5. Determinação da eficiência de encapsulação

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade total do composto} - \text{Quantidade do composto não encapsulado}}{\text{Quantidade total do composto}} \times 100$$

4.12. Estabilidade dos nanossistemas

A estabilidade das nanopartículas, com e sem fármaco, foi avaliada em termos do tamanho, Pdl e potencial zeta por um período de 3 meses em diferentes temperaturas (4°C, 25°C e 35°C). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados expressos em gráficos obtidos no GraphPad Prism9.

4.13. Complexação com proteínas plasmáticas

A interação entre as NCP e a albumina sérica bovina (BSA) foi investigada através da análise da formação da coroa proteica. Para isso, os nanossistemas foram incubados (1:10) com diferentes concentrações de uma solução de BSA (1 a 40 mg/mL) em um tempo fixo de 30 minutos. Posteriormente, foi fixada a concentração de BSA (5 mg/mL e 20 mg/mL) ao longo de 0,25, 0,5, 1, 4, 8 e 24 horas. O tamanho de partícula e o potencial zeta das nanopartículas foram determinados de modo a avaliar a cinética de adsorção da albumina e a formação da coroa proteica.

4.14. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

O ensaio de redução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) foi empregado para avaliar a citotoxicidade das nanopartículas contra a linhagem celular tumoral MCF-7, um tipo de adenocarcinoma mamário. Este método envolve a avaliação da viabilidade e proliferação celular através da atividade redutora das enzimas mitocondriais e citoplasmáticas. Assim, 100 µL de células foram semeados em placas de 96 poços a uma concentração de 1×10^5 células/mL. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações das isatinas e NCPs (concentração teórica de 3,125 a 100 µg/mL)

por mais 24 horas. As formulações sem fármaco e com MCT foram usadas para avaliar a citotoxicidade dos nanocarreadores vazios.

Após a incubação, o sobrenadante foi removido, e meio fresco com 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionado. As placas foram incubadas por mais 4 horas, após as quais 100 µL de uma solução de ácido clorídrico de laurilsulfato de sódio a 10% (SDS-HCl) foram adicionados para dissolver os cristais de formazan produzidos. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTek Instruments®, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA) a um comprimento de onda de 570 nm. Três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata ou quadruplicata, foram conduzidos, e os dados são expressos como a concentração que inibe o crescimento celular em 50% (IC₅₀), determinada por meio de análise de regressão não linear.

4.15. Docking molecular do mecanismo de ação

As estruturas dos derivados de isatina foram modeladas usando o software MarvinSketch v.23.14 e otimizadas usando o método MMFF semi-empírico do Spartan v.14. As estruturas cristalográficas de sete alvos envolvidos na cascata de sinalização do câncer foram selecionadas do Protein Data Bank (PDB) (Tabela 3). Como comparativo, foram selecionados antagonistas de cada um dos alvos.

Tabela 3. Alvos e ligantes utilizados em estudos de docking molecular

Alvo	PDB (ID)	Resolução	Ligante	RMSD	Referencia
Caspase 3	1RHK	2,50 Å	PRD_000231	0.802	(Becker <i>et al.</i> , 2004)
Caspase 7	8DGZ	2,80 Å	PRD_000422	0.218	(Hobbs <i>et al.</i> , 2023)
Caspase 8	1QTN	1,20 Å	Ac_IETD_aldehyde	0.434	(Watt <i>et al.</i> , 1999)
JNK1	2G01	3,50 Å	73Q	0.131	(Liu <i>et al.</i> , 2006)
p38-α	7BDO	2,70 Å	TBK	0.315	(Chiniadis <i>et al.</i> , 2021)
ERK1	4QTB	1,40 Å	38Z	0.143	(Chaikuad <i>et al.</i> , 2014)

ERK1/2	6SLG	1,33 Å	LHZ	0.281	(Ward <i>et al.</i> , 2019)
--------	------	--------	-----	-------	--------------------------------

Fonte: Formiga, 2025

O software Molegro Virtual Docker v.2013.6.0.1 foi utilizado para realizar o docking molecular. Todas as moléculas de água e os cofatores foram excluídos e antes do docking molecular, a etapa de redocking foi realizada, a fim de avaliar a precisão e confiabilidade dos resultados a partir do Root-Mean-Square Deviation (RMSD). O RMSD é uma etapa necessária para verificar se o algoritmo foi capaz de produzir a pose correta e valores ≤ 2 Å são considerados satisfatórios.

A simulação foi conduzida usando as configurações padrão. As funções de escore Plants, MolDock e ReRank scores foram utilizadas para avaliar as poses do ligante. Vinte runs foram realizados usando o algoritmo de busca MolDock SE e as 5 principais poses foram mantidas. Uma grade com raio de 15 Å e resolução de 0,30 Å foi gerada centrada nas posições dos ligantes cristalográficos nas proteínas selecionadas. As poses das substâncias e dos ligantes-padrão foram posteriormente analisadas usando o Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298.

4.16. Análise estatística

A análise estatística foi feita por comparação estabelecida através da análise de Variância (ANOVA) one way ou two-way, onde os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$ (teste de Tukey), onde o nível de significância adotado foi de 95%. Também foi utilizado o teste t quando necessário. As concentrações inibitórias médias (CI_{50}) e seus intervalos de confiança de 95% foram obtidos por análise de regressão não-linear. Foram utilizados para estas análises os programas GraphPad Prism 8.0.2 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, EUA) e Excel® versão 2108.

Resultados e Discussão

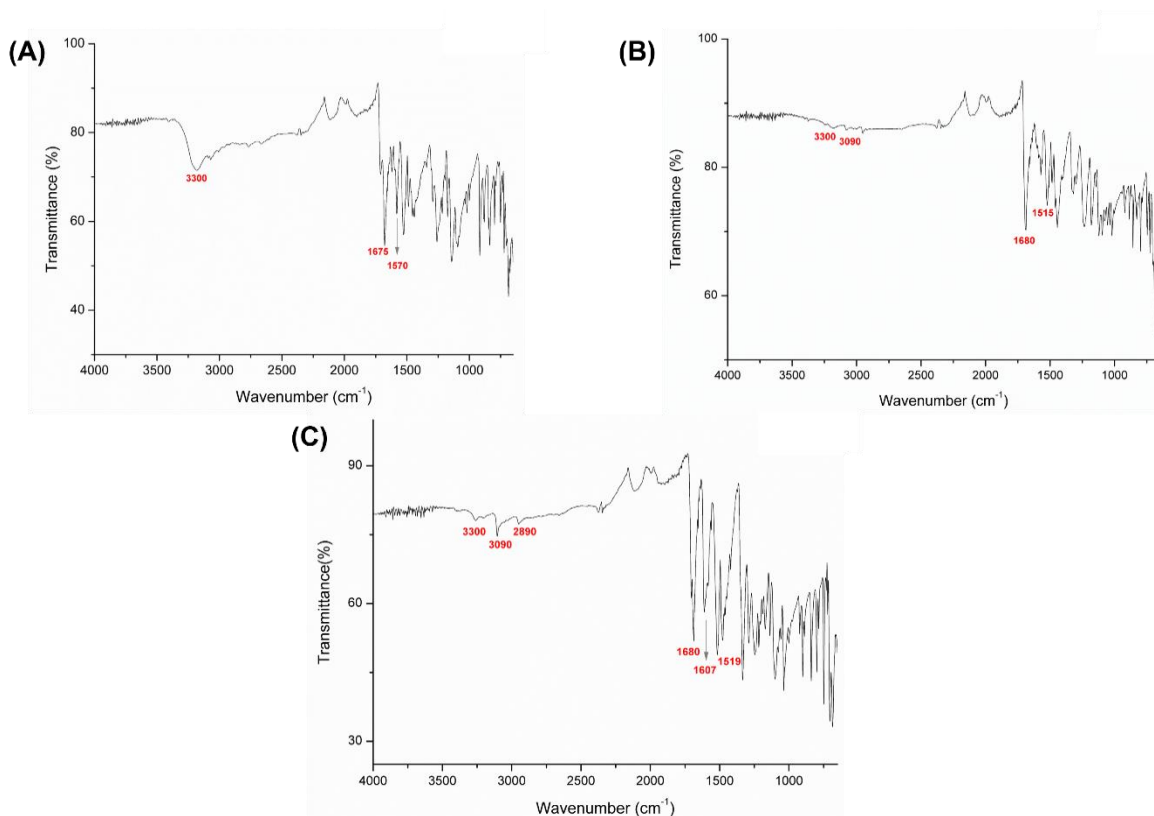
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química das isatina

5.1.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 7 apresenta os espectros de infravermelho das isatinas, onde foi possível observar sinais na região de 3300 cm^{-1} (estiramento N-H), bandas fracas em 3090 cm^{-1} (estiramento C-H sp^2 de aromáticos) e intensas próximas a 1680 cm^{-1} (estiramento C=O de amidas), além de bandas de média intensidade por volta de 1550 cm^{-1} (dobramento N-H).

Figura 7. Espectros de infravermelho das ISA7d (A), ISA8d (B) e ISA11d (C)



Fonte: Formiga, 2025

Todavia, os espectros indicam diferenças estruturais entre as isatinas, sendo confirmadas pelo aumento da intensidade do estiramento N-H para ISA7d, uma vez que ela possui mais aminas livres quando comparadas com a ISA8d e ISA11d. Estas por serem metiladas apresentam sinais referente ao estiramento de C-H sp^3 (2980 cm^{-1}). Além disso, houve o aumento da intensidade do

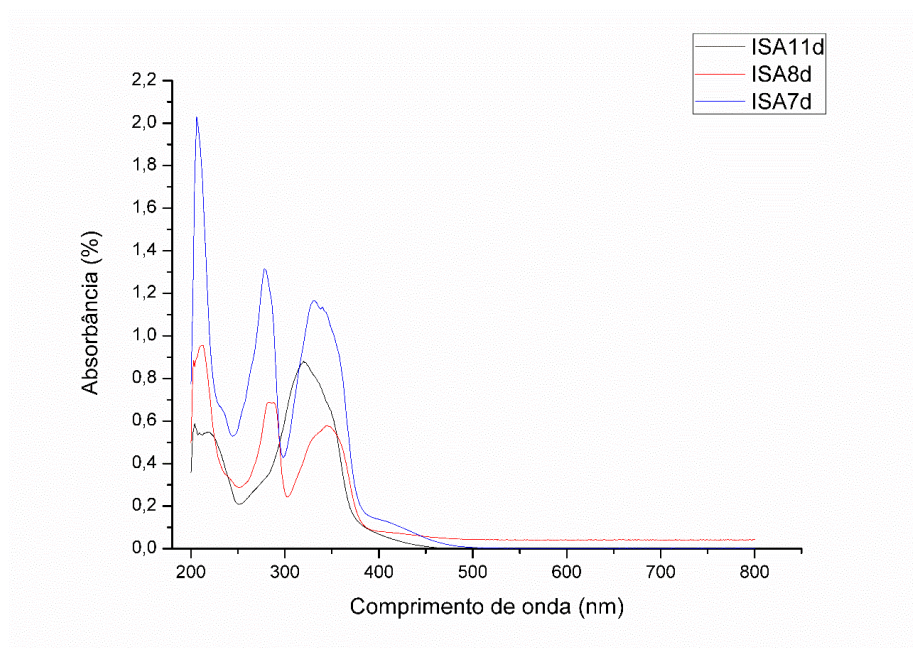
estiramento C-H sp^2 de aromáticos (3090 cm^{-1}) para a ISA11d, tendo em vista que possui menos substituições em seus anéis.

5.1.2. Espectroscopia de ultravioleta (UV-Vis)

Para detecção desses composto sintéticos foi realizada a espectroscopia de ultravioleta, com o objetivo de determinar as bandas de absorção e escolher a que apresentar o comprimento de onda máximo (λ_{max}) de maior intensidade, maximizando a resposta do detector e melhorando a precisão e sensibilidade da análise (Zhang; Wu; Sun, 2023).

Por serem semelhantes, a ISA7d apresentou duas regiões de absorção, 275 nm e 330 nm, assim como a ISA8d que obteve seu λ_{max} em 285 nm e 346 nm. Apesar da ISA11d possuir dois comprimentos de onda vistos no espectro, apenas o 320 nm foi significativo para sua identificação (Figura 8).

Figura 8. Espectros de ultravioleta das isatinas solubilizadas em acetonitrila (20 $\mu\text{g/mL}$)



Fonte: Formiga, 2025

As moléculas possuem propriedades eletrônicas e estruturais semelhantes, principalmente a ISA7d e ISA8d, que se diferenciam pela presença da metila ligada ao nitrogênio. O cloro, como grupo retirador de elétrons, reduz a densidade eletrônica do anel aromático, enquanto o grupo amida estabiliza a conjugação. Isso contribui para o deslocamento da absorção para as regiões observadas.

O pico em 278nm (ISA7d) e 285nm (ISA8d) estão relacionados às transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ no sistema conjugado da molécula que permite a delocalização de elétrons, resultando em um deslocamento para menores comprimentos de onda, denominado de efeito hipsocrômico. Em 330nm (ISA7d) e 346nm (ISA8d) as transições eletrônicas são do tipo $n \rightarrow \pi^*$, onde os elétrons não ligantes (n) do oxigênio são excitados para orbitais antiligantes π^* , e estão relacionadas ao grupo carbonila que também apresenta efeito hipsocrômico (Ishchenko *et al.*, 2018). Todavia, a ISA8d possui efeitos adicionais de estabilização devido a presença da metila e por isso tende a apresentar λ_{max} em regiões de maior absorção.

Pela ISA11d possuir um grupo nitro ($-\text{NO}_2$) ligado ao anel aromático ocorre a conjugação com o sistema, deslocando a absorção levemente para um comprimento de onda maior (320 nm), em virtude da redução de energia de transição (efeito batocrômico) (Noh *et al.*, 2022). Este pico é resultado das transições $n \rightarrow \pi^*$ relacionadas ao grupo carbonila presente na molécula.

Assim, deu-se seguimento com as análises em comprimento de onda de 275 nm, 285 nm e 320 nm por serem regiões de maior absorção e consequentemente melhor resposta do detector em relação a precisão e sensibilidade.

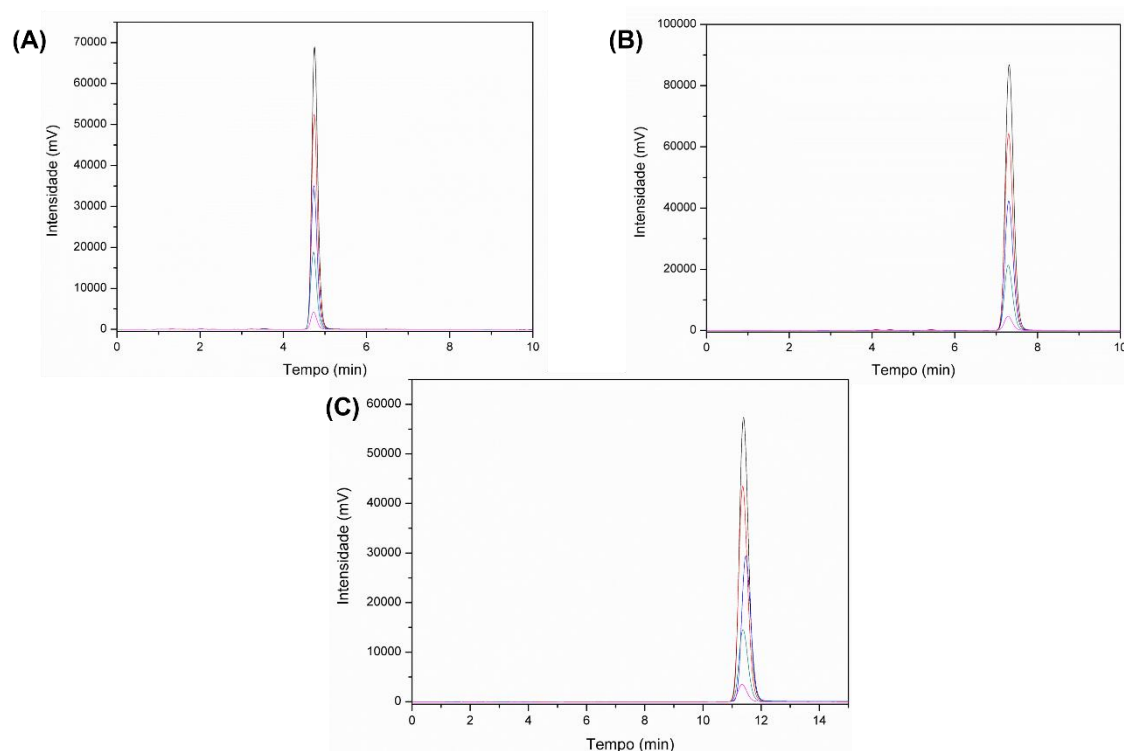
5.1.3. Validação de metodologia analítica das isatinas desenvolvida por HPLC

Após o desenvolvimento do método, foi feita sua validação na intenção de assegurar que era apropriado para a identificação e quantificação das isatinas.

5.1.3.1. Linearidade

Inicialmente foi realizada uma curva de calibração em HPLC onde as corridas para ISA7d e ISA8d obtiveram duração de 10 minutos, enquanto que para ISA11d foi de 15 minutos, com tempos de retenção de 4,5 minutos, 7,2 minutos e 11,3 minutos, respectivamente. Os picos apresentaram caráter nítido e sem muitos interferentes indicando a seletividade do método (Figura 9).

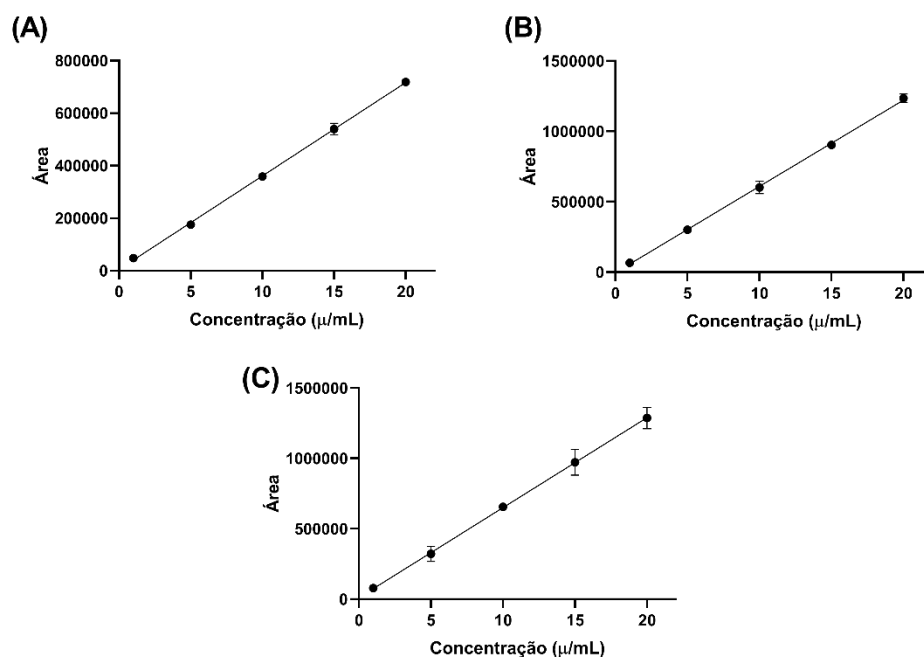
Figura 9. Cromatogramas da ISA7d (A), ISA8d (B) e ISA11d (C)



Fonte: Formiga, 2025

As curvas de calibração foram construídas com base nas áreas dos picos obtidos de cada composto, onde as equações da reta e coeficiente de determinação da regressão linear (R^2) da ISA7d, ISA8d e ISA11d foram, respectivamente: $y=35574x+5455$ e $R^2 = 0,9996$ (Figura 10A), $y = 61275x - 4049,6$ e $R^2 = 0,9995$ (Figura 10B), e $y=63934x+10368$ e $R^2 = 0,9999$ (Figura 10C). Todos os valores de R^2 foram acima de 0,999, indicando que os métodos serão fidedignos para aplicação nas demais metodologias (Sammartano *et al.*, 2023).

Figura 10. Curvas de calibração da ISA7d (A), ISA8d (B) e ISA11d (C)

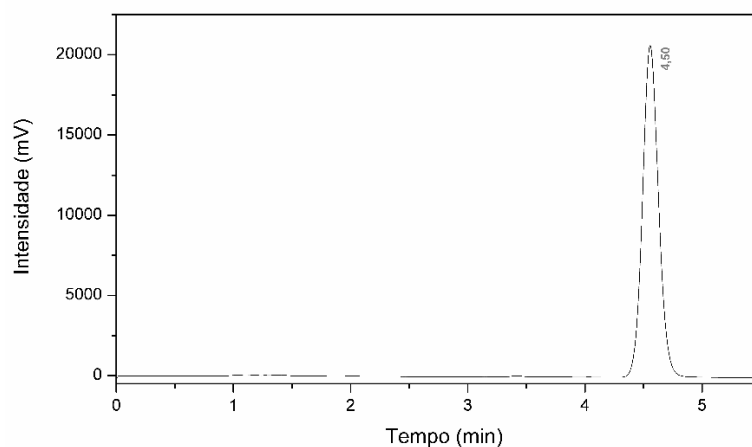


Fonte: Formiga, 2025

5.1.3.2. Especificidade

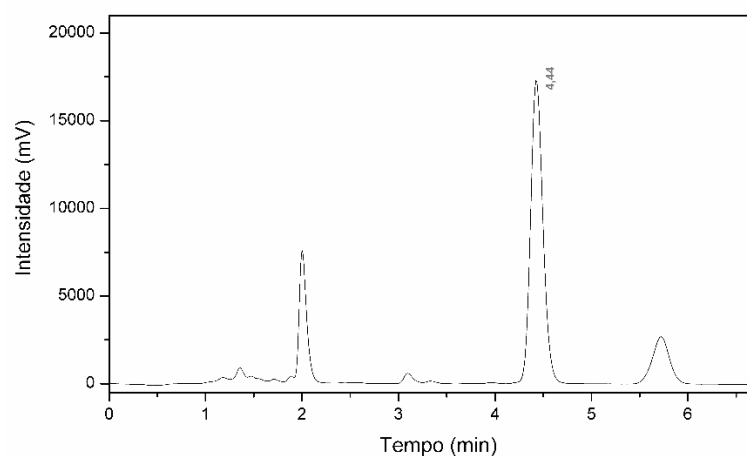
Pela análise dos cromatogramas obtidos das isatinas isoladas e nas formulações, foi visto que não existe a presença de picos coeluinto junto aos picos do padrão, como vistos nas figuras 11, 12, 33, 14, 15 e 16. Estes resultados indicam que quando as formulações foram dosadas não haverá interferência na identificação e determinação da concentração das moléculas sintéticas

Figura 11. Cromatograma da ISA7d (10µg/mL) referente à especificidade



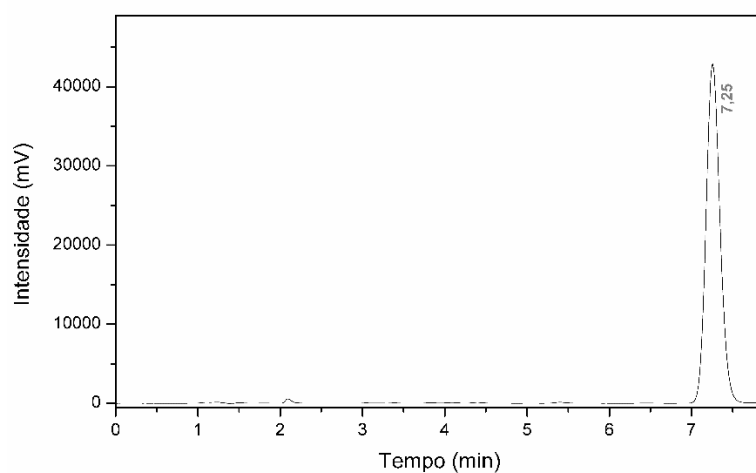
Fonte: Formiga, 2025

Figura 12. Cromatograma da formulação contendo ISA7d (10µg/mL) referente à especificidade



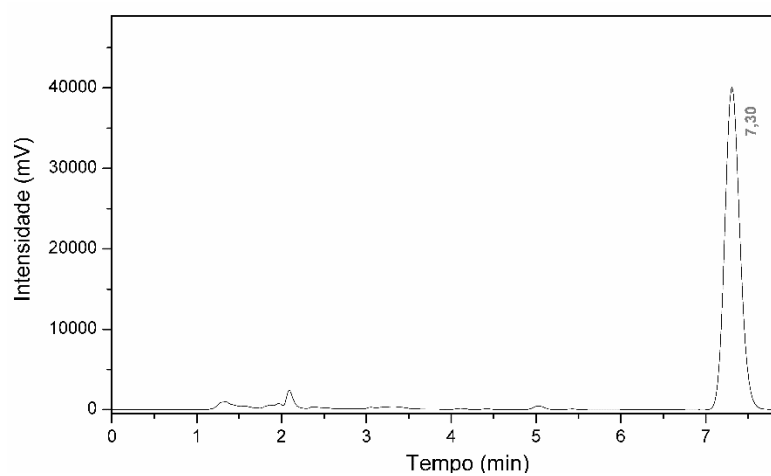
Fonte: Formiga, 2025

Figura 13. Cromatograma da ISA8d (10µg/mL) referente à especificidade

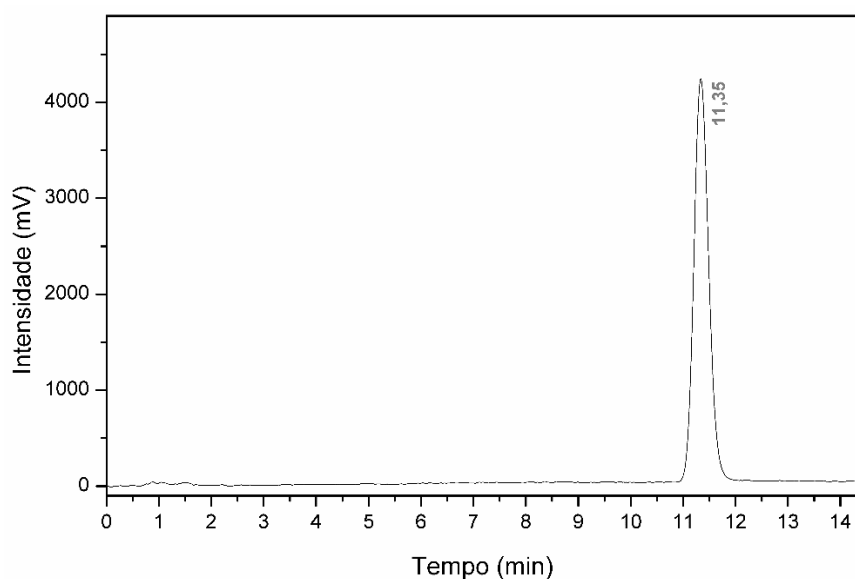


Fonte: Formiga, 2025

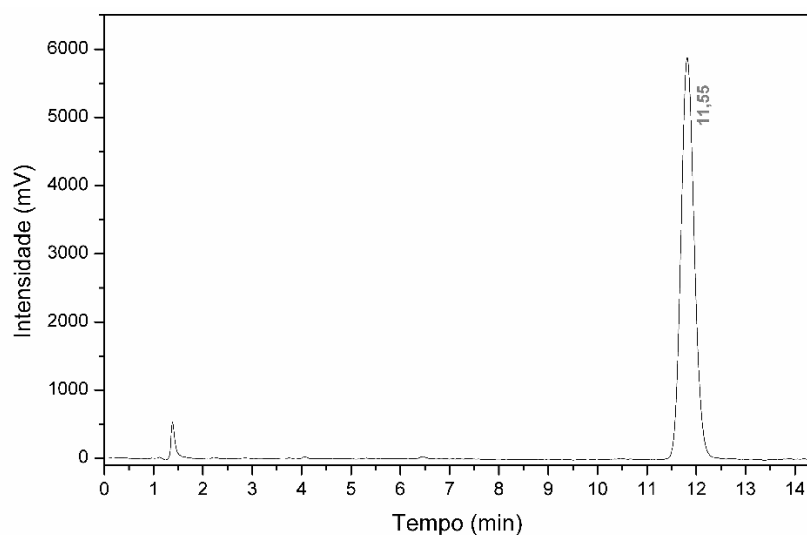
Figura 14. Cromatograma da formulação contendo ISA8d (10µg/mL) referente à especificidade



Fonte: Formiga, 2025

Figura 15. Cromatograma da ISA11d (1 μ g/mL) referente à especificidade

Fonte: Formiga, 2025

Figura 16. Cromatograma da formulação contendo ISA11d (1 μ g/mL) referente à especificidade

Fonte: Formiga, 2025

5.1.3.3. Efeito matriz

A fim de analisar o efeito matriz proveniente do óleo em que as isatinas foram solubilizadas, foi realizado um cálculo de porcentagem de variação comparando o coeficiente angular das curvas obtidas no solvente e na solução com MCT (Tabela 4), além de serem avaliados os paralelismos das retas para cada molécula (Figura 17). Com isso, foi possível concluir que não houve efeito de matriz quando analisadas as curvas dos 3 métodos, uma vez que a variação

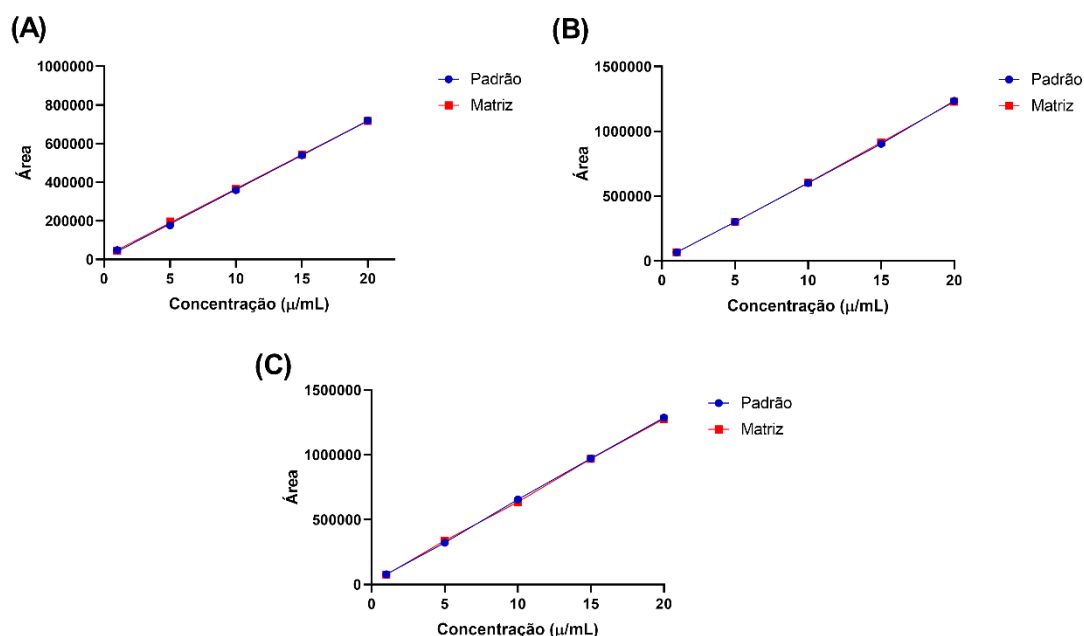
foi de no máximo 1,15%. Assim, observa-se que os métodos são eficientes para analisar as isatinas em matriz complexa como a de MCT.

