



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro Acadêmico de Vitória
Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica –
PPGNAFPF**

ANDREZA TALLYNE DE AGUIAR SILVA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
NANOPARTÍCULAS DE PIBCA REVESTIDAS COM O POLISSACARÍDEO
LEVANA**

Vitória de Santo Antão- PE, 2022

ANDREZA TALLYNE DE AGUIAR SILVA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
NANOPARTÍCULAS DE PIBCA REVESTIDAS COM O POLISSACARÍDEO
LEVANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco Centro Acadêmico da Vitória de Santo Antão, área de concentração fatores ambientais moduladores da plasticidade fenotípica, para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira
Coorientadora: Profa. Dra. Cynthia Gisele Oliveira Coimbra

Vitória de Santo Antão- PE, 2022

Catálogo na Fonte
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB-4/2018

S586d	Silva, Andreza Tallyne de Aguiar. Desenvolvimento, caracterização e avaliação <i>in vitro</i> de nanopartículas de pibca revestidas com o polissacarídeo levana / Andreza Tallyne de Aguiar Silva. - Vitória de Santo Antão, 2022. 71 f.; il.: color. Orientadora: Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira. Coorientadora: Cynthia Gisele Oliveira Coimbra. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, 2022. Inclui referências e anexos. 1. Polissacarídeos. 2. Fermentação. 3. Sistemas de liberação de fármacos por nanopartículas. I. Nogueira, Mariane Cajubá de Britto Lira (Orientadora). II. Coimbra, Cynthia Gisele Oliveira (Coorientadora). III. Título. 615 CDD (23. ed.)
	BIBCAV/UFPE - 119/2022

ANDREZA TALLYNE DE AGUIAR SILVA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
NANOPARTÍCULAS DE PIBCA REVESTIDAS COM O POLISSACARÍDEO
LEVANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco Centro Acadêmico da Vitória de Santo Antão, área de concentração fatores ambientais moduladores da plasticidade fenotípica, para a obtenção do título de mestre.

Aprovada em: 04 de julho de 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - Centro Acadêmico de Vitória

Prof^a. Dr^a Noêmia Pereira da Silva Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - Centro Acadêmico de Vitória

Prof^a. Dr^a Christine Lamenha Luna Finkler (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - Centro Acadêmico de Vitória

A Deus e a minha família: em especial a minha amada avó **Jovelina Jesuína da Conceição** (*in memoriam*) e a **Ana Amélia** (ainda em meu ventre) ambas indiretamente/diretamente motivaram a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gosto de agradecer, pois acredito que é uma forma de reconhecer o quanto foi/é importante o papel de cada pessoa em minha vida. Afinal como disse Isaac Newton: "Se eu pude enxergar mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes". Dessa forma, deixo aqui minha gratidão:

A Deus, nosso pai celestial, acredito que sem Ele nada existiria nem mesmo a vida;

A grande mulher que já existiu em minha vida, minha avó Jovelina, que me disse (apesar de não ter nem o ensino médio) que só o que levamos dessa vida é o conhecimento e a fé;

A toda minha família (em especial a minha mãe, pai e irmão) por todo suporte amoroso, incentivo e torcida pelo meu sucesso;

Aos amigos Viviane, Jader, Natália e tia Ângela que me acolheram em suas casas durante a realização dos experimentos em Recife;

Aos colegas de trabalho do Hospital Regional do Agreste, em especial a Maria Ayanny que além de me dar a maior força para o meu sucesso, fez trocas de plantões para que fosse possível minha ida para realizar os experimentos;

Aos demais amigos que prefiro não citar os nomes para não me estender, pois graças a Deus não são poucos, mas sabem que são irmãos que eu posso sempre contar independente da situação, e às vezes mesmo não estando fisicamente, mas se fazem presentes, obrigada por todas as conversas e amor;

