



**ERIKA APARECIDA OLIVEIRA**

**EFEITOS DO NANOENCAPSULAMENTO DE EXTRATOS  
DE PLANTAS MEDICINAIS NO CULTIVO DE CÉLULAS  
CANCERÍGENAS**

**LAVRAS-MG  
2024**

**ERIKA APARECIDA OLIVEIRA**

**EFEITOS DO NANOENCAPSULAMENTO DE EXTRATOS DE PLANTAS  
MEDICINAIS NO CULTIVO DE CÉLULAS CANCERÍGENAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para obtenção do título de Doutora.

Profa. Dra. Ana Paula Peconick  
Orientadora

Prof. Dr. Wanderley José Mantovani Bittencourt  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Oliveira, Erika Aparecida.

Efeitos do nanoencapsulamento de extratos de plantas  
medicinais no cultivo de células cancerígenas / Erika Aparecida  
Oliveira. - 2023.

60 p. : il.

Orientador(a): Ana Paula Peconick.

Coorientador(a): Wanderley José Mantovani Bittencourt.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. nanotecnologia. 2. câncer. 3. fitoterápico. I. Peconick, Ana  
Paula. II. Bittencourt, Wanderley José Mantovani. III. Título.

**ERIKA APARECIDA OLIVEIRA**

**EFEITOS DO NANOENCAPSULAMENTO DE EXTRATOS DE PLANTAS  
MEDICINAIS NO CULTIVO DE CÉLULAS CANCERÍGENAS**

**EFFECTS OF NANOENCAPSULATION OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS ON  
CULTURE OF CANCER CELLS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 14 de novembro de 2023

Dr. Djeison Lutier Raymundo	UFLA
Dra. Kiyoko Uemura Utiumi	UFLA
Dra. Luciane Vilela Resende	UFLA
Dr. Wanderley José Mantovani Bittencourt	UNILAVRAS

Profa. Dra. Ana Paula Peconick  
Orientadora

Prof. Dr. Wanderley José Mantovani Bittencourt  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2024**

*Aos meus pais, Lúcia e Roque, a quem devo tudo que sou*

*Aos meus filhos, Marina e Matheus, por me ensinarem a ser cada dia melhor*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que eu conviva com grandes pessoas que me ensinam muito a cada dia;

Aos meus familiares, que sempre torceram por mim;

Ao meu marido Carlos, por todos os ensinamentos;

Aos meus pais, Roque e Lúcia, pelo amor incondicional, por todos os ensinamentos e orientações que fizeram com que eu me tornasse quem sou;

À minha irmã, Simone, por todas as lágrimas e gargalhadas que vivenciamos juntas;

Aos meus amados filhos, Marina e Matheus, por encherem a minha vida de alegria, rugas e cabelos brancos;

À minha querida amiga Rafaella (Rafa), por todos os anos de convivência e amizade que foi crescendo ao longo do tempo;

À minha amiga Zélya, por todo o carinho, apoio, amizade e confidências trocadas;

À Vilma e à Adriana, colaboradoras do DMV, por trilharmos juntas a nossa jornada;

À Fátima (PPGCV), pela amizade, carinho e incentivo nessa caminhada;

Ao Christian (DMV), por todos os ensinamentos a mim repassados;

À minha equipe Izadora, Marina, Diogo, Fábio e Caio, por estarem juntos comigo nessa loucura chamada pós-graduação;

Aos membros do LISASC, por todas as alegrias e tristezas compartilhadas e pela confiança, vocês me tornam melhor a cada dia;

À professora Ângela Dayana Barrera Brito do DFI, pela ajuda na produção das nanopartículas;

Ao DMV, por todo o suporte estrutural para a realização deste trabalho;

Ao Laboratório de Sementes do DAG, em especial à professora Helô pelo empréstimo dos equipamentos, e também ao Geraldo e à Jaque (TAEs), por me ajudarem com minhas amostras;

Ao Laboratório da professora Joyce (DAG) e ao Celso (TAE), por cederem o espaço para a realização de análises;

Ao Horto de Plantas Medicinais, em especial à Giulia, por conceder as amostras das plantas estudadas;

Ao LME (Laboratório de Microscopia Eletrônica), por ter cedido espaço para as análises;

Ao Fabrício e ao Ricardo (Laboratório Central de Biologia Molecular), pelo empréstimo de reagentes;

Ao Geraldo (DNU), pela ajuda com materiais e equipamentos;

Ao Izael (DGQMA), pelo empréstimo de equipamentos;

À Escola de veterinária da UFMG, por ter cedido material para os estudos;

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade;

À FAPEMIG, por ter financiado este projeto;

À CAPES e ao CNPq pelo apoio;

Ao Wanderley, meu grande parceiro e amigo, por estar sempre comigo, me auxiliando em todas as fases deste trabalho. Sua amizade foi um presente, desses bem grandes que Deus nos surpreende quando menos esperamos;

À minha amiga Elaine, pela parceria, compreensão, ensinamentos e aventuras que vivemos juntas. Você me inspira a ser cada dia melhor, tanto como pessoa quanto profissional.

À minha grande amiga e orientadora Ana Paula, por sua gentileza, meiguice, sorriso largo, fé na vida, compreensão, confiança. A sua amizade é algo que não tem preço;

À todas as adversidades que enfrentei, pois elas me ensinaram a ser resiliente;

À todos aqueles que me ajudaram de alguma forma;

À todas as pessoas difíceis que encontrei pelo caminho, por me ensinarem exatamente como não devo ser.

*“Foi o tempo que dedicaste à tua  
rosa que a fez tão importante.”*

Antoine de Saint-Exupéry

## RESUMO

O câncer é um grande grupo de doenças amplamente difundido e se tornou a segunda maior causa de morte no mundo além de ser um importante problema de saúde pública. Um dos fatores desencadeantes do câncer são os radicais livres formados pelo organismo que em condições de desequilíbrio desencadeiam estresse oxidativo. Estudos diversos comprovaram a eficiência dos compostos naturais extraídos de plantas, com ação antioxidante. Uma das maneiras de avaliar a ação das plantas medicinais é através do cultivo celular onde é possível verificar suas atividades antiproliferativas e citotóxicas. A nanotecnologia utilizada nas pesquisas integra os avanços tecnológicos associados ao diagnóstico e terapia do câncer, possibilitando o emprego das nanopartículas como formulações fitoquímicas. Os extratos brutos das plantas *Bryophyllum daigremontianum* e *Momordica charantia* reúnem características antioxidantes excepcionais. Nesse trabalho, foi avaliado o potencial sequestrador de radicais livres dos extratos brutos dessas plantas, através do teste DPPH, onde a ação da *Momordica charantia* obtida é dose dependente ao passo que *Bryophyllum daigremontianum* é inversamente proporcional. Também foram realizados testes de avaliação de compostos fenólicos totais, compostos antioxidantes totais e flavonas/flavonoides totais dessas plantas. Os resultados evidenciaram um elevado potencial antioxidante comparados com os padrões de referência. Também foram realizados testes *in vitro* desses extratos para avaliação da capacidade citotóxica e os resultados foram satisfatórios. Além disso, a eficácia desses extratos nanoencapsulados em nanopartículas de quitosana também foram avaliados e houve sinergia entre esses compostos. Os resultados obtidos por este trabalho permitem uma melhor compreensão e aplicação seguras da nanotecnologia associada aos medicamentos fitoterápicos na terapia oncológica de precisão.

Palavras-chave: nanotecnologia; câncer; quitosana; fitoterápico.

## ABSTRACT

Cancer is a large group of diseases that are widespread and have become the second leading cause of death in the world in addition to being an important public health problem. One of the triggering factors for cancer are free radicals formed by the body which, under conditions of imbalance, trigger oxidative stress. Various studies have proven the efficiency of natural compounds extracted from plants, with antioxidant action. One of the ways to evaluate the action of medicinal plants is through cell cultivation where it is possible to verify their antiproliferative and cytotoxic activities. The nanotechnology used in research integrates technological advances associated with cancer diagnosis and therapy, enabling the use of nanoparticles as phytochemical formulations. The crude extracts of the plants *Bryophyllum daigremontianum* and *Momordica charantia* bring together exceptional antioxidant characteristics. In this work, the free radical scavenging potential of crude extracts of these plants was evaluated using the DPPH test, where the action of *Momordica charantia* obtained is dose dependent while that of *Bryophyllum daigremontianum* is inversely proportional. Tests were also carried out to evaluate total phenolic compounds, total antioxidant compounds and total flavones/flavonoids from these plants. The results showed a high antioxidant potential compared to reference standards. *In vitro* tests were also carried out on these extracts to evaluate their cytotoxic capacity and the results were satisfactory. Furthermore, the efficacy of these extracts nanoencapsulated in chitosan nanoparticles was also evaluated and there was synergy between these compounds. The results obtained by this work allow for a better understanding and safe application of nanotechnology associated with herbal medicines in precision oncology therapy.

Keywords: nanotechnology; cancer; chitosan; phytotherapy.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>11</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>CÂNCER.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>PLANTAS MEDICINAIS.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Aranto (<i>Bryophyllum daigremontianum</i>) .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Melão de São Caetano (<i>Momordica charantia</i>) .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>NANOPARTÍCULAS.....</b>	<b>18</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>20</b>
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....</b>	<b>24</b>
	<b>ARTIGO 1 .....</b>	<b>25</b>
	<b>AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS E ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE <i>Bryophyllum daigremontianum</i> e <i>Momordica charantia</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>
	<b>ARTIGO 2 .....</b>	<b>37</b>
	<b>SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E TPP.....</b>	<b>37</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
	<b>ARTIGO 3 .....</b>	<b>49</b>
	<b>PLANTAS MEDICINAIS NA TERAPIA ONCOLÓGICA .....</b>	<b>49</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grande grupo de doenças que podem se desenvolver em qualquer parte do corpo, quando há surgimento de células anormais que crescem descontroladamente. É amplamente difundido e se tornou a segunda maior causa de morte no mundo (W.H.O., 2023), e é um importante problema de saúde pública em todo o mundo (SIEGEL *et al.*, 2020). Dentre esses números, 400.000 crianças e adolescentes com idades entre 0 e 19 anos, apresentam algum tipo de tumor a cada ano (W.H.O., 2021). De acordo com Sarver *et al.* (2022), o câncer também é responsável pela maioria dos óbitos em animais de companhia que já passaram da meia-idade.

O câncer de mama, por exemplo, é um grande desafio clínico, tanto para mulheres como para cadelas, onde essas duas espécies compartilham numerosas características clínicas, semelhanças genéticas e moleculares (CARVALHO *et al.*, 2016).

Dentre os diversos fatores desencadeantes do câncer, está o estresse oxidativo. De acordo com Fierascu *et al.* (2021), sob condições de estresse, o corpo gera uma maior quantidade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS) do que antioxidantes, sejam eles enzimáticos ou não. Andrés *et al.* (2022) afirmam que mudanças químicas causadas por ROS/RNS são danosas para o funcionamento das células, uma vez que provocam processos de oxidação e nitratação, promovendo modificações nas estruturas das proteínas, do DNA e dos lipídios, afetando assim sua função adequada.

Grandes descobertas experimentais foram realizadas nas últimas décadas visando controlar ou mesmo inibir o estresse oxidativo e a inflamação. Estudos diversos comprovaram a eficiência dos compostos naturais extraídos de plantas, com ação antioxidante. Dentre esses compostos estão os fenóis, carotenóides, iridóides que demonstraram atividade antioxidante e antiinflamatória (TENUTA *et al.*, 2020). Esses compostos obtidos a partir de plantas medicinais são considerados menos tóxicos que os medicamentos sintéticos (PARVEEN *et al.*, 2018).

De acordo com Tugba Artun *et al.* (2016), o cultivo celular utilizando linhagens celulares tumorais é uma excelente metodologia para avaliar o potencial terapêutico das plantas medicinais, permitindo a avaliação das atividades antiproliferativas e citotóxicas das plantas.

Estudos incessantes na tentativa de encontrar novas maneiras de melhorar a eficiência do mecanismo de entrega de drogas, fez com que pesquisadores desenvolvessem materiais de dimensões nanométricas para incorporação dessas drogas (ASSA *et al.*, 2017). Esses nanomedicamentos são capazes de fazer com que as drogas sejam absorvidas de maneira mais

eficiente pelo organismo com menos efeitos colaterais (SALATIN *et al.*, 2015).

A nanotecnologia utilizada nas pesquisas do câncer se tornou uma nova e promissora área de estudos. Ela integra os avanços tecnológicos na produção de dispositivos em nanoescala com componentes celulares e moleculares que estão associados ao diagnóstico e terapia do câncer (STEPHEN *et al.*, 2020).

Aljuffali *et al.* (2016), afirmam que o emprego das nanopartículas como formulações fitoquímicas possibilita um desfecho para desafios no tratamento do câncer. Isso é devido às propriedades exclusivas das nanodispersões, como alta razão entre área superficial e volume, aumento da solubilidade e caracterizações ópticas, eletrônicas e biológicas controláveis.

Dentre os polímeros naturais utilizados para o nanoencapsulamento, a quitosana se destaca como material carreador de drogas por apresentar interessantes características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e baixa imunogenicidade, sendo considerada um material seguro (ZHANG *et al.*, 2019).

Desse modo, pretende-se combinar as excelentes propriedades da quitosana ao uso terapêutico das plantas medicinais de *Bryophyllum daigremontianum* e *Momordica charantia*, sobre a citotoxicidade de células cancerígenas *in vitro*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Câncer

O câncer é uma doença amplamente difundidas no mundo e que atinge um número expressivo de seres, tanto na esfera humana quanto animal. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (W.H.O., 2022), em 2021 foram estimados 20 milhões de pessoas diagnosticadas com essa doença e 10 milhões destas pessoas vieram a óbito. Dentre esses números, 400.000 crianças e adolescentes com idades entre 0 e 19 anos, apresentam algum tipo de tumor a cada ano (W.H.O., 2021). O câncer também é uma das principais causas de morte em animais de estimação. A Veterinary Cancer Society estima que a cada 4 cães, 1 cão será diagnosticado com câncer (25%) ao longo de sua vida, e que o câncer é a principal causa de morte em animais de estimação idosos (SARVER *et al.*, 2022).

A patogenia do câncer é multifatorial e está associada a fatores não somente genéticos, mas também a fatores ambientais, nutricionais e estilo de vida (LEWANDOWSKA *et al.*, 2019). Os tratamentos prescritos, em virtude do diagnóstico precoce ou não, são diversos e extremamente desafiadores. Tais tratamentos dependem do tipo de câncer, do estágio da doença, da sua extensão e localização, da imunidade do paciente e da sua idade, do seu estado emocional dentre tantos outros. Esses tratamentos podem ser terapias farmacológicas, imunológicas, cirúrgicas, terapias alvo e/ou radioterápicas, muitas vezes associadas a tecnologias de ponta.

O estreitamento da relação humana e animal tem despertado um maior interesse na investigação da doença, no sentido do conceito “*One Health*”, onde a saúde animal, saúde humana e saúde ambiental estão intrinsecamente entrelaçadas e são interdependentes. Em se tratando de carcinoma mamário invasivo, por exemplo, mulheres e cadelas compartilham numerosas características clínicas, semelhanças genéticas e moleculares. Desta forma, tumores de mamas em cadelas são representantes do tumor mamário em mulheres e funcionam como uma ferramenta muito importante na comparação oncológica entre essas duas espécies (KLOPFLEISCH *et al.*, 2010; QUEIROGA *et al.*, 2011; NGUYEN *et al.*, 2018; ROGEZ *et al.*, 2019).