Tabela 4. Variação percentual do coeficiente angular derivado da análise do efeito matriz proveniente da adição de MCT

Isatina	Equação padrão	Equação matriz	Variação (%)
ISA7d	$63934x + 10368$	$63196x + 14449$	1,15
ISA8d	$61275x - 4049,6$	$61204x - 1494,9$	0,12
ISA11d	$35574x + 5455$	$35266x + 13160$	0,86

Fonte: Formiga, 2025

Figura 17. Análise comparativa do coeficiente angular das curvas de ISA7d (A), ISA8d (B) e ISA11d (C)



Fonte: Formiga, 2025

5.1.3.4. Precisão

A precisão foi determinada em dois dias consecutivos por dois analistas diferentes e mesmo equipamento para a obtenção dos valores de reprodutibilidade. O valor dos teores e desvios padrão relativos estão expressos nas tabelas 5, 6 e 7 para os analistas 1 e 2.

Tabela 5. Valores encontrados pelos analistas 1 e 2 para a ISA7d no teste de precisão (reprodutibilidade)

		Concentração (µg/mL)	CMD (µg/mL)	DP	DPR (%)
Analista 1	Baixa	1,08	1,08	0,0017	0,16
		1,09			
		1,08			
	Média	5,06	5,07	0,0018	0,03
		5,07			
		5,29			
	Alta	15,03	15,06	0,0463	0,31
		15,09			
		15,06			
Analista 2	Baixa	1,08	1,08	0,0086	0,8
		1,07			
		1,08			
	Média	5,07	5,07	0,0062	0,12
		5,06			
		5,03			
	Alta	15,06	15,09	0,0466	0,31
		15,13			
		14,99			

*CMD: Concentração Média Determinada. DP: Desvio Padrão. DPR: Desvio Padrão Relativo

Fonte: Formiga, 2025

Tabela 6. Valores encontrados pelos analistas 1 e 2 para a ISA8d no teste de precisão (reprodutibilidade)

		Concentração (µg/mL)	CMD (µg/mL)	DP	DPR (%)
Analista 1	Baixa	1,13	1,12	0,0068	0,60
		1,12			
		1,12			
	Média	5,11	5,08	0,0389	0,77
		5,04			
		5,10			
	Alta	15,04	15,05	0,0095	0,06
		15,05			
		14,99			
Analista 2	Baixa	1,13	1,12	0,0164	1,47
		1,10			
		1,11			
	Média	5,12	5,06	0,0812	1,60
		4,97			
		5,10			
	Alta	15,05	15,07	0,0162	0,23
		14,99			
		15,08			

*CMD: Concentração Média Determinada. DP: Desvio Padrão. DPR: Desvio Padrão Relativo

Fonte: Formiga, 2025

Tabela 7. Valores encontrados pelos analistas 1 e 2 para a ISA11d no teste de precisão (reprodutibilidade)

		Concentração (µg/mL)	CMD (µg/mL)	DP	DPR (%)
Analista 1	Baixa	1,01	1,02	0,0101	0,99
		1,02			
		1,01			
	Média	5,11	5,06	0,0696	1,38
		5,01			
		4,93			
	Alta	14,99	15,07	0,1163	0,77
		15,15			
		15,01			
Analista 2	Baixa	1,02	1,05	0,0386	3,67
		1,08			
		1,00			
	Média	5,13	5,06	0,0958	1,89
		4,99			
		5,02			
	Alta	15,07	15,00	0,0971	0,65
		14,93			
		15,01			

*CMD: Concentração Média Determinada. DP: Desvio Padrão. DPR: Desvio Padrão Relativo

Fonte: Formiga, 2025

Dessa forma, foi visto que o desvio padrão relativo apresentado nas análises feitas pelos analistas 1 e 2 não ultrapassou o $DPR < 5\%$ (Brasil, 2017). Esses resultados demonstram que o método é preciso e admite variações entre analistas. Além disso, foi feita análise estatística utilizando o teste t, onde foi visto que o T calculado é menor que o t crítico, para todas as concentrações (Tabela 8), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações obtidas nos dois dias (confiança de 95%).

Tabela 8. Valores de p obtidos no test t e DPR para as diferentes concentrações de isatina entre os analistas

Isatina	Concentração	DPR(%)	p
ISA7d	Baixa	0,74	0,08
	Média	1,87	0,24
	Alta	0,32	0,46
ISA8d	Baixa	1,07	0,14
	Média	1,14	0,26
	Alta	0,23	0,10
ISA11d	Baixa	2,70	0,29
	Média	1,45	0,32
	Alta	0,50	0,24

Fonte: Formiga, 2025

Por isso, de acordo com todos os resultados obtidos, o doseamento das isatinas pelo método proposto é preciso, estando seus desvios padrão relativos dentro dos limites exigidos.

5.1.3.5. Exatidão

Este parâmetro foi avaliado conforme a proximidade dos dados encontrados com os valores esperados, sendo calculado pela taxa de recuperação das isatinas em cada um dos níveis, conforme visto na tabela 9.

Tabela 9. Resultados encontrados através dos testes de exatidão nos três níveis

Isatina	Nível	Concentração (µg/mL)	%R	%RM	DP	DPR (%)
ISA7d	Baixo	0,99	99	98,7	0,01	0,01
		1,00	99			
		0,97	97			
	Médio	4,86	99	98,9	0,02	0,02
		4,72	98			
		4,82	99			
	Alto	14,91	99	99,0	0,04	0,04
		14,86	99			
		14,80	99			
ISA8d	Baixo	1,16	102	101,6	0,01	0,01
		1,14	100			
		1,15	101			
	Médio	5,05	101	100,4	0,02	0,02
		4,97	100			
		4,99	100			
	Alto	15,12	101	101,1	0,04	0,04
		15,11	101			
		15,09	101			
ISA11d	Baixo	1,046	100	99,3	0,02	0,02
		1,024	99			
		1,026	99			
	Médio	4,69	96	97,7	0,18	0,20
		4,69	96			
		5,02	100			
	Alto	14,76	98	99,2	0,29	0,30
		15,08	100			
		14,89	99			

* %R: Porcentagem de recuperação. %RM: Porcentagem de recuperação média. DP: Desvio padrão. DPR: Desvio Padrão Relativo

Fonte: Formiga, 2025

Pela análise dos dados foi observado que os valores de recuperação estavam dentro do esperado, cujas médias representaram $98,9 \pm 0,1$ (ISA7d), $101,0 \pm 1,0$ (ISA8d) e $98,4 \pm 0,7$ (ISA11d), Através do tratamento estatístico feito por análise de variância (ANOVA de fator único), foi visto que não houve diferença significativa para ISA7d ($p=0,9$), ISA8d ($p=0,1$) e ISA11d ($p=0,5$) na recuperação dos três níveis no intervalo de confiança de 95%. Isto prova que o método é exato para a quantificação das isatinas.

5.1.3.6. Limite de detecção e limite de quantificação

Estes parâmetros foram calculados com base na extrapolação dos dados da curva de calibração, por meio do desvio padrão (equação da linha de regressão) determinado pelo erro padrão da estatística de regressão. Dessa forma, os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 19,3 ng/mL e 64,3 ng/mL para ISA7d, 39,0 ng/mL e 129,9 ng/mL para ISA8d, 36,1 ng/mL e 142,0 ng/mL para ISA11d.

5.1.3.7. Robustez

Na robustez foram avaliadas as variáveis: fluxo e fase móvel. Foram analisadas amostras das isatinas cujos resultados podem ser vistos nas tabelas de 10 a 12.

Tabela 10. Condições de robustez (fluxo e composição da fase móvel) do método HPLC para ISA7d (10 µg/mL) em fase móvel contendo 10 mg/mL de MCT

Parâmetro	Condição	Concentração (µg/mL)	DP	DPR (%)
Fase móvel B (%)	62	9,9	0,0089	0,09
	68	10,2	0,0076	0,07
Fluxo (mL min ⁻¹)	1,52	10,4	0,0319	0,31
	1,68	9,8	0,0207	0,22

DP: Desvio padrão. DPR: Desvio Padrão Relativo

Fonte: Formiga, 2025

Tabela 11. Condições de robustez (fluxo e composição da fase móvel) do método HPLC para ISA8d (10 µg/mL) em fase móvel contendo 10 mg/mL de MCT

Parâmetro	Condição	Concentração (µg/mL)	DP	DPR (%)
Fase móvel B (%)	67	9,8	0,0188	0,19
	73	9,9	0,0511	0,05
Fluxo (mL min ⁻¹)	1,43	10,3	0,0057	0,51
	1,57	9,9	0,0186	0,19

DP: Desvio padrão. DPR: Desvio Padrão Relativo

Fonte: Formiga, 2025

Tabela 12. Condições de robustez (fluxo e composição da fase móvel) do método HPLC para ISA11d (10 µg/mL) em fase móvel contendo 10 mg/mL de MCT

Parâmetro	Condição	Concentração (µg/mL)	DP	DPR (%)
Fase móvel B (%)	43	9,8	0,0187	0,19
	47	10,0	0,1813	1,81
Fluxo (mL min ⁻¹)	1,52	10,2	0,0239	0,22
	1,68	9,8	0,0161	0,17

DP: Desvio padrão. DPR: Desvio Padrão Relativo

Fonte: Formiga 2025

Em todas as condições de robustez, foram observadas pequenas variações (máximo 1,81%), indicando que esses parâmetros não alteraram significativamente a área do pico das moléculas. Além disso, não foram observados interferência nos picos em todas as condições de estabelecidas. Portanto, o método desenvolvido foi robusto para dosar as isatinas em uma matriz complexa como o MCT.

5.1.4. Estudo de solubilidade e coeficiente de partição (LogP)

O estudo de solubilidade demonstra que as isatinas obtiveram baixa solubilidade em MCT (Tabela 13). Quando comparadas, a ISA8d foi a que apresentou mais afinidade com a fase oleosa (476,7 µg/mL), que pode estar atrelado a diferença de polaridade entre os compostos sintéticos.

Tabela 13. Solubilidade das isatinas em MCT

Isatinas	Solubilidade em MCT (mg/mL)
ISA7d	351,0 ± 1,21
ISA8d	476,7 ± 0,83
ISA11d	178,5 ± 2,04

Fonte: Formiga, 2025

Por isso, avaliou-se o coeficiente de partição que é uma etapa fundamental no estudo de formulações líquidas, uma vez que analisa o comportamento da substância em ambientes químicos com diferentes polaridades (Xavier Junior *et al.*, 2016). Dessa forma, a solubilidade em MCT foi comprovada pelo coeficiente da ISA8d (>1,05) que foi maior em relação a ISA7d (>0,80) e ISA11d (>0,78), como visto na tabela 14.

Tabela 14. Coeficiente de partição das isatinas

Amostras	Componentes	Concentração (mg/mL)	Valor de P (óleo/água)	logP
ISA7d	MCT	0,19 ± 0,15	6,3	0,80
	Água	0,030 ± 0,01		
	n-octanol	1,35 ± 0,01	3,2	0,50
	Água	0,42 ± 0,05		
ISA8d	MCT	0,58 ± 0,10	11,4	1,05
	Água	0,05 ± 0,04		
	n-octanol	0,54 ± 0,23	8,9	0,95
	Água	0,60 ± 0,02		
ISA11d	MCT	0,36 ± 0,04	6,0	0,78
	Água	0,06 ± 1,20		
	n-octanol	0,33 ± 0,02	5,7	0,75
	Água	0,06 ± 0,05		

Fonte: Formiga, 2025

Os triglicerídeos de cadeia média são classificados como lipídios neutros, compostos por ácidos graxos com comprimentos da cadeia carbônica variando entre 6 e 12. Por apresentar este caráter neutro, o MCT é muito utilizado em formulações como meio para solubilizar ativos lipofílicos sem interferir na atividade biológica (Mayookha *et al.*, 2024).

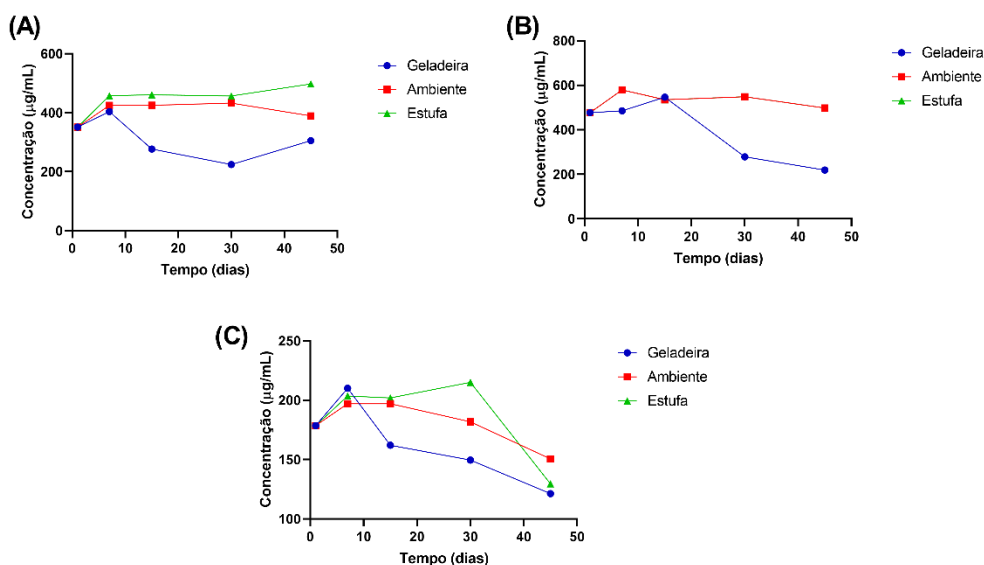
Nesse sentido, observou-se que as isatinas possuem uma lipofilicidade moderada, apesar de não solubilizar de forma eficiente em MCT. Esse fato pode ser resultado da eletronegatividade dos átomos presentes nas moléculas que atraem os elétrons compartilhados com mais intensidade, criando um momento dipolo que influencia nas propriedades físicas e químicas das moléculas, como a solubilidade (Ghosh; Gupta, 2006; Velasco-Bejarano *et al.*, 2024).

A ISA7d apresenta dois átomos de cloro no anel aromático, que são relativamente apolares, mas levemente eletronegativos. De forma semelhante, a ISA8d também possui essa composição, no entanto, apresenta um grupo metila que a deixa menos polar. A ISA11d dispõe de grupo nitro, altamente eletronegativo, que promove uma distribuição desigual da carga, fazendo com que esse composto seja o mais polar entre as moléculas (Velasco-Bejarano *et al.*, 2024).

5.1.5. Cinética de degradação

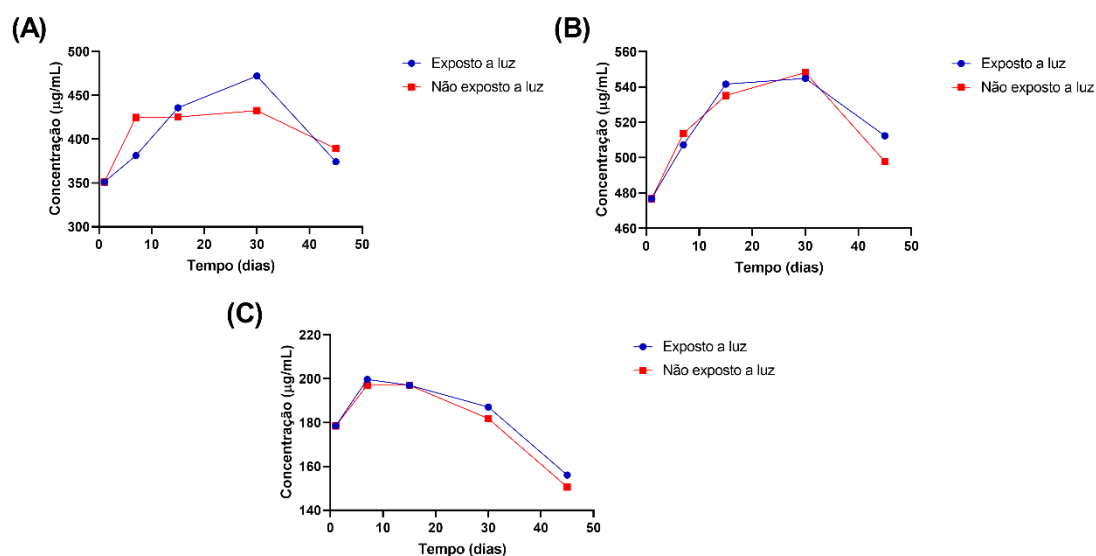
A cinética de degradação possibilitou avaliar se as isatinas, em contato com a matriz oleosa, sofria deterioração em diferentes condições de temperatura (Figura 18), exposição a luz (Figura 19) e umidade (Figura 20) por 45 dias.

Figura 18. Avaliação das ISA7d (A), ISA8d(B) e ISA11d(C) em matriz oleosa sob diferentes temperaturas



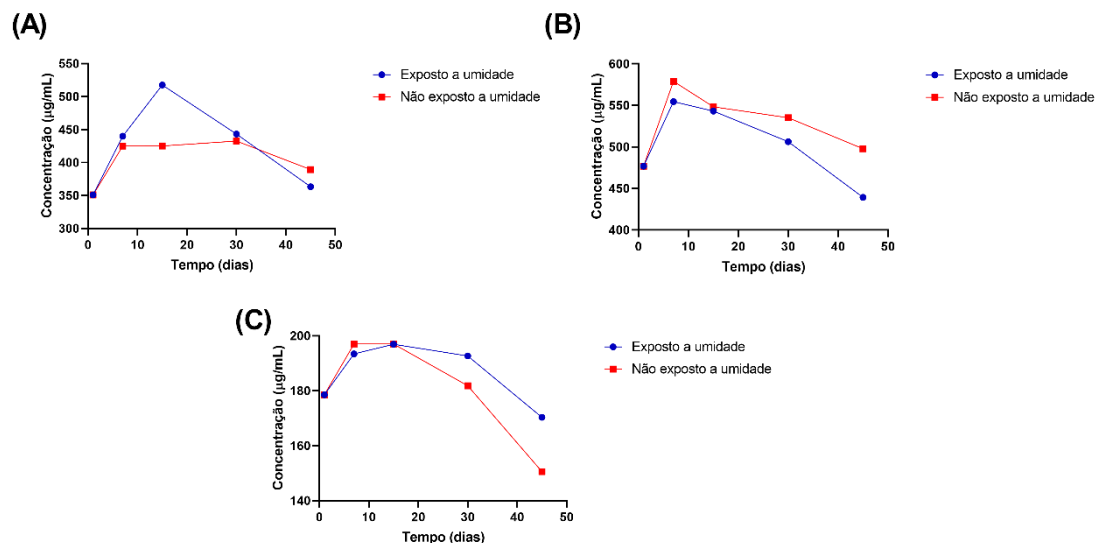
Fonte: Formiga, 2025

Figura 19. Avaliação das ISA7d (A), ISA8d(B) e ISA11d(C) em matriz oleosa sob exposição a luz



Fonte: Formiga, 2025

Figura 20. Avaliação das ISA7d (A), ISA8d(B) e ISA11d(C) em matriz oleosa sob condições de umidade



Fonte: Formiga, 2025

Foi possível observar que o tempo de contato entre as isatinas e o óleo favoreceram a solubilidade, independentemente das condições ambientais. Entretanto, em temperaturas elevadas (25 e 37°C) a intensidade do pico obtido por HPLC foi maior, indicando maior solubilização, enquanto que em temperaturas mais baixas (4°C) não favoreceu essa interação. A degradação só foi observada acima de 30 dias para todas soluções, porém os sinais de deterioração foram maiores para aquelas armazenadas em geladeira.

O perfil de exposição a luz foi diferente quando comparadas às isatinas, onde a ISA7d tendeu a se manter constante quando armazenado ao abrigo da luz, que a longo prazo favoreceu a diminuição da sua degradação. Já a ISA8d e ISA11d não obtiveram diferenças significativas desse parâmetro, indicando que a exposição da luz não alterou o perfil de degradação num período de 45 dias.

A umidade favoreceu a solubilização das ISA7d e ISA8d em 15 dias, contudo a longo prazo essa exposição levou a maior degradação das substâncias. Entretanto, para ISA11d a umidade não só garantiu que ela solubilizasse de forma constate, como também protegeu de deteriorar em 45 dias, sendo a única solução que não apresentou picos de degradação.

Moléculas sintéticas exibem diversos perfis de estabilidade sob condições ambientais variadas, podendo sofrer degradação em sua forma isolada. Quando em matriz complexa, como o MCT, pode sofrer proteção devido as características físico-químicas do óleo. Entretanto, a longo prazo os óleos são suscetíveis à degradação, principalmente, quando expostos a altas temperaturas e luz. Por isso, condições de armazenamento adequadas, como temperaturas mais baixas e escuridão, podem aumentar a estabilidade do óleo (Dintcheva; D'Anna, 2019).

De forma geral, temperaturas mais altas aumentam a solubilização de moléculas sintéticas em óleos (Abbasi; Radi, 2016), uma vez que é conduzida por ganhos de entalpia, que são menos favoráveis em temperaturas mais baixas (Zhang *et al.*, 2015). Por isso, conforme a temperatura aumenta, a capacidade de ligação é favorecida assim como a solubilização. Contudo, aumento da entropia (desordem das moléculas em altas temperaturas) pode conduzir o processo de degradação o que anula o efeito de entalpia no sistema (Al-Mulla, 2012).

Alguns compostos degradam-se mais rapidamente quando expostos ao ar e umidade, o que pode levar à oxidação e outras reações que não envolve alterações na temperatura (Stathopoulos *et al.*, 2020). Por isso, esperava-se que a ISA11d, sofressem alterações consideráveis quando expostas à luz e umidade, de modo que seus grupos funcionais, principalmente o NO₂ (Liu *et al.*, 2020), favorecem reações de oxidação. Porém, acredita-se que a interação com o MCT, protegeu a moléculas de sofrer degradação a longo prazo, por manter ligações estáveis. Nessa perspectiva, buscou-se comparar se essa estabilidade se manteria ou melhoraria quando as isatinas fossem carregadas em nanossistemas poliméricos.

5.2. Desenvolvimento e caracterização das nanocápsulas poliméricas (NCPs)

5.2.1. Estudo de pré-formulação

O estudo de pré-formulação é essencial para escolher os componentes da formulação de acordo com suas propriedades físico-químicas, garantindo a compatibilidade e otimizando parâmetros de formulação e de produção (Chaurasia; Arora; Arora, 2024).

Por isso, diferentes polímeros e tensoativos (hidrofílicos e lipofílicos) foram associados, com concentração constante, de forma a determinar qual seria a melhor formulação. Dessa forma, foram propostas 12 combinações variando esses componentes e avaliou-se qual apresentava melhores parâmetros de tamanho, Pdl e potencial zeta (Tabela 15).

Tabela 15. Composição e resultados das amostras na produção das NCPs

Código	Composição			Parâmetros físico-químicos		
	Polímero	TL*	TH*	Tamanho (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
F01	PCL80	Span60	Tween80	272,7±3,5	0,21±0,10	-44,8±1,3
F02	PCL80	Lipoid s100	Tween80	266,8±4,5	0,14±0,02	-37,3±1,4
F03	PCL80	Lipoid phosal	Tween80	261,8±2,9	0,14±0,04	-38,7±2,2
F04	PCL80	Span60	Kolliphor	280,2±4,1	0,14±0,00	-40,7±0,8
F05	PCL80	Lipoid s100	Kolliphor	257,3±5,5	0,14±0,03	-36,5±0,8
F06	PCL80	Lipoid phosal	Kolliphor	253,9±5,6	0,13±0,02	-30,6±1,3
F07	PCL10	Span60	Tween80	269,8±3,1	0,14±0,02	-33,9±1,6
F08	PCL10	Lipoid s100	Tween80	255,0±4,1	0,12±0,03	-26,1±0,8
F09	PCL10	Lipoid phosal	Tween80	238,7±0,7	0,08±0,03	-27,4±0,8
F10	PCL10	Span60	Kolliphor	256,0±1,9	0,08±0,01	-30,5±0,9
F11	PCL10	Lipoid s100	Kolliphor	235,0±1,6	0,06±0,03	-26,1±0,2
F12	PCL10	Lipoid phosal	Kolliphor	221,4±1,1	0,08±0,02	-30,5±0,9

*Policaprolactona Mn 80.000 e Policaprolactona Mn 10.000. ** Span®60, Lipoid® s100 ou Lipoid® Phosal. *** Tween®80 e Kolliphor®ELP

Fonte: Formiga, 2025

Esses parâmetros são essenciais para eficácia dos nanossistemas, haja visto que o direcionamento passivo de agentes terapêuticos para tecidos está diretamente relacionado com o tamanho das partículas (Danaei *et al.*, 2018). Por isso, o presente estudo buscou o desenvolvimento de nanopartículas variando de 100 e 400 nm, pois esses tamanhos favorecem sua internalização em células tumorais.