A Iago Dillion, mais que um doutorando e colega de laboratório, é um grande amigo. Sabe aquelas pessoas que sempre pensam em ajudar o próximo, motivando, incentivando, dando o seu melhor, seu tempo, pensando no melhor? Ele é assim. Ele quem me apresentou a minha orientadora e a coorientadora, me ajudou nos experimentos, compartilhou dos meus "perrengues". Para mim, é um referencial de profissional e ser humano;

As professoras Mariane Cajubá (minha orientadora) e Cynthia Coimbra (coorientadora) por todo suporte, ajuda, ensinamento e incentivo. Ensinamento principal de ser uma mulher, que pode ser família, ter vida social, amigos, mas também pode ensinar e ser pesquisadora. Quero dizer que vocês, assim como as professoras Gláucia Lima e Christine Finkler, são inspirações para mim, devido toda luta diária por um ensino de qualidade e melhorias no avanço na ciência; As técnicas Marcella e Fátima pelo suporte nos laboratórios do Departamento de Antibióticos; Aos colegas de laboratório do Departamento de Antibióticos, Nataly e Diego, por ajudarem durante os perrengues dos experimentos, por nossas conversas e troca de experiência;

Ao estudante de iniciação científica Pedro por sua ajuda nos experimentos de estabilidade das nanopartículas;

Agradeço ainda a todos que direta ou indiretamente torceram pelo meu sucesso e me ajudaram nessa caminhada;

E por último, mas não menos especial, ao meu marido Douglas, além de dar o melhor presente de minha vida (minha filha Ana Amélia que está no forninho) sempre me motivou e incentivou a evoluir, tanto na carreira profissional como na vida. Além de compreender meus dias longe de casa para a realização dos experimentos, obrigada por tudo meu amor.

RESUMO

A utilização de polissacarídeos vem sendo descrita como uma alternativa exitosa no desenvolvimento de nanossistemas para se alcançar sítio-específicos. A levana é um exopolissacarídeo que pode ser produzida por alguns micro-organismos. Ela possui várias atividades biológicas entre essas imunoestimulante, substituto de plasma sanguíneo, agente prolongador da ação de fármacos, dentre outras. O presente trabalho visou desenvolver nanopartículas do polímero Isobutilcianoacrilato (PIBCA) revestidas com levana. O estudo iniciou a partir da obtenção da levana (pela fermentação da *Zymomonas mobilis*), liofilização e em seguida sua utilização para o desenvolvimento das nanopartículas (Np-Lev). As Np-Lev foram obtidas utilizando o PIBCA, pela técnica de polimerização por emulsão aniônica, e foram caracterizadas quanto ao tamanho, potencial zeta e análise morfológica. Tanto as Np-Lev como a levana foram caracterizadas por meio de difração por raio-X, espectroscopia de infravermelho e análise termogravimétrica. Foram realizados os estudos de estabilidade a longo prazo, sob condições forçadas e ciclo congelamento/descongelamento para verificar as condições de vida de prateleira das NP-Lev. Ademais, foi avaliada a citotoxicidade e a captura celular das Np-Lev em células do tipo MDA-MB-231 (células de câncer de mama) e B16F10 (células de melanoma). Foi evidenciada a obtenção de nanopartículas inéditas: obtidas por levana e o PIBCA. Foi possível obter 24g de levana por litro de caldo fermentado. As nanopartículas revestidas pela levana apresentaram formas esféricas, tamanho de $243,9 \pm 2,3$ nm, potencial zeta de $-12 \pm 0,7$ mV. Pela técnica de espectroscopia de energia dispersa, o carbono e o oxigênio foram os elementos químicos encontrados nas Np-Lev. Na análise de infravermelho foram observados que as Np-Lev apresentaram uma extensa banda referente ao grupamento OH e uma banda que deve-se a água formada. Essas bandas são também evidenciadas nos espectros da levana. Na análise termogravimétrica observa-se que a temperatura nas Np-Lev aumenta no início da degradação térmica (em torno de 5–6°C) comparada a levana e pela calorimetria diferencial de varredura tanto a levana como as Np-Lev apresentam curvas características de eventos endotérmicos e exotérmicos correlacionados a temperatura com a degradação das amostras. Pela análise de difração de raio-X, em ambas amostras, os picos de cristalinidade foram semelhantes, sendo que a Np-Lev apresentou um pico a $6,18\theta$, diferente da levana que não apresenta pico abaixo de 10θ . Foram obtidas nanopartículas estáveis de acordo com suas caracterizações e quando armazenadas sob temperatura ambiente ou sob refrigeração, apresentando instabilidade quando submetidas a alterações constantes de temperaturas durante as primeiras 48 horas (ciclo congelamento/descongelamento). As Np-Lev foram mais citotóxicas que a levana, provavelmente por facilitar a internalização das nanopartículas no interior das células, com isso favorecendo a atividade antiproliferativa da levana. Assim, foi verificado que a levana produzida pôde ser utilizada para produção de nanopartículas de PIBCA, que essas Np-Lev apresentaram estabilidade durante sete meses (sob temperatura ambiente e refrigeração) e também tiveram atividade anticarcinogênica frente a linhagens de células de câncer de mama e melanoma.