De acordo com Carvalho *et al.* (2016), as semelhanças dos tumores mamários existentes entre humanos e cães evidenciam a importância das cadelas como modelo translacional para comparação oncológica, no estudo da sinalização molecular baseada na imunossupressão tumoral. Quanto à classificação imunohistoquímica do câncer de mama humano, que serve para diferenciar os grupos moleculares nas mulheres, Abadie *et al.* (2018) afirmam que a

classificação imunohistoquímica do câncer de mama em seres humanos, geralmente empregada para identificar os grupos moleculares na patologia humana, pode ser extrapolada para os carcinomas mamários invasivos em cães. Esses carcinomas em cadelas aparecem como um grupo heterogêneo de tumores moleculares distintos, como o câncer de mama humano.

Os desafios da oncologia têm provocado grande interesse da comunidade científica na busca por uma plataforma de avaliação e tratamentos eficazes e menos invasivos para humanos e animais. Kahn *et al.* (2007) citam em seu trabalho, a relação entre humanos e animais de acordo com Rudolf Virchow (1821 – 1902), médico alemão considerado o pai da patologia moderna. Esse médico dizia que entre medicina animal e humana não há linha divisória e nem deveria haver, e que o objeto é diferente, mas a experiência obtida constitui a base de toda a medicina.

Um dos fatores desencadeantes do câncer é a formação de radicais livres pelo organismo, através do oxigênio, que é uma molécula extremamente reativa, ou nitrogênio. Durante o metabolismo celular, há a formação de radicais livres gerados pelo desemparelhamento dos elétrons que estão centrados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio. Tal reação gera as espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS), que podem causar danos a biomoléculas como peroxidação de lipídeos da membrana, injúria às proteínas, enzimas, tecidos e ao DNA. Isso acontece durante o metabolismo celular, mas se agrava em condições de estresse, onde o organismo produz mais ROS e RNS. Por uma falha na resposta imune inata, o desequilíbrio no aumento de ROS e RNS em detrimento à produção endógena de moléculas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas agrava esse estresse oxidativo (DUTRA *et al.*, 2009; GANIE *et al.*, 2014; BESSADA *et al.*, 2015; TENUTA *et al.*, 2020; FIERASCU *et al.*, 2021).

## **2.2 Plantas Medicinais**

A flora brasileira compreende inúmeras espécies de plantas com grande potencial para uso terapêutico. O Brasil é um país com uma rica flora, sendo contabilizadas mais de 35.600 espécies de acordo com Flora do Brasil (BFG, 2021). Muitas dessas espécies são utilizadas pelas populações no intuito de tratar diversas doenças que acometem humanos e animais (VILA VERDE *et al.*, 2018b). Assim, estudos realizados com plantas medicinais que evidenciam potencial terapêutico têm sido avaliados.

Uma das alternativas para o combate ao câncer está associada ao uso de plantas

medicinais, que tradicionalmente acompanham o homem desde os tempos primórdios. Neste interim, muitas plantas têm apresentado potencial antioxidante devido aos seus compostos como os compostos fenólicos e flavonóides (TENUTA *et al.*, 2020) além de esteroides, taninos e terpenos (LI *et al.*, 2020; PANT *et al.*, 2021).

Embora ainda haja uma grande distribuição de medicamentos sintéticos e bioecológicos, as plantas continuam representando um importante manancial de medicamentos, sendo utilizada por milhões de pessoas em todo o mundo para tratamento de suas enfermidades (PANT *et al.*, 2021).

As plantas medicinais têm apresentado um importante papel no sistema de saúde mundial e elas representam até o momento, apenas 10% de toda a vegetação do planeta (PANT, 2014). Segundo Sur e Ray (2020), a WHO apresentou um relatório onde divulgou que cerca grande parte da população mundial faz uso de fitoterapia para cuidados de saúde primária. Como exemplos de medicamentos oriundos de fontes naturais tem-se os alcalóides da vinca (vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina), taxanos (paclitaxel, docetaxel), podofilotoxina e suas derivações (topotecano, irinotecano) e antraciclina (doxorrubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina).

As plantas medicinais são capazes de produzir uma enorme variedade de compostos bioativos, tanto para atrair polinizadores quanto para autodefesa contra agentes invasores (BUCHANAN *et al.*, 2015). Esses compostos bioativos são os chamados metabólitos secundários da planta e compreendem as substâncias alcaloides, fenólicas, flavonoides, esteroides, taninos e terpenos (LI *et al.*, 2020; PANT *et al.*, 2021). Já são catalogados mais de 2.140.000 metabólitos secundários (SMs). Desde montante, os terpenóides representam 29.000, alcaloides 12.000, fenólicos 8.000, além de outros que se encontram em processo de identificação (PANT *et al.*, 2021). Essas plantas tem sido alvo das pesquisas no tratamento para diversas neoplasias.

De todas as drogas anticancerígenas usadas até o momento, mais de 60% delas são provenientes diretamente de plantas medicinais ou baseadas em seus compostos fitoquímicos e/ou seus metabólitos secundários (CRAGG E PEZZUTO, 2016; TESFAYE *et al.*, 2020; FIERASCU *etal.*, 2021; PANT *et al.*, 2021). Dentre essas drogas, as mais conhecidas no combate ao câncer estão os alcaloides da vinca, vimblastina, vincristina, paclitaxel (CRAGG E PEZZUTO, 2016).

### **2.2.1 Aranto (*Bryophyllum daigremontianum*)**

*Briophyllum daigremontianum* ou *Kalanchoe daigremontiana* pertence à família

*Crassulaceae* (Figura 1). São plantas suculentas nativas de Madagascar e naturalizadas na África, América do Sul e Ásia (BOGUCA-KOCKA *et al.*, 2018; STEFANOWICZ-HAJDUK *et al.*, 2022). São popularmente conhecidas como Aranto, Folha da Fortuna, Mãe de Milhares, Calanchoê dentre outros nomes e são amplamente empregadas como plantas medicinais para tratamento de diversas doenças como problemas de pele, artrite, asma, contusões, diabetes, infecções, úlceras e tumores (KOLODZIEJCZYK-CZEPAS *et al.*, 2016). Segundo Stefanowicz-Hajduk, Asztemborska, *et al.* (2020), essa planta apresenta atividades anti-inflamatória, antioxidante e citotóxica. A ação antioxidante é devida a vários compostos, dentre eles, os compostos fenólicos (GARCÍA-PÉREZ, LOZANO-MILO, *et al.*, 2020).

Figura 1 – Aspectos botânicos de *B. doaigremontianum*



Fonte: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Aranto#/media/Ficheiro:Bryophyllum\\_laetivirens\\_in\\_Tropengew%C3%A4chsh%C3%A4user\\_des\\_Botanischen\\_Gartens\\_01.jpg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Aranto#/media/Ficheiro:Bryophyllum_laetivirens_in_Tropengew%C3%A4chsh%C3%A4user_des_Botanischen_Gartens_01.jpg)

### 2.2.2 Melão de São Caetano (*Momordica charantia*)

*Momordica charantia* pertence à família *Cucurbitaceae* (Figura 3). É conhecido como Melão de São Caetano, Melão Amargo, Cabaço Amargo (RAINA *et al.*, 2016; BORTOLOTTI *et al.*, 2019). É amplamente conhecida e cultivada na Ásia, África e Américas Central e do Sul (RAY *et al.*, 2010; RAINA *et al.*, 2016; SURE RAY, 2020).

Dentre as diversas aplicações, o Melão de São Caetano é utilizado como antihiperlipidêmico e antidiabético, imunomodulador, anti-inflamatório, antioxidante e anticancerígeno e antimutagênico (JIA *et al.*, 2017; FAROOQI *et al.*, 2018; BORTOLOTTI *et al.*, 2019).

A atividade biológica da *Momordica charantia* se deve aos compostos triterpenóides,

ácidos fenólicos, flavonóides, óleos essenciais, ácidos graxos, aminoácidos, lectinas, esteroides, saponinas, polipeptídeos, alcalóides (JIA *et al.*, 2017; BORTOLOTTI *et al.*, 2019; SUR E RAY, 2020).

Figura 3– Aspectos botânicos da *Momordica charantia*



Fonte:<https://cdn.awsli.com.br/1284/1284861/produto/679312018f2f0cfb21.jpg>

## 2.2 Nanopartículas

Estudos incessantes na tentativa de encontrar novas maneiras de melhorar a eficiência do mecanismo de entrega de drogas, fez com que pesquisadores desenvolvessem materiais de dimensões nanométricas para incorporação dessas drogas (ASSA *et al.*, 2017). Essa nanotecnologia é capaz de fazer com que as drogas sejam absorvidas de maneira mais eficiente e com menos efeitos colaterais (SALATIN *et al.*, 2015).

Várias pesquisas descrevem o benefício da nanotecnologia no campo da medicina (CONTERA *et al.*, 2020). Embora em constante desenvolvimento, ela já vem sendo aplicada no diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças (EL-SAYEDE KAMEL, 2020). A nanotecnologia surgiu como uma esperança promissora na medicina, comunicação, genômica e robótica pelo fato de que partículas de tamanho nanométrico apresentam comportamentos notórios de auto-ordenação e construção sob controle de forças bem distintas das partículas macrométricas (EMERICHE THANOS, 2003).

Os nanomateriais contribuíram significativamente para a evolução da medicina de precisão, em todas as áreas (ADIR *et al.*, 2020). Os Sistemas de Entregas de Drogas (DDSs) são uma área considerável no âmbito da biomedicina e se baseiam em condutas interdisciplinares que estabelecem interações entre os produtos farmacêuticos, ciência de polímeros, química analítica, química bioconjugada e biologia molecular. (ASSA *et al.*, 2017). De acordo com Salatin *et al.* (2015), as vantagens das nanopartículas se devem ao

controle das suas propriedades físico-químicas, como tamanho e morfologia; possibilidade de entrega de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos; liberação de fármacos encapsulados em um padrão sustentado mantendo assim a concentração terapêutica; melhoria da baixa solubilidade das drogas em meio aquoso; acúmulo no interior das células cancerígenas sem serem reconhecidas pela glicoproteína P; e facilidade na modificação da superfície para melhorar a circulação sanguínea, especificidade e absorção celular.

Progressos na nanotecnologia do câncer identificaram oportunidades relevantes para a entrega de fármacos ou drogas específicas através de uma classe emergente de nanoterapêuticos. Estes nanoterapêuticos podem ser conduzidos diretamente para células neoplásicas. Este direcionamento caracteriza um avanço possibilitando um melhor desempenho de entrega do fármacos/drogas sobre os agentes quimioterápicos clássicos (BAZAK *et al.*, 2014).

Essa nanotecnologia utilizada nas pesquisas do câncer se tornou uma nova área de estudos, onde integra os avanços tecnológicos na produção de dispositivos em nanoescala com componentes celulares e moleculares que estão associados ao diagnóstico e terapia do câncer (STEPHEN *et al.*, 2020).

Segundo Aljuffali *et al.* (2016), o emprego das nanopartículas como formulações fitoquímicas possibilita um desfecho para desafios no tratamento do câncer. Isso acontece devido às propriedades exclusivas das nanodispersões, como alta razão entre área superficial e volume, aumento da solubilidade e caracterizações ópticas, eletrônicas e biológicas controláveis.

Dentre os polímeros naturais utilizados para o nanoencapsulamento, a quitosana se destaca como material carreador de drogas por apresentar interessantes características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e baixa imunogenicidade, sendo considerada um material seguro (ZHANG *et al.*, 2019). A quitosana é um biopolissacarídeo obtido pela N-desacetilação da quitina (MORARU *et al.*, 2020), composto por unidades monoméricas de 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glicose ligadas a (1-4) e 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosose residual (AKOLADE *et al.*, 2018).

Assim, o uso da nanotecnologia associada ao uso de plantas medicinais na terapia anticancerígena torna-se uma atraente linha de pesquisa para a compreensão e aplicabilidade destes sistemas de formas distintas.

## REFERÊNCIAS

- ABADIE, J. et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. **Breast Cancer Res Treat**, v. 167, n. 2, p. 459-468, Jan 2018.
- ADIR, O. et al. Integrating Artificial Intelligence and Nanotechnology for Precision Cancer Medicine. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**, v. 32, n. 13, p. e1901989-e1901989, 2020.
- AKOLADE, J. O. et al. Influence of formulation parameters on encapsulation and release characteristics of curcumin loaded in chitosan-based drug delivery carriers. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 45, p. 11-19, 2018/06/01/ 2018.
- ALJUFFALI, I. A. et al. Nanomedicine as a Strategy for Natural Compound Delivery to Prevent and Treat Cancers. **Curr Pharm Des**, v. 22, n. 27, p. 4219-31, 2016.
- ANDRÉS, C. M. C. et al. The Role of Reactive Species on Innate Immunity. **Vaccines (Basel)**, v. 10, n. 10, Oct 17 2022.
- ASSA, F. et al. Chitosan magnetic nanoparticles for drug delivery systems. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 492-509, 2017/05/19 2017.
- BAZAK, R. et al. Passive targeting of nanoparticles to cancer: A comprehensive review of the literature. **Molecular and clinical oncology**, v. 2, n. 6, p. 904-908, 2014.
- BESSADA, S. M. F.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 604-615, 2015/12/15/ 2015.
- BFG. **Flora do Brasil 2020**. Rio de Janeiro: 2021.
- BOGUCKA-KOCKA, A. et al. Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four Kalanchoë species. **Saudi J Biol Sci**, v. 25, n. 4, p. 622-630, May 2018.
- BORTOLOTTI, M.; MERCATELLI, D.; POLITO, L. Momordica charantia, a Nutraceutical Approach for Inflammatory Related Diseases. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 486-486, 2019.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. John wiley & sons, 2015. ISBN 0470714220.
- CARVALHO, M. I. et al. A Comparative Approach of Tumor-Associated Inflammation in Mammary Cancer between Humans and Dogs. **Biomed Res Int**, v. 2016, p. 4917387, 2016.

CONTERA, S.; BERNARDINO DE LA SERNA, J.; TETLEY, T. D. Biotechnology, nanotechnology and medicine. **Emerg Top Life Sci**, v. 4, n. 6, p. 551-554, Dec 17 2020.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. **Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre**, v. 25 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 41-59, 2016.

DUTRA, R. C. et al. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. **J Pharm Pharmacol**, v. 61, n. 2, p. 243-50, Feb 2009.

EL-SAYED, A.; KAMEL, M. Advanced applications of nanotechnology in veterinary medicine. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 27, n. 16, p. 19073-19086, Jun 2020.

EMERICH, D. F.; THANOS, C. G. Nanotechnology and medicine. **Expert Opin Biol Ther**, v. 3, n. 4, p. 655-63, Jul 2003.

FAROOQI, A. A. et al. Bitter gourd (*Momordica charantia*) as a rich source of bioactive components to combat cancer naturally: Are we on the right track to fully unlock its potential as inhibitor of deregulated signaling pathways. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 98-105, 2018/09/01/ 2018.

FIERASCU, R. C. et al. Selected Aspects Related to Medicinal and Aromatic Plants as Alternative Sources of Bioactive Compounds. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 4, p. 1521, 2021.

GANIE, S. A. et al. In vitro antioxidant and cytotoxic activities of *Arnebia benthamii* (Wall ex. G. Don): a critically endangered medicinal plant of Kashmir Valley. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 792574-792574, 2014.

GARCÍA-PÉREZ, P. et al. From Ethnomedicine to Plant Biotechnology and Machine Learning: The Valorization of the Medicinal Plant *Bryophyllum* sp. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 13, n. 12, Dec 4 2020.

JIA, S. et al. Recent Advances in *Momordica charantia*: Functional Components and Biological Activities. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 12, p. 2555, 2017.

KAHN, L. H.; KAPLAN, B.; STEELE, J. H. Confronting zoonoses through closer collaboration between medicine and veterinary medicine (as 'one medicine'). **Vet Ital**, v. 43, n. 1, p. 5-19, Jan-Mar 2007.