Além disso, buscou-se desenvolver NCPs com componentes seguros para administração em organismo humano. O MCT foi utilizado como óleo das nanocápsulas por prevenir a difusão e cristalização durante a preparação do sistema, bem como por não degradar o polímero (Souto; Severino; Santana, 2012). Apesar de não solubilizar o princípio ativo de forma eficiente, o MCT é seguro e não interfere na atividade biológica do fármaco.

Foi priorizado formulações com PCL10 por ele apresentar um baixo peso molecular e, conseqüentemente, poder ser utilizado em altas concentrações e

encapsular maiores quantidades de óleo (Ghosh; Pramanik, 2010). Somado a isso, o PCL é mais adequado para sistemas de administração de medicamentos de longo prazo, devido sua solubilidade e degradabilidade (Deng *et al.*, 2020).

Por ser um tensoativo seguro, o KolliphorELP® foi preferido em relação ao Tween80®, do qual já foi relatado reação adversa em altas concentrações (Xie *et al.*, 2024). Por fim, o Lipoids100® foi escolhido por possui maior segurança para administração intravenosa que é via estipulada para a formulação de interesse (Angel-Isaza; Bustamante-Cristancho; Uribe-B, 2020).

5.2.2. Otimização do nanossistema

O design experimental resultou em 15 formulações diferentes de NCPs. Estas apresentavam-se com aparência macroscópica branca leitosa, tamanho variando entre 239,8 e 359,8 nm, Pdl de 0,12 a 0,54, e potencial zeta de -12,8 e -28,7 mV (Tabela 16). Além disso, foram realizadas análises do diagrama de Pareto e gráficos de superfície de resposta para descobrir os efeitos significativos de cada variável independente e suas interações.

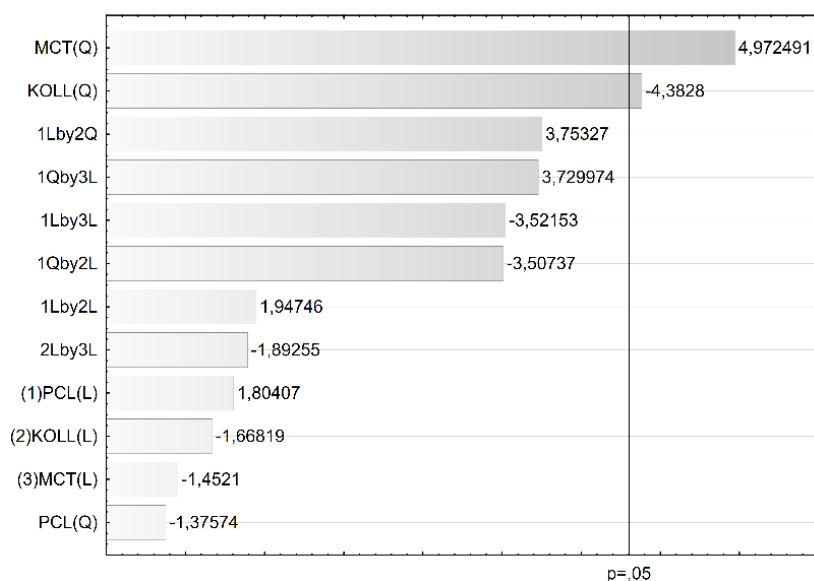
Tabela 16. Planejamento fatorial do tipo Box-Behnken

NCP	Variáveis independentes			Tamanho (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
	PCL (mg)	Kol* (mg)	MCT* (mg)			
1	50	20	175	357,7±7,0	0,51±0,05	-28,7±0,3
2	100	60	175	317,3±3,7	0,25±0,02	-19,3±0,7
3	50	100	175	336,7±12,3	0,24±0,02	-23,9±0,9
4	100	100	300	271,8±4,0	0,37±0,03	-23,4±0,4
5	100	20	300	359,8±29,9	0,54±0,04	-25,7±0,9
6	100	100	50	264,4±3,5	0,17±0,03	-20,0±0,4
7	100	60	175	290,0±3,0	0,27±0,02	-22,8±0,7
8	50	60	50	239,8±1,35	0,12±0,02	-20,1±0,4
9	150	60	50	354,6±2,6	0,22±0,04	-23,6±1,8
10	50	60	300	249,1±3,9	0,36±0,04	-23,6±1,0
11	150	100	175	357,5±9,0	0,20±0,05	-15,1±0,7
12	100	20	50	300,7±7,9	0,15±0,11	-12,8±0,3
13	150	20	175	325,3±12,1	0,17±0,08	-19,9±1,2
14	100	60	175	302,8±5,6	0,23±0,01	-24,8±0,1
15	150	60	300	267,7±11,8	0,35±0,02	-21,6±1,0

*Kol: Kolliphor®ELP. MCT: Triglicerídeo de cadeia média

Fonte: Formiga, 2025

O diagrama de Pareto revelou as variáveis mais influentes no tamanho das NCPs, quantificando seus efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) (Figura 21). Em modelos estatísticos, as interações lineares indicam uma relação direta e proporcional entre duas variáveis. Por sua vez, as interações quadráticas permitem modelar relações mais complexas incluindo termos quadráticos e de interação, obtendo a curva na superfície de resposta (Ockuly *et al.*, 2017). O modelo proposto apresentou R^2 de 0,985, sendo capaz de explicar 98,5% da variabilidade entre os valores previstos e observados, demonstrando a confiabilidade das previsões geradas.

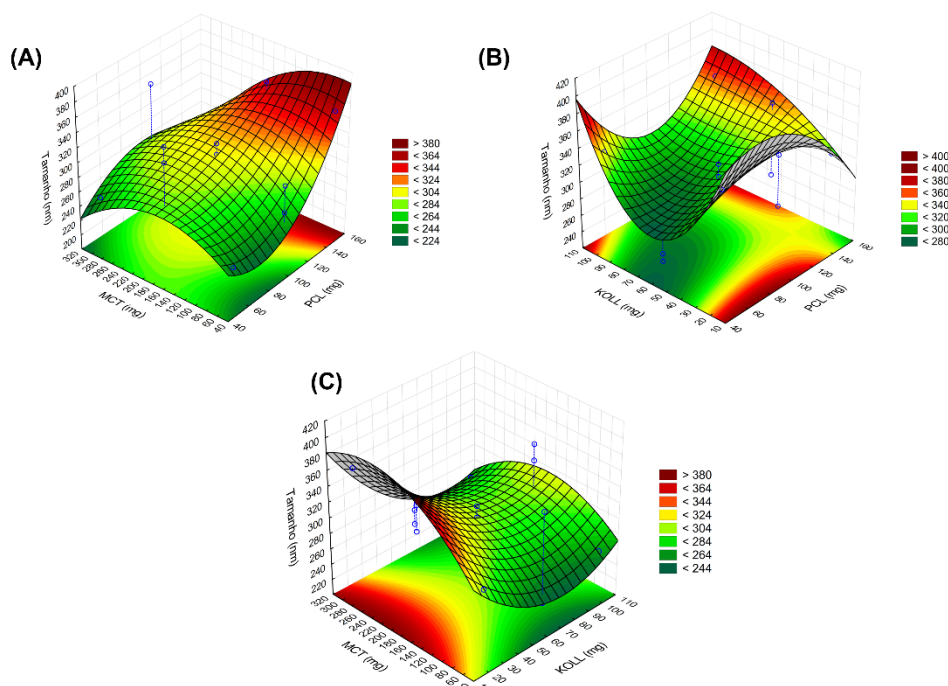
Figura 21. Diagrama de Pareto obtido através do Box-Behnken

Fonte: Formiga, 2025

Considerando cada uma das variáveis apresentadas no diagrama de Pareto, apenas o MCT e Kolliphor®ELP tiveram um efeito significativo na produção de NCP. A interação quadrática do MCT demonstrou ter um efeito positivo no aumento do tamanho das partículas, enquanto o Kolliphor (Q) contribuiu para a diminuição desse parâmetro.

Os gráficos tridimensionais de superfície de resposta (Figura 22) forneceram informações adicionais sobre a influência das variáveis independentes escolhidas. Os diagramas indicam que partículas menores podem ser obtidas com baixas concentrações de PCL desde que interaja com concentrações maiores de Kolliphor e menores de MCT.

Figura 22. Superfície de resposta das variáveis independentes em função do tamanho das partículas



Fonte: Formiga, 2025

Como o Kolliphor é um surfactante não iônico, ele sofre alta hidratação e por isso é altamente estável em meio aquoso, sendo capaz de produzir tamanhos de partículas menores e valores de Pdl mais baixos em comparação com surfactantes aniônicos, catiônicos e anfífilicos (Cortés *et al.*, 2021). Enquanto que a utilização de altas concentrações de MCT pode levar a problemas de miscibilidade com os demais componentes da formulação. Essa limitação impacta diretamente o tamanho das partículas que tendem a ser maiores com o aumento da concentração do óleo (Patel *et al.*, 2013).

Apesar de não ter relação significativa, a concentração do polímero pode aumentar a viscosidade da fase orgânica promovendo gotículas maiores no preparo da emulsão, o que acarreta no aumento do tamanho das partículas ou a uma polidispersão do sistema por precipitação desse polímero (Badri *et al.*, 2015), como foi o caso do presente estudo.

A partir dessas informações, a formulação escolhida foi a NCP8, pois continha uma quantidade satisfatória de MCT (50 mg), uma menor concentração de PCL (50 mg) e não exigia altas concentrações de surfactante, com apenas 60

mg de Kolliphor. Além disso, o nanossistema apresentou tamanho de partícula ($239,8 \pm 1,35$ nm), Pdl ($0,12 \pm 0,02$) e potencial zeta ($-20,1 \pm 0,4$ mV) menores em relação as demais formulações, o que favorece sua aplicação biológica.

Como a análise de regressão foi aplicada na matriz de design através dos dados adquiridos, a equação polinomial de primeira ordem na forma codificada foi estabelecida: $Y = 406,972 - 1,442x_1 + 0,00376x_1^2 - 5,376x_2 + 0,06478x_2^2 + 0,312x_3 - 0,00673x_1x_2 - 0,00045x_1x_2^2 + 0,00034x_1^2x_2 + 0,01921x_1x_3 - 0,00012x_1^2x_3 - 0,00259x_2x_3$, onde Y1 representa o tamanho de partícula previsto (nm), e x_1 , x_2 e x_3 representam os termos codificados para três variáveis de teste independentes: PCL, Kolliphor®ELP e MCT, respectivamente.

Com a aplicação dessas variáveis no cálculo experimental foi observado que era possível desenvolver formulações variando suas concentrações de óleo e tensoativo hidrofílico, visto que o polímero não apresentou diferença significativa no tamanho das partículas. Por isso, novas formulações com maiores concentrações de MCT (60-120 mg) e menores concentrações de tensoativo (40-50 mg) foram desenvolvidas e comparadas com a formulação escolhida anteriormente e gerando as variantes NCP8A a NCP8G (Tabela 17).

Tabela 17. Efeito da alteração da concentração de óleo e tensoativo nas formulações otimizadas de NCP

Código	Kol (mg)	MCT (mg)	Tamanho (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
NCP8	60	50	$239,8 \pm 1,35$	$0,12 \pm 0,02$	$-20,1 \pm 0,4$
NCP8A	40	50	$256,3 \pm 7,0$	$0,10 \pm 0,02$	$-19,8 \pm 0,2$
NCP8B	50	50	$238,4 \pm 3,1$	$0,09 \pm 0,02$	$-23,6 \pm 0,2$
NCP8C	50	75	$250,9 \pm 4,0$	$0,09 \pm 0,01$	$-26,5 \pm 0,9$
NCP8D	50	100	$242,7 \pm 4,0$	$0,16 \pm 0,02$	$-27,2 \pm 0,3$
NCP8E	60	75	$270,0 \pm 3,6$	$0,16 \pm 0,01$	$-25,9 \pm 0,6$
NCP8F	60	100	$270,8 \pm 5,9$	$0,15 \pm 0,02$	$-25,9 \pm 0,7$
NCP8G	60	120	$293,2 \pm 6,7$	$0,16 \pm 0,03$	$-25,1 \pm 0,4$

Fonte: Formiga, 2025

Observou-se que o aumento do teor de óleo com a diminuição da concentração de tensoativo não causou diferenças significativas no tamanho das partículas, Pdl ou no potencial zeta, exceto quando ultrapassa 100mg de MCT. Este fato pode estar atrelado a uma faixa de proporcionalidade entre as

concentrações de tensoativo e o óleo, que apesar de viscoso não são muito resistentes às tensões de corte aplicada durante a emulsificação pelo Kolliphor nas concentrações de 50 e 60 mg (Souto; Severino; Santana, 2012).

Por essa razão, decidiu-se continuar os experimentos com a formulação NCP8D, que será referida como a “formulação otimizada” (oNCP), pois atingiu tamanho médio satisfatório ($242,7 \pm 4,0$ nm), bom Pdl ($0,16 \pm 0,02$) e potencial zeta adequado para garantir sua estabilidade eletrostática ($-27,2 \pm 0,3$ mV).

5.2.3. Funcionalização do nanossistema otimizado

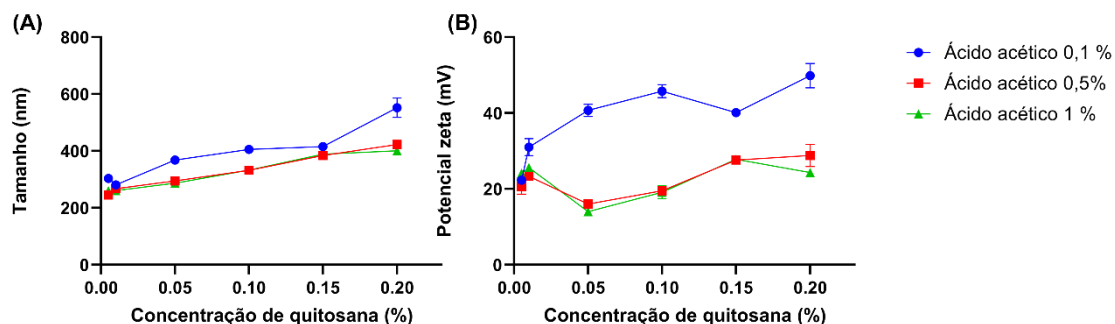
Foram realizadas funcionalizações com diferentes modificadores de superfície, quitosana e polietilenoglicol (PEG), a fim de garantir uma entrega mais direcionada.

A quitosana é um polissacarídeo catiônico biocompatível, mucoadesivo e não tóxico (Valencia *et al.*, 2021). Como contém grupos amina (NH_3^+) em sua estrutura, sempre gera partículas carregadas positivamente (Kurczewska, 2023), que tendem a aumentar a adesão celular e a internalização das NCPs nas células tumorais (Aibani *et al.*, 2021). Além disso, a quitosana apresenta baixa imunogenicidade e toxicidade, tornando-as uma alternativa mais segura para a liberação de fármacos (Layek; Das, 2021).

Todavia, a solubilidade da quitosana em soluções aquosas é aprimorada na presença de ácidos que facilitam a ionização de seus grupos amina, levando a uma melhor dissolução. Porém, altas concentrações de ácido são tóxicas em fluidos biológicos, por isso, a faixa terapêutica de trabalho deve ser baixa (Fiamingo; Campana-Filho; Oliveira-Junior, 2020).

Assim, foi realizado um estudo de solubilidade em diferentes concentrações de ácido acético (0,1% a 1%) e de quitosana (0,005% a 0,25%), para a produção de um nanossistema eficaz, estável e reprodutível, cujos resultados encontram-se expressos na figura 23.

Figura 23. Tamanho (A) e potencial zeta (B) das nanopartículas funcionalizadas com quitosana em diferentes concentrações de ácido acético (0,1-1%)



Fonte: Formiga, 2025

O tamanho das nanopartículas aumentou proporcionalmente com a concentração de quitosana, sugerindo que teores menores de ácido acético levam a tamanhos maiores de nanopartículas (Mishra *et al.*, 2024). Não houve diferença significativa no tamanho das partículas entre 0,5% e 1% de ácido, indicando que a força do ácido foi equivalente na protonação das moléculas de quitosana para interagir com a superfície da NCP. No entanto, maiores porcentagens de quitosana (0,15% e 0,2%) aumentaram o Pdl, indicando seu excesso no sistema.

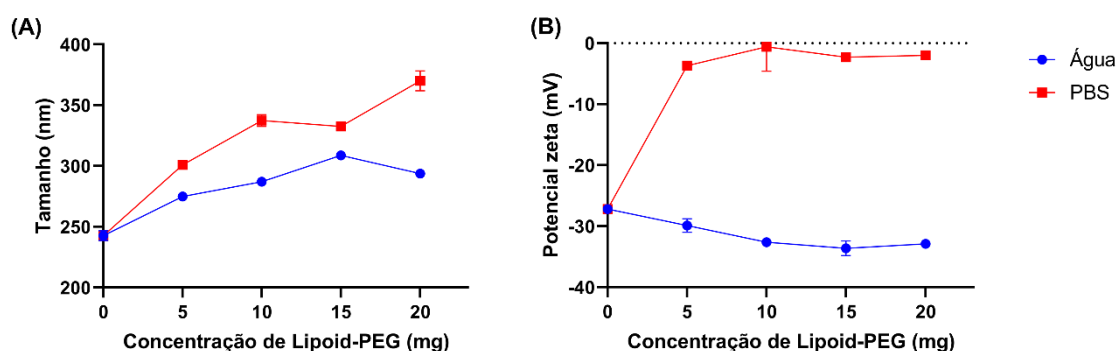
Em relação ao potencial zeta, um aumento proporcional na carga foi observado em soluções ácidas de 0,1%, onde o pH era 6,0. Isso pode ser explicado pelo ponto isoelétrico da quitosana, que a torna menos protonada (Aranaz *et al.*, 2021), impedindo-a de interagir com as cargas negativas dos componentes do sistema e expondo seus grupos amina. Nas concentrações de ácido de 0,5% e 1%, houve redução na carga das partículas, mas essa dispersão apresentou pH próximo a 5,4, o que permite melhor protonação da quitosana e, consequentemente, sua interação com o sistema.

Diante do que foi exposto, a NCP com 0,01% de quitosana na concentração de 0,5% de ácido acético, foi escolhida para dar continuidade aos experimentos, pois apresentou tamanho de $267,7 \pm 1,0$ nm (similar ao oNCP), Pdl $0,16 \pm 0,02$ e $\zeta +23,3 \pm 0,7$ mV, sendo denominado de qNCP.

Já o PEG é um polímero hidrofílico que pode ser adicionado independentemente às nanopartículas ou conjugado com outros polímeros e

lipídios. Ele neutraliza a carga superficial das partículas, impedindo o reconhecimento pelo sistema imunológico. O comprimento de sua cadeia e o meio determina a neutralização desse sistema, tornando essencial alcançar um equilíbrio na proporção desse polímero para evitar impactos na estabilidade (Shi *et al.*, 2021). Assim, as funcionalizações foram feitas com Lipoid-PEG 5000 (5 a 20 mg) em diferentes meios (água e PBS) e os resultados encontram-se expressos na figura 24.

Figura 24. Tamanho (A) e potencial zeta (B) de nanopartículas funcionalizadas com Lipoid-PEG 5000 em PBS e água



Fonte: Formiga, 2025

O aumento, em módulo, do potencial zeta na água após a adição de mais Lipoid-PEG 5000 é esperada devido à exposição dos grupos funcionais carregados negativamente do PEG. A redução do ζ em PBS pode ser devido à capacidade de tamponamento do PBS, que filtra as cargas de superfície, levando a mudanças mínimas no potencial zeta, independentemente da quantidade de PEGilação (Shi *et al.*, 2021).

Foi observado, um aumento no tamanho das partículas e neutralização da carga em formulações produzidas em PBS (pH 7,0), quando comparadas com oNCP. O PEG na superfície das nanopartículas aumenta seu tamanho de forma proporcional ao aumento de sua concentração, neutralizando a carga por minimizar a atração de van der Waals entre as partículas (Mok; Park; Park, 2008). Acredita-se que esse efeito não foi observado em água ultrapura (pH 5,0) devido à natureza anfotérica da fosfatidilcolina conjugada à cadeia de PEG.

A partir dos parâmetros obtidos, optou-se por dar continuidade aos experimentos com a NCP contendo 5 mg de Lipoid-PEG 5000 em meio

tamponado, por apresentar tamanho de $300,9 \pm 1,8$ nm, Pdl $0,19 \pm 0,02$ e ζ - $3,7 \pm 0,2$ mV, denominada em diante de pNCP.

5.2.4. Incorporação das isatinas nos nanossistemas produzidos

Após o desenvolvimento dos nanossistemas, as isatinas (ISA7d, ISA8d e ISA11d) foram adicionadas as NCPs otimizada e funcionalizadas para prosseguir com a caracterização e obtiveram resultados similares quanto aos parâmetros físico-químicos, como vistos na tabela 18.

Tabela 18. Parâmetros físico-químicos das nanocápsulas poliméricas contendo derivados de isatina

Amostra	Isatina	Tamanho (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
oNCP	SF*	242,7±4,0	0,16±0,02	-27,2±0,3
	ISA7d	284,2±6,7	0,18±0,05	-24,0±0,9
	ISA8d	292,2±4,1	0,19±0,02	-20,2±0,4
	ISA11d	279,5±3,1	0,13±0,06	-29,5±0,1
qNCP	SF*	267,7±1,0	0,16±0,02	+23,3±0,7
	ISA7d	260,5±4,1	0,17±0,01	+18,1±0,4
	ISA8d	268,9±1,1	0,13±0,02	+28,3±2,0
	ISA11d	250,7±2,0	0,15±0,04	+27,7±1,2
pNCP	SF*	300,9±1,8	0,19±0,02	-3,7±0,2
	ISA7d	278,9±6,1	0,20±0,08	-7,6±0,7
	ISA8d	277,8±3,7	0,21±0,03	-7,6±0,7
	ISA11d	302,9±6,0	0,20±0,04	-7,6±0,1

*SF: sem fármaco

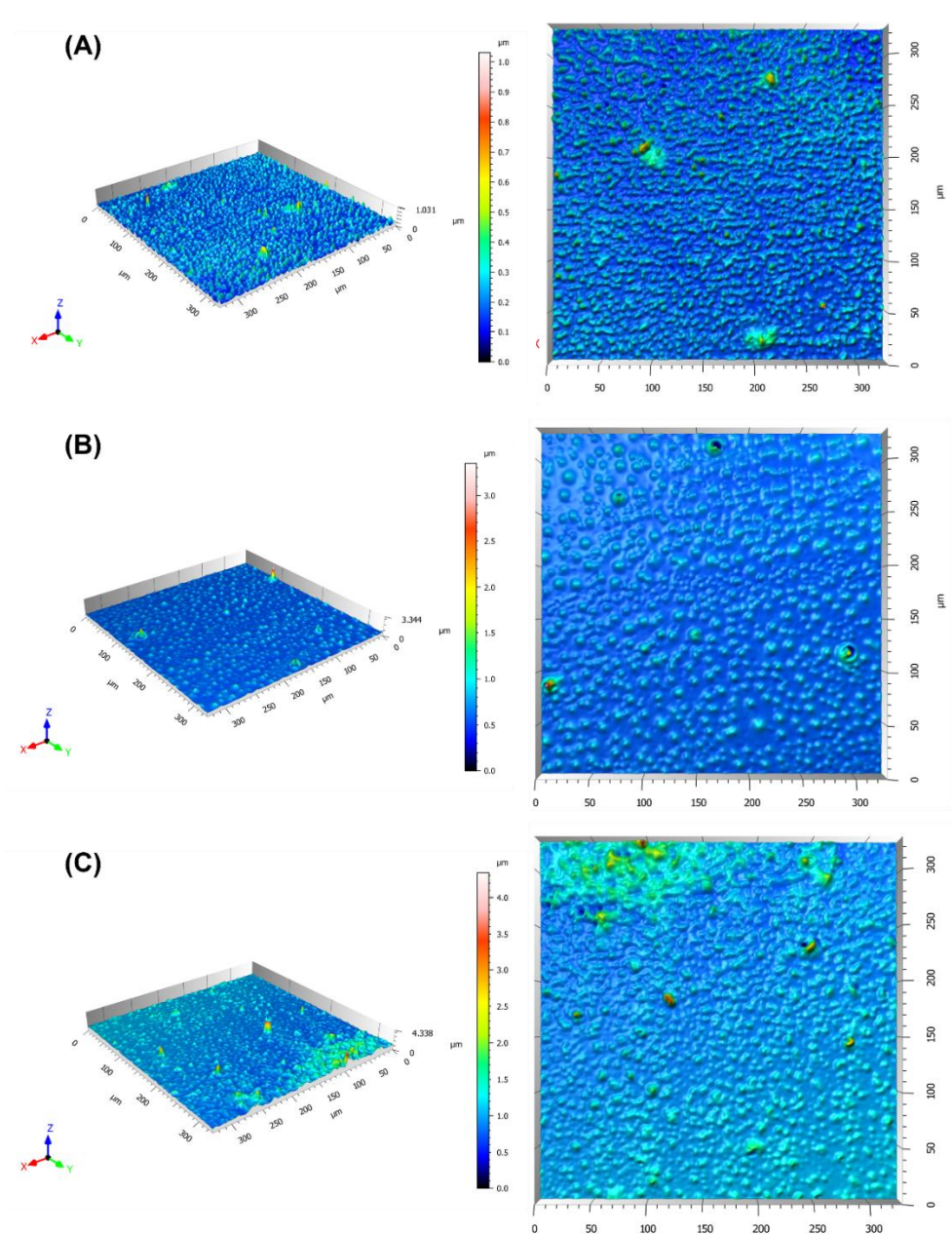
Fonte: Formiga, 2025

Houve uma alteração esperada no tamanho médio e na carga das partículas, pois as isatinas se solubilizaram na matriz oleosa ocupando um espaço no interior desse nanossistema. Além disso, a adição de moléculas sintéticas pode melhorar a estabilidade e reduzir a liberdade conformacional do sistema por favorecer as interações moleculares, fazendo com que aumente ou diminua de tamanho (Zheng *et al.*, 2007). Ademais, a densidade de ligantes pode modificar as propriedades de superfície, por aumentar a quantidade de cargas negativas (Vaskan *et al.*, 2024), e consequentemente interferir nas interações eletrostáticas, alterando o potencial zeta das NCPs.

5.2.5. Análise morfológica

O perfilômetro é um instrumento que cria um perfil topográfico de uma superfície, fornecendo informações detalhadas de suas dimensões físicas (altura, largura e profundidade), além de características do material como a rugosidade (Savio *et al.*, 2024). Nesse sentido, as NCPs produzidas exibiram uma forma esférica, monodispersa e com tamanhos, majoritariamente, inferiores a 300 nm (Figura 25).