Palavras-chave: nanopartículas poliméricas; exopolissacarídeo; fermentação; *zymomonas mobilis*; poli-isobutilcianoacrilato.

ABSTRACT

The use of polysaccharides has been described as a successful alternative in the development of nanosystems to reach specific sites. Levan is an exopolysaccharide that can be produced by some microorganisms. It has several biological activities, including immunostimulant, blood plasma substitute, drug action prolonging agent, among others. The present work aimed to develop nanoparticles of the polymer Isobutylcyanoacrylate (PIBCA) coated with levan. The study started from the acquisition of levan (by fermentation of *Zymomonas mobilis*), lyophilization and then its use for the development of nanoparticles (Np-Lev). Np-Lev were obtained using PIBCA, by the anionic emulsion polymerization technique, and were characterized in terms of size, zeta potential and morphological analysis. Both Np-Lev and levan were characterized by X-ray diffraction, infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis. Long-term stability studies were performed under forced conditions and freeze/thaw cycle to verify the shelf life conditions of NP-Lev. Furthermore, the cytotoxicity and cellular uptake of Np-Lev in MDA-MB-231 (breast cancer cells) and B16F10 (melanoma cells) cells were evaluated. The obtaining of novel nanoparticles was evidenced: obtained by levana and PIBCA. It was possible to obtain 24g of levan per liter of fermented broth. The levan coated nanoparticles showed spherical shapes, size of 243.9 ± 2.3 nm, zeta potential of -12 ± 0.7 mV. Using the dispersed energy spectroscopy technique, carbon and oxygen were the chemical elements found in Np-Lev. In the infrared analysis, it was observed that the Np-Lev presented an extensive band referring to the OH group and a band that is due to the water formed. These bands are also evident in the levan spectra. In the thermogravimetric analysis it is observed that the temperature in the Np-lev increases at the beginning of the thermal degradation (around 5–6°C) compared to the levan and by the differential scanning calorimetry both the levan and the Np-Lev present characteristic curves of endothermic and exothermic events correlated with temperature and sample degradation. By the X-ray diffraction analysis, in both samples, the crystallinity peaks were similar, and the Np-Lev showed a peak at 6.18θ , different from the levan that does not present a peak below 10θ . Stable nanoparticles were obtained according to their characterizations and when stored at room temperature or under refrigeration, showing instability when subjected to constant temperature changes during the first 48 hours (freeze/thaw cycle). Np-Lev was more cytotoxic than levan, probably because it facilitates the internalization of nanoparticles inside the cells, thus favoring the antiproliferative activity of levan. Thus, it was verified that the levan produced could be used for the production of PIBCA nanoparticles, that these Np-Lev were stable for seven months (at room temperature and refrigeration) and also had anticarcinogenic activity against breast and breast cancer cell lines melanoma.