KLOPFLEISCH, R. et al. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. **BMC Cancer**, v. 10, p. 618, Nov 9 2010.

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J. et al. Antioxidant efficacy of *Kalanchoe daigremontiana* bufadienolide-rich fraction in blood plasma in vitro. **Pharm Biol**, v. 54, n. 12, p. 3182-3188, Dec 2016.

- LEWANDOWSKA, A. M. et al. Environmental risk factors for cancer - review paper. **Ann Agric Environ Med**, v. 26, n. 1, p. 1-7, Mar 22 2019.
- LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80-89, 2020/03/01/ 2020.
- MORARU, C. et al. Understanding the Factors Influencing Chitosan-Based Nanoparticles-Protein Corona Interaction and Drug Delivery Applications. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 20, p. 4758, 2020.
- NGUYEN, F. et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. **Breast Cancer Res Treat**, v. 167, n. 3, p. 635-648, Feb 2018.
- PANT, B. Application of plant cell and tissue culture for the production of phytochemicals in medicinal plants. **Adv Exp Med Biol**, v. 808, p. 25-39, 2014.
- PANT, P.; PANDEY, S.; DALL'ACQUA, S. The Influence of Environmental Conditions on Secondary Metabolites in Medicinal Plants: A Literature Review. **Chem Biodivers**, v. 18, n. 11, p. e2100345, Nov 2021.
- PARVEEN, A.; JIN, M.; KIM, S. Y. Bioactive phytochemicals that regulate the cellular processes involved in diabetic nephropathy. **Phytomedicine**, v. 39, p. 146-159, 2018/01/15/ 2018.
- QUEIROGA, F. L. et al. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. **In Vivo**, v. 25, n. 3, p. 455-65, May-Jun 2011.
- RAINA, K.; KUMAR, D.; AGARWAL, R. Promise of bitter melon (*Momordica charantia*) bioactives in cancer prevention and therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40-41, p. 116-129, 2016/10/01/ 2016.
- RAY, R. B. et al. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. **Cancer Res**, v. 70, n. 5, p. 1925-31, Mar 1 2010.
- ROGEZ, B. et al. CD44 and CD24 Expression and Prognostic Significance in Canine Mammary Tumors. **Vet Pathol**, v. 56, n. 3, p. 377-388, May 2019.
- SALATIN, S.; MALEKI DIZAJ, S.; YARI KHOSROUSHAHI, A. Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles. **Cell Biology International**, v. 39, n. 8, p. 881-890, 2015/08/01 2015.
- SARVER, A. L. et al. Increased risk of cancer in dogs and humans: a consequence of recent extension of lifespan beyond evolutionarily-determined limitations? **Ageing Cancer**, v. 3, n. 1, p. 3-19, Mar 2022.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA Cancer J Clin**, v. 70, n. 1, p. 7-30, Jan 2020.

STEFANOWICZ-HAJDUK, J. et al. Identification of Flavonoids and Bufadienolides and Cytotoxic Effects of *Kalanchoe daigremontiana* Extracts on Human Cancer Cell Lines. **Planta Med**, v. 86, n. 4, p. 239-246, Mar 2020.

STEFANOWICZ-HAJDUK, J. et al. An In Vitro Anticancer, Antioxidant, and Phytochemical Study on Water Extract of *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet and H. Perrier. **Molecules**, v. 27, n. 7, Mar 31 2022.

STEPHEN, B. J. et al. Cancer Nanotechnology in Medicine: A Promising Approach for Cancer Detection and Diagnosis. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v. 37, n. 4, p. 375-405, 2020.

SUR, S.; RAY, R. B. Bitter Melon (*Momordica Charantia*), a Nutraceutical Approach for Cancer Prevention and Therapy. **Cancers (Basel)**, v. 12, n. 8, Jul 27 2020.

TENUTA, M. C. et al. Contribution of Flavonoids and Iridoids to the Hypoglycaemic, Antioxidant, and Nitric Oxide (NO) Inhibitory Activities of *Arbutus unedo* L. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 2, p. 184, 2020.

TESFAYE, S. et al. Ethiopian Medicinal Plants Traditionally Used for the Treatment of Cancer, Part 2: A Review on Cytotoxic, Antiproliferative, and Antitumor Phytochemicals, and Future Perspective. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 17, p. 4032, 2020.

TUGBA ARTUN, F. et al. In vitro anticancer and cytotoxic activities of some plant extracts on HeLa and Vero cell lines. **J buon**, v. 21, n. 3, p. 720-5, May-Jun 2016.

VILA VERDE, G. M. et al. A Green Protocol for Microwave-Assisted Extraction of Volatile Oil Terpenes from *Pterodon emarginatus* Vogel. (Fabaceae). **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 651, 2018.

W.H.O. Childhood cancer. **World Health Organization**

2021. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer-in-children> >. Acesso em: 02/11/2023.

W.H.O.; World Cancer Day: closing the care gap. **World Health Organization**

2022. Disponível em: < <https://www.who.int/news/item/03-02-2022-world-cancer-day-closing-the-care-gap> >. Acesso em: 02/11/2023.

W.H.O.;. Cancer. **World Health Organization**, 2023. Disponível em: < [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1) >. Acesso em: 02/11/2023.

ZHANG, E. et al. Advances in chitosan-based nanoparticles for oncotherapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 115004, 2019/10/15/ 2019.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**

## ARTIGO 1

### **Avaliação de Compostos e Atividades Antioxidantes de *Bryophyllum daigremontianum* e *Momordica charantia***

#### RESUMO

A flora brasileira, composta por mais de 35.600 espécies, destaca-se como uma fonte rica de medicamentos tradicionais, sendo a fitoterapia amplamente utilizada, conforme relatado pela OMS. O foco deste estudo foi investigar os compostos antioxidantes, fenólicos e flavonoides nos extratos hidroalcoólicos das plantas *Bryophyllum daigremontianum* e *Momordica charantia*. Os ensaios antioxidantes (DPPH), bem como a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides, confirmaram o potencial antioxidante dessas plantas. Esses resultados contribuem para a compreensão da biodiversidade brasileira, destacando o potencial terapêutico dessas plantas. Os resultados das análises dos extratos hidroalcoólicos de *B. daigremontianum* sugerem a necessidade de mais investigações sobre seus efeitos em diferentes concentrações. Essas descobertas ressaltam a importância de explorar a rica biodiversidade brasileira em busca de medicamentos potenciais e reforçam a relevância da fitoterapia na promoção da saúde.

Palavras-chave: plantas medicinais; DPPH; flavonoides.

#### ABSTRACT

The Brazilian flora, made up of more than 35,600 species, stands out as a rich source of traditional medicines, with herbal medicine being widely used, as reported by the WHO. The focus of this study was to investigate the antioxidant, phenolic and flavonoid compounds in the ethanolic extracts of the plants *Bryophyllum daigremontianum* and *Momordica charantia*. Antioxidant assays (DPPH), as well as the quantification of phenolic compounds and flavonoids, confirmed the antioxidant potential of these plants. These results contribute to the understanding of Brazilian biodiversity, highlighting the therapeutic potential of these plants. The results of the analyzes of ethanolic extracts of *B. daigremontianum* suggest the need for further investigations into its effects at different concentrations. These findings highlight the importance of exploring Brazil's rich biodiversity in search of potential medicines and reinforce the relevance of phytotherapy in promoting health.

Keywords: medicinal plants; DPPH; flavonoids.

## 1 INTRODUÇÃO

A flora brasileira compreende inúmeras espécies de plantas com grande potencial para uso terapêutico. O Brasil é um país com uma rica flora, sendo contabilizadas mais de 35.600 espécies, segundo dados da Flora do Brasil (BFG, 2021). Muitas dessas espécies são utilizadas pelas populações no intuito de tratar diversas doenças que acometem humanos e animais (VILA VERDE *et al.*, 2018), representando um importante manancial de medicamentos, sendo utilizada por milhões de pessoas em todo o mundo para tratamento de suas enfermidades (PANT *et al.*,

2021). De acordo com Sur e Ray (2020), a OMS divulgou um relatório dizendo que a maioria da população mundial faz uso de fitoterapia para cuidados de saúde primária.

As plantas medicinais são capazes de produzir uma enorme variedade de compostos bioativos, tanto para atrair polinizadores quanto para autodefesa contra agentes invasores (BUCHANAN *et al.*, 2015). São esses compostos secundários que tem propriedades bioativas e compreendem as substâncias alcaloides, fenólicas, flavonoides, esteroides, taninos e terpenos (LI *et al.*, 2020; PANT *et al.*, 2021).

Dentre as plantas medicinais mais pesquisadas, há inúmeros estudos sobre *Briophyllum daigremontianum* e a *Momordica charantia* devido às suas propriedades bioativas, dentre as quais, as possíveis ações farmacológicas contra o câncer.

A *Briophyllum daigremontianum* ou *Kalanchoe daigremontiana* pertence à família *Crassulaceae*. São plantas suculentas nativas de Madagascar e naturalizadas na África, América do Sul e Ásia (ZAWIRSKA-WOJTASIAK *et al.*, 2019; STEFANOWICZ-HAJDUK *et al.*, 2022). São popularmente conhecidas como Aranto, Folha da Fortuna, Mãe de Milhares, Calanchoê dentre outros nomes, sendo amplamente empregadas como plantas medicinais para tratamento de diversas doenças, tais como o câncer (KOLODZIEJCZYK-CZEPAS *et al.*, 2016).

*Bryophyllum* spp. tem sido avaliada através de intensos ensaios fitoquímicos para análises adequadas de suas particularidades biológicas e farmacológicas. Diversos autores têm conseguido comprovar o potencial bioativo diversificado dos extratos desse gênero (GARCÍA-PÉREZ, LOZANO-MILO, *et al.*, 2020). Dentre essas potencialidades terapêuticas, Stefanowicz-Hajduk *et al.* (2022) destacaram em seus estudos as ações anti-inflamatórias, antioxidantes e anticancerígenas.

Segundo Kolodziejczyk-Czepas *et al.* (2016), as ações terapêuticas de várias plantas se devem especialmente à ação pleiotrópica dos seus compostos flavonóides, os ácidos fenólicos e outros compostos bioativos. Contudo, as diferentes espécies de *Briophyllum* apresentam composição química mais complexa. As partes aéreas dessas plantas contêm não apenas flavonoides e ácidos fenólicos já citados, mas também, antocianinas, alcalóides, saponinas e taninos, além de substâncias esteróides como os bufadienólides que apresentam atividade anticancerígena.

A *Momordica charantia* pertence à família *Cucurbitaceae*. É conhecida como Melão de São Caetano, Melão Amargo, Cabaço Amargo (RAINA *et al.*, 2016; BORTOLOTTI *et al.*, 2019). É amplamente cultivada na Ásia, África e Américas Central e do Sul (RAY *et al.*, 2010; RAINA *et al.*, 2016; SUR E RAY, 2020).

Dentre as diversas aplicações, o Melão de São Caetano é utilizado como hipoglicemiante e antidiabético, hepatoprotetor, imunomodulador, antiinflamatório e anticancerígeno (FAROOQI *et al.*, 2018; MURONGA *et al.*, 2021), além de controle de hipertensão, obesidade, ação contra infecções bacterianas e virais (BORTOLOTTI *et al.*, 2019). Ele também possui atividades antidiabéticas e antitumorais (FANG *et al.*, 2019; MURONGA *et al.*, 2021).

A atividade biológica da *Momordica charantia* se deve aos compostos triterpenóides, ácidos fenólicos, flavonóides, óleos essenciais, ácidos graxos, aminoácidos, lectinas, esteróides, saponinas, polipeptídeos, alcalóides (JIA *et al.*, 2017; BORTOLOTTI *et al.*, 2019; SUR E RAY, 2020).

Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a presença de compostos antioxidantes, fenólicos e flavonoides nos extratos hidroalcoólicos de *Bryophyllum daigremontianum* e *Momordica charantia* bem como quantificar esses compostos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Aquisição das amostras de plantas e preparo de extrato hidroalcoólico bruto

As amostras de *Bryophyllum daigremontianum* (caule e folhas) e *Momordica charantia* (flores e frutos), foram coletadas entre fevereiro e março de 2023, no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado nas coordenadas geográficas 21° 22' S e 44° 97' W a 918 m de altitude. A pesquisa foi cadastrada no SISGEN sob número de cadastro A7CADE5. Ambas as amostras das plantas maduras foram coletadas no início da manhã.

A amostras de *Bryophyllum daigremontianum* (caule e folhas) e *Momordica charantia* (flores e frutos) foram colocadas em estufas de ventilação forçada para secagem à temperatura de 40° C. Após, as amostras foram trituradas e 100 gramas de cada planta foram adicionados em 1000 mL de etanol 92°INMP. As soluções foram sonicadas em banho ultrassônico (SolidSteel®) em 3 intervalos de 10 minutos. O etanol foi removido sob vácuo em um evaporador rotativo a 40° C para produzir o extrato bruto. Após esse processo, os extratos brutos foram liofilizados em Liofilizador (LIOTOP® - L101). A quantidade de extrato obtida foi de 13,04 gramas de *Bryophyllum daigremontianum* e 9,34 gramas *Momordica charantia*.

## 2.2 Ensaios antioxidantes e doseamento de compostos fenólicos

Os testes foram realizados em triplicata.

### 2.2.1 Ensaios DPPH (2,2-Diphenil-1-picrylhydrazil)

Os ensaios de DPPH foram realizados de acordo com Brand-Williams *et al.* (1995). Foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de solução etanólica de DPPH (SIGMA® - 0,024mg/mL) em 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra. A mistura foi incubada por 60 minutos no escuro, em temperatura ambiente. Após esse tempo, a absorbância foi medida em 517 nm. O controle positivo usado foi o BHT (Butil-hidroxitolueno) e a captura de radicais livres pelo DPPH foi expressa em porcentagem de inibição. Fórmula para cálculo:

$$AA\% = \left(100 - \frac{Abs\ amostra - Abs\ branco}{Abs\ controle}\right) \times 100$$

Onde: AA% é a atividade de eliminação de radicais; *Abs amostra* são os valores de absorbância para extrato bruto; *Abs branco* é a absorbância do solvente e *Abs controle* a absorbância do BHT.

### 2.2.2 Capacidade Antioxidante Total (CAT)

A capacidade antioxidante total foi medida com base no método de redução do molibdato de amônio descrito por Prieto *et al.* (1999). Um total de 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi misturado com 1500  $\mu\text{L}$  da solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato monobásico de sódio 28 mM, molibdato de amônio 4 mM). Após 90 minutos de incubação a 95 ° C, as amostras foram arrefecidas até a temperatura ambiente e as suas absorbâncias foram medidas a 695 nm. O CAT foi determinado usando uma curva padrão de ácido ascórbico ( $y = 3,11148x - 0,0123$  e  $R^2 = 0,999$ ). Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes em ácido ascórbico por grama de amostra seca (mgEqAA/g).

### 2.2.3 Compostos Fenólicos Totais (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais das amostras foi determinado utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteu, de acordo com Kim *et al.* (2003) com modificações. Resumidamente, 50  $\mu\text{L}$  de cada extrato foi misturado em 500  $\mu\text{L}$  de reagente de Folin-Ciocalteu (10%) e 7% de

solução de bicarbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Em seguida, a mistura foi incubada por 120 minutos no escuro, em temperatura ambiente. Após, foi realizada a centrifugação a 5.000 rpm durante 10 minutos. Uma alíquota de 275  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionado em cada poço de microplaca e a absorbância foi lida a 760 nm. Foi utilizada a curva padrão de ácido gálico 0,05% em etanol P.A.. O teor de fenólicos totais foi expresso em equivalente a mg de ácido gálico (GAE) por mg de extrato de peso seco, calculado utilizando-se fórmula,  $y = 19,984 x + 0,973$ ,  $R^2 = 0,999$ ), o resultado foi expresso em mg equivalente de ácido gálico /g material seco (mg EqAG/g).