Figura 25. NCPs otimizadas (A) e funcionalizadas com quitosana (B) e Lipoid-PEG (C) em superfície 3D



Fonte: Formiga, 2025

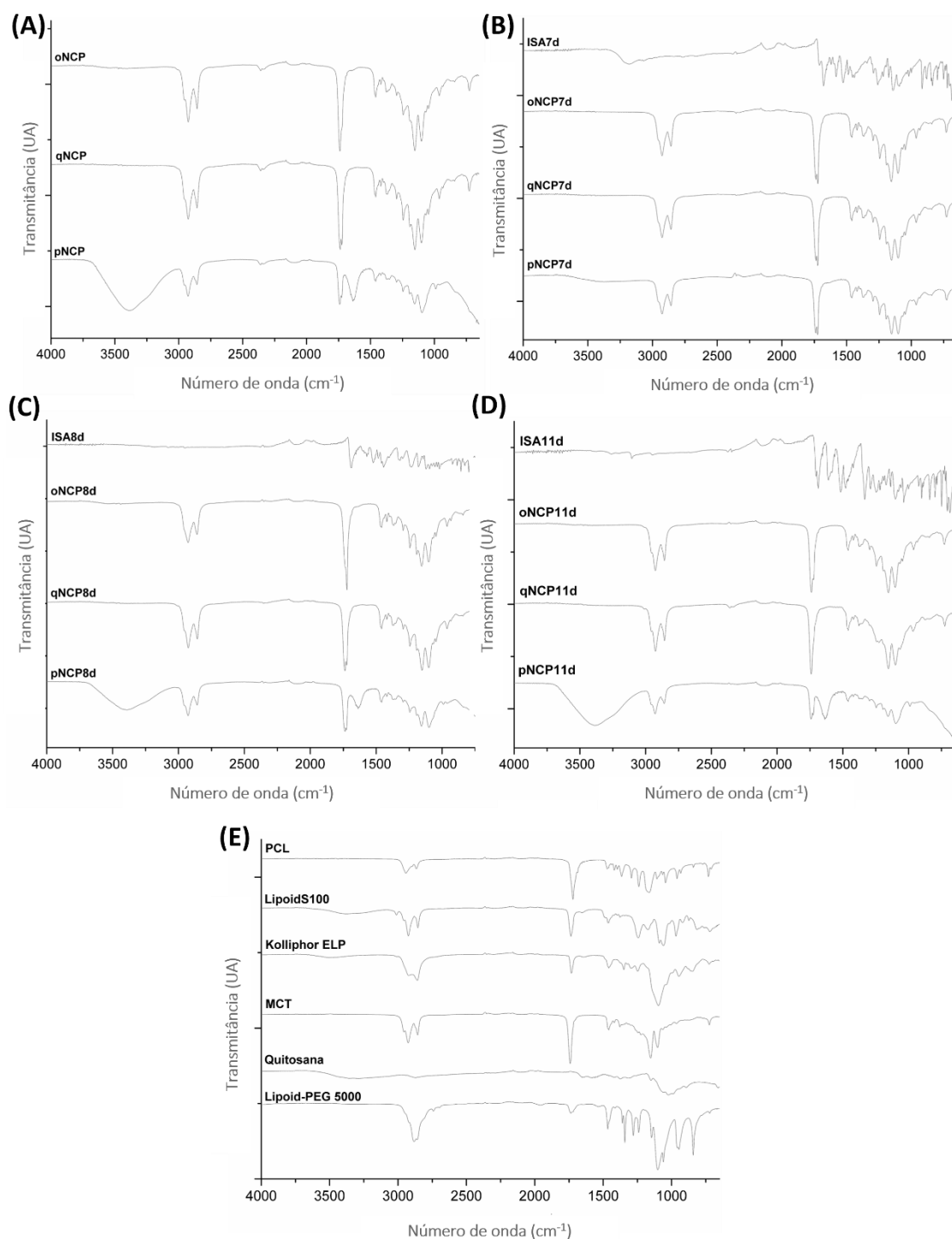
As oNCPs e qNCPs apresentaram partículas menores e mais uniformes, sem formação de aglomerados. Por outro lado, as pNCPs mostraram-se ligeiramente aglomeradas e com maior tamanho, corroborando os resultados anteriores de tamanho e Pdl. A morfologia esférica das CLN, aliada ao tamanho apropriado, confere a essas nanopartículas propriedades ideais para a entrega de fármacos, como alta eficiência de encapsulação e maior captação celular (Deng *et al.*, 2020).

5.2.6. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier da NCPs

Para confirmar a composição química das amostras com base em seus grupos funcionais, as nanopartículas foram analisadas por FTIR (Figura 26). Observou-se que houve descolamento das bandas de grupos carboxila ($\text{C}=\text{O}$) do MCT presentes na região de 1750 cm^{-1} para a 1738 cm^{-1} em todas as nanopartículas, além da redução da intensidade do sinal na pNCP.

Também ocorreu a diminuição da intensidade da banda 1155 cm^{-1} (dobramento C-C) associado ao surgimento de absorções na região de 1297 cm^{-1} (dobramento C-O) possivelmente relacionados aos sinais de PCL e de Kolliphor presentes no mesmo número de onda. Por fim, surgiu uma banda intensa referente a grupos hidroxila (3402 cm^{-1}) atrelados a interação do lipoid-PEG com lipoid-s100 formando ligações com os grupamentos amina, expondo as hidroxilas, o que aumenta a intensidade da banda. Assim, todos sinais indicam que as partículas foram bem formadas e revestidas.

Figura 26. Análise comparativa dos espectros de FTIR dos componentes e formulações utilizados na produção de NCPs otimizado e funcionalizados



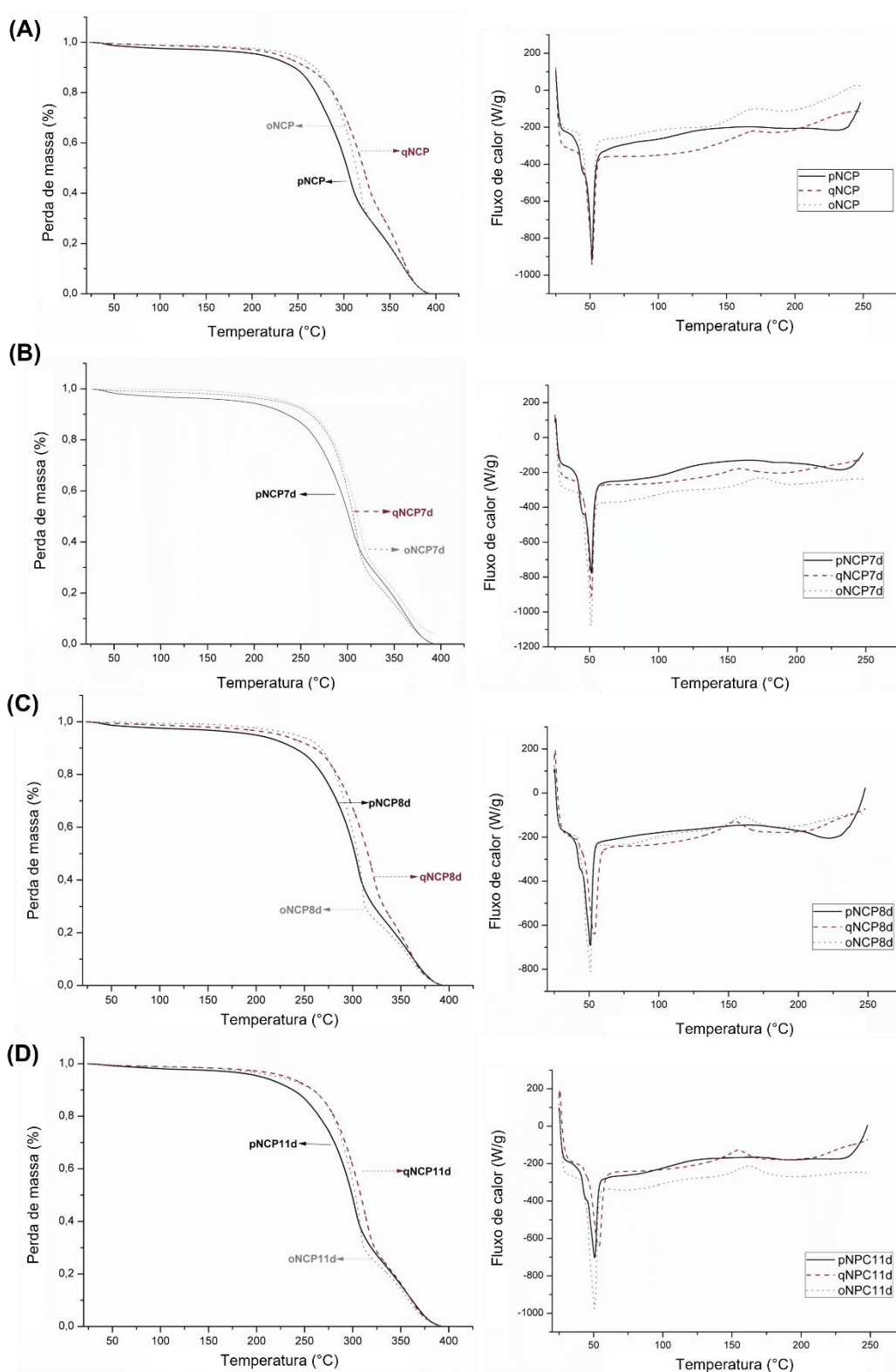
(A) Formulações sem isatina; (B) Formulações contendo ISA7d; (C) Formulações contendo ISA8d; (D) Formulações contendo ISA11d; (E) Componentes da formulação

Fonte: Formiga, 2025

Comparando as bandas das isatinas isoladas com as das formulações que as carregam, não foi possível observar sinais característicos desses compostos sintéticos. Além disso, os espectros das NCPs na presença ou ausência das isatinas são muito semelhantes, com exceção da pNCP7d que não obteve bandas largas na região de 3402 cm^{-1} , indicando que na reorganização desse sistema não houve exposição de muitos grupamentos hidroxila. No entanto, os espectros indicam que houve o encapsulamento da isatina de forma efetiva.

5.2.7. Análises térmicas

A análise termogravimétrica (TG) e calorimétrica exploratória diferencial (DSC) permitiram avaliar a estabilidade térmica das formulações, fornecendo informações detalhadas sobre o comportamento térmico, grau de cristalinidade e polimorfismo dos componentes (Byrn; Zografi; Chen, 2017). A Figura 27 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos por essas técnicas para as diferentes formulações.

Figura 27. TG e DSC das nanocápsulas poliméricas

(A) TG e DSC da NCPs sem fármaco, (B) TG e DSC das NCPs com ISA7d, (C) TG e DSC das NCPs com ISA8d, (D) TG e DSC das NCPs com ISA11d.

Fonte: Formiga, 2025

Todas as amostras exibem um comportamento endotérmico próximo de 50°C (fusão) e exotérmico entre 200 e 250°C (redução de massa), indicando uma perda de massa gradual, constante em todas as formulações. As nanopartículas otimizadas, tiveram a redução inicial de massa em torno de 250°C, com aproximadamente 40% de massa perdida. Isso sugere que há uma decomposição da matriz de PCL (Sivalingam; Madras, 2003) e de outros componentes como lipídios e surfactantes (Chen *et al.*, 2023), uma vez que eles são relativamente estáveis em altas temperaturas.

As NCPs funcionalizadas com quitosana apresentaram maior perda de massa final devido à menor estabilidade térmica da quitosana (Muraleedharan *et al.*, 2015), liberando moléculas de baixo peso molecular. O PEG contribui para maior estabilidade térmica do sistema devido à sua resistência à degradação térmica até cerca de 300°C. Por isso, a perda de massa é menor em relação as demais amostras (Wang *et al.*, 2019).

Os gráficos de DSC destacam o ponto de fusão do polímero, faixa de ~50°C, devido a sua cristalinidade e peso molecular. Moléculas sintéticas podem estar adsorvidas no invólucro polimérico, o que pode ter estabilizado as regiões cristalinas do PCL e tornado os picos de fusão mais evidentes, quando comparada com a oNCP sem fármaco (Germann *et al.*, 2023).

A presença de quitosana pode aumentar a interação intermolecular na superfície, o que afeta a mobilidade das cadeias poliméricas, o que torna o material mais amorfo, o que desencadeou um pequeno aumento na temperatura de fusão das qNCPs com e sem fármaco (Lamarra *et al.*, 2018). Além disso, há um aumento da intensidade da temperatura nas formulações funcionalizadas com PEG, uma vez que, possui ponto de fusão semelhante ao do PCL (Sivalingam; Madras, 2003; Wang *et al.*, 2019), favorecendo uma sobreposição de sinal. Os picos exotérmicos crescentes no final da análise indicam a degradação das amostras com o aumento da temperatura.

De forma geral, as isatinas obtiveram impactos diferentes nas formulações. ISA7d reduziu levemente a cristalinidade do polímero, acarretando em pequenas alterações no ponto de fusão. Já a ISA8d, aumentou a interação com a matriz, produzindo partículas mais estáveis e com menor perda de massa.

Entretanto, a ISA11d causou uma maior redução na temperatura de fusão, além de promover uma redução de massa significativa para partículas com quitosana.

5.3. Doseamento e eficiência de encapsulação (EE%)

Apesar da baixa solubilidade em MCT, optou-se por produzir os nanossistemas com uma concentração teórica de 200 µg/mL, tendo em vista que as isatinas poderiam interagir com os demais componentes da formulação e aumentar sua solubilidade no meio.

Ainda assim, os resultados sugerem que houve uma baixa solubilidade dos compostos sintéticos, confirmada pelos testes de doseamento que apontam perda dessas moléculas na preparação das NCPs, principalmente para ISA7d, onde oNCP7d apresentou 42,0 µg/mL, qNCP7d obteve 28,7 µg/mL e pNCP com 43,3 µg/mL de isatina, sendo o maior doseamento entre elas.

Assim como no estudo de solubilidade, a ISA8d foi a que demonstrou melhor interação com o óleo, o que refletiu na sua concentração nos sistemas oNCP8d (70,2 µg/mL), qNCP8d (78,9 µg/mL) e pNCP8d (66,0 µg/mL). Em contrapartida, a ISA11d que apresentava baixa solubilidade em MCT, obteve o maior doseamento entre os nanossistemas, correspondendo a 130,1 µg/mL (oNCP11d), 75,6 µg/mL (qNCP11d) e 79,1 µg/mL (pNCP11d).

A concentração que permaneceu incorporada nas NCPs fora efetivamente encapsulada, com eficiências acima de 96,1%, conforme expresso na tabela 19.

Tabela 19. Doseamento e eficiência de encapsulação dos nanossistemas otimizados e funcionalizados

Isatina	Formulação	Doseamento (µg/mL)	Eficiência de encapsulação (%)
ISA7d	oNCP7d	42,0 ± 1,2	97,3 ± 0,0002
	qNCP7d	28, 7 ± 0,4	96,1 ± 0,0005
	pNCP7d	43,3 ± 1,2	97,4 ± 0,0001
ISA8d	oNCP8d	70,2 ± 0,7	98,6 ± 0,0006
	qNCP8d	78,9 ± 0,5	98,8 ± 0,0005
	pNCP8d	66,0 ± 1,4	98,6 ± 0,0003
ISA11d	oNCP11d	130,1 ± 1,3	99,1 ± 0,0001
	qNCP11d	75,6 ± 0,4	98,4 ± 0,0002
	pNCP11d	79,1 ± 1,0	98,5 ± 0,0004

Fonte: Formiga, 2025

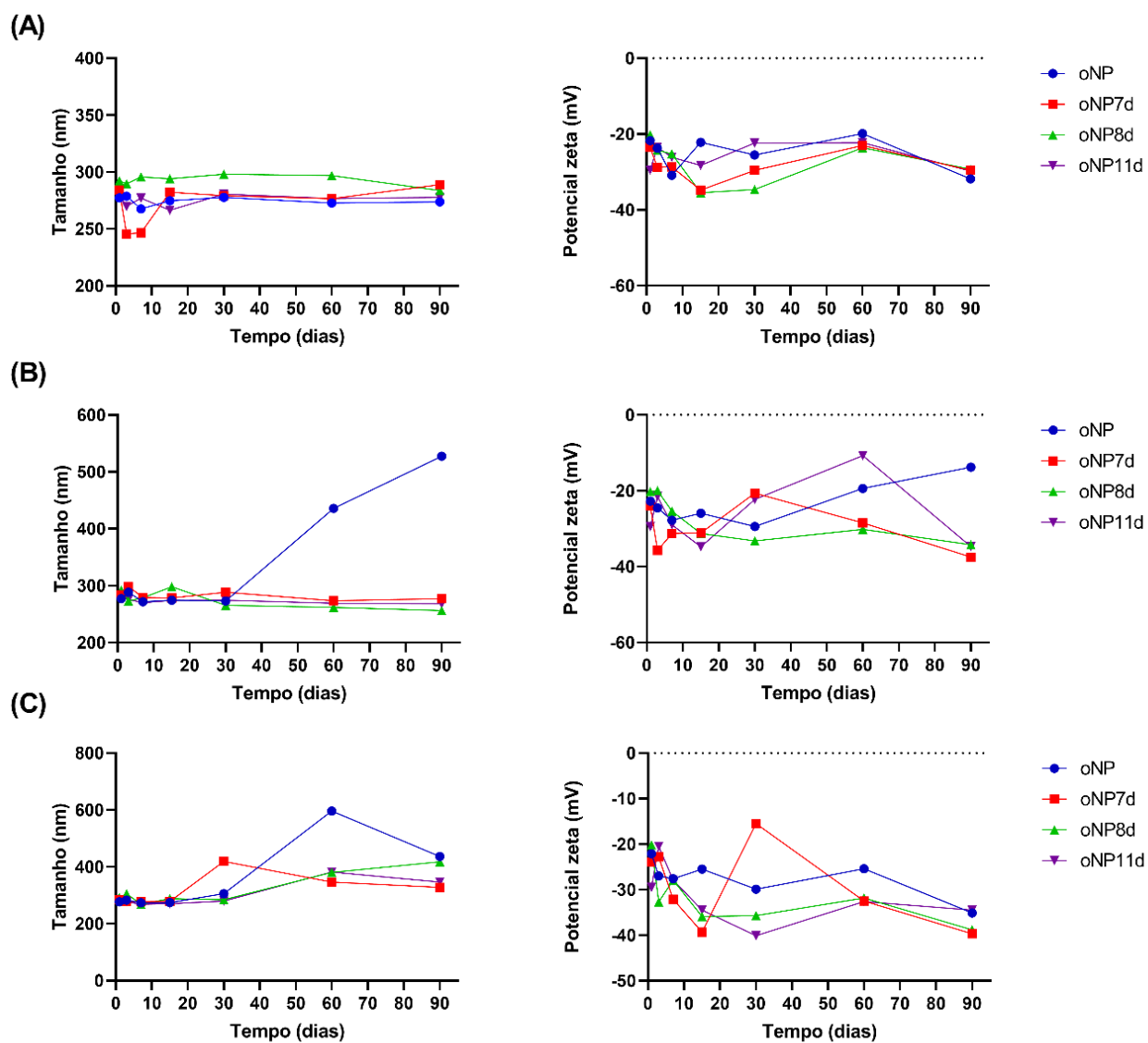
A solubilidade em MCT é derivada de diversos fatores como a estrutura química da molécula sintética, suas ramificações e grupos funcionais que podem interferir da interação com óleo, diminuindo a solubilização (Ghosh; Gupta, 2006). Porém, mesmo que as isatinas possuam baixa solubilidade no óleo, elas podem estar adsorvidas na interface das nanopartículas ou em compartimentos micelares formados por tensoativos (Zhang *et al.*, 2024), o que pode ter refletido no doseamento dos sistemas formados pela ISA11d, que em relação as demais tem menos afinidade pela fase oleosa e consequentemente consegue interagir de maneira mais eficiente com os demais componentes das formulações.

Entretanto, apesar das isatinas estarem em baixas concentrações, elas estão efetivamente encapsuladas. Dessa forma, o nanossistema pode direcionar melhor o fármaco para um tecido específico, o que pode aumentar a eficácia do tratamento quando comparado com a molécula isolada que possui baixa solubilidade em fluidos biológicos (Danaei *et al.*, 2018).

5.3.1. Estabilidade dos nanossistemas

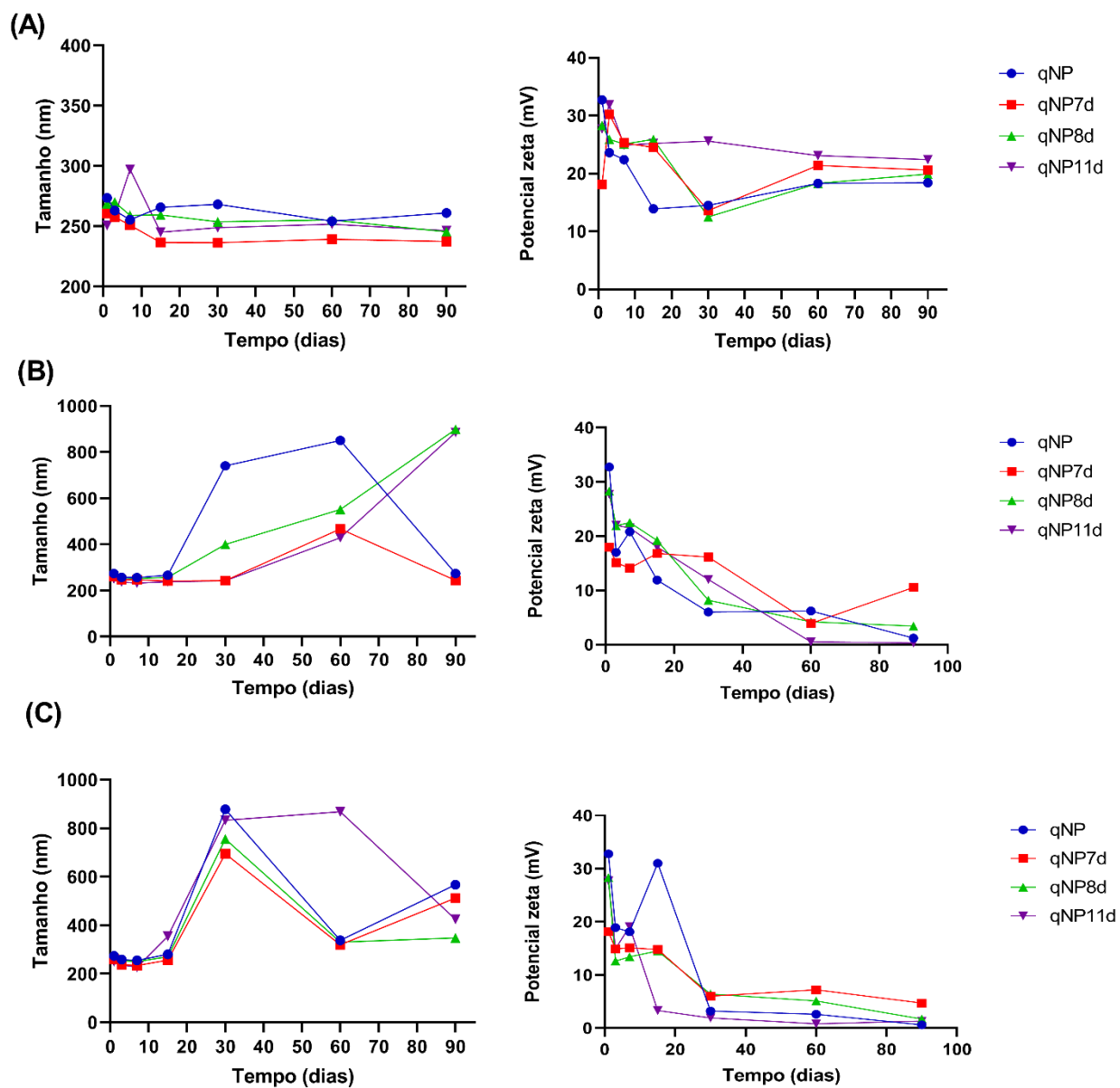
Os testes de estabilidade foram em três temperaturas diferentes (4, 25 e 37°C) por 90 dias para as formulações otimizadas (Figura 28) e funcionalizadas com quitosana (Figura 29) e PEG (Figura 30).

Figura 28. Alterações no tamanho e zeta dos oNCPs quando submetidos a 4 (A), 25 (B) e 37°C (C)



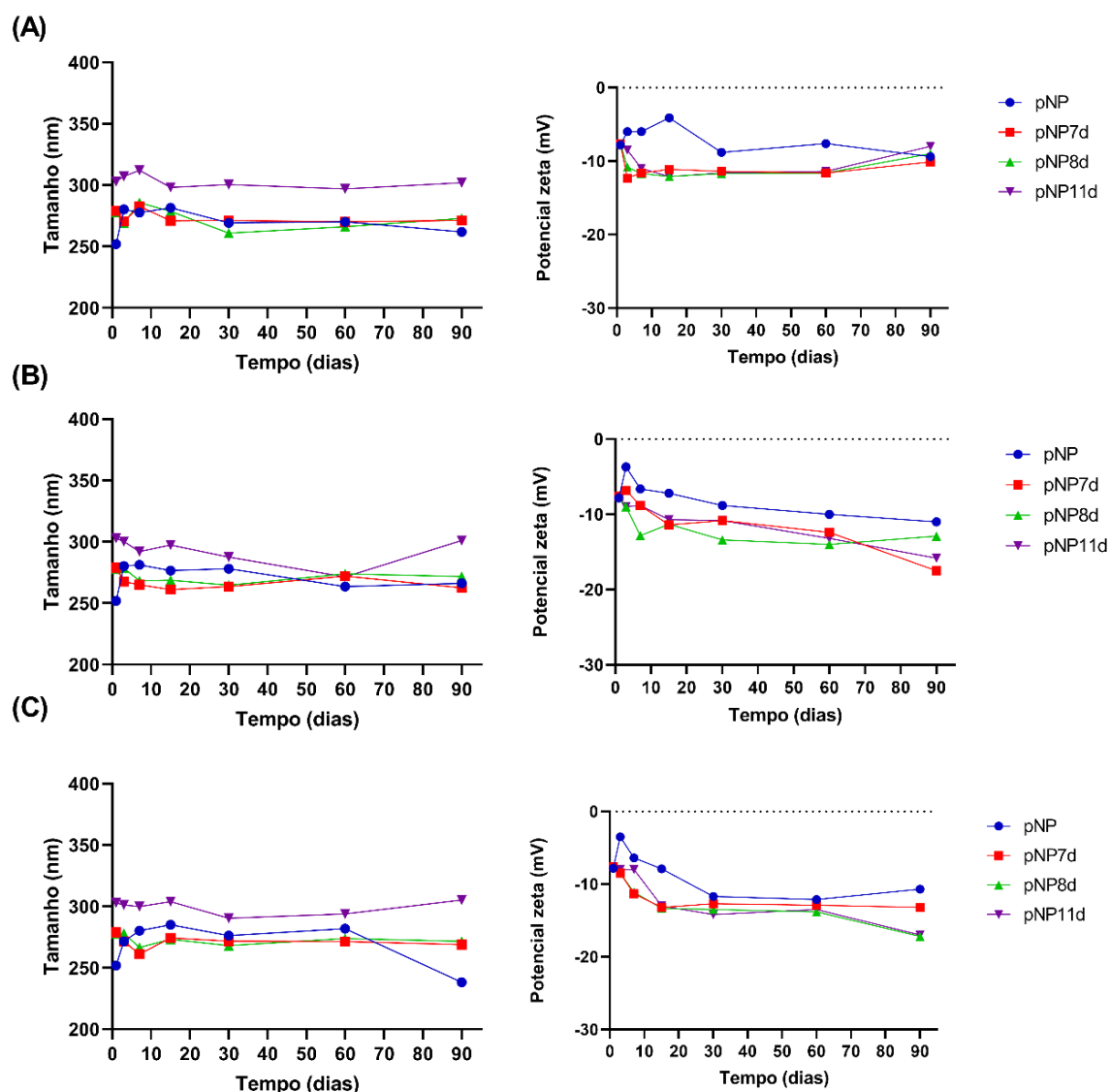
Fonte: Formiga, 2025

Figura 29. Alterações no tamanho e zeta dos qNCPs quando submetidos a 4 (A), 25 (B) e 37°C (C)



Fonte: Formiga, 2025

Figura 30. Alterações no tamanho e zeta dos pNCPs quando submetidos a 4 (A), 25 (B) e 37°C (C)



Fonte: Formiga, 2025

As oNCPs permaneceram estáveis, sem mudança de cor ou separação de fases e com mudanças insignificantes de tamanho a 4°C, atingindo no máximo 288,9 nm. Entretanto, em temperaturas mais altas (25 e 37°C), a adição das isatinas mantiveram o sistema estável por um tempo mais prologando quando comparadas com as nanopartículas sem fármaco, comprovando que adição de moléculas sintéticas pode melhorar a estabilidade do sistema por favorecer as interações moleculares (Zheng *et al.*, 2007).