Keywords: polymeric nanoparticles; exopolysaccharide; fermentation; *zymomonas mobilis*; polyisobutylcyanoacrylate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação estrutural das nanopartículas poliméricas.....	21
Figura 2 - Representação química do alquilcianoacrilato.....	22
Figura 3 - Levana após sua purificação.....	25
Figura 4 – Estrutura β (2 $\rightarrow$ 6) da ramificação principal da levana.....	26
Figura 5 - Processo da fermentação da <i>Zymomonas mobilis</i> para obtenção da levana.....	30
Figura 6 - Levana liofilizada.....	36
Figura 7 - Morfologia das nanopartículas de Levana verificadas pelo microscópio eletrônico de varredura.....	38
Figura 8 - Componentes químicos encontrados nas Np-Lev.....	39
Figura 9 - Gráfico das curvas termogravimétricas da levana e da nanopartícula de levana.....	40
Figura 10 - Gráfico da calorimetria diferencial exploratória da levana e da nanopartícula de levana.....	41
Figura 11 - Gráfico de difração de raio X da levana e Np-Lev.....	42
Figura 12 - Gráfico da análise de infravermelho da levana e das nanopartículas de levana.....	43
Figura 13 - Estabilidade a longo prazo potencial zeta das Np-Lev.....	44
Figura 14 - Estabilidade a longo prazo tamanho das Np-Lev.....	45
Figura 15 - Estabilidade a longo prazo PDI das Np-Lev.....	45
Figura 16 - Estabilidade sob condições forçadas (estresse mecânico – centrifugação e térmico - agitador sob 37°C em banho-maria) potencial zeta das Np-Lev.....	47
Figura 17 - Estabilidade sob condições forçadas (estresse mecânico – centrifugação e térmico - agitador sob 37°C em banho-maria) tamanho das Np-Lev.....	48
Figura 18 - Estabilidade sob condições forçadas (estresse mecânico – centrifugação e térmico - agitador sob 37°C em banho-maria) PDI das Np-Lev.....	49
Figura 19 - Potencial zeta das Np-Lev no estudo de estabilidade preliminar (ciclo congelamento/descongelamento).....	49
Figura 20 – Tamanho das Np-Lev no estudo de estabilidade preliminar (ciclo congelamento/descongelamento).....	50

Figura 21 – PDI das Np-Lev no estudo de estabilidade preliminar (ciclo congelamento/descongelamento).....	51
Figura 22 – Np-Lev durante o estudo de estabilidade preliminar (ciclo congelamento/descongelamento).....	51
Figura 23 – Viabilidade das células MDA-MB-231 expostas a levana (A) e as Np-Lev (B)	53
Figura 24 - Viabilidade das células B16F10 expostas a levana (A) e as Np-Lev (B).....	54
Figura 25 – Células MDA-MB-231 antes e após a incubação em diferentes tempos com o sistema Onco A-Np-Lev. Coluna A: filtro de Alexa fluor; Coluna B: filtro DAPI; Coluna C: Filtro de Rodamina; Coluna D: Sobreposição das imagens A, B e C. Células controle da linha 1 em meio de cultura; linha 2, 3 e 4: após 15 min, 1 e 3 h de incubação com oncoA-Np-Lev, respectivamente. Barra de escala: 2 μ m.....	55
Figura 26 – Células B16F10 antes e após a incubação em diferentes tempos com o sistema Onco A-Np-Lev. Coluna A: filtro de Alexa fluor; Coluna B: filtro DAPI; Coluna C: Filtro de Rodamina; Coluna D: Sobreposição das imagens A, B e C. Células controle da linha 1 em meio de cultura; linha 2, 3 e 4: após 15 min, 1 e 3 h de incubação com oncoA-Np-Lev, respectivamente. Barra de escala: 2 μ m.....	56