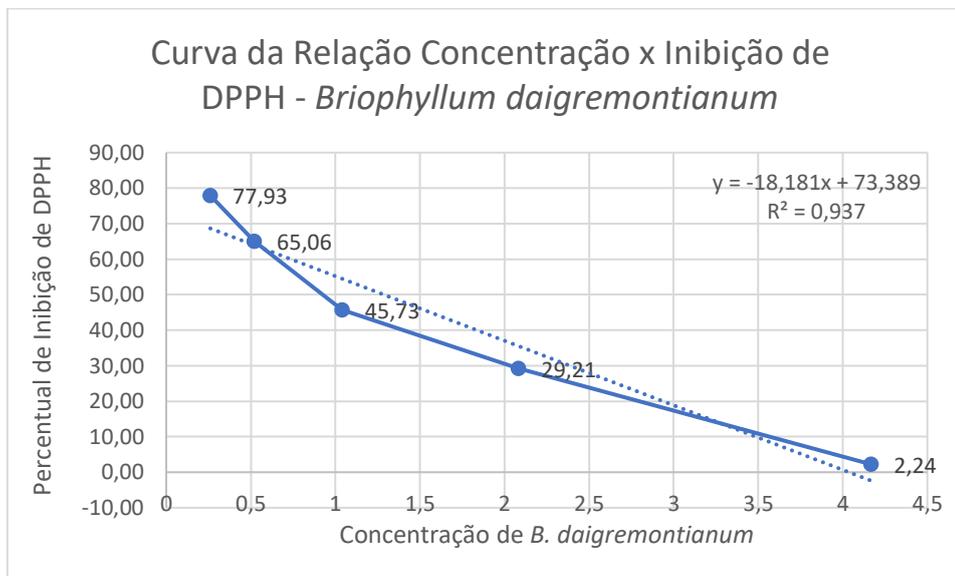
#### 2.2.4 Teor de flavonas/flavonoides totais (FFT)

O teor de flavonas/flavonoides dos extratos brutos foi realizado de acordo com o método determinado por Ahn *et al.* (2007). Uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi misturada com 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  (7% em água). A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada no escuro. Após 40 minutos, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, durante 10 minutos. Uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionada em poços de microplaca e a absorbância foi lida a 420 nm. O teor de flavonóides totais foi determinado por meio de uma curva padrão de quercetina ( $y = 17,983 x + 0,36$ ,  $R^2 = 0,999$ ). O teor de flavonas/flavonoides foi expresso em miligramas equivalentes em quercetina por grama de amostra seca (mgEqQ/g).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antioxidantes representam uma categoria de compostos capazes de atuar como inibidores antioxidantes de quebra de cadeia. Esses compostos interrompem a reação em cadeia dos radicais livres ao complexarem-se com eles. Para além de interrupção do mecanismo de formação, um antioxidante deve ter a capacidade de eliminar radicais ou estabilizá-los (CHRISTODOULOU *et al.*, 2022).

As plantas do presente estudo apresentaram propriedades bioativas notáveis. Os resultados do teste DPPH de *B. daigremontianum* e *M. charantia* estão apresentados nos gráficos 1 e 2 respectivamente.

Gráfico 1- Teste DPPH *Briophyllum daigremontianum*

Neste estudo, a *B. daigremontianum* apresentou um resultado bem inesperado, com uma curva inversa, o que demonstra que sua alta capacidade oxidativa em doses maiores que 4 mg/mL. Esse resultado pode explicar um dos mecanismos da alta toxicidade da espécie. No entanto, doses mínimas tem um excelente potencial antioxidante (Gráfico 1), sendo a IC<sub>50</sub> encontrada de 1,28 mg/mL.

Kolodziejczyk-Czepas *et al.* (2016) encontraram frações do extrato aquoso ricas em bufadienolídeos isoladas das raízes de *B. daigremontianum*, onde apresentaram atividade antioxidante contra radicais DPPH na dose de 21,80 µg/mL (IC<sub>50</sub>) assim como Stefanowicz-Hajduk *et al.* (2022), que também utilizaram extrato aquoso dessa planta e identificaram uma dose baixa de 1750 µg/mL (IC<sub>50</sub>). Em contrapartida, encontramos no trabalho de Bogucka-Kocka *et al.* (2018), efeito inverso aos resultados do presente estudo, ou seja, eles relatam atividade sequestradora de radicais livres, em mg/mL dose dependente. Para esclarecer esse feito, foi realizado um levantamento nas bases de dados nos últimos anos e não foram encontrados dados expressivos sobre o ensaio de DPPH nessa planta. Os resultados encontrados no presente trabalho são relevantes, uma vez que não foram encontrados dados semelhantes na literatura pesquisada.

A amostra de *B. daigremontianum* desse estudo pode conter um alto teor de bufadienolídeos, por ter sido realizada a extração hidroalcoólica. De acordo com Stefanowicz-Hajduk, Asztemborska, *et al.* (2020), o teor quantitativo de bufadienolídeos extraído em etanol é alto quando comparado à extração aquosa, devido às suas propriedades hidrofóbicas. Isso

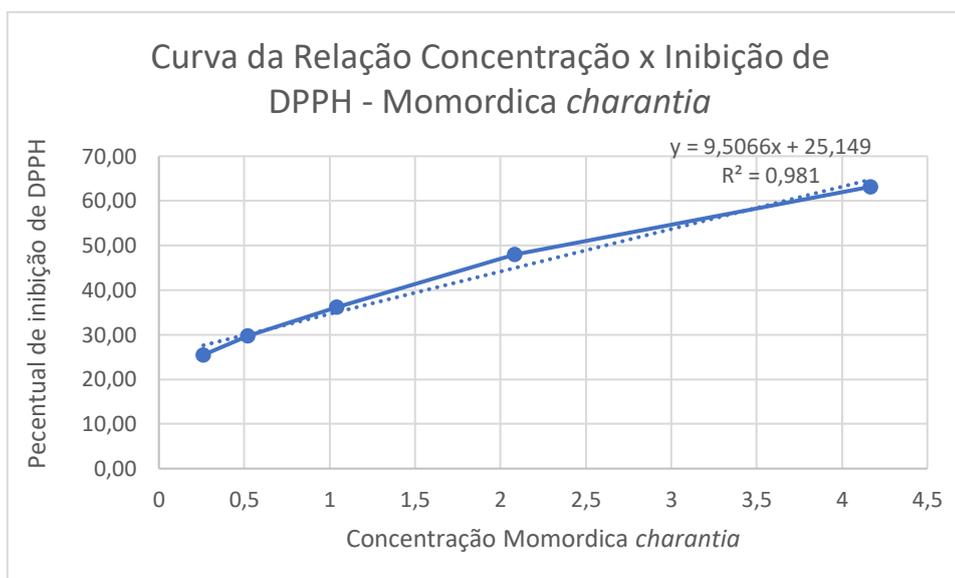
explicaria a alta toxicidade da nossa amostra em concentrações elevadas e efeito antioxidante em concentrações abaixo de 4 mg/mL.

De acordo com Stefanowicz-Hajduk, Asztemborska, *et al.* (2020) e Nascimento *et al.* (2023), os compostos de bufadienolídeo presentes em *B. daigremontianum* são conhecidos como componentes altamente tóxicos com acentuadas propriedades antitumorais e citotóxicas. O grupo de Stefanowicz-Hajduk, Hering, *et al.* (2020) encontrou 6 diferentes tipos de bufadienolídeo, sendo eles a briofilina A, briofilina C, bersaldegina-3-ortoacetato, daigremontianina, daigremonato de metila e bersaldegina-1,3,5-ortoacetato.

*Briophyllum daigremontianum* revelou-se surpreendente em seu potencial antioxidante, demonstrando uma atividade inversamente proporcional à dose, indicando uma possível toxicidade em concentrações mais elevadas e um excelente potencial antioxidante em doses mínimas.

Em relação a *M. charantia*, esta apresentou o resultado no gráfico abaixo:

Grafico 2- Teste DPPH *Momordica charantia*.



A amostra de *M. charantia* apresentou efeito dependente da concentração quanto à sua atividade antioxidante e a  $IC_{50}$  determinada foi de 2,61 mg/mL, Pham *et al.* (2019) encontram em sua pesquisa, valores significativos da atividade de eliminação de DPPH, utilizando extrato etanólico de *M. charantia* na concentração de 0,66 mg/mL ( $IC_{50}$ ). Perumal *et al.* (2021) também determinaram a  $IC_{50}$  de extrato hidroalcoólico dessa planta em concentrações de etanol variando de 20 a 80% e concluíram que o extrato obtido com etanol 80% inibiram os radicais livres na dose de 0,37 mg/mL.

Hussain *et al.* (2022) encontraram em seu trabalho ação antioxidante de extrato metanólico aquoso de *M. charantia*, com capacidade de eliminação de radicais DPPH de 63,87% quando comparado ao BHT (88,89 %). Park *et al.* (2019) também utilizaram extrato metanólico de *M. charantia* em concentrações que variam de 0–200 µg /mL e verificaram ação antioxidante dose dependente.

Quanto aos testes de CAT, CFT e FFT, os resultados estão apresentados na Tabela 1 abaixo. Esses dados demonstram o potencial antioxidante das amostras analisadas quando comparadas ao padrão.

Tabela 1. Capacidade antioxidantes, fenólicos e flavonas/flavonóides

	<i>B. daigremontinum</i>	<i>M. charantia</i>
CAT	6,16 eq/g Ácido Ascórbico	2,57eq/g Ácido Ascórbico
FFT	1559,00 eq/g Quercetina	43,63 eq/g Quercetina
CFT	5,44 eq/g Ácido Gálico	0,49 eq/g Ácido Gálico

CAT- Compostos Antioxidantes Totais  
 FFT – Flavonas/Flavonóides Totais  
 CFT- Compostos Fenólicos Totais

Os flavonoides são compostos com diferentes subclasses que exibem atividades biológicas amplamente reconhecidas (flavonóis, flavonas, flavanonóis, flavanonas, flavanóis e antocianidinas), sendo suas diferenças baseadas pelo grau de oxidação e substituintes do anel C; muitas das quais estão relacionadas à sua capacidade de neutralizar radicais livres, resultando em atividade antioxidante. Estas atividades abrangem o combate ao câncer, a atenuação de processos inflamatórios e capacidade imunomoduladora (NASCIMENTO *et al.*, 2023).

A *B. daigremontianum* apresenta alto teor de ácidos fenólicos (subfamílias de ácidos cinâmicos e ácidos benzoicos) e flavonoides. Os ácidos fenólicos e favonoides são descritos como antioxidantes notáveis, cuja atividade varia de acordo com o número, e combinação de grupos hidroxila em sua estrutura. Dentre os flavonoides, a subfamília de glicosídeos é a que mais se destaca (GARCÍA-PÉREZ, LOZANO-MILO, *et al.*, 2020).

O resultado para pesquisa de compostos flavonas/flavonoides totais para *B. daigremontianum* encontrado neste trabalho (1559,00 eq/g Quercetina ) está acima do valor com o valor encontrado por García-Pérez, Losada-Barreiro, *et al.* (2020) que foi de 5.13 eq/g Ácido Gálico. Estudos de Bogucka-Kocka *et al.* (2018) mostraram que *B. daigremontianum* extraída em solvente etanólico continha as maiores quantidades de ácidos fenólicos (124 µg/g de peso

seco). Estudos de Stefanowicz-Hajduk, Asztemborska, *et al.* (2020) identificaram 19 compostos pertencentes a flavonoides na espécie *B. daigremontianum*.

No tocante aos flavonoides, apesar de ser uma classe de compostos extensivamente pesquisada, as avaliações toxicológicas parecem constituir apenas uma fração limitada dessas investigações. A maior parte dos dados disponíveis refere-se aos flavonoides com ampla distribuição entre as plantas, como é o caso da quercetina e do kaempferol. Essas agliconas de flavonóis tiveram seus efeitos tóxicos examinados em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. Embora alguns testes *in vitro* sugiram uma possível toxicidade, principalmente devido à atividade pró-oxidante, esses efeitos não foram corroborados em estudos *in vivo*. Na maioria das análises *in vivo* realizadas, a quercetina e o kaempferol demonstraram ter uma baixa toxicidade. Por outro lado, há uma carência de dados sobre a toxicidade dos glicosídeos flavonol (NASCIMENTO *et al.*, 2023). Radziejewska *et al.* (2021) também relatam em seu trabalho sobre a falta de elucidação dos mecanismos de ação de flavonoides.

Estudos de Raina *et al.* (2016) afirmam que sementes de *M. charantia* são ricas em compostos fenólicos e que apresentam acentuada atividade antioxidante quando a extração é realizada com teor mínimo de 80% de etanol. Neste trabalho, foi utilizado 92% de etanol no preparo dos extratos, o que garantiu a retirada da maior parte dos compostos fenólicos. Os principais compostos fenólicos são catequina, ácido gálico, ácido genticônico, ácido clorogênico e epicatequina.

O resultado encontrado no presente estudo para CFT (Compostos Fenólicos Totais) da amostra de *M. charantia* utilizando extração hidroalcoólica apresentou 0,49 eq/g ácido gálico, o que supera o valor encontrado por Busuioc *et al.* (2020) em seu trabalho que foi de  $27,64 \pm 1,89$  mg Ácido gálico/mL de suco *M. charantia*.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados dos testes antioxidantes, fenólicos e flavonoides revelaram o potencial antioxidante das amostras, evidenciando suas propriedades benéficas para a saúde. Essas descobertas contribuem para a compreensão da complexidade da composição química dessas plantas medicinais e fornecem subsídios para futuros estudos e aplicações terapêuticas. A pesquisa destaca a importância de explorar e compreender a vasta biodiversidade do Brasil, não apenas como um recurso natural valioso, mas também como uma fonte valiosa de medicamentos potenciais.

## REFERÊNCIAS

AHN, M.-R. et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1383-1392, 2007/01/01/ 2007.

BFG. **Flora do Brasil 2020**. Rio de Janeiro: 2021.

BOGUCKA-KOCKA, A. et al. Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoë* species. **Saudi J Biol Sci**, v. 25, n. 4, p. 622-630, May 2018.

BORTOLOTTI, M.; MERCATELLI, D.; POLITO, L. *Momordica charantia*, a Nutraceutical Approach for Inflammatory Related Diseases. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 486-486, 2019.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995/01/01/ 1995.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. John Wiley & sons, 2015. ISBN 0470714220.

BUSUIOC, A. C. et al. Comparative Study of the Chemical Compositions and Antioxidant Activities of Fresh Juices from Romanian Cucurbitaceae Varieties. **Molecules**, v. 25, n. 22, Nov 23 2020.

CHRISTODOULOU, M. C. et al. Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals. **Antioxidants (Basel)**, v. 11, n. 11, Nov 8 2022.

FANG, E. F. et al. Emerging Antitumor Activities of the Bitter Melon (*Momordica charantia*). **Curr Protein Pept Sci**, v. 20, n. 3, p. 296-301, 2019.

FAROOQI, A. A. et al. Bitter gourd (*Momordica charantia*) as a rich source of bioactive components to combat cancer naturally: Are we on the right track to fully unlock its potential as inhibitor of deregulated signaling pathways. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 98-105, 2018/09/01/ 2018.