Em relação ao potencial zeta, não houve alterações significantes nas formulações armazenadas na geladeira. O armazenamento a 25°C e 37 °C,

apontou desestabilização para oNCP em 60 dias, refletindo no aumento da carga (-35,7 mV) possivelmente atrelado a liberação do óleo no meio (Poli, Jong e Hassanali, 2020) evidente pela separação de fases.

As qNCPs também não tiveram grandes aumentos de tamanho quando armazenado a 4 °C, subindo para no máximo 261,1 nm no dia 90 e mantendo suas características macroscópicas. O potencial zeta também permaneceu estável (por volta de +21,5 mV). Assim como nas oNCPs, a adição das moléculas sintéticas manteve o sistema estável por tempo prologando em temperatura ambiente, porém não foi observado esse comportamento em 37°C, onde as partículas desestabilizaram em 30 dias.

Nanopartículas composta por quitosana exibem comportamento termo-responsivo, no qual temperaturas aumentadas podem levar à quebra de ligações de hidrogênio e encolhimento da cadeia, resultando em desestabilização (Chen *et al.*, 2024). Isso acarreta na liberação de óleo que influenciam na carga do sistema que tendeu a zero nos 90 dias. Além disso, esses resultados são respaldados pela análise térmica desses sistemas, inferindo que as qNCPs são mais instáveis sob altas temperaturas.

Os sistemas funcionalizados com PEG foram os únicos que permaneceram estáveis durante os 90 dias, independente da incorporação das isatinas e das alterações de temperatura, porque esse surfactante atua como um agente de aglomeração macromolecular, melhorando a dispersão de nanopartículas e prevenindo a agregação (Ballegooie *et al.*, 2022).

5.3.2. Complexação com proteínas

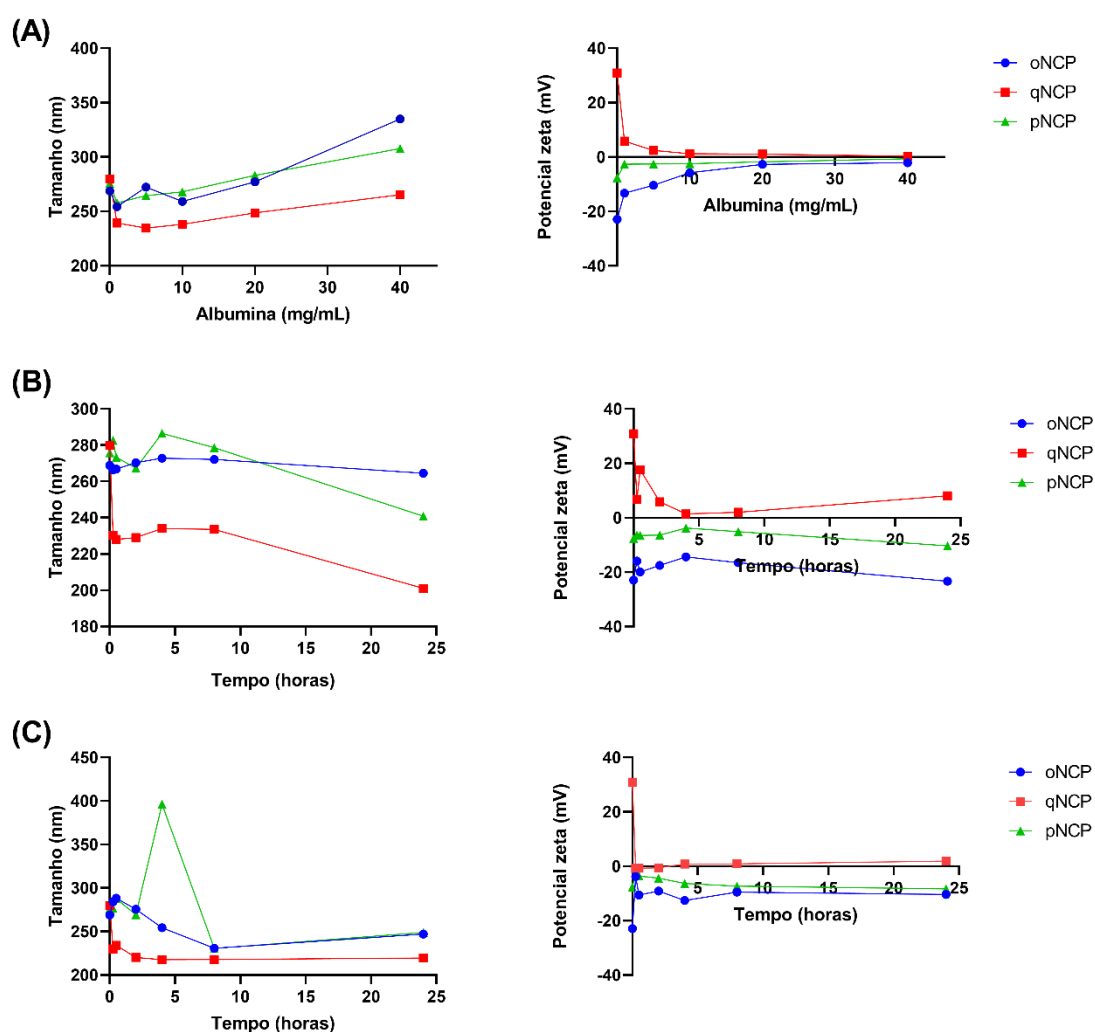
A interação de nanopartículas com fluidos biológicos resulta na formação de uma camada proteica, denominada de coroa proteica. Ela influencia significativamente na biodistribuição, estabilidade e interação com o sistema imunológico. A composição e dinâmica dessa coroa são determinadas por fatores como tamanho, carga superficial e funcionalização da nanopartícula, além das características do meio biológico (Uchôa *et al.*, 2025).

Conforme mostrado na Figura 31, as mudanças no tamanho das partículas e no potencial zeta após a formação da coroa proteica foram avaliadas

considerando a concentração de albumina e o tempo de incubação. A Figura 31A mostra que as qNCPs interagiram com as proteínas em todas as concentrações (1 a 40 mg/mL), ao passo que as oNCPs e pNCPs se complexaram apenas em valores mais altos de BSA (20 e 40 mg/mL).

As Figuras 31B e 31C apontam o comportamento das partículas em diferentes tempos com uma concentração fixa de BSA de 5 e 20 mg/mL, respectivamente. Com isso, foi possível observar que o tempo é um fator determinante para essa complexação após 24 horas, exceto para as pNCPs em altas concentrações de albumina que tenderam aumentar de tamanho em 4 horas de incubação.

Figura 31. Tamanho e potencial zeta das NCPs após a formação da coroa proteica em diferentes concentrações (A) e ao longo do tempo em 5 mg/mL(B) e 20 mg/mL(C) de albumina



A proteína corona pode alterar as propriedades físico-químicas das NCP incluindo seu tamanho hidrodinâmico e potencial zeta. Ela pode ser formada com diferentes proteínas séricas, no entanto, a albumina é a mais comum por estar mais concentrada no sangue (~40 mg/mL). Em pH fisiológico, a albumina se encontra carregada negativamente, o que favorece sua interação com a quitosana (carga positiva) (Caprificio *et al.*, 2021) e consequentemente a neutralização de suas cargas, refletidos em seu ζ . Com essa relação, esperava-se o aumento do tamanho do sistema, porém a força de ligação pode favorecer a compactação das partículas (Boeris; Farruggia; Picó, 2010).

As nanopartículas funcionalizadas com PEG reduzem a adsorção de proteínas e prolonga o tempo de sua circulação na corrente sanguínea, haja vista sua carga neutra, o que corrobora com os dados encontrados no estudo. Apesar da PEGuilação reduzir essa adsorção, ela não impede completamente, por isso em altas concentrações proteicas as moléculas de albumina se reorganizam estruturalmente dentro da camada adsorvida, formando uma camada múltipla que reflete no raio hidrodinâmico da partícula (Mallory *et al.*, 2023).

A análise estatística realizada por Shourni *et al.*, 2022 revelou que, em baixas concentrações, a adsorção de albumina nas nanopartículas ocorre de forma gradual, devido a processos de difusão. Contudo, ao aumentar a concentração de albumina, observa-se uma reorganização das moléculas na superfície, formando uma camada mais densa e estável. Essa organização é favorecida por interações eletrostáticas, neutralizando a carga superficial das nanopartículas (Ding; Ma, 2014).

5.4. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade das NCPs com e sem isatinas (oNCP vazios ou brancos) foi avaliada na linhagem celular tumoral humana MCF-7. Os resultados são expressos no Tabela 20 como a concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50% (IC₅₀) para cada tratamento dentro de 24 horas.

Tabela 20. IC₅₀ na linhagem celular MCF-7 após tratamento com NCPs com e sem fármaco por 24 horas, utilizando o ensaio de MTT.

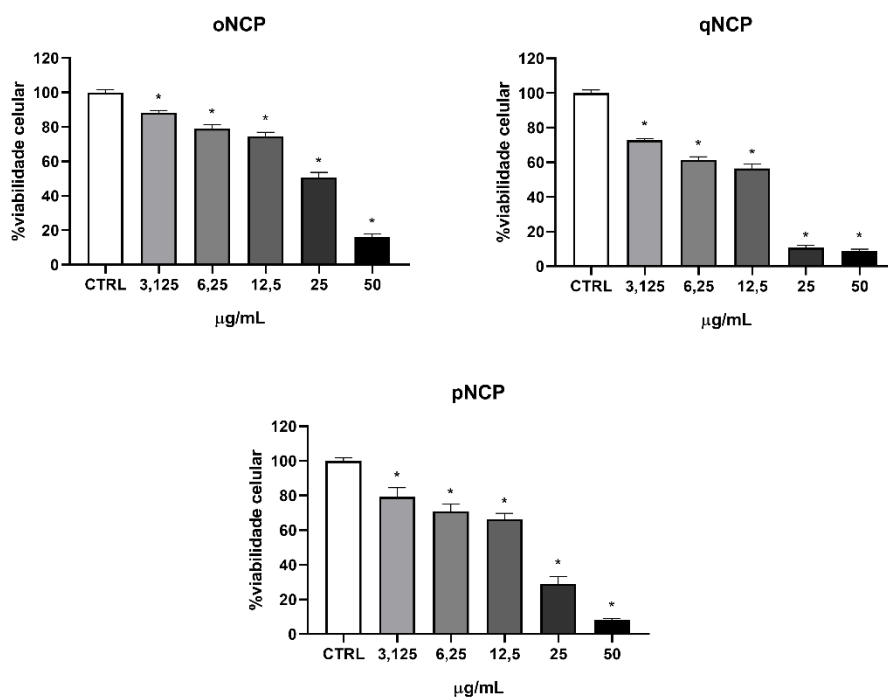
Formulação	Composição	IC ₅₀
ISA7d	-	47,92 ± 6,7
oNCP7d	ISA7d + MCT	14,81 ± 1,36
qNCP7d	ISA7d+MCT+Quitosana	8,058 ± 0,53
pNCP7d	ISA7d+MCT+PEG	13,55 ± 1,13
ISA8d	-	<100
oNCP8d	ISA8d + MCT	15,56 ± 1,17
qNCP8d	ISA8d+MCT+Quitosana	8,79 ± 0,6
pNCP8d	ISA8d+MCT+PEG	13,43 ± 0,8
ISA11d	-	<100
oNCP11d	ISA11d + MCT	19,44 ± 1,8
qNCP11d	ISA11d+MCT+Quitosana	7,34 ± 0,42
pNCP11d	ISA11d+MCT+PEG	10,0 ± 0,61

Fonte: Formiga, 2025

Como observado, a ISA7d apresentou IC₅₀ de 47,92±6,7 µg/mL (ISA7d), sendo a única com atividade aparente nas concentrações testadas. A ISA8d e ISA11d obtiveram IC₅₀ e maiores que 100 µg/mL (ISA8d e ISA11d) em 24 horas. Porém, as nanopartículas necessitaram de uma concentração inferior, onde o IC₅₀ variou de 8,058±0,53 a 14,81±1,36 µg/mL para NCP-7d, 8,79±0,6 a 15,56±1,17 µg/mL para NCP-8d e 7,34±0,42 a 19,44±1,8 µg/mL para NCP-11d, com qNCPs apresentando o efeito de aumento mais promissor.

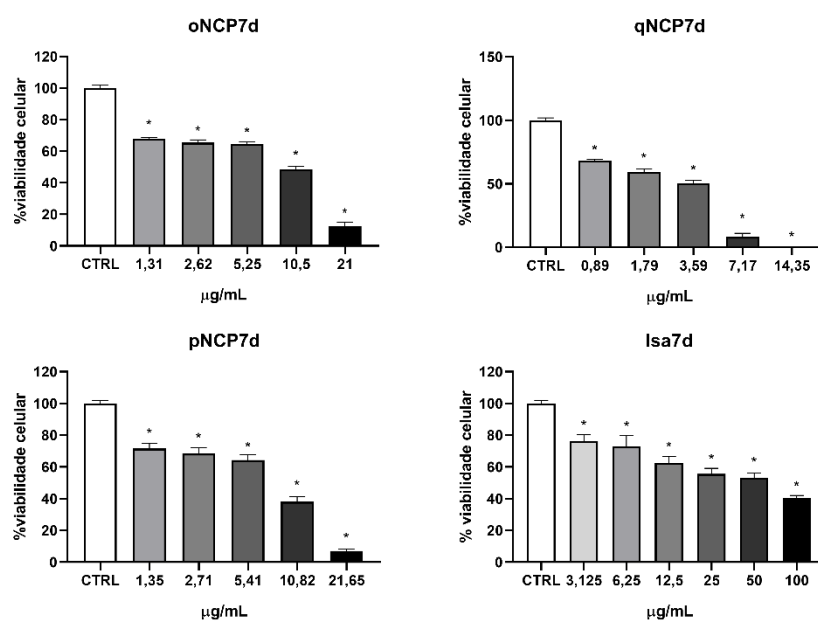
Na concentração avaliada, nanopartículas sem o fármaco exibiram citotoxicidade contra a linhagem, possivelmente atrelado a uma saturação do meio, necessitando de uma purificação nesses sistemas. As figuras 32, 33, 34 e 35 ilustram as curvas de citotoxicidade nas células após 24 horas de exposição a NCPs e isatinas.

Figura 32. Citotoxicidade na linha celular MCF-7 após tratamento de 24 horas com NCP otimizadas e funcionalizadas sem fármaco



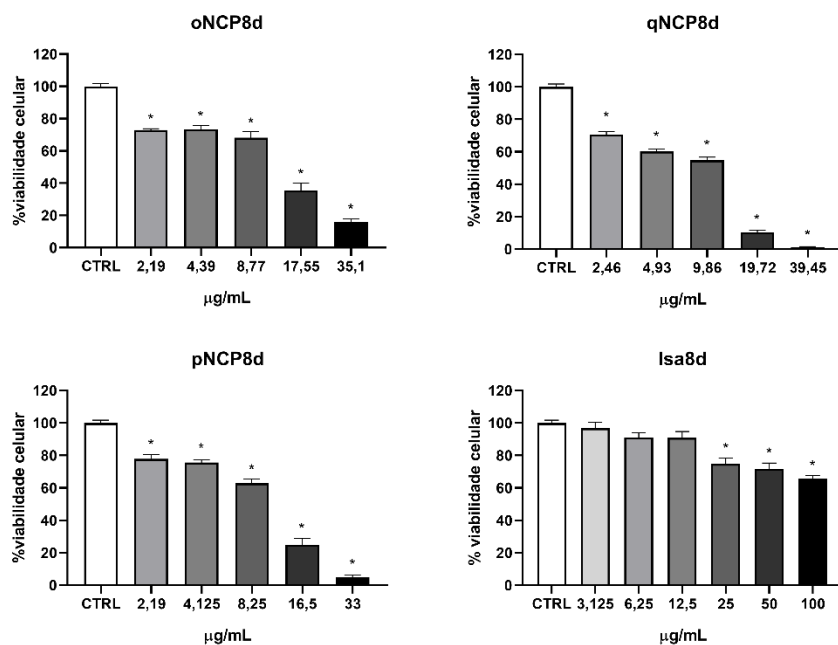
Fonte: Formiga, 2025

Figura 33. Citotoxicidade na linha celular MCF-7 após tratamento de 24 horas com NCPs e ISA7d



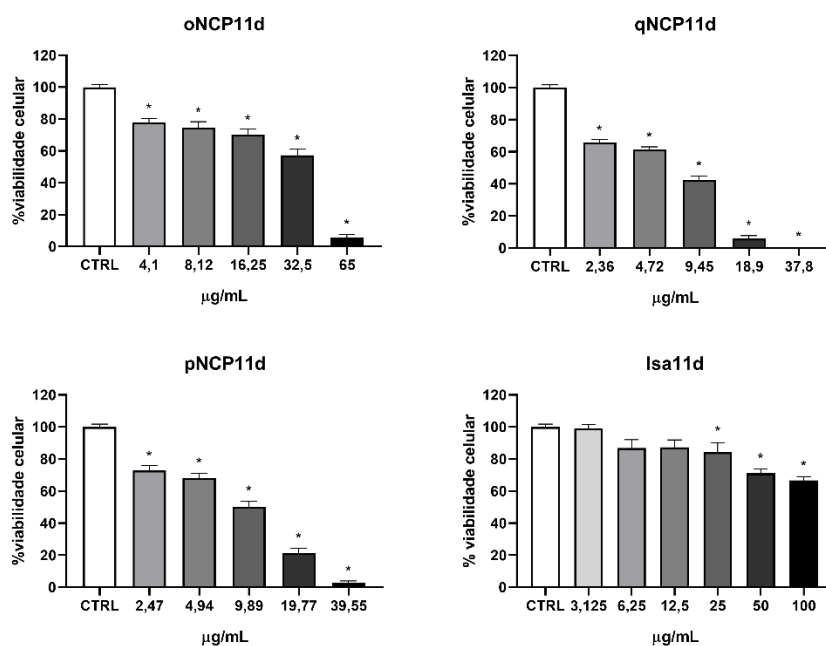
Fonte: Formiga, 2025

Figura 34. Citotoxicidade na linha celular MCF-7 após tratamento de 24 horas com NCPs e ISA8d



Fonte: Formiga, 2025

Figura 35. Citotoxicidade na linha celular MCF-7 após tratamento de 24 horas com NCPs e ISA11d



Fonte: Formiga, 2025

A atividade antitumoral em linhagens de adenocarcinoma mamário pode estar atrelada a estrutura dessas moléculas, onde o cloro pode ter aumentado a lipofilicidade da isatina ISA7d, facilitando a penetração na membrana celular (Cyboran-Mikołajczyk *et al.*, 2024). Enquanto que o NO₂ da ISA11d pode ter favorecido as formações de pontes de hidrogênio e interações dipolo-dipolo, com enzimas envolvidas no ciclo celular e apoptose (Noriega *et al.*, 2022).

Entretanto, como a ISA7d possui um grupo nitrogênio livre, este pode ter participado de interações intermoleculares com proteínas alvo como as quinases (Schenk *et al.*, 2024), o que não ocorreu com a ISA8d. Além disso, esse grupamento interfere na hidrofobicidade da molécula, possivelmente, mantendo-a em condições ideais para atravessar membranas biológicas e exercer sua atividade, de forma que as demais isatinas só conseguiram quando inseridas num nanossistema.

As NCPs facilitam uma melhor captação celular, geralmente por meio de endocitose, levando a maiores concentrações intracelulares do fármaco em comparação com suas formas livres (Zeng; Morgenstern; Nyström, 2014). O tamanho, a forma, a composição e as propriedades superficiais das nanopartículas estão entre os fatores que influenciam significativamente suas capacidades de penetração (Brown *et al.*, 2020). Assim, os resultados obtidos demonstraram que as nanopartículas carregadas com derivados de isatina apresentaram maior atividade antiproliferativa em relação ao composto livre, indicando a eficácia do sistema de liberação

A maior inibição do crescimento, gerada pelas partículas funcionalizadas com quitosana foi atrelado ao fato desse polímero quando em baixo peso molecular já apresentar efeitos antitumorais (Qin *et al.*, 2002), devido ao aumento da atividade de células natural killer (NKs) que liberam mediadores para danificar a membrana tumores (Maeda; Kimura, 2004).

Essa resposta mais efetiva pode ser justificada pela sensibilidade da quitosana ao pH, fazendo com que o fármaco seja liberado de forma direcionada ao microambiente tumoral cujo pH é ácido (Nogueira *et al.*, 2013). Além disso, a quitosana pode induzir apoptose por meio de vias mitocôndrias, como já foram observados em linhagens de melanoma (Gibot *et al.*, 2015).

Já o aumento da atividade nanopartículas PEGuilados pode ter relação com o aumento da estabilidade desses sistemas e a ausência de cargas superficiais, fazendo com que migre para os tecidos tumorais sem ser reconhecido (Wu *et al.*, 2020). Assim como a quitosana, o PEG também apresenta uma resposta mediada pelo pH, liberando o fármaco de forma específica no local do tumor (Chen *et al.*, 2017).

5.5. Docking molecular

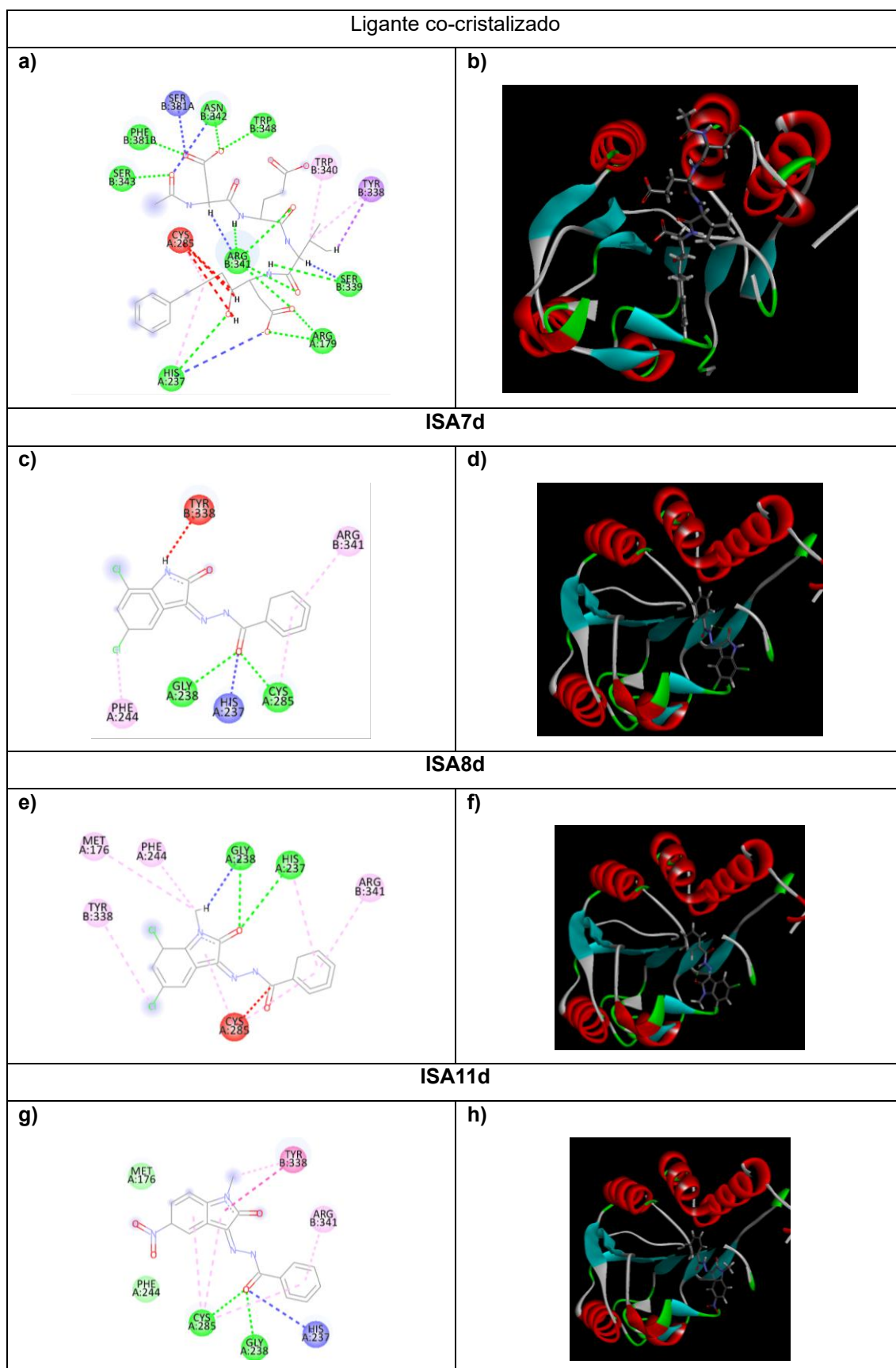
Os resultados do docking molecular (Tabela 21) estimam a energia de ligação dos complexos formados entre os ligantes e os alvos selecionados, em que valores negativos indicam complexos mais estáveis (Prieto-Martínez; Arciniega; Medina-Franco, 2018).

Tabela 21. Valores de Moldock Score das substâncias analisadas e respectivos padrões

Ligantes	Moldock Score						
	Caspase 3	Caspase 7	Caspase 8	JNK	Erk1	Erk1/2	p38- α
Ligante-padrão	-178.22	-79.73	-173.27	-60.22	-220.2	-169.43	-177.00
7D	-84.54	-54.77	-69.52	-80.36	-110.47	-76.18	-100.98
8D	-79.76	-44.14	-69.41	-78.08	-111.87	-82.81	-106.56
11D	-85.73	-51.92	-79.66	-79.50	-112.96	-78.25	-102.82

Fonte: Formiga, 2025

Analisando os valores formados com a caspase-3 (Becker *et al.*, 2004), percebe-se que o ligante-padrão (Figura 36 a,b) formou um complexo com menor energia quando comparado aos derivados de isatina estudados. Entre essas moléculas, ISA11d possui menor valor de energia de ligação (-85.73) comparado a ISA7d (-84.54) e ISA8d (-79.76). As interações intermoleculares mostram muito mais interações entre o ligante-padrão com o alvo (Figura 36 a,b), o que pode explicar os valores de energia. Os derivados ISA7d (Figura 36 c,d) e ISA8d (Figura 36 e,f) possuíram valores de energia superior a ISA11d (Figura 36 g,h), o que pode estar relacionado às formações de interações desfavoráveis nas duas primeiras substâncias, o que não ocorre na última.