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Alguns nanossistemas e suas definições.....	20
Tabela 1. Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de levana (Np-Lev) e nanopartículas padrão - Dextrana (Np-Dex)	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEP - Polimerização por emulsão aniônica
COVID-19 - Coronavírus disease - 19
DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole
DEN - UFPE - Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO - Dimetilsufóxido
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DRX - Difração de Raio X
DSC - Calorimetria Diferencial de Varredura
EPI - Equipamento de Proteção Individual
EPS - Exopolissacarídeos
FT-IR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
IBCA - Isobutilcianoacrilato
INTM - Instituto Nacional de Tecnologia em União e Revestimento de Materiais
IV - Infravermelho
LABENZ - UFPE - Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Pernambuco
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] - 2,5-difeniltetrazólio
Np-Dex - Nanopartículas de dextrana
Np-Lev - Nanopartículas de Poli(isobutilcianoacrilato) revestidas com levana
OncoA-Np-Lev - Nanopartículas de Poli(isobutilcianoacrilato) revestidas com levana com Oncalixona A
OncoA - Oncalixona A
PCL - Policaprolactona
PDI - Índice de polidispersão
pH - Potencial hidrogeniônico
PIBCA - Poli(isobutilcianoacrilato)
PLA - Poli(ácido láctico)
PLGA - Ácido Poli(lactídeo coglicolídeos)
RNA - Ácido ribonucleico
RREP - Polimerização por Emulsão de Radicais Redox
SSDL - Standard de Swings & De Ley

TG - Curvas termogravimétricas

TGA - Análise Termogravimétrica

LISTA DE SÍMBOLOS

β - Beta

$^{\circ}\text{C}$ - Graus

θ - Teta

$\mu\text{g/mL}$ - Micrograma por mililitro

μL - Microlitro

rpm -Rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Nanotecnologia farmacêutica.....	19
2.2 Nanopartículas poliméricas	20
2.3 Isobutilcianoacrilato (IBCA)	22
2.4 Levana.....	24
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Obtenção e purificação da levana.....	29
4.1.1 <i>Manutenção e cultivo do micro-organismo.....</i>	<i>29</i>
4.1.2 <i>Obtenção da levana.....</i>	<i>29</i>
4.1.3 <i>Extração e purificação de levana.....</i>	<i>30</i>
4.2 Desenvolvimento de nanopartículas de PIBCA revestidas com levana	30
4.3 Caracterização da levana e das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana	31
4.3.1 <i>Espectroscopia de infravermelho</i>	<i>31</i>
4.3.2 <i>Análise termogravimétrica</i>	<i>31</i>
4.3.3 <i>Difração de Raio-X.....</i>	<i>32</i>
4.4 Caracterização das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana	32
4.4.1 <i>Tamanho.....</i>	<i>32</i>
4.4.2 <i>Potencial Zeta.....</i>	<i>32</i>
4.4.3 <i>Análise morfológica e espectroscopia de energia dispersiva</i>	<i>32</i>
4.5 Estudo de estabilidade a longo prazo	33
4.6 Estudo de estabilidade sob condições forçadas	33
4.7 Estudo de estabilidade preliminar (ciclo congelamento/descongelamento)	33
4.8 Avaliação <i>in vitro</i> das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana.....	34
4.8.1 <i>Estudo de citotoxicidade em células MDA-MB-231 e B16F10.....</i>	<i>34</i>
4.8.2 <i>Estudo da captura celular das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana</i>	<i>34</i>
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Obtenção da Levana após fermentação com <i>Zymomonas mobilis</i>.....	36

5.2	Desenvolvimento das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana	36
5.3	Análise morfológica e espectroscopia de energia dispersa das Np-Lev	37
5.4	Análise termogravimétrica.....	39
5.5	Difração de raio-X	41
5.6	Espectroscopia de infravermelho	42
5.7	Estudo de estabilidade a longo prazo	43
5.8	Estudo de estabilidade sob condições forçadas	46
5.9	Estudo de estabilidade preliminar (ciclo congelamento/descongelamento)	49
5.10	Estudo de citotoxicidade em células MDA-MB-231 e B16F10	51
5.11	Captura celular das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana.....	54
6	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO A - IS POLYISOBUTYL CYANOACRYLATE NANOPARTICLES A PROMISING NANOSYSTEM?	70
	ANEXO B - DEVELOPMENT OF LEVAN-COATED PIBCA NANOPARTICLES AND THEIR ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY AGAINST MDA-MB-231 AND B16F12 CELLS	71