GARCÍA-PÉREZ, P. et al. Exploring the Use of *Bryophyllum* as Natural Source of Bioactive Compounds with Antioxidant Activity to Prevent Lipid Oxidation of Fish Oil-In-Water Emulsions. **Plants (Basel)**, v. 9, n. 8, Aug 11 2020.

GARCÍA-PÉREZ, P. et al. From Ethnomedicine to Plant Biotechnology and Machine Learning: The Valorization of the Medicinal Plant *Bryophyllum* sp. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 13, n. 12, Dec 4 2020.

HUSSAIN, L. et al. Therapeutic Investigation of Standardized Aqueous Methanolic Extract of Bitter Melon (*Momordica charantia* L.) for Its Potential against Polycystic Ovarian Syndrome in Experimental Animals' Model: In Vitro and In Vivo Studies. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2022, p. 5143653, 2022.

JIA, S. et al. Recent Advances in *Momordica charantia*: Functional Components and Biological Activities. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 12, p. 2555, 2017.

KIM, D.-O.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, n. 3, p. 321-326, 2003/06/01/ 2003.

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J. et al. Antioxidant efficacy of *Kalanchoe daigremontiana* bufadienolide-rich fraction in blood plasma in vitro. **Pharm Biol**, v. 54, n. 12, p. 3182-3188, Dec 2016.

LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80-89, 2020/03/01/ 2020.

MURONGA, M. et al. Three Selected Edible Crops of the Genus *Momordica* as Potential Sources of Phytochemicals: Biochemical, Nutritional, and Medicinal Values. **Front Pharmacol**, v. 12, p. 625546, 2021.

NASCIMENTO, L.; CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Bioactive Compounds from *Kalanchoe* Genus Potentially Useful for the Development of New Drugs. **Life (Basel)**, v. 13, n. 3, Feb 26 2023.

PANT, P.; PANDEY, S.; DALL'ACQUA, S. The Influence of Environmental Conditions on Secondary Metabolites in Medicinal Plants: A Literature Review. **Chem Biodivers**, v. 18, n. 11, p. e2100345, Nov 2021.

PARK, S. H. et al. Antioxidative and Antimelanogenesis Effect of *Momordica charantia* Methanol Extract. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2019, p. 5091534, 2019.

PERUMAL, V. et al. Antioxidants profile of *Momordica charantia* fruit extract analyzed using LC-MS-QTOF-based metabolomics. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 2, p. 100012, 2021/07/30/ 2021.

PHAM, T. M. H. et al. Investigation of Biological Activities of Wild Bitter Melon (*Momordica charantia* Linn. Var. *Abbreviata* Ser.). **Biomolecules**, v. 9, n. 6, May 30 2019.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the

Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999/05/01/1999.

RADZIEJEWSKA, I. et al. Anti-Cancer Potential of Afzelin towards AGS Gastric Cancer Cells. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 14, n. 10, Sep 25 2021.

RAINA, K.; KUMAR, D.; AGARWAL, R. Promise of bitter melon (*Momordica charantia*) bioactives in cancer prevention and therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40-41, p. 116-129, 2016/10/01/ 2016.

RAY, R. B. et al. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. **Cancer Res**, v. 70, n. 5, p. 1925-31, Mar 1 2010.

STEFANOWICZ-HAJDUK, J. et al. Identification of Flavonoids and Bufadienolides and Cytotoxic Effects of *Kalanchoe daigremontiana* Extracts on Human Cancer Cell Lines. **Planta Med**, v. 86, n. 4, p. 239-246, Mar 2020.

STEFANOWICZ-HAJDUK, J. et al. Biological activities of leaf extracts from selected *Kalanchoe* species and their relationship with bufadienolides content. **Pharm Biol**, v. 58, n. 1, p. 732-740, Dec 2020.

STEFANOWICZ-HAJDUK, J. et al. An In Vitro Anticancer, Antioxidant, and Phytochemical Study on Water Extract of *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet and H. Perrier. **Molecules**, v. 27, n. 7, Mar 31 2022.

SUR, S.; RAY, R. B. Bitter Melon (*Momordica Charantia*), a Nutraceutical Approach for Cancer Prevention and Therapy. **Cancers (Basel)**, v. 12, n. 8, Jul 27 2020.

VILA VERDE, G. M. et al. A Green Protocol for Microwave-Assisted Extraction of Volatile Oil Terpenes from *Pterodon emarginatus* Vogel. (*Fabaceae*). Molecules. 23 2018.

ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. et al. Vitamin C and aroma composition of fresh leaves from *Kalanchoe pinnata* and *Kalanchoe daigremontiana*. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 19786, Dec 24 2019.

## ARTIGO 2

### Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Quitosana e TPP

#### RESUMO

A limitação associada aos agentes terapêuticos convencionais é caracterizada pela falta de seletividade, efeitos colaterais indesejáveis, baixa eficiência e distribuição inadequada no organismo. Para superar esses obstáculos, uma abordagem inovadora é a associação de agentes terapêuticos com nanopartículas, devido às suas propriedades físico-químicas e biológicas únicas. A nanotecnologia na medicina tem sido amplamente explorada, proporcionando avanços no diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças. Nanopartículas apresentam capacidade de resguardar medicamentos contra degradação precoce, aprimorar a penetração intracelular e intensificar a absorção e eficácia do medicamento no local desejado. Isso contribui para a medicina de precisão, permitindo o uso de doses mais baixas e melhorando o índice terapêutico. As nanopartículas são classificadas com base em sua morfologia, tamanho e forma, podendo ser inorgânicos e orgânicos. A quitosana, um polímero natural, se destaca por suas propriedades bioativas, incluindo atividades antitumorais e antioxidantes. A preparação de nanopartículas de quitosana envolve o uso do Tripolifosfato de Sódio (TPP) como agente de reticulação. O estudo em questão buscou produzir nanopartículas à base de quitosana e TPP, incorporando extratos de *Bryophyllum daigremontianum* e *Momordica charantia* para aplicação em estudos *in vitro* em células tumorais. Os métodos incluíram a preparação das nanopartículas de quitosana, nanoencapsulamento dos extratos e análises por microscopia eletrônica e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) que evidenciam a presença de grupos funcionais nas nanopartículas de quitosana e TPP e nanoencapsulamento dos extratos, evidenciando a probabilidade de aplicação em estudos *in vitro* em células tumorais. Destaca-se que essas nanopartículas têm potencial aplicação em medicina, oferecendo biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade.

Palavras-chave: nanotecnologia; antitumoral; reticulação.

#### ABSTRACT

The limitation associated with conventional therapeutic agents is characterized by lack of selectivity, undesirable side effects, low efficiency and inadequate distribution in the body. To overcome these obstacles, an innovative approach is the association of therapeutic agents with nanoparticles, due to their unique physicochemical and biological properties. Nanotechnology in medicine has been widely explored, providing advances in the diagnosis, prevention and treatment of diseases. Nanoparticles have the ability to protect medicines against premature degradation, improve intracellular penetration and intensify the absorption and effectiveness of the medicine at the desired location. This contributes to precision medicine, allowing the use of lower doses and improving the therapeutic index. Nanoparticles are classified based on their morphology, size and shape, and can be inorganic and organic. Chitosan, a natural polymer, stands out for its bioactive properties, including antitumor and antioxidant activities. The preparation of chitosan nanoparticles involves the use of Sodium Tripolyphosphate (TPP) as a cross-linking agent. The study in question sought to produce nanoparticles based on chitosan and TPP, incorporating extracts of *Bryophyllum daigremontianum* and *Momordica charantia* for

application in *in vitro* studies on tumor cells. The methods included the preparation of chitosan nanoparticles, nanoencapsulation of the extracts and analysis by electron microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), which showed the presence of functional groups in the chitosan and TPP nanoparticles and nanoencapsulation of the extracts, demonstrating the likelihood of application *in vitro* studies on tumor cells. It should be noted that these nanoparticles have potential applications in medicine, offering biodegradability, biocompatibility and non-toxicity.

Keywords: nanotechnology; antitumor; crosslinking.

## 1 INTRODUÇÃO

A eficiência do tratamento de várias doenças enfrenta um grande obstáculo que é a entrega precisa de agentes terapêuticos na zona alvo. A utilização dos agentes terapêuticos convencionais apresenta entraves, tais como falta de seletividade, efeitos colaterais indesejáveis, baixa eficiência e distribuição inadequada no organismo. Uma abordagem promissora nesse campo envolve a associação de agentes terapêuticos com nanopartículas que possuem propriedades físico-químicas e biológicas únicas, juntamente com o desenvolvimento de rotas direcionadas para conduzir esses agentes a locais específicos no corpo (YETISGIN *et al.*, 2020). Várias pesquisas detalham o benefício da nanotecnologia no campo da medicina (CONTERA *et al.*, 2020) sendo utilizada no diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças (EL-SAYED E KAMEL, 2020). Segundo Adir *et al.* (2020), os nanomateriais contribuíram significativamente para a evolução da medicina de precisão, em todas as áreas.

As nanopartículas apresentam a capacidade de resguardar o medicamento contra degradação precoce, aprimorar a penetração intracelular, estender a liberação, intensificar a absorção e a eficácia do medicamento no local desejado, o que as torna um recurso de grande relevância no campo da saúde (KUČUK *et al.*, 2023). Essa estratégia direcionada aumenta a concentração dos agentes terapêuticos nas células e tecidos desejados, permitindo o uso de doses mais baixas, especialmente quando há um conflito entre a atividade terapêutica e os efeitos tóxicos dos agentes (YETISGIN *et al.*, 2020; MILEWSKA *et al.*, 2021). A elevação da concentração dos agentes terapêuticos no local-alvo também melhora o seu índice terapêutico, aumentando a eficácia e ou a tolerabilidade nos sistemas biológicos (YETISGIN *et al.*, 2020).

Os nanocarreadores são classificadas de acordo com sua morfologia, tamanho e forma, podendo ser inorgânicos (metais) e orgânicos (lipídios, proteínas, açúcares); à base de carbono ou polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos (IAZ *et al.*, 2020; WONG *et al.*, 2020; BAI *et al.*, 2022). Dentre os polímeros naturais, a quitosana (CS) é uma das substâncias mais investigadas pela farmacologia (MIKUŠOVÁ E MIKUŠ, 2021; KUČUK *et al.*, 2023), reconhecido

como uma substância bioativa que possui várias características biológicas, dentre elas atividades antitumorais e antioxidantes (SHARIATINIA, 2019). É um aminopolissacarídeo catiônico linear, produzido através da desacetilação da quitina (WONG *et al.*, 2020; MIKUŠOVÁ E MIKUŠ, 2021), que é uma substância abundantemente encontrada em exoesqueleto de crustáceos e em alguns fungos e microalgas (RIZEQ *et al.*, 2019; MIKUŠOVÁ E MIKUŠ, 2021). Estruturalmente, a quitosana é composta por unidades de  $\beta$ -D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina por 1,4 ligações glicosídicas (WONG *et al.*, 2020).

Para a preparação das nanopartículas de quitosana, um dos métodos mais utilizados é a reticulação iônica ou gelificação iônica, cuja vantagem está em evitar o uso de solventes orgânicos, temperaturas elevadas ou agitação intensa (MIKUŠOVÁ E MIKUŠ, 2021). Um dos agentes de reticulação mais empregados é o Tripolifosfato de Sódio (TPP). Esse composto apresenta um centro de fósforo e é uma base de Lewis ativa. O TPP possui hibridização  $sp^3$  no centro do fósforo. Sendo assim, esta molécula pode doar outra molécula e, portanto, acredita-se que o acoplamento ocorra entre o grupo amino positivo da quitosana (CS) e o TPP negativo; o que em última análise leva à preparação de nanopartículas (BHATTACHARYA *et al.*, 2022).

Uma abordagem promissora nesse campo envolve a associação de agentes terapêuticos com nanopartículas que possuem propriedades físico-químicas e biológicas únicas, juntamente com o desenvolvimento de rotas direcionadas para conduzir esses agentes a locais específicos no corpo (YETISGIN *et al.*, 2020).

A área da nanotecnologia, que engloba a síntese, a elaboração e a aplicabilidade de nanomateriais em dimensões entre 1 e 100 nm, tem suscitado cada vez mais interesse em várias áreas nos últimos anos. Dentre outras coisas, os nanomateriais, em especial as nanopartículas, encenam um papel relevante no âmbito das aplicações na saúde, por proporcionarem maior eficiência e baixa toxicidade (KUČUK *et al.*, 2023).

Por todos os fatos elencados acima, esse estudo teve o propósito de determinar um protocolo para a produção de nanopartículas à base de quitosana (CS) e TPP eficientes na entrega de extratos de *Bryophyllum daigremontianum*, *Momordica charantia*, para aplicação em estudos *in vitro* em células tumorais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparo de Nanopartículas de Quitosana

A síntese das nanocápsulas de quitosana/tripolifosfato de sódio (CS/TPP) foi realizada com base no trabalho de Akolade *et al.* (2018). Foram testadas diferentes soluções de quitosana (CS – SIGMA<sup>®</sup>) de baixo peso molecular (BPM, 50-190 KDa) e de médio peso molecular (MPM, 190-310 KDa). As quitosanas testadas foram: CS pura, BPM, fabricante Sigma-Aldrich; CS comercial BPM, adquirida em farmácia de manipulação, grau de pureza 10%.

As soluções de CS foram preparadas na concentração de 0,2% e 0,5%, dissolvidas em solução de ácido acético 0,5% e 1,0%. Para pesagem da CS comercial de BPM foi considerado o fator de correção de 10%. As soluções permaneceram sob agitação constante, em agitador magnético, por 24 horas. Após esse período, as soluções de CS comercial foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e filtrado em filtro de seringa com poro de 0,45µm de diâmetro. O pH de todas as soluções foi corrigido para 4,8-5,0.

A solução de TPP (Na<sub>2</sub>O<sub>10</sub>P<sub>3</sub> - Exôdo Científica - PM 367,86g/mol) foi preparada na concentração 0,1% em água deionizada. Essa solução foi usada como agente de reticulação. A solução de TPP, foi gotejada na solução de CS, sob agitação constante, em temperatura ambiente). As proporções de CS/TPP utilizadas foram 3:1 e 4:1. Após o gotejamento, a solução permaneceu sob agitação constante por 30 minutos para formação das nanopartículas. Uma alíquota de cada amostra foi submetida à análise em microscopia eletrônica para avaliar o tamanho delas.

## 2.2 Nanoencapsulamento dos Extratos

Para a preparação do complexo CS/TPP/Aranto (*Bryophyllum daigremontianum*), e CS/TPP/Melão de São Caetano (*Momordica charantia*), foram utilizadas as seguintes proporções:

Aranto: massa de CS igual à massa de Aranto (mCS=mAranto);

Melão de São Caetano: massa de CS igual ao triplo da massa de Melão de São Caetano (mCS=3 x mM).

As soluções de CS (SIGMA<sup>®</sup>) foram preparadas na concentração de 0,5%, dissolvidas em solução de ácido acético 0,5%. As soluções permaneceram sob agitação constante, em agitador magnético, por 24 horas. O pH de todas as soluções foi corrigido para 4,8-5,0.

Os extratos foram dissolvidos na solução de CS, sendo 145mg de Aranto e 45mg de Melão de São Caetano, seguindo o coeficiente de solubilidade da amostra no solvente. Após a diluição do extrato, foi realizada o gotejamento do TPP sobre a solução de CS, como descrito anteriormente.