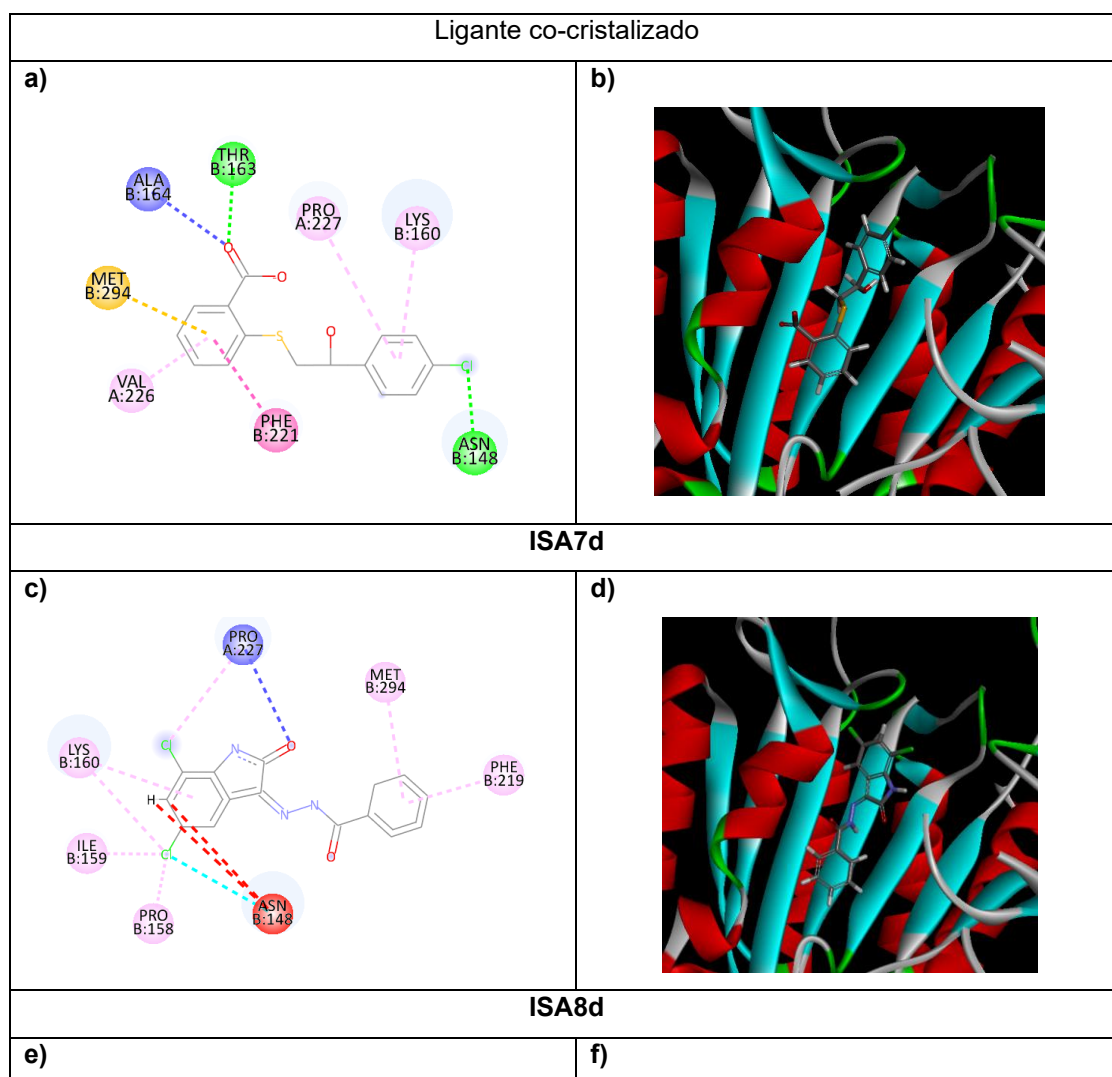
Figura 36. Interações intermoleculares formadas por caspase 3 e ligantes analisados

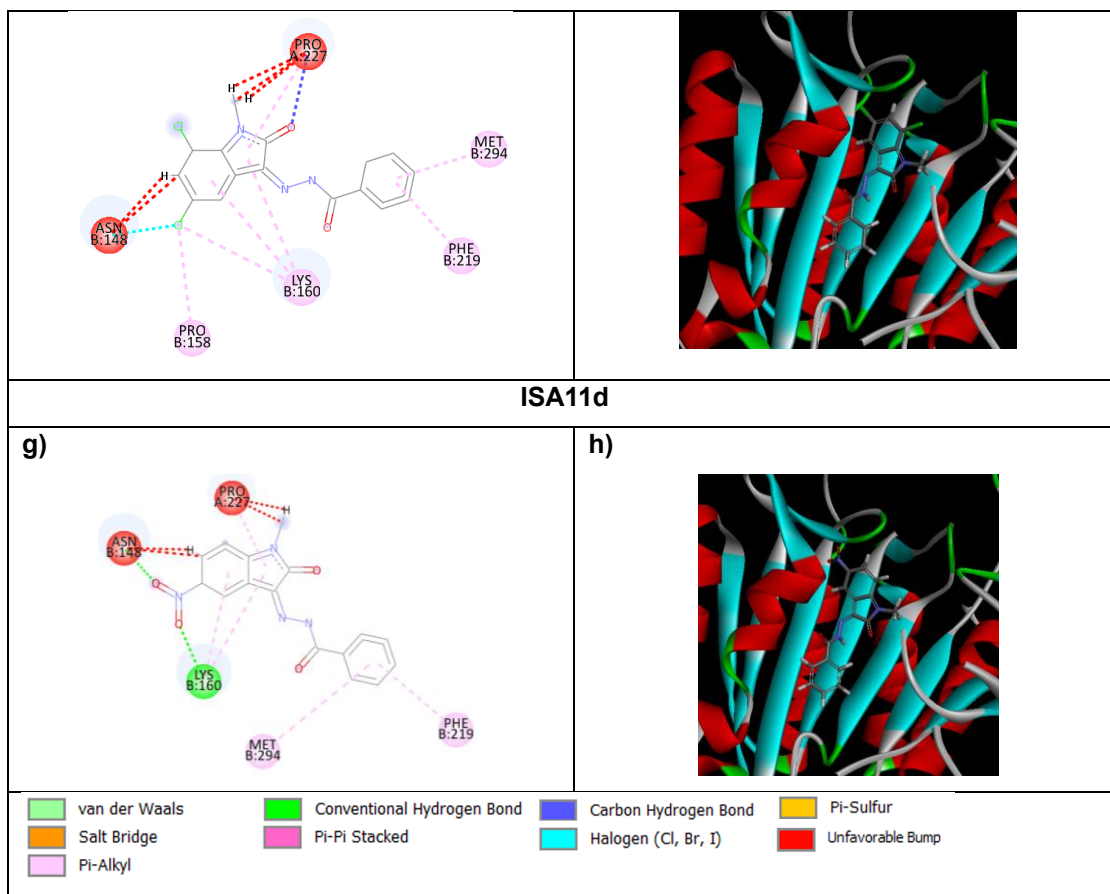
van der Waals	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sulfur
Salt Bridge	Pi-Pi Stacked	Halogen (Cl, Br, I)	Unfavorable Bump
Pi-Alkyl			

Fonte: Formiga, 2025

Em relação à caspase 7 (Hobbs *et al.*, 2023), o ligante-padrão também formou um complexo de menor energia (Figura 37 a,b). Em relação às substâncias estudadas, ISA7d obteve menores valores de energia comparado as demais, possivelmente por formar menos interações desfavoráveis (Figura 37 c,d), o que ocorre na ISA8d e ISA11d devido à adição de grupos volumosos em CH₃O e NO₂, o que provocou um impedimento estérico com Tyr338 (Figura 37 e,f) e Cys285 (Figura 37 g,h), respectivamente.

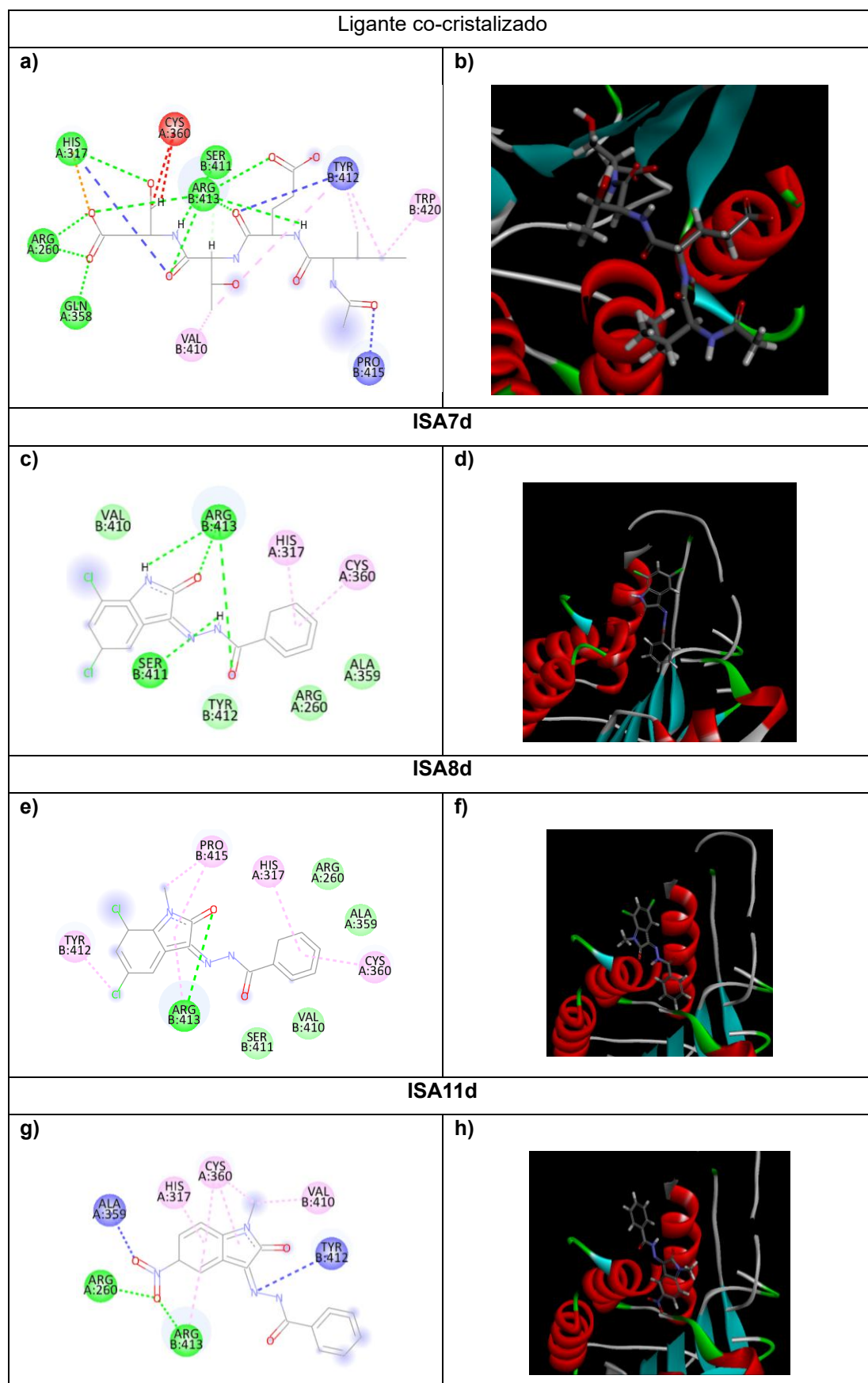
Figura 37. Interações intermoleculares formadas por caspase 7 e ligantes analisados





Fonte: Formiga, 2025

Quanto à caspase 8, novamente o ligante co-cristalizado obteve um escore melhor comparado aos derivados de isatina (Figura 38 a,b). As moléculas ISA7d (Figura 38 c,d) e ISA8d (Figura 38 e,f) apresentaram resultados similares e ambas menores que ISA11d (Figura 38 g,h), que formou mais interações favoráveis, especialmente duas ligações de hidrogênio com Arg260 e Arg413 (Watt *et al.*, 1999), também vistas no ligante co-cristalizado.

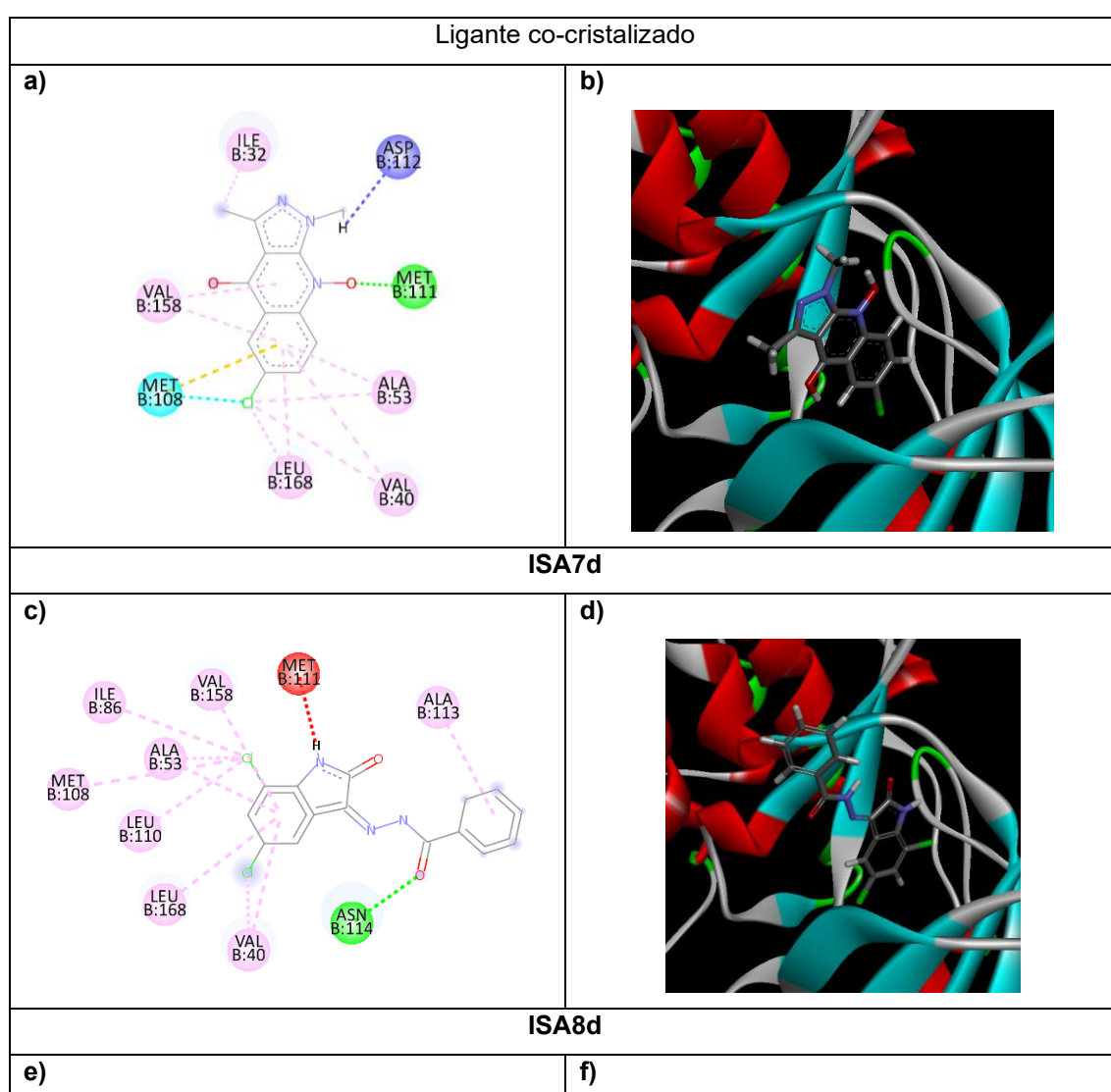
Figura 38. Interações intermoleculares formadas por caspase 8 e ligantes analisados

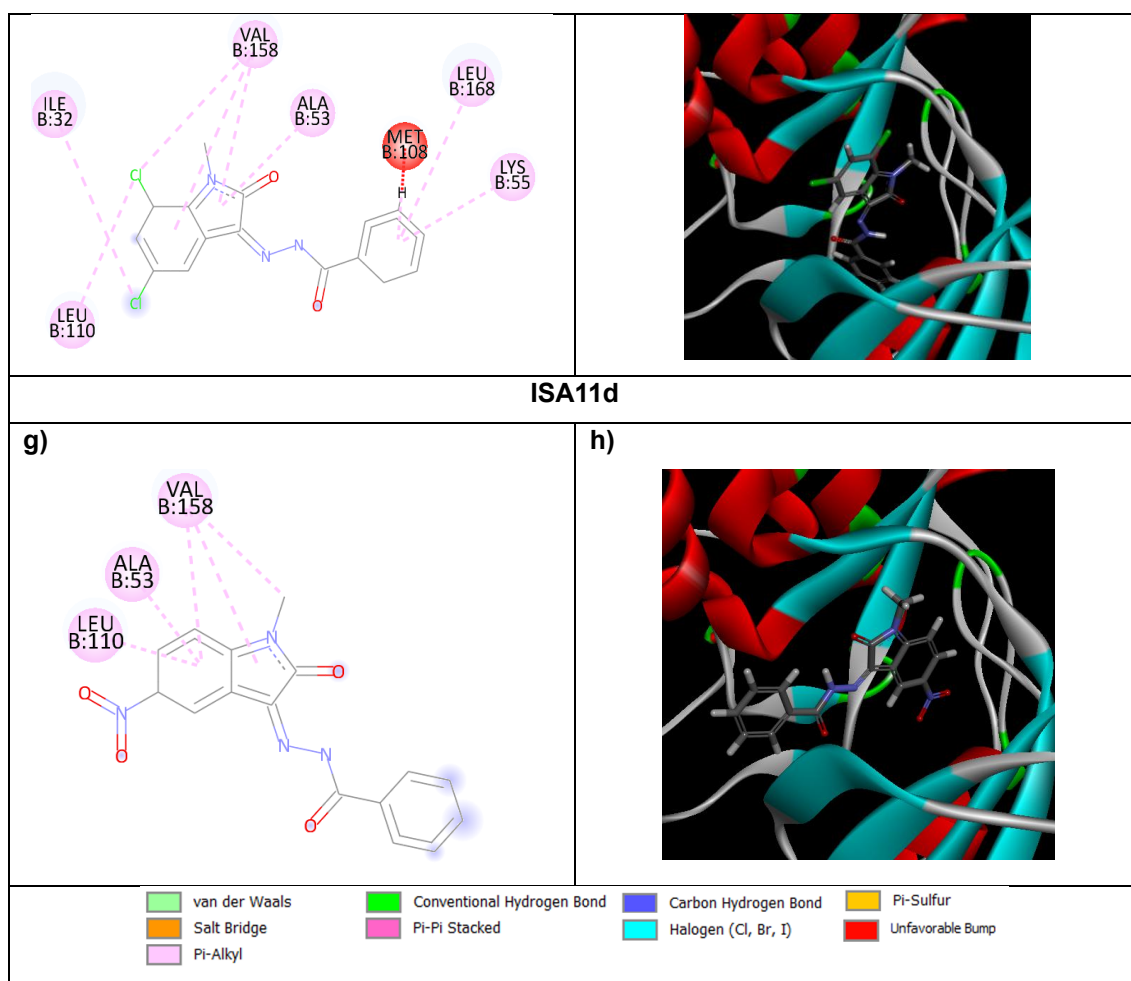
van der Waals	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sulfur
Salt Bridge	Pi-Pi Stacked	Halogen (Cl, Br, I)	Unfavorable Bump
Pi-Alkyl			

Fonte: Formiga, 2025

Quanto a JNK, todos os derivados de isatina apresentaram escores melhores que o ligante co-cristalizado (Figura 39 a,b). Apesar de haver interações desfavoráveis entre ISA7d (Figura 39 c,d) e ISA8d (Figura 39 e,f), a maior quantidade de interações favoráveis parece contrabalancear isso, uma vez ISA11d não formou interação desfavorável (Liu *et al.*, 2006) I.

Figura 39. Interações intermoleculares formadas por JNK e ligantes analisados

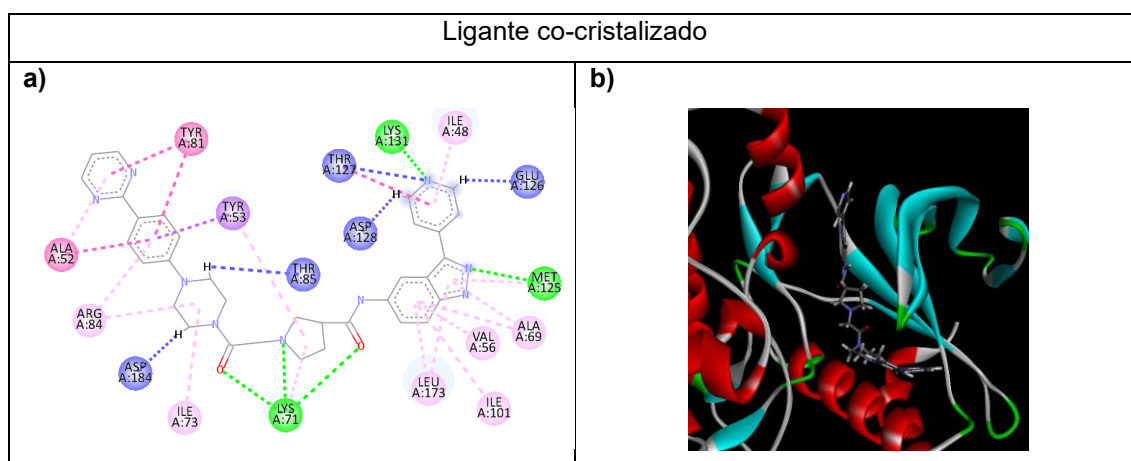


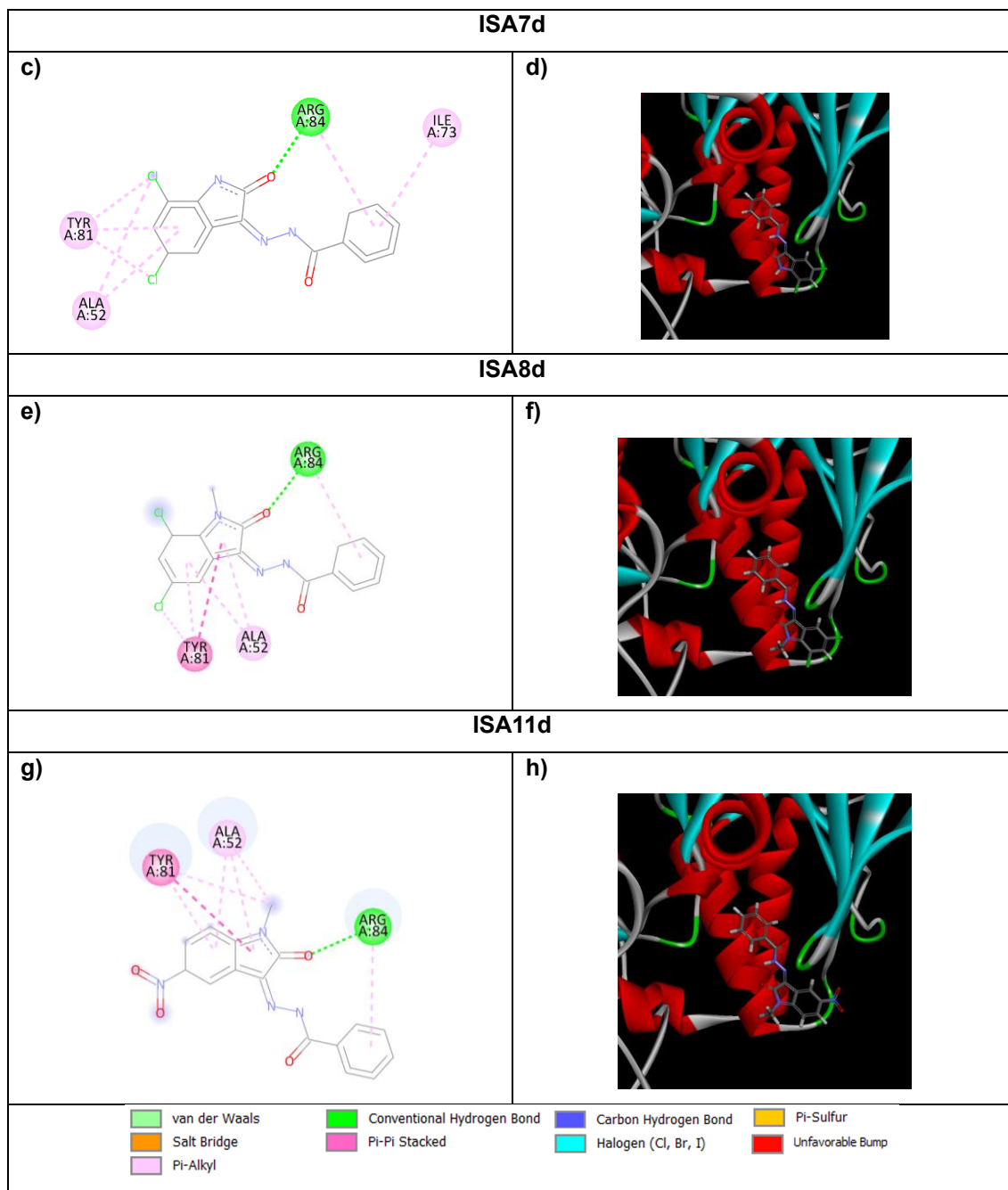


Fonte: Formiga, 2025

Acerca dos complexos formados com Erk1, os derivados formaram menos interações que o ligante co-cristalizado (Figura 40 a,b). Entre os derivados da isatina, as três substâncias possuíram interações semelhantes, com destaque a uma ligação de hidrogênio que todos formam com Arg84 (Chiniadis *et al.*, 2021).