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia farmacêutica vem crescendo cada vez mais com a introdução dos diversos nanossistemas. Dentre estes, as nanopartículas poliméricas têm se destacado devido a facilidade dos métodos de obtenção, a variedade de polímeros e as moléculas adicionadas a superfícies que podem atribuir propriedades de direcionamento dessas nanopartículas a sítios-alvo (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; YADAV et al., 2019). Segundo Alexander e colaboradores (2016) os polímeros utilizados para obtenção das nanopartículas podem ser de origem natural ou sintética, devendo ser biodegradáveis e biocompatíveis.

Cancino, Marangoni e Zucolotto (2014) e Alvarenga e colaboradores (2022) sugerem que o uso da nanotecnologia oferece oportunidades para o desenvolvimento de novas estratégias em termos de prevenção, diagnóstico e tratamento de diversas patologias, tais como a COVID-19 e o câncer. A afirmação dos autores é facilmente confirmada a partir do elevado número de artigos científicos com a temática nanotecnologia e COVID-19 encontrados na literatura (TAVARES et al., 2022; YANG, 2021; MEHTA et al., 2020; SHIN et al., 2020) e nanotecnologia e câncer (SONG; ANSELMO; HUANG, 2019; ZHANG et al., 2019; ZHANG et al., 2020; JIN et al., 2020).

Além das publicações, observa-se o desenvolvimento de diversos produtos com base nanotecnológica, como foi recentemente descrito por Cavalcanti e Nogueira (2020) e Tavares e colaboradores (2022). O uso da nanotecnologia, especificamente dos nanossistemas de liberação controlada, torna-se uma estratégia tecnológica valiosa para lidar com alguns dos principais entraves na pesquisa pré-clínica e clínica dessas doenças. Um dos caminhos promissores é o uso de nanossistemas para liberação pulmonar, especificamente para o direcionamento aos macrófagos alveolares. Seguindo esta ideia, foi desenvolvido o Novochizol, que são nanopartículas de quitosana, um polissacarídeo, voltado para aplicação em aerosol (NOVOCHIZOL, 2020). Além da quitosana, vários polissacarídeos são utilizados no desenvolvimento de nanossistemas, a fim de agregar alguma funcionalidade, a exemplo da levana.

A levana é um exopolissacarídeo, pode ser produzido por vários micro-organismos, tais como a *Zymomonas mobilis* (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005; MELO et al., 2006). Esse polissacarídeo é utilizado pelas indústrias por suas propriedades de fixação de cores e sabores, espessante, emulsificante e estabilizante (SANTOS; CAVALCANTI; CELLIGOI, 2011), além de apresentar atividade anticarcinogênica, tanto *in vivo* como *in vitro* sem desenvolver a

citotoxicidade apresentada pelos agentes antineoplásicos tradicionais utilizados (BEZERRA, 2011; JÁCOME-JÚNIOR, 2006; CALAZANS et al., 2000). Além disso, apresenta atividade imunoestimulante, substituto de plasma sanguíneo e agente prolongador da ação de fármacos (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005). Desse modo, devido ao potencial de suas aplicações biológicas, a levana torna-se um polissacarídeo atrativo no desenvolvimento de nanossistemas para carrear fármacos direto a células alvo.

A utilização de polissacarídeos vem sendo descrita como uma saída exitosa no desenvolvimento de nanossistemas para se alcançar um alvo (LIRA et al., 2011; LIRA-NOGUEIRA, et al., 2022). Estes polímeros são candidatos promissores para o controle de doenças, por estarem presentes na superfície celular e interferirem no fenômeno de reconhecimento celular normal. Diante da atividade promissora da levana, este trabalho teve como objetivo a utilização da levana para o desenvolvimento de nanopartículas com Isobutilcianoacrilato.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nanotecnologia farmacêutica

A nanotecnologia é definida como ciência de manipular estruturas em nanoescala (1 a 1000 nanômetros) que podem ser usadas em vários produtos (FDA, 2020). Essa ciência vem sendo considerada um grande avanço nas mais diversas áreas, tendo em vista suas variadas aplicações como encapsulamento de fármacos, compostos bioativos em alimentos, nanosensores, cosméticos, desenvolvimento de novos materiais na área médica e diagnóstica, eletrônica, entre outras (GERASSI, 2016).