### 2.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR):

Esta análise forneceu evidências da presença de grupos funcionais presentes na estrutura do complexo CS/TPP. O equipamento utilizado foi FTIR Affinity, Shimadzu

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

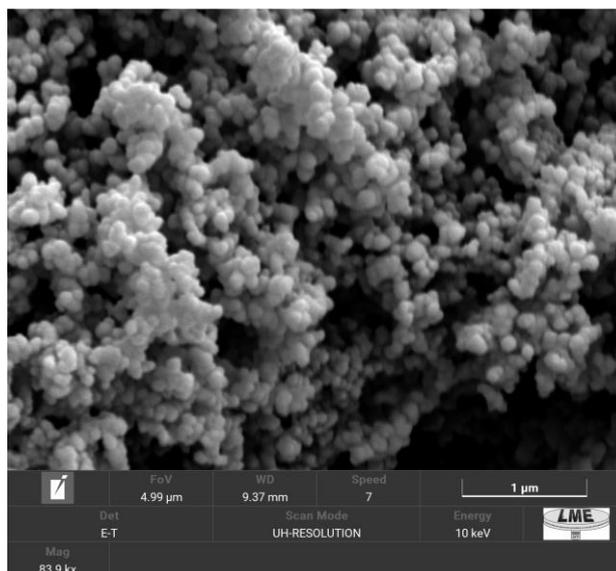
Os nanomateriais à base de quitosana estão na vanguarda das pesquisas e atraem grande interesse devido às suas características físico-químicas versáteis, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade (RIZEQ *et al.*, 2019; SHARIATINIA, 2019; GAO E WU, 2022).

As nanopartículas a base de CS e TPP, com diferentes concentrações de ácido acético (0,5% e 1%); diferentes concentrações de CS (0,2% e 0,5%) e diferentes proporções CS:TPP (3:1 e 4:1) foram produzidas.

Uma alíquota de cada amostra, em diferentes concentrações, foi observada em Microscopia Eletrônica de Varredura-MEV Tecsan® Clara. A solução de ácido acético 0,5%, solução de CS BPM comercial 0,5%, proporção CS/TPP 4:1 resultou em nanopartículas de tamanho 50 nm (Figura 1), ao passo que as nanopartículas produzidas em solução de ácido acético 0,5%, solução de CS BPM 0,5%, e proporção CS/TPP 3:1 apresentaram diâmetro de 100 nm (Figura 2).

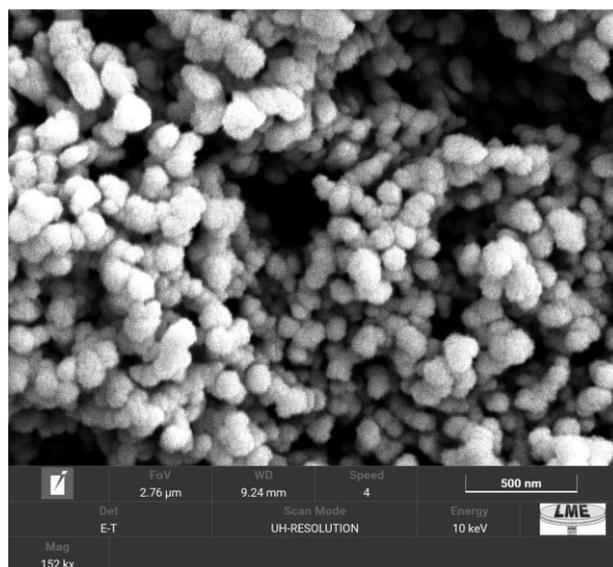
Este estudo está alinhado com os estudos de Yetisgin *et al.* (2020), onde o tamanho da partícula desempenha um papel crucial no controle da circulação e distribuição das nanopartículas terapêuticas, principalmente direcionadas para o tratamento de tumores. De acordo com esses autores, nanopartículas com dimensões inferiores a 10 nm podem ser prontamente eliminadas pelo sistema fisiológico, passando por filtração renal. Por outro lado, partículas que ultrapassam 200 nm podem ser removidas por células fagocíticas no sistema reticuloendotelial (RES). Consequentemente, nanopartículas terapêuticas com tamanho inferior a 100 nm desfrutam de um tempo de circulação mais prolongado na corrente sanguínea; e esses autores afirmam que nanopartículas terapêuticas com dimensões na faixa de 20 a 200 nm apresentam uma maior taxa de acumulação nos tumores, uma vez que escapam ao reconhecimento pelo RES e à filtração renal.

Figura 1 – Microscopia Eletrônica de Varredura: nanopartículas CS/TPP 4:1, tamanho 50nm



Fonte: acervo da autora

Figura 2 – Microscopia Eletrônica de Varredura: nanopartículas CS/TPP 3:1, tamanho 100nm



Fonte: acervo da autora

Bhattacharya et al. (2022) também relatam em seu trabalho que partículas cujo tamanho seja de até 200 nm, podem evitar a opsonização reticuloendotelial. Além disso, Yetisgin *et al.* (2020) descrevem em seu trabalho que os vasos sanguíneos nas regiões tumorais tendem a ser mais numerosos e maiores em comparação com os tecidos saudáveis circundantes.

Como resultado, nanopartículas com tamanhos adequados podem chegar às áreas tumorais com relativa facilidade e permanecer por mais tempo, o que é conhecido como o aprimorado EPR (efeito de permeabilidade e retenção) (YETISGIN et al., 2020).

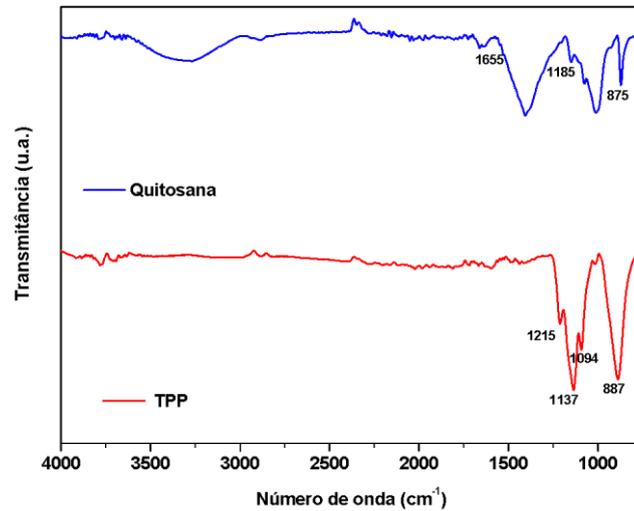
De acordo com a literatura descrita, as nanopartículas produzidas no presente trabalho atingiram o tamanho adequado para a entrega de medicamentos.

Outro teste realizado neste estudo através da Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) demonstrou que a produção das nanopartículas foram bem sucedidas e também que houve o nanoencapsulamento dos extratos hidroalcoólicos de interesse.

Os espectros de FTIR e os picos característicos da quitosana, TPP, e das nanopartículas de CS-TPP são mostrados na Figura 3. No espectro FTIR da quitosana, a banda larga entre 3500 e 3200  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada às vibrações de estiramento axial dos grupos O-H e à vibração de estiramento dos grupos funcionais N-H, cujas bandas estão superpostas. A pequena banda entre 2.955 e 2.800  $\text{cm}^{-1}$  é devida às vibrações de estiramento C-H, relacionada à presença de grupos metil na estrutura da quitosana. O pico em 1655  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído ao modo de vibração de estiramento da ligação C=O da amida. As bandas entre 1520 e 1280  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos grupos funcionais da amida secundária e terciária. Finalmente, a região entre 1185 e 895  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à estrutura sacarídica da quitosana, o que também está descrito por Silva *et al.* (2018).

No espectro FTIR do tripolifosfato de sódio puro (Figura 3) observa-se a bandas em 1215  $\text{cm}^{-1}$ , associada às vibrações de estiramento P=O. A banda em 1137  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída às vibrações de estiramento simétrico e anti-simétrico dos grupos PO<sub>3</sub>. Finalmente, a banda em 887  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída à vibração de estiramento assimétrico da ponte P-O-P. Esta interação é registrada na região correspondente ao grupo da amina primária (N-H) em 1643  $\text{cm}^{-1}$  e pela presença da banda larga em 1398  $\text{cm}^{-1}$ , relacionadas às vibrações de estiramento do grupo P=O. Este resultado sugere que através do método utilizado foi possível a síntese da quitosana reticulada. O espectro de CS mostra que a banda de absorção característica em 3360  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao modo de vibração de estiramento de NH sobreposto ao modo de vibração de estiramento O – H. O pico em 2.870  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído ao modo de vibração de estiramento C-H, enquanto o pico em 1.650  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído a C=O. A vibração de flexão do grupo NH aparece em 1580  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto a vibração de flexão de O-H aparece em 1430  $\text{cm}^{-1}$ . O pico em 1370  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído à vibração de flexão da deformação C-H. Os dois picos em 1080  $\text{cm}^{-1}$  e 1030  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos às vibrações esqueléticas envolvendo alongamento O-C. (SHAFQAT *et al.*, 2023; SILVA NIETO *et al.*, 2023).

Figura 3- Espectros FTIR de (CS) e TPP



Fonte: acervo da autora

Neste estudo foram realizados diversos testes de nanoencapsulamento utilizando extratos hidroalcoólicos de várias plantas para padronizar a técnica. Os espectros de FTIR das nanopartículas de quitosana reticulada e dos extratos encapsulados nas nanopartículas estão apresentados na Figura 4.

No espectro FTIR das nanopartículas de quitosana (Figura 4-NANO), observam-se as bandas características da quitosana reticulada. A banda larga entre 3500 e 3200 cm<sup>-1</sup> está relacionada às vibrações de estiramento axial dos grupos O-H e à vibração de estiramento dos grupos funcionais N-H, cujas bandas estão superpostas. A pequena banda entre 2955 e 2800 cm<sup>-1</sup> é devida às vibrações de estiramento C-H, relacionada à presença de grupos metil na estrutura da quitosana. A banda em 1654 cm<sup>-1</sup> corresponde à vibração de flexão de N-H, enquanto a banda em 1545 cm<sup>-1</sup> é atribuída à vibração de alongamento N-O-P. A presença destas bandas no espectro indica a ligação dos íons fosfóricos (correspondentes do TPP) com os íons amônio da quitosana. Além disso, no espectro da quitosana reticulada também se observou uma banda em 1407 cm<sup>-1</sup>, indicando a presença dos grupos P-O. Em suma, a análise FTIR confirma que foram formadas as ligações iônicas cruzadas entre os grupos NH<sub>3</sub><sup>+</sup> da quitosana e os íons polifosfato do TPP. (SILVA *et al.*, 2021).

Figura 4- Espectros FTIR do nanoencapsulamento

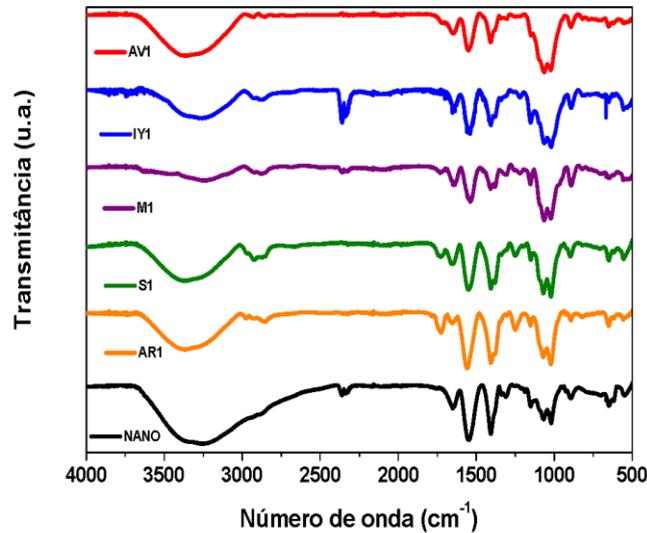


Figura 4: NANO- nanopartícula de quitosana  
 AR1- *B.daigremontianum*  
 M1- *M. charantia*

Nos espectros FTIR dos extratos nanoencapsulados observam-se os picos característicos da quitosana reticulada com algumas modificações e os picos relacionados aos diversos compostos ativos de cada extrato (Figura 4 - AR1 e M1). Este estudo ressalta a mudança da banda larga entre 3500 e 3200  $\text{cm}^{-1}$  que está relacionada às vibrações de estiramento axial dos grupos O-H, uma vez que, segundo a literatura, os íons  $(\text{OH})^-$  competem com os íons fosfóricos para interagir com os íons  $\text{NH}_3^+$  da quitosana. Dessa forma, com o inserção do extrato, mais grupos  $(\text{OH})^-$  podem ser ligados aos grupos amino, interferindo assim na reticulação da quitosana. Esta mudança pode afetar diretamente na interação do sistema com as células em estudo (BHUMKAR E POKHARKAR, 2006).

De acordo com os dados obtidos nesse estudo, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se o extrato de *M. Charantia* (Figura 4 - M1). Este extrato apresenta vários compostos ativos, dentre os quais podemos citar a momordicina e o charantin. O espectro FTIR da momordicina apresenta bandas características relacionadas ao alongamento do anel C=C e às vibrações de estiramento axial dos grupos O-H (KRITHIGA E BRIGETMARY, 2015). Portanto, como observa-do no espectro FTIR (M1), as duas bandas se superpõem às bandas da quitosana reticulada. Inclusive, pode-se observar que as bandas vibracionais correspondentes às ligações cruzadas da quitosana/TPP foram visivelmente modificadas. No entanto, para investigar a natureza da ligação cruzada com a inserção do extrato, é necessário fazer um estudo de potencial zeta ou condutividade.

## 4 CONCLUSÃO

Conclui-se com esse trabalho que para a obtenção de nanopartículas com dimensões acima de 10 nm e menores que 100 nm, as soluções ideais são as de ácido acético 0,5%, solução de CS 0,5% e proporção CS/TPP 4:1 ou CS/TPP 3:1 atingindo tamanho ideal para a entrega eficiente de medicamentos. Também houve o nanoencapsulamento dos extratos hidroalcoólicos, sendo que a *M. charantia* apresentou o melhor resultado. Com esses dados, estudos futuros poderão corroborar para uma entrega mais eficaz de ativos fitoterápicos de interesse terapêutico e oncológico.

## REFERÊNCIAS

ADIR, O. et al. Integrating Artificial Intelligence and Nanotechnology for Precision Cancer Medicine. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**, v. 32, n. 13, p. e1901989-e1901989, 2020.

AKOLADE, J. O. et al. Influence of formulation parameters on encapsulation and release characteristics of curcumin loaded in chitosan-based drug delivery carriers. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 45, p. 11-19, 2018/06/01/ 2018.

BAI, X. et al. Sustained Drug Release from Smart Nanoparticles in Cancer Therapy: A Comprehensive Review. **Micromachines (Basel)**, v. 13, n. 10, Sep 28 2022.

BHATTACHARYA, S.; ANJUM, M. M.; PATEL, K. K. Gemcitabine cationic polymeric nanoparticles against ovarian cancer: formulation, characterization, and targeted drug delivery. **Drug Deliv**, v. 29, n. 1, p. 1060-1074, Dec 2022.

BHUMKAR, D. R.; POKHARKAR, V. B. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 2, p. E50, Jun 2 2006.

CONTERA, S.; BERNARDINO DE LA SERNA, J.; TETLEY, T. D. Biotechnology, nanotechnology and medicine. **Emerg Top Life Sci**, v. 4, n. 6, p. 551-554, Dec 17 2020.

EL-SAYED, A.; KAMEL, M. Advanced applications of nanotechnology in veterinary medicine. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 16, p. 19073-19086, 2020/06/01 2020.

GAO, Y.; WU, Y. Recent advances of chitosan-based nanoparticles for biomedical and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 203, p. 379-388, 2022/04/01/ 2022.

IJAZ, I. et al. Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 13, n. 3, p. 223-245, 2020/07/02 2020.

KRITHIGA, J. A.; BRIGETMARY, M. Synthesis of Agnps of Momordica charantia Leaf Extract, Characterization and Antimicrobial Activity. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 6, p. 1-7, 2015.