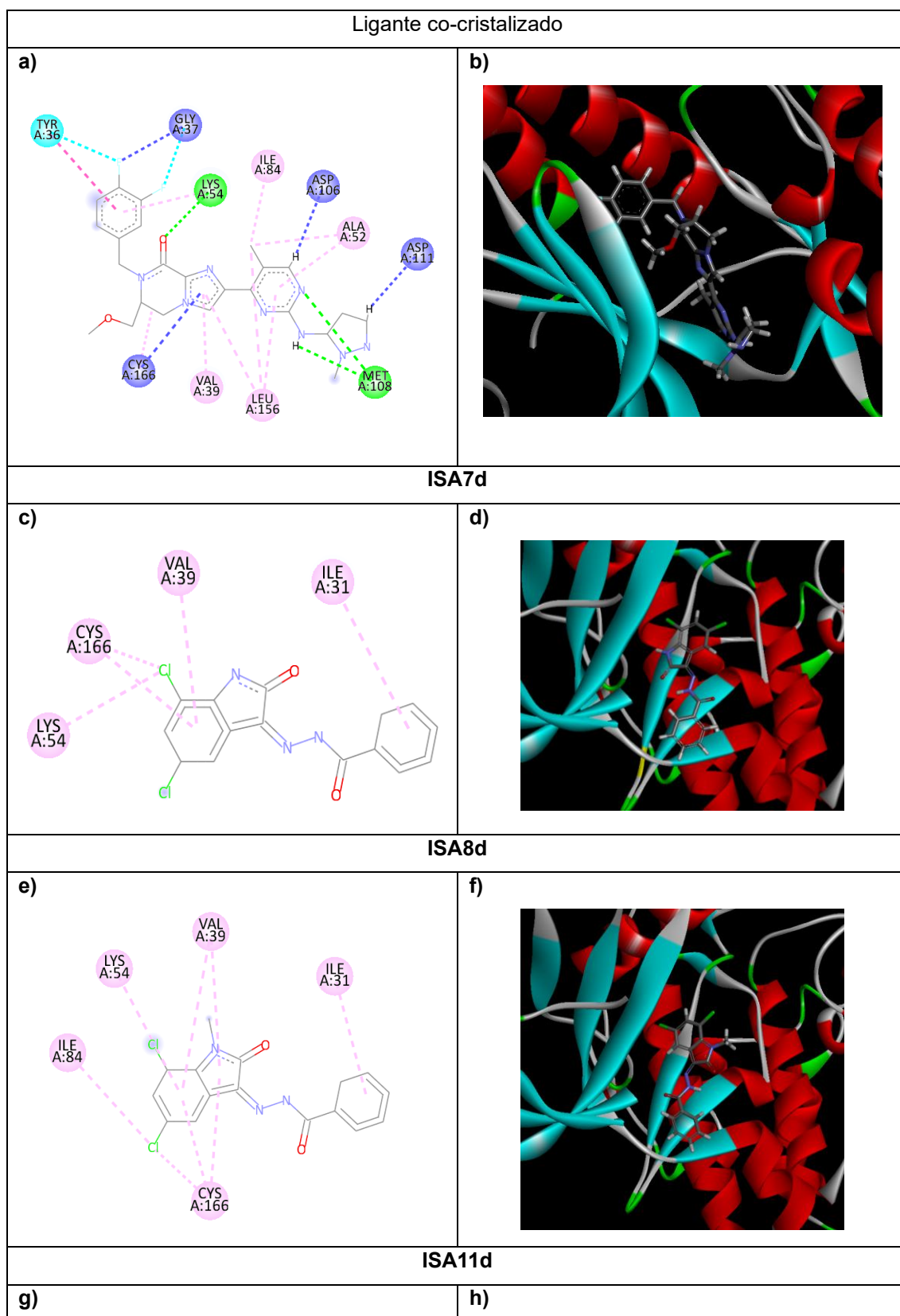
Figura 40. Interações intermoleculares formadas por Erk1 e ligantes analisados

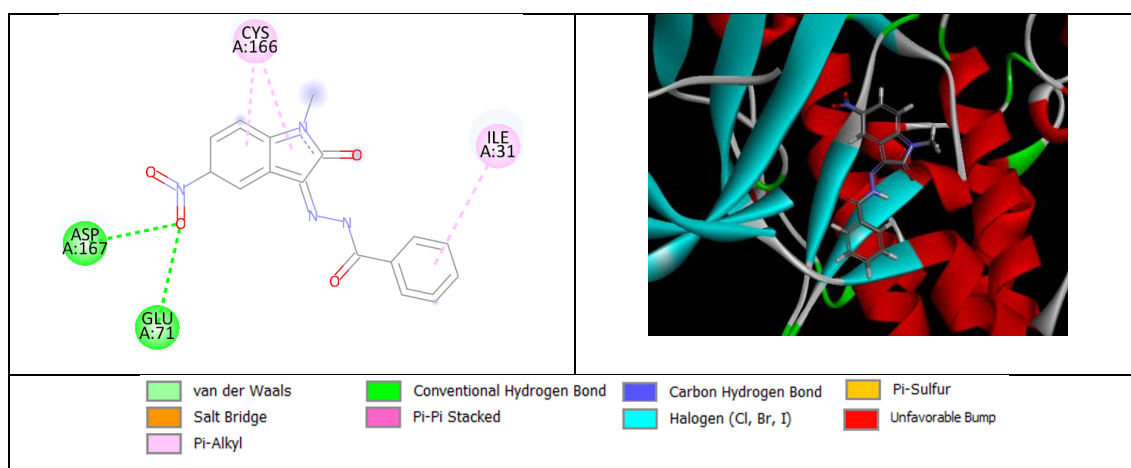




Fonte: Formiga, 2025

Já em relação a Erk de forma não seletiva (Erk1/2), resultados similares foram obtidos, com o ligante co-cristalizado (Figura 41 a,b) possuindo o melhor valor de escore. ISA7d (Figura 41 c,d), ISA8d (Figura 41 e,f) e ISA11d (Figura 41 g,h) também possuíram escores similares de energia de ligação (Chaikuad *et al.*, 2014).

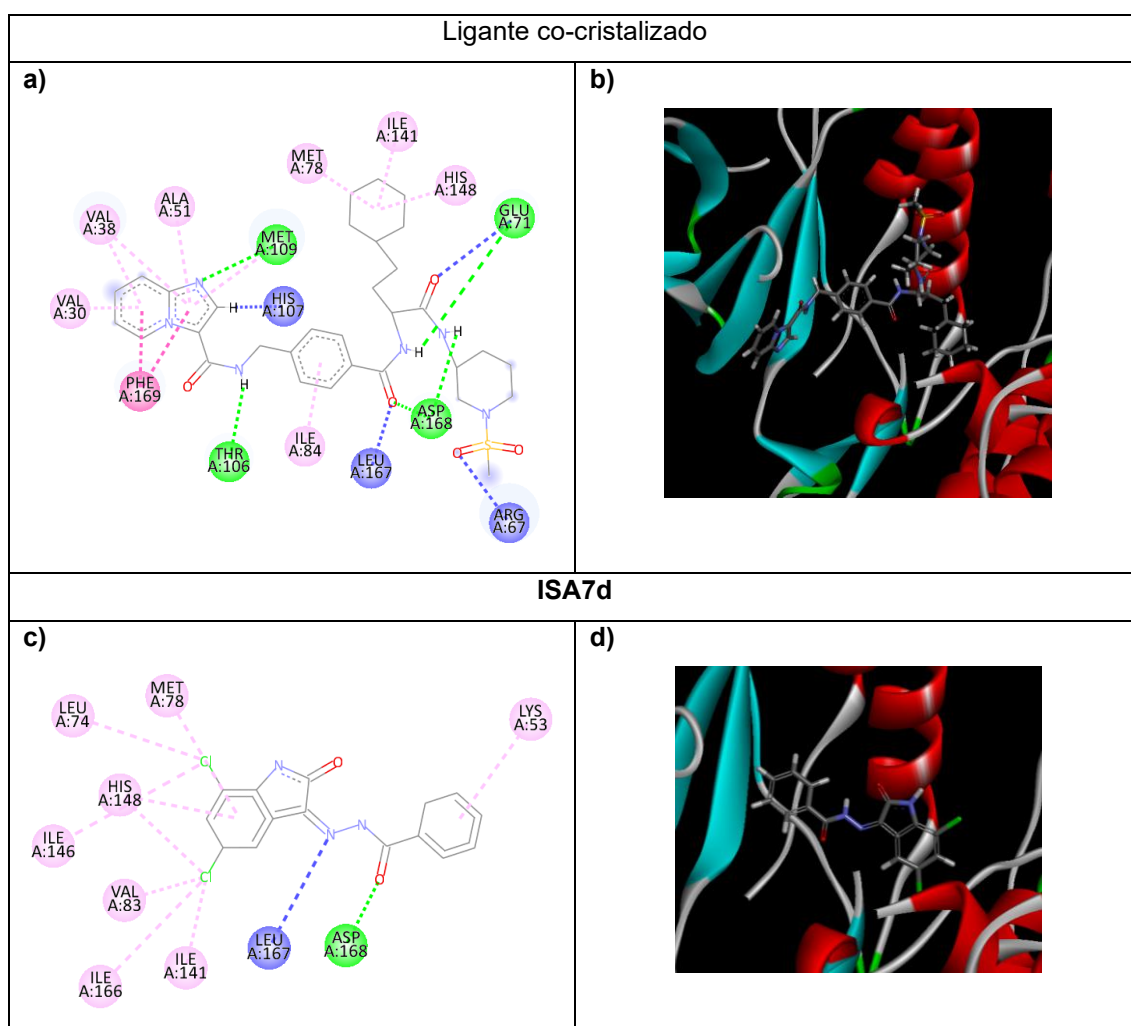
Figura 41. Interações intermoleculares formadas por Erk1/2 e ligantes analisados

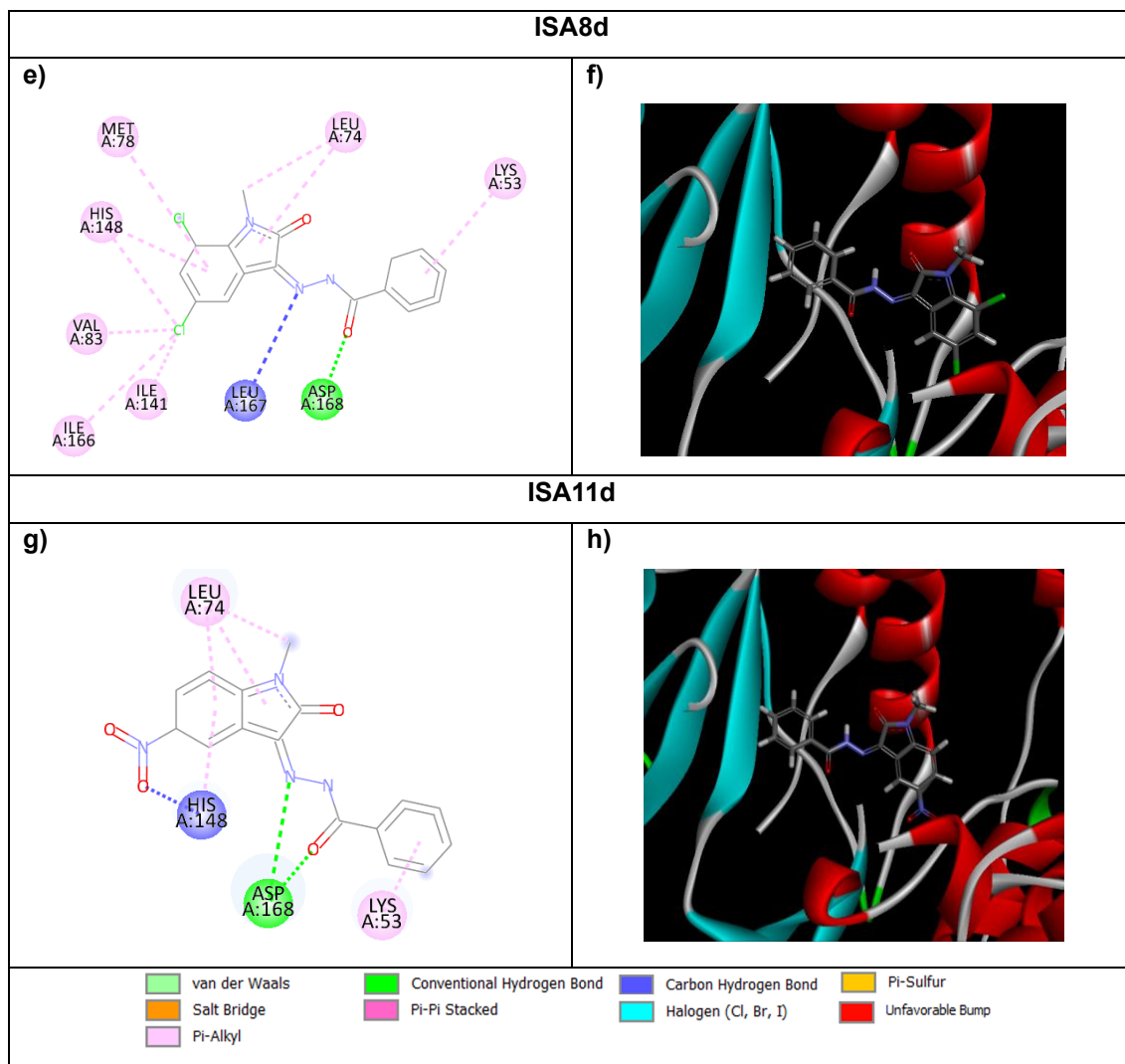


Fonte: Formiga, 2025

Por fim, o ligante co-cristalizado obteve o melhor resultado no complexo formado com p38- α (Figura 42 a,b). No que se refere aos derivados de isatina, ISA8d formou mais interações comparado a ISA7d e ISA11d (Ward *et al.*, 2019).

Figura 42. Interações intermoleculares formadas por p38- α e ligantes analisados





Fonte: Formiga, 2025

Nessa perspectiva, o mecanismo de morte celular possivelmente está atrelado à via da JNK para todas as isatinas, tendo em vista que apresentaram interações mais favoráveis quando comparadas ao ligante padrão. Todavia, esses resultados não anulam a possibilidade de morte por outras vias, apesar de menos favorecidas, sendo necessários estudos *in vitro* posteriores para a confirmação desse parâmetro.

Considerações finais

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os derivados de isatinas foram encapsulados em nanopartículas formando sistemas seguros e eficazes frente a linhagens tumorais. Os métodos analíticos para determinar as moléculas por HPLC foram validados, comprovando que estão aptos para quantificar a molécula em matriz complexa. Apesar de sua característica mais lipofílica, as isatinas apresentaram baixa solubilidade em MCT e se degradaram após 30 dias, principalmente sob diferentes temperaturas. Além disso, as nanopartículas foram escolhidas de acordo com os melhores parâmetros no estudo de pré-formulação e planejamento fatorial, onde o Kolliphor® e o MCT foram as principais variáveis que influenciaram no tamanho das partículas. A NCP otimizado foi efetivamente submetido à funcionalização com quitosana e PEG em diferentes concentrações, o que induziu variações principalmente no potencial zeta. As isatinas foram adicionadas e as nanopartículas foram purificadas, permanecendo com mesmos parâmetros físico-químicos obtidos com as partículas sem fármaco. Os sistemas se mantiveram estáveis por 90 dias a 4°C, preservando sua forma esférica e resistindo a altas temperaturas, com exceção das partículas funcionalizadas com quitosana. Apesar de baixos doseamento, as NCPs foram efetivamente encapsuladas e quando incubadas com albumina, todos apresentaram boa estabilidade ao longo do tempo e com o aumento das concentrações. Por fim, as qNCPs induziram a maior toxicidade celular contra a linhagem celular MCF-7 e provavelmente essa taxa de morte é devido ao estresse oxidativo através da via da JNK, conforme confirmado *in vitro* e *in silico*. Portanto, este sistema nanotecnológico funcionalizado e projetado com características compatíveis são promissores para aplicações futuras no tratamento do câncer de mama.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- CHEOW, W. S.; HADINOTO, K. Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 370, n. 1–3, p. 79–86, nov. 2010.
- HAMAUE, N. *et al.* Determination of Isatin, an Endogenous Monoamine Oxidase Inhibitor, in Urine and Tissues of Rats by HPLC. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 30, n. 3, p. 387–391, mar. 1998.
- KUMAR, G. *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution studies of orally administered nanoparticles encapsulated ethionamide used as potential drug delivery system in management of multi-drug resistant tuberculosis. **Drug Delivery**, v. 18, n. 1, p. 65–73, 24 jan. 2011.
- LUO, Q. *et al.* Tumor Microenvironment-Responsive Shell/Core Composite Nanoparticles for Enhanced Stability and Antitumor Efficiency Based on a pH-Triggered Charge-Reversal Mechanism. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 895, 16 jun. 2021.
- MAWATARI, K. *et al.* Fluorimetric determination of isatin in human urine and serum by liquid chromatography postcolumn photoirradiation. **The Analyst**, v. 126, n. 1, p. 33–36, 2001.
- OH, J. Y. *et al.* Mesoporous silica nanoparticle-supported nanocarriers with enhanced drug loading, encapsulation stability, and targeting efficiency. **Biomaterials Science**, v. 10, n. 6, p. 1448–1455, 2022.
- REGALADO, E. L. *et al.* The Emergence of Universal Chromatographic Methods in the Research and Development of New Drug Substances. **Accounts of Chemical Research**, v. 52, n. 7, p. 1990–2002, 16 jul. 2019.
- TANTRA, R.; JARMAN, J. C.; ROBINSON, K. N. Introduction. Em: TANTRA, R. (Ed.). **Nanomaterial Characterization**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2016. p. 1–24.
- VARENNE, F. *et al.* Towards quality assessed characterization of nanomaterial: Transfer of validated protocols for size measurement by dynamic light scattering and evaluation of zeta potential by electrophoretic light scattering. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, n. 1–2, p. 299–311, ago. 2017.
- ABBASI, S.; RADI, M. Food grade microemulsion systems: Canola oil/lecithin:n-propanol/water. **Food Chemistry**, v. 194, p. 972–979, mar. 2016.

ABDELKHALIQ, A. *et al.* Impact of nanoparticle surface functionalization on the protein corona and cellular adhesion, uptake and transport. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 70, 15 dez. 2018.

ABDOLMALEKI, A. *et al.* Importance of Nano Medicine and New Drug Therapies for Cancer. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 11, n. 3, p. 450–457, maio 2021.

ABESEKARA, M. S.; CHAU, Y. Recent advances in surface modification of micro- and nano-scale biomaterials with biological membranes and biomolecules. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 12 out. 2022.

AHMED, A. *et al.* UV–vis spectroscopic method for detection and removal of heavy metal ions in water using Ag doped ZnO nanoparticles. **Chemosphere**, v. 303, p. 135208, set. 2022.

AIBANI, N. *et al.* Chitosan Nanoparticles at the Biological Interface: Implications for Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 10, p. 1686, 14 out. 2021.

AL-KHUZAIE, M. G. A.; FAHAD, M. M.; AL-SAFI, A. J. A Review on Synthesis, Reaction and Biological Importance of Isatin Derivatives. **Biomedicine and Chemical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 193–206, 1 jul. 2022.

AL-MULLA, A. Enthalpy-Entropy Compensation in Polyester Degradation Reactions. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

ALRUSHAID, N. *et al.* Nanotechnology in Cancer Diagnosis and Treatment. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, p. 1025, 22 mar. 2023.

Andrade, I. M. G. Investigação do **Solvente Eutético Cloreto de Colina/Etilenoglicol da Preparação de Adutos de Moritabaylis Hillman Derivados da Acrilonitrila**. 2022. Dissertação (Mestrado em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2022.

ANEJA, B. *et al.* Design and development of Isatin-triazole hydrazones as potential inhibitors of microtubule affinity-regulating kinase 4 for the therapeutic management of cell proliferation and metastasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 163, p. 840–852, fev. 2019.

ANGEL-ISAZA, A. M.; BUSTAMANTE-CRISTANCHO, L. A.; URIBE-B, F. L. Successful Outcome Following Intravenous Lipid Emulsion Rescue Therapy in a Patient with Cardiac Arrest Due to Amitriptyline Overdose. **The American journal of case reports**, v. 21, p. e922206, 24 maio 2020.

ARANAZ, I. *et al.* Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. **Polymers**, v. 13, n. 19, p. 3256, 24 set. 2021.

BADRI, W. *et al.* Elaboration of Nanoparticles Containing Indomethacin: Argan Oil for Transdermal Local and Cosmetic Application. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, n. 1, 18 jan. 2015.

BALLEGOOIE, C. V.AN *et al.* PEG Conjugated Zein Nanoparticles for In Vivo Use. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, p. 1831, 31 ago. 2022.

BANDYOPADHYAY, S.; MANI, E. Design and modeling of sub-micron particles via precipitation. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 59–91.

BANERJEE, B. *et al.* Synthesis of Isatin-derived Heterocycles with Promising Anticancer Activities. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 96–123, jan. 2025.

BARZAMAN, K. *et al.* Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **International Immunopharmacology**, v. 84, p. 106535, jul. 2020.

BECKER, J. W. *et al.* Reducing the Peptidyl Features of Caspase-3 Inhibitors: A Structural Analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 2466–2474, 1 maio 2004.

BERKO, Y. A.; FUNMILOLA, A. F.; AKALA, E. O. Fabrication of Paclitaxel and 17AAG-loaded Poly- ϵ -Caprolactone Nanoparticles for Breast Cancer Treatment. **Journal of Pharmaceutics & Drug Delivery Research**, v. 10, n. 1, jan. 2021.

BERRECOSO, G.; CRECENTE-CAMPO, J.; ALONSO, M. J. Quantification of the actual composition of polymeric nanocapsules: a quality control analysis. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 12, n. 11, p. 2865–2874, nov. 2022.

BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 85–100, 21 fev. 2020.

BOERIS, V.; FARRUGGIA, B.; PICÓ, G. Chitosan–bovine serum albumin complex formation: A model to design an enzyme isolation method by polyelectrolyte precipitation. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 19, p. 1543–1548, jun. 2010.

BOICE, A.; BOUCHIER-HAYES, L. Targeting apoptotic caspases in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1867, n. 6, p. 118688, jun. 2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Instituto nacional de câncer (INCA). **Estimativa 2023 | incidência de câncer no brasil**. Rio de janeiro, 2023a. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>>. Acesso em: 04 fev. 2024.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Instituto Nacional De Câncer (INCA). **Dados e números sobre câncer de mama - Relatório anual 2022**. Rio de Janeiro, 2023b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/dados_e_numeros_site_cancer_mama_setembro2022.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe da validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário oficial da união**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166_24_07_2017.pdf. Acesso em: 02 fev 2025

BRAY, F. *et al*. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, 4 maio 2024.

BROWN, J. S. *et al*. Updating the Definition of Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 21, n. 11, p. 1142–1147, 1 nov. 2023.

BROWN, T. D. *et al*. Effect of Nanoparticle Composition, Size, Shape, and Stiffness on Penetration Across the Blood–Brain Barrier. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 6, n. 9, p. 4916–4928, 14 set. 2020.

BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2 maio 2020.

BURLEC, A. F. *et al*. Current Overview of Metal Nanoparticles' Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications, with a Focus on Silver and Gold Nanoparticles. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 10, p. 1410, 4 out. 2023.

BUYEL, J. F. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 506–520, mar. 2018.

BYRN, S. R.; ZOGRAFI, G. D.; CHEN, X. (SEAN). Differential Scanning Calorimetry and Thermogravimetric Analysis. *Em: Solid State Properties of Pharmaceutical Materials*. [s.l.] Wiley, 2017. p. 124–141.

CAHYANA, A. H. *et al.* Eco-friendly Cu/NiO nanoparticle synthesis: Catalytic potential in isatin-based chalcone synthesis for anticancer activity. **MethodsX**, v. 11, p. 102471, dez. 2023.

CAPRIFICO, A. E. *et al.* Overcoming the protein corona in chitosan-based nanoparticles. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 8, p. 1825–1840, ago. 2021.

CASTILLO-TOBIÁS, I. *et al.* Fundamental Considerations of Targeted Drug Therapies for Breast Cancer. **Future Pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 686–707, 8 out. 2023.

CHAIKUAD, A. *et al.* A unique inhibitor binding site in ERK1/2 is associated with slow binding kinetics. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 10, p. 853–860, 7 out. 2014.

CHAUURASIA, V.; ARORA, N.; ARORA, V. Formulation and Development of Nanoparticulate Drug Delivery System in the Treatment of Cancer. **International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance**, v. 15, n. 03, p. 1613–1620, 25 set. 2024.

CHEKE, R. S. *et al.* Therapeutic Outcomes of Isatin and Its Derivatives against Multiple Diseases: Recent Developments in Drug Discovery. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 3, p. 272, 22 fev. 2022.

CHEKROUN, E. *et al.* Antioxidant activity and phytochemical screening of two Cucurbitaceae: Citrullus colocynthis fruits and Bryonia dioica roots. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 8, p. 632–637, ago. 2015.

CHEN, C. *et al.* Thermo-responsive composite nanoparticles based on hydroxybutyl chitosan oligosaccharide: Fabrication, stimulus release and cancer therapy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 276, p. 133842, set. 2024.

CHEN, HONGMEI *et al.* Thermal degradation and combustion properties of most popular synthetic biodegradable polymers. **Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy**, v. 41, n. 2, p. 431–441, 15 fev. 2023.

CHEN, Y. *et al.* Enzymatic PEG-Poly(amine- co -disulfide ester) Nanoparticles as pH- and Redox-Responsive Drug Nanocarriers for Efficient Antitumor Treatment. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 36, p. 30519–30535, 13 set. 2017.

CHINIADIS, L. *et al.* Insights into the Protein Ruthenation Mechanism by Antimetastatic Metallodrugs: High-Resolution X-ray Structures of the Adduct

Formed between Hen Egg-White Lysozyme and NAMI-A at Various Time Points. **Inorganic Chemistry**, v. 60, n. 14, p. 10729–10737, 19 jul. 2021.

COGLITORE, D.; JANOT, J.-M.; BALME, S. Protein at liquid solid interfaces: Toward a new paradigm to change the approach to design hybrid protein/solid-state materials. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 270, p. 278–292, ago. 2019.

CORTÉS, H. *et al.* Non-Ionic Surfactants for Stabilization of Polymeric Nanoparticles for Biomedical Uses. **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 12, 10 jun. 2021. CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, jun. 2013.

CYBORAN-MIKOŁAJCZYK, S. *et al.* The influence of the chlorine atom on the biological activity of 2'-hydroxychalcone in relation to the lipid phase of biological membranes - Anticancer and antimicrobial activity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 398, p. 111082, ago. 2024.

DANAEI, M.; *et al.* ,. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018.

DANG, Y.; GUAN, J. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. **Smart Materials in Medicine**, v. 1, p. 10–19, 2020.

DEMBITSKY, V.; GLORIOZOVA, T.; POROIKOV, V. Novel Antitumor Agents: Marine Sponge Alkaloids, their Synthetic Analogs and Derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 319–336, 1 mar. 2005.

DENG, S. *et al.* Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status, Challenges and Opportunities. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 5, 28 abr. 2020.

DING, H.; MA, Y. Computer simulation of the role of protein corona in cellular delivery of nanoparticles. **Biomaterials**, v. 35, n. 30, p. 8703–8710, out. 2014.

DINTCHEVA, N. TZ.; D'ANNA, F. Anti-/Pro-Oxidant Behavior of Naturally Occurring Molecules in Polymers and Biopolymers: A Brief Review. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 15, p. 12656–12670, 5 ago. 2019.

DONG, X. *et al.* Development of new lipid-based paclitaxel nanoparticles using sequential simplex optimization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 1, p. 9–17, maio 2009.

FARAHANI, M. K. *et al.* Breast cancer brain metastasis: from etiology to state-of-the-art modeling. **Journal of Biological Engineering**, v. 17, n. 1, p. 41, 29 jun. 2023.

FERRAZ DE PAIVA, R. E. *et al.* Anticancer Compounds Based on Isatin-Derivatives: Strategies to Ameliorate Selectivity and Efficiency. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 4 fev. 2021.

FIAMINGO, A.; FILHO, S. P. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. **Tuning the Properties of High Molecular Weight Chitosans to Develop Full Water Solubility Within a Wide pH Range**, 17 fev. 2020.

FONSECA, A. DaA *et al.* PA-Int5: An isatin-thiosemicarbazone derivative that exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory effects in Swiss mice. **Biomedical Reports**, v. 15, n. 1, p. 61, 26 maio 2021.

GAVAS, S.; QUAZI, S.; KARPIŃSKI, T. M. Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. **Nanoscale Research Letters**, v. 16, n. 1, p. 173, 5 dez. 2021.

GERMANN, L. S. *et al.* Modulating Thermal Properties of Polymers through Crystal Engineering. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 62, n. 19, 2 maio 2023.

GHOSH, D. C.; GUPTA, K. A NEW SCALE OF ELECTRONEGATIVITY OF 54 ELEMENTS OF PERIODIC TABLE BASED ON POLARIZABILITY OF ATOMS. **Journal of Theoretical and Computational Chemistry**, v. 05, n. 04, p. 895–911, 21 dez. 2006.

GHOSH, D.; PRAMANIK, P. LOW MOLECULAR WEIGHT BIODEGRADABLE POLYMER BASED NANOPARTICLES AS POTENTIAL DELIVERY SYSTEMS FOR THERAPEUTICS: THE WAY FORWARD? **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, p. 31–34, 1 jan. 2010.