Os nanossistemas permitem o aumento da eficácia terapêutica do fármaco com o aumento da sua solubilidade, proteção contra degradação enzimática, aumento do intervalo entre as doses e/ou diminuição de efeitos adversos (PRASAD et al., 2018, APOLINÁRIO et al., 2020). A utilização da nanotecnologia na medicina permite que os instrumentos e metodologias tradicionais de análise sejam melhoradas a cada nova descoberta; além disso, a possibilidade de incorporação de vários tipos de moléculas na superfície de uma única nanopartícula permite a adição de propriedades adicionais ao nanomaterial (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014).

Para o desenvolvimento dos nanossistemas com alta especificidade, sejam quais forem as aplicações, se faz fundamental as seguintes características: estabilidade, dispersão de tamanho, morfologia, carga superficial e toxicidade, para que os resultados desejados sejam alcançados (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014; PRASAD et al., 2018). Acredita-se que essa ciência vem avançando na quantidade de produtos nas mais diversas áreas devido à variedade de nanossistemas, tais como micelas, lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, dentre outros (GERASSI, 2016). No quadro 1 pode-se observar a definição de alguns nanossistemas.

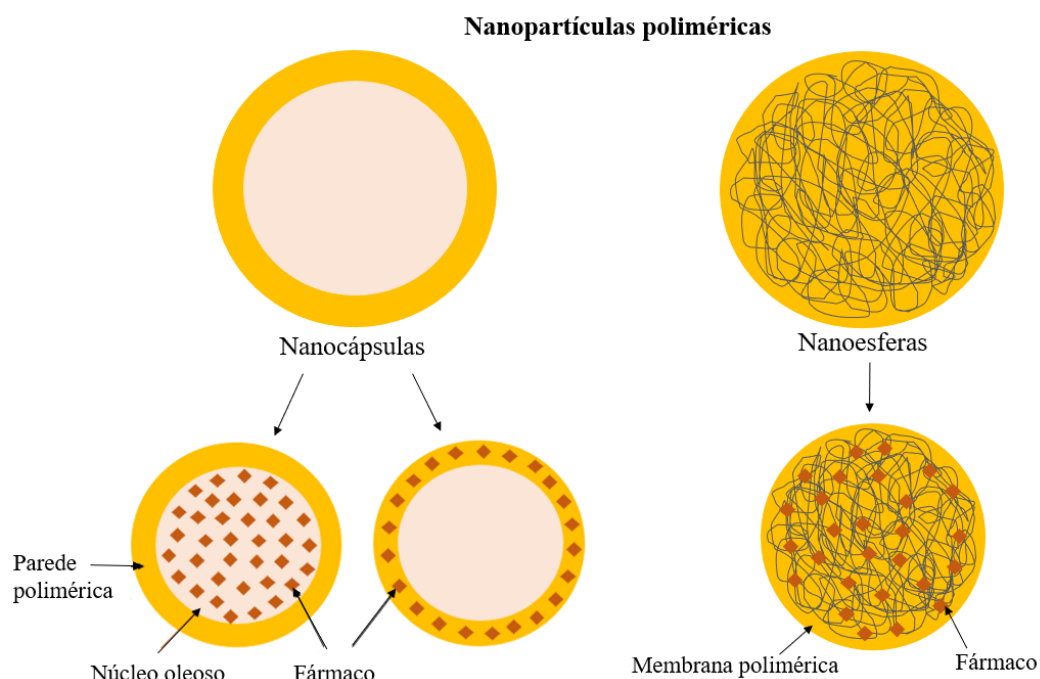
Quadro 1 – Alguns nanossistemas e sua definição.