KUČUK, N. et al. Sustainable Biodegradable Biopolymer-Based Nanoparticles for Healthcare Applications. **Int J Mol Sci**, v. 24, n. 4, Feb 6 2023.

MIKUŠOVÁ, V.; MIKUŠ, P. Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 17, Sep 6 2021.

MILEWSKA, S. et al. Current Trends and Challenges in Pharmacoeconomic Aspects of Nanocarriers as Drug Delivery Systems for Cancer Treatment. **Int J Nanomedicine**, v. 16, p. 6593-6644, 2021.

RIZEQ, B. R. et al. Synthesis, Bioapplications, and Toxicity Evaluation of Chitosan-Based Nanoparticles. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 22, Nov 16 2019.

SHAFQAT, O. et al. Synthesis, structural characterization and in vitro pharmacological properties of betanin-encapsulated chitosan nanoparticles. **Chemico-Biological Interactions**, v. 370, p. 110291, 2023/01/25/ 2023.

SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 131-194, 2019/01/01/ 2019.

SILVA, A. L. C. et al. Synthesis and characterization of nanocomposites consisting of polyaniline, chitosan and tin dioxide. **Materials Chemistry and Physics**, v. 216, p. 402-412, 2018/09/01/ 2018.

SILVA, N. C. D. et al. Extraction of phenolic compounds from acerola by-products using chitosan solution, encapsulation and application in extending the shelf-life of guava. **Food Chemistry**, v. 354, p. 129553, 2021/08/30/ 2021.

SILVA NIETO, R. et al. Chitosan-Based Nanogels Designed for Betanin-Rich Beetroot Extract Transport: Physicochemical and Biological Aspects. **Polymers (Basel)**, v. 15, n. 19, Sep 25 2023.

WONG, K. H. et al. Natural Ingredient-Based Polymeric Nanoparticles for Cancer Treatment. **Molecules**, v. 25, n. 16, Aug 9 2020.

YETISGIN, A. A. et al. Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. **Molecules**, v. 25, n. 9, May 8 2020.

## ARTIGO 3

### Plantas Medicinais na Terapia Oncológica

#### RESUMO

O câncer, desencadeado pela formação de radicais livres e estresse oxidativo, reflete desequilíbrio celular. Este estudo enfoca plantas medicinais, ricas em antioxidantes, como alternativas terapêuticas, destacando os potenciais benefícios dos compostos fenólicos e flavonoides. A nanotecnologia emerge como inovação na terapia anticâncer, oferecendo métodos de entrega de fármacos específicos. Nanopartículas de plantas como *Bryophyllum daigremontianum* e *Momordica charantia* revelam-se promissoras. Comparando plantas medicinais com o metotrexato, medicamento oncológico, observa-se a eficácia das plantas na inibição do crescimento celular com ou sem nanoencapsulamento. A pesquisa sublinha a importância de explorar terapeuticamente plantas medicinais, ressaltando o papel crucial da nanotecnologia no desenvolvimento de abordagens mais eficazes e específicas contra o câncer. Essas descobertas oferecem perspectivas significativas para aprimorar estratégias terapêuticas e ampliar opções no tratamento do câncer, unindo a tradição medicinal e a vanguarda nanotecnológica.

Palavras-chave: nanopartículas; quitosana; citotoxicidade; câncer.

#### ABSTRACT

Cancer, triggered by the formation of free radicals and oxidative stress, reflects cellular imbalance. This study focuses on medicinal plants, rich in antioxidants, as therapeutic alternatives, highlighting the potential benefits of phenolic compounds and flavonoids. Nanotechnology emerges as an innovation in anticancer therapy, offering specific drug delivery methods. Nanoparticles from plants such as *Bryophyllum daigremontianum* and *Momordica charantia* show promise. Comparing medicinal plants with methotrexate, an oncological drug, the effectiveness of plants in inhibiting cell growth with or without nanoencapsulation is observed. The research highlights the importance of therapeutically exploring medicinal plants, highlighting the crucial role of nanotechnology in developing more effective and specific approaches against cancer. These discoveries offer significant perspectives to improve therapeutic strategies and expand options in cancer treatment, uniting medicinal tradition and cutting-edge nanotechnology.

Keywords: nanoparticles; chitosan; cytotoxicity; cancer.

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos fatores desencadeantes do câncer é a formação de radicais livres pelo organismo que podem causar danos a biomoléculas como peroxidação de lipídeos da

membrana, injúria às proteínas, enzimas, tecidos e ao DNA. Os radicais livres são compostos químicos que apresentam um único elétron desemparelhado em uma de suas órbitas externas, conferindo-lhes instabilidade e reatividade, o que resulta na formação de mais radicais ou outras substâncias indesejáveis na proporção que um elétron busca se associar a outro. A geração de radicais pode ser desencadeada por fontes como calor, irradiação ultravioleta, poluição do ar ou pode ocorrer naturalmente nas mitocôndrias. Em organismos humanos, moléculas pequenas, peptídeos, proteínas e enzimas, predominantemente compostas por nitrogênio, oxigênio e enxofre, desempenham diversas funções vitais. Nitrogênio e oxigênio geralmente formam 'cadeias' de dois a três átomos (como peróxidos, ozônio, trióxido de dinitrogênio, etc.), ao passo que as cadeias de enxofre podem ser mais longas. Esses átomos possuem múltiplos estados de oxidação e, em determinados eventos e circunstâncias, podem liberar radicais livres como subprodutos (CHRISTODOULOU *et al.*, 2022). Isso acontece durante o metabolismo celular, mas se agrava em condições de estresse. Por uma falha na resposta imune inata, o desequilíbrio no aumento desses radicais livres em detrimento à produção endógena de moléculas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas agrava esse estresse oxidativo (TENUTA *et al.*, 2020; FIERASCU *et al.*, 2021).

Uma das alternativas para o combate ao câncer está associada ao uso de plantas medicinais, que tradicionalmente acompanham o homem desde os tempos primórdios. Neste interim, muitas plantas têm apresentado potencial antioxidante devido aos seus compostos como os compostos fenólicos e flavonóides (TENUTA *et al.*, 2020) além de esteroides, taninos e terpenos (LI *et al.*, 2020; PANT *et al.*, 2021), além de citotoxicidade (KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS *et al.*, 2016; STEFANOWICZ-HAJDUK, ASZTEMBORSKA, *et al.*, 2020).

De todas as drogas anticancerígenas usadas até o momento, mais de 60% delas são provenientes diretamente de plantas medicinais ou baseadas em seus compostos fitoquímicos e/ou seus metabólitos secundários (CRAGG E PEZZUTO, 2016; TESFAYE *et al.*, 2020; FIERASCU *et al.*, 2021; PANT *et al.*, 2021). Dentre essas drogas, as mais conhecidas no combate ao câncer estão os alcaloides da vinca, vimblastina, vincristina, paclitaxel (CRAGG E PEZZUTO, 2016) e antraciclina (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarrubicina) (SUR E RAY, 2020).

A evolução na produção da nanomedicina, simultaneamente com as novas percepções na biologia do câncer, propiciaram o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas direcionadas, baseadas em estímulos endógenos e exógenos para aprimorar a entrega de fármacos (ADIR *et al.*, 2020). Tais progressos na nanotecnologia do câncer desvendaram possibilidades significativas para entrega de drogas específicas direcionadas para células neoplásicas proporcionando vantagem sobre os agentes quimioterápicos tradicionais que

apresentam baixa especificidade e estreita janela de eficácia terapêutica (STEICHEN *et al.*, 2013).

Em um levantamento bibliográfico sobre nanotecnologia e terapia anticancerígena, Chaturvedi *et al.* (2019) conseguiram compilar várias pesquisas e concluíram que a nanotecnologia empregada nos estudos sobre o câncer confere uma tecnologia ímpar de diagnóstico precoce, prevenção e terapia personalizada utilizando nanopartículas. Dessa forma, as pesquisas atualmente consistem em desenvolver sistemas de entrega que sejam altamente controlados e versáteis (YETISGIN *et al.*, 2020).

Baseado nessas considerações, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial terapêutico das plantas medicinais popularmente conhecidas como Aranto (*Bryophyllum daigremontianum*) e Melão de São Caetano (*Momordica charantia*), com e sem nanoencapsulamento e analisar a eficiência desses extratos hidroalcoólicos na terapia celular tumoral *in vitro* comparados à droga Metotrexato.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reativação celular

As células RAW 264-7 (macrófago murino tumoral – ATCC TIB-71) e B16-F10 (melanoma murinho – ATCC CRL-6475) congeladas foram retiradas do nitrogênio e aquecidas em banho maria a 37° C, por 2 minutos. Após desprendimento das células no criotubo, elas foram imediatamente vertidas em um frasco de cultivo celular A25 contendo 15 mL de meio de cultivo RPMI GIBCO® (preparo de acordo com o fabricante) e 10% de soro fetal bovino (SFB-SIGMA®). As células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 48 horas em estufa JOuan 1GO150 CELL Life.

### 2.2 Síntese de Nanopartículas

As soluções de CS (SIGMA®) foram preparadas na concentração de 0,5%, dissolvidas em solução de ácido acético 0,5%. As soluções permaneceram sob agitação constante, em agitador magnético, por 24 horas. O pH de todas as soluções foi corrigido para 4,8-5,0. Os extratos brutos das plantas foram dissolvidos na solução de CS, sendo 145mg de *B. daigremontianum* e 45mg de *M. charantia*.

A solução de TPP ( $\text{Na}_2\text{O}_{10}\text{P}_3$  - Exôdo Científica - PM 367,86g/mol) foi preparada na concentração 0,1% em água deionizada. Essa solução foi usada como agente de reticulação. A solução de TPP, foi gotejada na solução de CS com e sem extratos, sob agitação constante, em temperatura ambiente). A proporção de CS/TPP utilizada foi 3:1. Após o gotejamento, a solução permaneceu sob agitação constante por 30 minutos para formação das nanopartículas. As amostras foram liofilizadas.

### 2.3 Ensaio MTT

Os extratos nanoencapsulados e sem nanoencapsulamento foram testados quanto aos seus efeitos citotóxicos contra as células RAW 264-7 e B16-F10, utilizando os ensaios de viabilidade baseados em brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio pelo Cell Proliferation Kit –MTT. Para o teste com extratos sem nanoencapsulamento, foram adicionados em cada poço de microplaca 50  $\mu\text{L}$  dos extratos de interesse e controle positivo nas seguintes concentrações: 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,312 mg/mL, em triplicata, branco e controle positivo (Metotrexato 25 mg/mL- Hytas®), juntamente com 100  $\mu\text{L}$  de cultivo celular padronizado na concentração de  $10^6$ . Para os ensaios com os extratos nanoencapsulados, foram utilizadas duas concentrações (10mg/mL e 5mg/mL) das amostras e controle negativo (nanopartículas de quitosana pura). As placas foram incubadas por um período de 24 horas, a 37° C e 5%  $\text{CO}_2$ . Após esse período, foi adicionado em cada poço 10  $\mu\text{L}$  do reagente MTT e novamente incubadas por 4 horas, a 37° C e 5%  $\text{CO}_2$ . Em seguida, foi adicionado em cada poço 100  $\mu\text{L}$  de tampão de solubilização e novamente incubadas por 12 horas, a 37° C e 5%  $\text{CO}_2$ . As placas foram lidas em um leitor EPOCH a 550nm. Os dados foram analisados em mg/eq Metotrexato.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo comparou-se a ação das plantas medicinais e o equivalente de Metotrexato que é um medicamento utilizado em terapias oncológicas, evidenciando qual a dosagem necessária de cada amostra para que seu efeito seja equivalente a 1mg do Metotrexato. Ambos os extratos testados com nanoencapsulamento e sem nanoencapsulamento, de ambas as plantas, apresentaram ação citotóxica nas células B16-F10 e RAW 264-7.

Os resultados das análises estão compilados na tabela 1abaixo.

Tabela 1. Efeito das amostras sobre a citotoxicidade em células B16-F10 e RAW 264-7

Cultivo Celular	Dosagem em mg/eq Metotrexato	
	B16-F10	RAW 264-7
<i>B. daigremontianum</i>	0,17	1,48
<i>M. charantia</i>	0,19	0,19
<i>B. daigremontianum</i> nanoencapsulado	0,60	0,32
<i>M. charantia</i> nanoncapsulado	1,18	0,60

mg/eq Metotrexato – mg do extrato equivalente a 1 mg de Metotrexato

Numerosos estudos foram conduzidos globalmente com o intuito de identificar antioxidantes naturais provenientes de fontes vegetais. Já foi comprovado que plantas que contêm compostos fenólicos e flavonoides exibem uma marcante atividade antioxidante. Nos últimos anos, há um notável interesse em produtos naturais derivados de plantas, como flavonoides, terpenos e alcaloides, devido às suas variadas propriedades farmacológicas, que incluem efeitos citotóxicos e ação quimioprotetora contra o câncer; e aproximadamente metade dos medicamentos testados em ensaios clínicos foi obtida a partir de fontes naturais. (AKTER *et al.*, 2022).

Com relação aos flavonoides, que estão presentes nos extratos de *B. daigremontianum*, e *M. charantia* já encontrados em estudo prévio, corroboram com estudos de outros autores que evidenciaram a ampla gama de atividades da quercetina na supressão da proliferação de células cancerígenas por meio de diversos mecanismos de ação. No contexto da leucemia humana, a quercetina exibiu atividade em um modelo de xenoenxerto de células leucêmicas humanas HL60. Existem indícios de que a quercetina desencadeia processos de sinalização nos níveis de apoptose, ciclo celular e autofagia, resultando na inibição do crescimento tumoral em HL60. (NASCIMENTO *et al.*, 2023). Akter *et al.* (2022) e colaboradores demonstraram em um estudo *in vivo*, a atividade antitumoral de flavonóide (quercetina) no carcinoma ascítico de Ehrlich assim como Radziejewska *et al.* (2021) verificaram a mesma atividade *in vitro* em células de câncer gástrico AGS. Isso pode explicar um dos mecanismos da citotoxicidade encontrada no presente estudo (Tabela1).

De acordo com Radziejewska *et al.* (2021), a disfunção da apoptose e o processo de morte celular programada são características distintas das células oncológicas, frequentemente conduzindo à sua transformação maligna. A glicosilação anômala é também reconhecida como uma assinatura do câncer e constitui uma das alterações pós-traducionais mais prevalentes que ocorrem durante as transformações neoplásicas. Esses autores descrevem que os glicanos, componentes fundamentais de glicoproteínas, glicoesfingolipídeos e proteoglicanos, desempenham papéis cruciais em várias fases do desenvolvimento tumoral, incluindo proliferação, invasão e metástase, através de interações entre células, interações célula-matriz, diferenciação celular e migração de células cancerosas. Assim, direcionar estruturas específicas de glicanos associadas ao câncer emerge como uma abordagem promissora com potencial aplicação no tratamento oncológico.

Uma das moléculas transportadoras proeminentes de glicanos no epitélio gástrico é a mucina MUC1, uma glicoproteína transmembrana com expressão significativamente elevada na maioria dos adenocarcinomas de origem epitelial (RADZIEJEWSKA *et al.*, 2021). Isso vai ao encontro da capacidade mucoadesiva da quitosana, relatada por Zhang *et al.* (2019) e Rasul *et al.* (2020), onde eles afirmam que uma das propriedades mais relevantes para seu emprego no câncer se deve à sua propriedade catiônica, que faz com que a quitosana tenha uma maior adesão à superfície mucosa aniônica das células cancerígenas permitindo a internalização da droga na célula alvo. Rasul *et al.* (2020) descrevem em seu trabalho que essa propriedade mucoadesiva é uma característica primordial na encapsulação, liberação de drogas bem como modulação da cinética de absorção dessas drogas. Os resultados encontrados no presente estudo, utilizando a quitosana como agente nanoencapsulador, onde foi demonstrado uma ação eficiente dos extratos nanoencapsulados quando comparados a ação do Metotrexato podem ser explicados pela ação mucoadesiva da quitosana (Tabela 1).