GIBOT, L. *et al.* Anticancer properties of chitosan on human melanoma are cell line dependent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 370–379, jan. 2015.

GUO, H. Isatin derivatives and their anti-bacterial activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 164, p. 678–688, fev. 2019.

GUPTA, A. K. *et al.* Systematic Review on Cytotoxic and Anticancer Potential of N-Substituted Isatins as Novel Class of Compounds Useful in Multidrug-Resistant Cancer Therapy: In Silico and In Vitro Analysis. **Topics in Current Chemistry**, v. 377, n. 3, p. 15, 9 jun. 2019.

HANIKOGLU, A. *et al.* Hybrid Compounds & Oxidative Stress Induced Apoptosis in Cancer Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 13, p. 2118–2132, 24 abr. 2020.

HOBBS, K. F. *et al.* Allosteric Tuning of Caspase-7: Establishing the Nexus of Structure and Catalytic Power. **Chemistry – A European Journal**, v. 29, n. 40, 14 jul. 2023.

HOU, Y. *et al.* Isatin–azole hybrids and their anticancer activities. **Archivder Pharmazie**, v. 353, n. 1, 6 jan. 2020.

ISHCHENKO, A. A. *et al.* UV–Vis absorption spectra and electronic structure of merocyanines in the gas phase. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 190, p. 332–335, fev. 2018.

JIN, D. *et al.* Active regulation of protein coronas for enhancing the in vivo biodistribution and metabolism of nanoparticles. **Inorganic Chemistry Frontiers**, v. 11, n. 17, p. 5741–5752, 2024.

KARNWAL, A. *et al.* Transforming Medicine with Nanobiotechnology: Nanocarriers and Their Biomedical Applications. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 9, p. 1114, 23 ago. 2024.

KASHYAP, D. *et al.* [Retracted] Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. **BioMed Research International**, v. 2022, n. 1, 18 jan. 2022.

KAUR, J.; CHIMNI, S. S. Catalytic synthesis of 3-aminooxindoles *via* addition to isatin imine: an update. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 16, n. 18, p. 3328–3347, 2018.

KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 598–613, jul. 2018.

KLOCHKOV, S.; NEGANOVA, M. Unique indolizidine alkaloid securinine is a promising scaffold for the development of neuroprotective and antitumor drugs. **RSC Advances**, v. 11, n. 31, p. 19185–19195, 2021.

KOOTI, W. *et al.* Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Part 2: Review Study. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 22, n. 4, p. 982–995, 31 out. 2017.

KRUK, J. *et al.* Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. **Free Radical Research**, v. 53, n. 5, p. 497–521, 4 maio 2019.

KUMAR, Y. *et al.* Functionalized nanoparticles: Tailoring properties through surface energetics and coordination chemistry for advanced biomedical applications. **Nanoscale**, v. 15, n. 13, p. 6075–6104, 2023.

KURCZEWSKA, J. Chitosan-Based Nanoparticles with Optimized Parameters for Targeted Delivery of a Specific Anticancer Drug—A Comprehensive Review. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 503, 2 fev. 2023.

LAMARRA, J. *et al.* Structural Insight into Chitosan Supports Functionalized with Nanoparticles. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2018, n. 1, jan. 2018.

LAYEK, B.; DAS, S. Chitosan-based nanomaterials in drug delivery applications. *Em*: **Biopolymer-Based Nanomaterials in Drug Delivery and Biomedical Applications**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 185–219.

LI, Y. *et al.* Globular Protein-Coated Paclitaxel Nanosuspensions: Interaction Mechanism, Direct Cytosolic Delivery, and Significant Improvement in Pharmacokinetics. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, p. 1485–1500, 4 maio 2015.

LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. Volume 13, p. 757–772, abr. 2018.

LIU, M. *et al.* Synthesis and SAR of 1,9-dihydro-9-hydroxypyrazolo[3,4-b]quinolin-4-ones as novel, selective c-Jun N-terminal kinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 10, p. 2590–2594, maio 2006.

LIU, Z. *et al.* Study on the NO₂ production pathways and the role of NO₂ in fast selective catalytic reduction DeNO_x at low-temperature over MnO_x/TiO₂ catalyst. **Chemical Engineering Journal**, v. 379, p. 122288, jan. 2020.

LOMBARDO, D.; KISELEV, M. A.; CACCAMO, M. T. Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine. **Journal of Nanomaterials**, v. 2019, p. 1–26, 27 fev. 2019.

LU, W. *et al.* Nanomedicines: Redefining traditional medicine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 134, p. 111103, fev. 2021.

LU, Z. *et al.* Activation of reactive oxygen species-mediated mitogen-activated protein kinases pathway regulates both extrinsic and intrinsic apoptosis induced by arctigenin in Hep G2. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 29–43, 1 jan. 2020.

MADDELA, S.; MAKULA, A.; JAYARAMBABU, N. Fe₃O₄ Nanoparticles Mediated Synthesis of Novel Isatin-dihydropyrimidinone Hybrid Molecules as Antioxidant and Cytotoxic Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 456–463, 20 fev, 2017.

MAEDA, Y.; KIMURA, Y. Antitumor Effects of Various Low-Molecular-Weight Chitosans Are Due to Increased Natural Killer Activity of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes in Sarcoma 180–Bearing Mice. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 945–950, abr. 2004.

MALLORY, D. P. *et al.* Direct Quantification of Serum Protein Interactions with PEGylated Micelle Nanocarriers. **Biomacromolecules**, v. 24, n. 6, p. 2479–2488, 12 jun. 2023.

MANGAS-SANJUAN, V. *et al.* Innovative in Vitro Method To Predict Rate and Extent of Drug Delivery to the Brain across the Blood–Brain Barrier. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 10, p. 3822–3831, 7 out. 2013.

MAYOOKHA, V. P. *et al.* Solvent-free synthesis of medium chain triacylglycerols by esterification of capric, caprylic acids with 1, 3-specific and non-specific lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 9 nov. 2024.

MISHRA, B. *et al.* Chitosan Nanoparticle-Mediated Delivery of Curcumin Suppresses Tumor Growth in Breast Cancer. **Nanomaterials**, v. 14, n. 15, p. 1294, 31 jul. 2024.

MOHAMMADIAN, S. *et al.* Polycaprolactone-based Nanocarriers Containing 5-fluorouracil as a Therapeutic Guided Drug Delivery Approach for Enhancing Anticancer Activity. **Current Cancer Drug Targets**, v. 23, n. 7, p. 524–533, ago. 2023.

MOK, H.; PARK, J. W.; PARK, T. G. Enhanced Intracellular Delivery of Quantum Dot and Adenovirus Nanoparticles Triggered by Acidic pH via Surface Charge Reversal. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 797–801, 1 abr. 2008.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 80, p. 50–64, ago. 2018.

MORANA, O.; WOOD, W.; GREGORY, C. D. The Apoptosis Paradox in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1328, 25 jan. 2022.

MURALEEDHARAN, K. *et al.* Kinetic Studies on the Thermal Dehydration and Degradation of Chitosan and Citralidene Chitosan. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, n. 1, p. 1–10, 22 mar. 2015.

NATH, P. *et al.* Isatin: A Scaffold with Immense Biodiversity. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 9, p. 1096–1112, jun. 2021.

NAVYA, P. N. *et al.* Current trends and challenges in cancer management and therapy using designer nanomaterials. **Nano Convergence**, v. 6, n. 1, p. 23, 15 dez. 2019.

NEVE, R. M. *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer Cell**, v. 10, n. 6, p. 515–527, dez. 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NOGUEIRA, D. R. *et al.* In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 11, p. 2758–2772, abr. 2013.

NOH, J. *et al.* Selective CO₂ adsorption and bathochromic shift in a phosphocholine-based lipid and conjugated polymer assembly. **RSC advances**, v. 12, n. 14, p. 8385–8393, 15 mar. 2022.

NOLAN, E.; LINDEMAN, G. J.; VISVADER, J. E. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. **Cell**, v. 186, n. 8, p. 1708–1728, abr. 2023.

NORIEGA, S. *et al.* The Diverse Biological Activity of Recently Synthesized Nitro Compounds. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 6, p. 717, 5 jun. 2022.

Nunes, J. S. **Planejamento estrutural, síntese e avaliação da atividade biológica de tiazóis derivados da isatina**. 2023. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. 2023.

OCKULY, R. A. *et al.* Response surface experiments: A meta-analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 164, p. 64–75, maio 2017.

OLIVER METZIG, M. *et al.* Inhibition of caspases primes colon cancer cells for 5-fluorouracil-induced TNF- α -dependent necroptosis driven by RIP1 kinase and NF- κ B. **Oncogene**, v. 35, n. 26, p. 3399–3409, 30 jun. 2016.

Organização Pan-Americana De Saúde (OPAS). **OPAS pede ampliação do acesso ao tratamento do câncer para salvar vidas**. 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/4-2-2022-opas-pede-ampliacao-do-acesso-ao-tratamento-do-cancer-para-salvar-vidas>. Acesso em 25 de out de 2023.

ORLOVA, D. D. *et al.* A Study on Hydrolytic Stability of Isatin N-Mannich Bases. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 48–56, 5 jan. 2018.

PAJUELO-LOZANO, N. *et al.* XPA, XPC, and XPD Modulate Sensitivity in Gastric Cisplatin Resistance Cancer Cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 17 out. 2018.

PATEL, K. *et al.* Medium Chain Triglyceride (MCT) Rich, Paclitaxel Loaded Self Nanoemulsifying Preconcentrate (PSNP): A Safe and Efficacious Alternative to Taxol. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 12, p. 1996–2006, 1 dez. 2013.

POLI, E.; JONG, K. H.; HASSANALI, A. Charge transfer as a ubiquitous mechanism in determining the negative charge at hydrophobic interfaces. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 901, 14 fev. 2020.

Prajapat, P. *et al.* Synthetic and Medicinal Chemistry in Drug Discovery: Needs for Today. **Ann Med Chem Res**, v. 3, n.1, p.1021, 2017.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D.; ARCINIEGA, M.; MEDINA-FRANCO, J. L. Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. **TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 21, 4 maio 2018.

QIN, C. *et al.* Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, n. 1–3, p. 111–117, dez. 2002.

RAMASWAMY, M.; DENG, M.; SIEGEL, R. M. Harnessing programmed cell death as a therapeutic strategy in rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 3, p. 152–160, 1 mar. 2011.

RAVAL, N. *et al.* Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. *Em: Basic Fundamentals of Drug Delivery*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 369–400.

RODRIGUES, N. C. P. *et al.* The Effect of Continuous Low-Intensity Exposure to Electromagnetic Fields from Radio Base Stations to Cancer Mortality in Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 3, p. 1229, 29 jan. 2021.

ROMIO, A. P. *et al.* Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization with Biodegradable Surfactant and Hydrophobe. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 210, n. 9, p. 747–751, 6 maio 2009.

SALVI, V. R.; PAWAR, P. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 255–267, jun. 2019.

SAMMARTANO, A. *et al.* Validation of the HPLC Analytical Method for the Determination of Chemical and Radiochemical Purity of Ga-68-DOTATATE. **Indian journal of nuclear medicine : IJNM : the official journal of the Society of Nuclear Medicine, India**, v. 38, n. 1, p. 1–7, 2023.

SANGI, D. P. SYNTHETIC STRATEGIES IN DRUG DISCOVERY: EMPLOYING DIVERSITY-ORIENTED SYNTHESIS. **Química Nova**, 2016.

SAVIO, L. *et al.* Profilometry: a non-intrusive active stereo-vision technique for wave-profile measurements in large hydrodynamic laboratories. **Experiments in Fluids**, v. 65, n. 9, p. 137, 6 set. 2024.

SCHENK, S. T. *et al.* Nitrate activates a MKK3-dependent MAPK module via NLP transcription factors in Arabidopsis, 12 jul. 2024.

SHAKEEL, F. *et al.* Measurement, Correlation, and Thermodynamics of Solubility of Isatin in Nine Different Green Solvents at (298.15 to 338.15) K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 60, n. 3, p. 801–805, 12 mar. 2015.

SHI, L. *et al.* Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. **Nanoscale**, v. 13, n. 24, p. 10748–10764, 2021.

SHIN, H.-Y.; LEE, J. H.; KIM, J.-Y. Formation mechanism of nanocomposites between starch and stearic acid via nanoprecipitation. **Food Hydrocolloids**, v. 131, p. 107780, out. 2022.

SHOURNI, S. *et al.* Characterization of protein corona formation on nanoparticles via the analysis of dynamic interfacial properties: Bovine serum albumin - silica particle interaction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 638, p. 128273, abr. 2022.

- SILVA, D. F. *et al.* Biomedical Approach of Nanotechnology and Biological Risks: A Mini-Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 23, p. 16719, 24 nov. 2023.
- SILVA, G. A. DA *et al.* Bentonite catalyzed solvent-free synthesis of N'-(2-oxoindolin-3-ylidene) benzohydrazide derivatives under microwave irradiation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1270, p. 133914, dez. 2022a.
- SIMON, J. *et al.* Exploiting the biomolecular corona: pre-coating of nanoparticles enables controlled cellular interactions. **Nanoscale**, v. 10, n. 22, p. 10731–10739, 2018.
- SINGH, S. *et al.* Aromatic Oils from Medicinal Plants and Their Role in Nanoparticles Synthesis, Characterization, and Applications. *Em: Secondary Metabolites from Medicinal Plants*. Boca Raton: CRC Press, 2023. p. 305–314.
- SIVALINGAM, G.; MADRAS, G. Thermal degradation of poly (ϵ -caprolactone). **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, n. 1, p. 11–16, jan. 2003a.
- SONG, F. *et al.* Indole/isatin-containing hybrids as potential antibacterial agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 10, 15 out. 2020.
- SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101–106, 27 jan. 2012.
- STATHOPOULOS, N. *et al.* Experimental investigation of thermal degradation of phase change materials for medium-temperature thermal energy storage and tightness during cycling inside metal spheres. **Journal of Energy Storage**, v. 31, p. 101618, out. 2020.
- SUFFREDINI, G.; EAST, J. E.; LEVY, L. M. New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging. **American Journal of Neuroradiology**, v. 35, n. 7, p. 1246–1253, jul. 2014a.
- SZCZEPANOWICZ, K. *et al.* Co-adsorption of polyanions and esterquat surfactants; effect on formation and stability of micellar core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 519, p. 117–124, abr. 2017.
- TAGDE, P. *et al.* Nanomedicine-Based Delivery Strategies for Breast Cancer Treatment and Management. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2856, 5 mar. 2022.

TAGLIERI, L. *et al.* Discovery of a pyrimidine compound endowed with antitumor activity. **Investigational New Drugs**, v. 38, n. 1, p. 39–49, 21 fev. 2020.

TIAN, X. *et al.* Targeting apoptotic pathways for cancer therapy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 134, n. 14, 15 jul. 2024.

TILLEQUIN, F. Rutaceous alkaloids as models for the design of novel antitumor drugs. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, n. 1, p. 65–79, 20 mar. 2007.

UCHÔA, A. F. C. *et al.* Optimization and functionalization of copaiba oil-loaded nanostructured lipid carriers to improve cytotoxicity against breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 105, p. 106575, mar. 2025.

VAGHARI-TABARI, M. *et al.* Signaling, metabolism, and cancer: An important relationship for therapeutic intervention. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 8, p. 5512–5532, 12 ago. 2021.

VALENCIA, M. S. *et al.* Bioactivity and cytotoxicity of quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, p. 101879, jan. 2021.

VARUN; SONAM; KAKKAR, R. Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications. **MedChemComm**, v. 10, n. 3, p. 351–368, 1 mar. 2019.

VASKAN, I. *et al.* Effect of ligand and shell densities on the surface structure of core–shell nanoparticles self-assembled from function–spacer–lipid constructs. **Biomaterials Science**, v. 12, n. 3, p. 798–806, 2024.

VEG, E. *et al.* The Role of Nanomaterials in Diagnosis and Targeted Drug Delivery. **Chemistry & Biodiversity**, v. 22, n. 1, 4 jan. 2025.

VELASCO-BEJARANO, B. *et al.* Electronegativity Effect on C-Halogen Bond Stretching in Alkyl Halides at Higher Education Level. **Journal of Educational Issues**, v. 10, n. 2, p. 88, 4 nov. 2024.

VENDITTI, I. Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: A review. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 3, p. 398–411, jul. 2019.

WANG, C. *et al.* Preparation and thermal properties of shape-stabilized polyethylene glycol/mesoporous silica composite phase change materials for thermal energy storage. **Energy Storage**, v. 1, n. 2, 13 abr. 2019.

WARD, R. A. *et al.* Discovery of a Potent and Selective Oral Inhibitor of ERK1/2 (AZD0364) That Is Efficacious in Both Monotherapy and Combination Therapy in Models of Nonsmall Cell Lung Cancer (NSCLC). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 24, p. 11004–11018, 26 dez. 2019.

WATT, W. *et al.* The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. **Structure**, v. 7, n. 9, p. 1135–1143, set. 1999.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, out. 2010.

WU, B. *et al.* Effect of Poly(ethylene glycol) (PEG) Surface Density on the Fate and Antitumor Efficacy of Redox-Sensitive Hybrid Nanoparticles. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 6, n. 7, p. 3975–3983, 13 jul. 2020.

XAVIER JUNIOR, F. H. *et al.* HPLC Method for the Dosage of Paclitaxel in Copaiba Oil: Development, Validation, Application to the Determination of the Solubility and Partition Coefficients. **Chromatographia**, v. 79, n. 7–8, p. 405–412, 27 abr. 2016.

XAVIER-JUNIOR, F. H. *et al.* Experimental design approach applied to the development of chitosan coated poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules encapsulating copaiba oil. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 536, p. 251–258, jan. 2018.

XIE, E. *et al.* Long-term exposure to dietary emulsifier Tween 80 promotes liver lipid accumulation and induces different-grade inflammation in young and aged mice. **Food Research International**, v. 184, p. 114205, maio 2024.

YAN, G.; ELBADAWI, M.; EFFERTH, T. Multiple cell death modalities and their key features (Review). **World Academy of Sciences Journal**, 11 mar. 2020.

YAN, X.; BERNARD, J.; GANACHAUD, F. Nanoprecipitation as a simple and straightforward process to create complex polymeric colloidal morphologies. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 294, p. 102474, ago. 2021.

YU, Z. *et al.* Smart Polymeric Nanoparticles in Cancer Immunotherapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, p. 775, 26 fev. 2023.

YUAN, R. *et al.* Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1401, n. 1, p. 19–27, 11 ago. 2017.

- ZAKY, M. F. *et al.* Influence of Surface-Modification via PEGylation or Chitosanization of Lipidic Nanocarriers on In Vivo Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Profiles of Apixaban. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 6, p. 1668, 7 jun. 2023.
- ZENG, X.; MORGENSTERN, R.; NYSTRÖM, A. M. Nanoparticle-directed sub-cellular localization of doxorubicin and the sensitization breast cancer cells by circumventing GST-Mediated drug resistance. **Biomaterials**, v. 35, n. 4, p. 1227–1239, jan. 2014.
- ZHANG, H. *et al.* Solubilization of octane in cationic surfactant–anionic polymer complexes: Effect of polymer concentration and temperature. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 450, p. 332–338, jul. 2015.
- ZHANG, S. *et al.* Linking of Chemical Reactions and Silica Nanoparticle Contact Using Synthetic Helical Molecules. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 42, n. 15, p. 1781–1796, 22 ago. 2024.
- ZHANG, Y.; WU, S.; SUN, P. Estimation of stability constants of Fe(III) with antibiotics and dissolved organic matter using a novel UV–vis spectroscopy method. **Science of The Total Environment**, v. 899, p. 165702, nov. 2023.
- ZHAO, C.-Y. *et al.* Nanotechnology for Cancer Therapy Based on Chemotherapy. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 826, 4 abr. 2018.
- ZHENG, J. *et al.* Nanostructure Design Using Protein Building Blocks Enhanced by Conformationally Constrained Synthetic Residues. **Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1205–1218, 1 fev. 2007.
- ZYL, A. J. P. VAN *et al.* The role of surfactant in controlling particle size and stability in the miniemulsion polymerization of polymeric nanocapsules. **European Polymer Journal**, v. 40, n. 12, p. 2717–2725, dez. 2004.

Anexos

ANEXOS

Artigos publicados em co-autoria na área de nanotecnologia

Journal of Drug Delivery Science and Technology 105 (2025) 106575



Contents lists available at ScienceDirect
Journal of Drug Delivery Science and Technology

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

Optimization and functionalization of copaiba oil-loaded nanostructured lipid carriers to improve cytotoxicity against breast cancer cells

Ana Flávia Chaves Uchôa^a, Allessya Lara Dantas Formiga^a,
Álisson Emannuel Franco Alves^a, Anny Letícia Marinho Ramos Cardoso^a,
Graziela Maria de Araujo Pereira^a, Lucas Medeiros Martins Carvalho^a,
Luís Felipe Alves da Silva^a, Paulo Sérgio da Silva Pereira^a,
Pedro Henricke Oliveira de Souza^a, Silvana Teresa Lacerda Jales^a,
Anauara Lima e Silva^b, Ramon Ramos Marques de Souza^c,
Marianna Vieira Sobral^c, Marcelo Sobral da Silva^b,
José Maria Barbosa Filho^b, Francisco Humberto Xavier-Júnior^{a,*}

^a Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology (BioTecFarm), Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Campus Universitário I, Castelo Branco III, Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil

^b Multisizer Characterization and Analysis Laboratory (LMCA), Institute of Research in Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, Campus Universitário I, Castelo Branco III, Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil

^c Oncopharmacology Laboratory (ONCOFAR), Institute of Research in Drugs and Medicines (IPEFarm), Federal University of Paraíba, Campus Universitário I, Castelo Branco III, Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Copaiba oil, biological products
Nanotechnology
Drug delivery
Nanoparticles
Breast cancer

ABSTRACT

Copaiba oil (CO) exhibits notable antineoplastic properties, that can be enhanced when encapsulated within nanosystems. Thus, this study focused on characterizing, optimizing, and functionalizing CO-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) and evaluating their interaction with albumin and MCF-7 breast cancer cells. NLCs were produced using solvent injection or hot emulsion with sonication (HES) methods, and optimized by Box-Behnken design, considering CO (1, 5, 9 %), Precirol® (1, 4, 7 %), and Tween® (0.1, 0.5, 0.9 %) as variables. The optimized formulation, containing 6 % CO, was produced by HES, showing a particle size of 183 ± 1.8 nm, PDI of 0.17 ± 0.01 , and zeta potential of -20.7 ± 0.2 mV. Tween® 80 significantly reduced particle size ($R^2 = 0.999$). Optimized NLC (oNLC) was functionalized with Pluronic®, cholesterol, chitosan, and PEG, and characterized by infrared spectroscopy. oNLC-PEG1% and oNLC-Plu1% displayed promising particle sizes (161.1 ± 1.1 and 186.4 ± 1.6 nm). Infrared spectra confirmed CO encapsulation. Stability tests showed no significant changes in samples stored at 4°C for 90 days, maintaining a spherical shape under electron microscopy. NLCs demonstrated great stability with albumin except for oNLC-Plu1% after 24h (434.3 ± 26.7 nm). oNLC-Chol exhibited the highest toxicity against MCF-7 cells (52.49 % inhibition at $25 \mu\text{g/mL}$). Thus, functionalized, stable NLCs were produced, displaying varied albumin interaction profiles and high anticancer efficacy, indicating their potential as a delivery system.

1. Introduction

The diversity of diseases requiring medication for treatment and health preservation is increasingly prominent in today's pharmaceutical market. However, there is still much to be discussed regarding their adverse effects [1]. Taking cancer as an example, the primary

medications used are antineoplastics. The major issue with these drugs lies in their high toxicity due to the low specificity for tumor cells, causing side effects in healthy cells as well [2]. Consequently, the utilization of natural products for the development of herbal medicines is a promising therapeutic alternative for numerous diseases [1].

Medicinal plants are mainly composed of a variety of secondary

* Corresponding author.

E-mail address: fhxj@academico.ufpb.br (F.H. Xavier-Júnior).

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.106575>

Received 23 September 2024; Received in revised form 4 December 2024; Accepted 24 December 2024

Available online 3 January 2025

1773-2247/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

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

Review article

Beyond the peril of envenomation: A nanotechnology approach for therapeutic venom delivery



Karla Samara Rocha Soares ^{a,*}, Allesya Lara Dantas Formiga ^{a,b}, Ana Flávia Chaves Uchôa ^a,
 Anny Letícia Marinho Ramos Cardoso ^{a,b}, João Pedro Crispim Guerra Rodrigues ^a,
 Julia de Pádua Farias Bezerra Leite ^a, Luís Felipe Alves Silva ^a,
 Álisson Emannuel Franco Alves ^{a,b}, José Maria Barbosa-Filho ^b,
 Francisco Humberto Xavier-Junior ^{a,b,*}

^a Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology (BioTecFarm), Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Campus Universitário I, Castelo Branco III, Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa-PB, Brazil

^b Pos-graduate Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, UFPB, Campus I- Castelo Branco III, 58051-900, João Pessoa-PB, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Venom peptides
 Drug delivery
 Nanoparticles

ABSTRACT

The considerable increase in cases of diseases that are difficult to treat, highlights the need to implement new therapeutic alternatives. Active components with high therapeutic potential were identified as snake venoms, with proven biological activity. In Brazil, a country known for its diverse fauna, there exists a wide range of venomous animals, including snakes, scorpions, and bees. The venom of these animals presents therapeutic potential due to the presence of biomolecules with properties such as antivenom, anticancer, and anti-inflammatory effects. However, these biomolecules are easily degraded when not adequately formulated. Nanocarrier formulations have been considered promising for the delivery of therapeutic bioactive molecules, particularly, genes and proteins. These nanosystems have been widely used in different areas like the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. In pharmacological therapy, the use of these nanosystems can provide stability, reduced toxicity, increased half-life, and protection from degradation or premature inactivation of the therapeutic agents enhancing the overall efficacy of the treatment. Different types of biodegradable delivery nanosystems, such as liposomes (LPS), polymeric nanoparticles (NP), and lipid nanoparticles (NL), have shown a high capacity for loading components present in animal venom, proving to be a useful tool for obtaining many new pharmacological applications. The objective of this review is to examine nanosystems effectively linked with crude venom or peptides isolated from various animals, elucidating their diverse pharmacological applications, especially, the production of serums and vaccines, as well as the development of anticancer and antimicrobial agents.

1. Introduction

Venomous animals are considered specialized predators capable of producing toxic secretions for both protection and predation, which contain peptides with chemical and neuropharmacological action with a wide structural and functional diversity [1–3]. Snakes and scorpions are mainly responsible for the most serious accidents with venomous animals since snake envenomation is considered a neglected tropical disease, which has been reported to kill between 81 000–130 000 people

every year, mostly in rural Africa, Asia, and South America [2,4].

Animal-derived venom are valuable natural resource for the development of drugs, such as snake venom, bee venom, and spider venom [5]. Venoms are complex bioactive compound cocktails, the main components of which are proteins, peptides, neurotransmitters, and other compounds [1,2,6], with high medicinal potential as they contain proteins and peptides in their composition that demonstrate broad pharmacological activities when applied to humans, acting as anti-venom, anticancer, anti-inflammatory, nociceptive, and antimicrobials

* Corresponding author. Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology (BioTecFarm), Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Campus Universitário I, Castelo Branco III. Cidade Universitária. CEP: 58051-900, João Pessoa-PB, Brazil

E-mail address: flxj@academico.ufpb.br (F.H. Xavier-Junior).

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2025.106652>

Received 7 October 2024; Received in revised form 17 December 2024; Accepted 25 January 2025

Available online 27 January 2025

1773-2247/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.