Em um estudo *in vitro*, Stefanowicz-Hajduk, Hering, *et al.* (2020) demonstraram ação citotóxica significativa do extrato aquoso de *Briophyllum daigremontianum* sobre as células HeLa (adenocarcinoma cervical), SKOV-3 (células de câncer de ovário humano) e A375 (melanoma maligno). Em outro estudo *in vitro*, Stefanowicz-Hajduk *et al.* (2022) demonstraram que o extrato aquoso de *B. daigremontianum* reduzem a viabilidade das células SKOV-3. Para avaliar a atividade citotóxica nas células SKOV-3 tratadas com o referido extrato, eles conduziram um ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Os resultados obtidos indicaram que, na concentração de 20 µg/mL do extrato, a porcentagem de células viáveis foi de  $53 \pm 3,33\%$ . Em concentrações mais elevadas

do extrato, especificamente 100 µg/mL e 200 µg/mL, os resultados foram de  $41,7 \pm 3,34\%$  e  $38,3 \pm 3,33\%$ , respectivamente.

Os compostos bufadienólides presentes *B. daigremontianum* são descritos em estudos *in vitro* diversos como potentes agentes citotóxicos em diferentes linhagens de células cancerígenas. Porém, sua toxicidade inerente dificulta sua administração em modelos animais e humanos de forma segura, sendo necessário o uso de compostos semi-sintéticos para evitar esse efeito adverso (GARCÍA-PÉREZ *et al.*, 2020).

Em suas pesquisas, Stefanowicz-Hajduk, Asztemborska, *et al.* (2020) empregaram o extrato etanólico de *B. daigremontianum*, juntamente com a fração bufadienolida ebersaldegenina-1,3,5-ortoacetato, o que evidenciou efeitos marcantes sobre queratinócitos humanos não tumorais. Devido às propriedades hidrofóbicas dos bufadienólídeos, o teor desses compostos em extratos aquosos é consideravelmente menor do que em extratos etanólicos. Isso pode justificar os usos etnomedicinais de extratos aquosos ou folhas *in natura*, os quais apresentam um teor relativamente mais seguro de bufadienólídeos quando comparados aos extratos à base de etanol e concentrações mais elevadas.

Neste trabalho, foi utilizado extrato hidroalcoólico de *B. daigremontianum*. Isso significa que tanto as frações hidrossolúveis como as frações hidrofóbicas dos compostos da planta foram extraídos e a ação antitumoral foi comprovada no ensaio MTT. A ação do extrato não nanoencapsulado dessa planta foi mais eficiente para as células B16-F10 (0,17 mg/eq Metotrexato) quando comparado às células RAW 264-7 (1,48 mg/eq Metotrexato); ao passo que no extrato nanoencapsulado a ação da planta foi melhor nas células RAW 264-7 (0,32 mg/eq Metotrexato) comparado às células B16-F10 (0,60 mg/eq Metotrexato). Esses resultados estão alinhados aos resultados descritos na literatura.

Ray *et al.* (2010) demonstraram em seus experimentos com células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 que o extrato de *Momordica charantia* inibe significativamente o crescimento das células e promove a apoptose dessas células, que é mediada por proteínas que regulam o ciclo da célula e apoptose. Eles observaram uma taxa de mais de 80% de morte celular em células de câncer de mama tratadas com 2% de extrato de *M. charantia* (variedade chinesa).

Extratos etanólicos de frutas de *Momordica charantia* diminuem a viabilidade de células cancerígenas no pâncreas e, extrato etanólico das sementes diminuem a proliferação de células T leucêmicas (células Su9T01, HUT-102 e Jurkat) além de outras ações em outros tipos de câncer (RAINHA *et al.*, 2016).

Rao (2018) relata em seu trabalho o potencial apresentado pelo extrato de *Momordica charantia* na prevenção do câncer oral através da sua ação imunomoduladora em diferentes processos biológicos. Farooqi *et al.* (2018) também evidenciaram que os constituintes bioativos desta planta são capazes de modular diversas proteínas envolvidas nas rotas de sinalização, regulando a apoptose e a metástase.

Em seu trabalho, Bortolotti *et al.* (2019) citam estudos de diversos autores sobre ensaios realizados com diversos extratos de *Momordica charantia*, em que tais extratos conseguiram controlar o processo inflamatório principalmente através do bloqueio da via de sinalização NF- $\kappa$ B; em células RAW 264.7, o extrato reduziu a produção de TNF- $\alpha$  que foi induzida por lipopolissacarídeo (LPS), diminuindo a expressão de genes inflamatórios e IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Houve também redução da ligação de NF- $\kappa$ B ao DNA bem como a fosforilação de p38, JNKs, ERKs e MAPKs.

Trabalhos recentes exploraram o potencial antitumoral do extrato bruto de *Momordica charantia*, demonstrando sua capacidade de inibir a proliferação celular em diversas linhagens cancerígenas, incluindo câncer de mama (MDA-MB-231, MCF-7), câncer de cólon (HT-29, SW480) e câncer pancreático (BxPC-3, MiaPaCa-2, AsPC-1). Após 48 horas de incubação, todas as linhagens celulares foram inibidas de maneira dependente da dose. Além disso, mais recentemente, o suco dessa planta também demonstrou atividade antitumoral contra células cancerígenas pancreáticas resistentes à gencitabina (FANG *et al.*, 2019).

Park *et al.* (2019) testaram extrato metanólico de *Momordica charantia* em células B16-F10 com doses variando de 0–400 $\mu$ g/ml por 24 h e não encontraram atividade citotóxica nessas concentrações.

No presente trabalho, os extratos hidroalcoólicos de *M. charantia* também demonstraram ação citotóxica para as células B16-F10 e RAW 264-7. Os extratos puros de *M. charantia* exibiram atividade mais eficiente em comparação ao Metotrexato, na dose de 0,19 mg/eq Metotrexato para ambas as linhagens celulares. Em relação ao extrato nanoencapsulado, a ação citotóxica foi melhor nas células RAW 264-7 (0,60 mg/eq Metotrexato) em comparação às células B16-F10 (1,18mg/eq Metotrexato).

A atividade citotóxica dos compostos isolados de *M. charantia* foram avaliados por Zhang *et al.* (2014) contra MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), Doay (meduloblastoma humano), HEp-2 (carcinoma laríngeo humano) e linhas de células tumorais WiDr (adenocarcinoma de cólon humano) em análises *em vitro*. Os dados revelaram que alguns compostos apresentaram citotoxicidade significativa contra MCF-7, Doay, HEp-2 e

WiDr (IC<sub>50</sub> ca. 7,81–19,76 IM), enquanto nenhum efeito foi observado para a linha celular normal (M10, células epiteliais mamária humano) a uma concentração de 30 µM .

As pesquisas de Farooqi *et al.* (2018) demonstraram que *M. charantia* age como um modulador das vias de sinalização AKT/mTOR/p70S6K, da via p38MAPK-MAPKAPK-2/HSP-27, assim como de proteínas reguladoras do ciclo celular e proteínas associadas à apoptose em diversos tipos de câncer.

Quanto ao nanoencapsulamento, verificou-se que a toxicidade da *B. daigremontianum* nanoencapsulada exerce efeito maior que a ação do metotrexato, tanto para as células B16-F10 (0,6 mg/eq de metotrexato) quanto para as células RAW 264-7 (0,32 mg/eq de metotrexato). Em relação ao extrato de *M. charantia* nanoencapsulado, os resultados obtidos para as células B16-F10 (1,18 mg/eq Metotrexato) não foram tão eficientes quando comparado ao Metotrexato, ao passo que o resultado encontrado para as células RAW 264-7 (0,6 mg/eq de metotrexato) foi superior. Esses resultados podem ser explicados pela ação anticancerígena da quitosana descrita por outros autores. Em sua revisão de literatura, Sartaj *et al.* (2021) descrevem um estudo sobre o uso de Docetaxel associado a elaboração de nanopartículas de quitosana, as quais foram reticuladas de modo iônico com o DTX, empregando tripolifosfato de sódio (TPP) como agente de reticulação. Para avaliar a eficácia, linhagens celulares MDA-MB-231 foram utilizadas como modelo em um estudo de citotoxicidade *in vitro*, no qual evidenciaram os efeitos benéficos das nanopartículas desenvolvidas em relação ao DTX puro. Esses resultados revelaram uma expressiva redução de aproximadamente 85% na viabilidade celular. Em suma, o presente estudo corrobora as vantagens das nanopartículas reticuladas ionicamente, sugerindo-as como um sistema promissor para a administração de medicamentos no tratamento do câncer de mama.

Outro fator de significativa importância é que os nanofármacos têm a capacidade de induzir uma notável supressão no crescimento tumoral, proporcionando um prolongamento no tempo de sobrevivência global de pacientes acometidos pelo câncer. Além disso, essas terapias apresentam um direcionamento específico que pode intensificar os efeitos citotóxicos nas células neoplásicas, ao mesmo tempo em que minimizam os impactos adversos em todo o organismo. Isso se traduz em vantagens substanciais em termos de custos, tornando a nanotecnologia uma alternativa mais econômica em comparação às terapias convencionais (MILEWSKA *et al.*, 2021).

Este presente estudo sugere que a modulação das diversas vias de transdução de sinal induzindo a morte celular ocorre devido aos compostos presentes nos extratos e corroboram

com as atividades de tais extratos descritos pelos autores mencionados ao longo dessa discussão.

#### 4 CONCLUSÃO

Conclui-se que os extratos hidroalcoólicos de *Bryophyllum daigremontianum* e *Momordica charantia*, nanoencapsulados ou não, apresentaram resultados na terapia oncológica promissores quando comparados à atividade do Metotrexato. Este trabalho salienta a importância de pesquisas para uma melhor compreensão e aplicação seguras da nanotecnologia associada aos medicamentos fitoterápicos na terapia oncológica de precisão.

#### REFERÊNCIAS

ADIR, O. et al. Integrating Artificial Intelligence and Nanotechnology for Precision Cancer Medicine. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**, v. 32, n. 13, p. e1901989-e1901989, 2020.

AKTER, M. et al. Anti-tumor and antioxidant activity of kaempferol-3-O-alpha-L-rhamnoside (Afzelin) isolated from *Pithecellobium dulce* leaves. **BMC Complement Med Ther**, v. 22, n. 1, p. 169, Jun 22 2022.

BORTOLOTTI, M.; MERCATELLI, D.; POLITO, L. *Momordica charantia*, a Nutraceutical Approach for Inflammatory Related Diseases. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 486-486, 2019.

CHATURVEDI, V. K. et al. Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy. **Curr Drug Metab**, v. 20, n. 6, p. 416-429, 2019.

CHRISTODOULOU, M. C. et al. Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals. **Antioxidants (Basel)**, v. 11, n. 11, Nov 8 2022.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. **Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre**, v. 25 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 41-59, 2016.

FANG, E. F. et al. Emerging Antitumor Activities of the Bitter Melon (*Momordica charantia*). **Curr Protein Pept Sci**, v. 20, n. 3, p. 296-301, 2019.

FAROOQI, A. A. et al. Bitter gourd (*Momordica charantia*) as a rich source of bioactive components to combat cancer naturally: Are we on the right track to fully unlock its potential as inhibitor of deregulated signaling pathways. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 98-105, 2018/09/01/ 2018.

FIERASCU, R. C. et al. Selected Aspects Related to Medicinal and Aromatic Plants as Alternative Sources of Bioactive Compounds. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 4, p. 1521, 2021.

GARCÍA-PÉREZ, P. et al. From Ethnomedicine to Plant Biotechnology and Machine Learning: The Valorization of the Medicinal Plant *Bryophyllum* sp. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 13, n. 12, Dec 4 2020.

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J. et al. Antioxidant efficacy of *Kalanchoe daigremontiana* bufadienolide-rich fraction in blood plasma in vitro. **Pharm Biol**, v. 54, n. 12, p. 3182-3188, Dec 2016.

LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiol Biochem**, v. 148, p. 80-89, Mar 2020.

MILEWSKA, S. et al. Current Trends and Challenges in Pharmaco-economic Aspects of Nanocarriers as Drug Delivery Systems for Cancer Treatment. **Int J Nanomedicine**, v. 16, p. 6593-6644, 2021.

NASCIMENTO, L.; CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Bioactive Compounds from *Kalanchoe* Genus Potentially Useful for the Development of New Drugs. **Life (Basel)**, v. 13, n. 3, Feb 26 2023.

PANT, P.; PANDEY, S.; DALL'ACQUA, S. The Influence of Environmental Conditions on Secondary Metabolites in Medicinal Plants: A Literature Review. **Chem Biodivers**, v. 18, n. 11, p. e2100345, Nov 2021.

PARK, S. H. et al. Antioxidative and Antimelanogenesis Effect of *Momordica charantia* Methanol Extract. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2019, p. 5091534, 2019.

RADZIEJEWSKA, I. et al. Anti-Cancer Potential of Afzelin towards AGS Gastric Cancer Cells. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 14, n. 10, Sep 25 2021.

RAINA, K.; KUMAR, D.; AGARWAL, R. Promise of bitter melon (*Momordica charantia*) bioactives in cancer prevention and therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40-41, p. 116-129, 2016/10/01/ 2016.

RAO, C. V. Immunomodulatory Effects of *Momordica charantia* Extract in the Prevention of Oral Cancer. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 11, n. 4, p. 185-186, Apr 2018.

RAY, R. B. et al. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. **Cancer Res**, v. 70, n. 5, p. 1925-31, Mar 1 2010.

SARTAJ, A. et al. Polymeric Nanoparticles: Exploring the Current Drug Development and Therapeutic Insight of Breast Cancer Treatment and Recommendations. **Polymers (Basel)**, v. 13, n. 24, Dec 15 2021.

STEFANOWICZ-HAJDUK, J. et al. Identification of Flavonoids and Bufadienolides and Cytotoxic Effects of *Kalanchoe daigremontiana* Extracts on Human Cancer Cell Lines. **Planta Med**, v. 86, n. 4, p. 239-246, Mar 2020.

STEFANOWICZ-HAJDUK, J. et al. Biological activities of leaf extracts from selected *Kalanchoe* species and their relationship with bufadienolides content. **Pharm Biol**, v. 58, n. 1, p. 732-740, Dec 2020.

STEFANOWICZ-HAJDUK, J. et al. An In Vitro Anticancer, Antioxidant, and Phytochemical Study on Water Extract of *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet and H. Perrier. **Molecules**, v. 27, n. 7, Mar 31 2022.

STEICHEN, S. D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 416-427, 2013.

SUR, S.; RAY, R. B. Bitter Melon (*Momordica Charantia*), a Nutraceutical Approach for Cancer Prevention and Therapy. **Cancers (Basel)**, v. 12, n. 8, Jul 27 2020.

TENUTA, M. C. et al. Contribution of Flavonoids and Iridoids to the Hypoglycaemic, Antioxidant, and Nitric Oxide (NO) Inhibitory Activities of *Arbutus unedo* L. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 2, p. 184, 2020.

TESFAYE, S. et al. Ethiopian Medicinal Plants Traditionally Used for the Treatment of Cancer, Part 2: A Review on Cytotoxic, Antiproliferative, and Antitumor Phytochemicals, and Future Perspective. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 17, p. 4032, 2020.

ZHANG, L.-J. et al. Cucurbitane-type glycosides from the fruits of *Momordica charantia* and their hypoglycaemic and cytotoxic activities. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 564-574, 2014/01/01/ 2014.