Nanossistema	Definição
Lipossomas	Estruturas esféricas, formadas por moléculas anfífilas, geralmente fosfolipídios. Consistem em uma ou mais bicamadas de fosfolipídios que envolvem um núcleo aquoso (GARCIA, 2014; SINGH, 2016).
Nanoemulsão	Uma mistura termodinamicamente estável de água, óleo e uma ou mais moléculas anfífilas, que se montam espontaneamente em gotículas de escala nanométrica (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTI, 2014; SINGH, 2016).
Nanopartículas poliméricas	São compostas de biopolímero, formadas a partir de polissacarídeos e/ou proteína em meio acidificado, amplamente utilizadas para encapsular. As características dos complexos formados dependem principalmente dos tipos e concentrações dos biopolímeros utilizados, bem como do pH da solução e da força iônica (CODEVILLA et al. 2015, SINGH, 2016).
Micelas	Constituídas por moléculas anfífilas de copolímeros, que formam uma nanocápsula em meio aquoso. Possuem uma zona hidrofóbica no seu interior e uma cápsula exterior hidrofílica, tem em média diâmetros inferiores a 100 nm (GARCIA, 2014).

2.2 Nanopartículas poliméricas

Dentre os nanossistemas existentes, as nanopartículas poliméricas têm se destacado, devido a facilidade dos métodos de obtenção e variedade de polímeros que podem atribuir propriedades de direcionamento dessas nanopartículas a sítios-alvo (CHAN et al., 2010; YADAV et al., 2019). As nanopartículas poliméricas apresentam tamanho menor que 1 micrômetro, e podem se apresentar no formato de nanocápsulas ou nanoesferas (Figura 1). As primeiras contêm um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, enquanto que as nanoesferas não contêm óleo em sua constituição, mas sim uma matriz polimérica (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

Figura 1 – Representação estrutural das nanopartículas poliméricas.



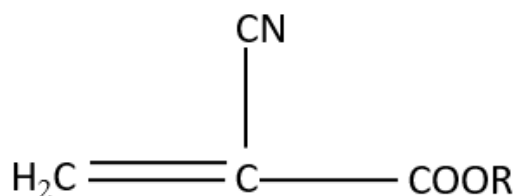
As nanopartículas poliméricas possibilitam a encapsulação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, além de permitir o acoplamento de proteínas, polissacarídeos, anticorpos, dentre outros compostos, proporcionando o direcionamento ativo destes nanossistemas a sítios-alvo, com isso potencializando o efeito terapêutico do fármaco e reduzindo a sua toxicidade (KUMAR, 2010; ALEXANDER et al., 2016). Os polímeros utilizados para obtenção das nanopartículas podem ser de origem natural (animal, vegetal ou microbiano como colágeno, celulose e levana, respectivamente) ou sintética (como o PCL - policaprolactona, o PLGA - ácido poli(láctico coglicólico) e o PLA - poli(ácido láctico)). Os polímeros naturais apresentam algumas desvantagens em relação aos sintéticos, como uma degradação aumentada devido serem passíveis a degradação *in vivo* por hidrólise ou ataque enzimáticos (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Vale ressaltar que esses polímeros devem ser biodegradáveis e biocompatíveis (FERREIRA, 2013; ELMOWAFY; TIBONI; SOLIMAN, 2019).

2.3 Isobutilcianoacrilato (IBCA)

O Isobutilcianoacrilato, derivado do alquil cianoacrilato, é um monômero biodegradável que vem sendo utilizado no preparo de nanopartículas por apresentar grande potencial como nanocarreador para a liberação de fármacos (OOWAKI et al., 2000; REECE; MAXEY; KRON, 2001; LIRA et al., 2011). Os alquilcianoacrilatos (ilustrado na Figura 2) foram obtidos em 1949, entretanto, só em 1959 foram relatadas estas propriedades adesivas (SASKA; GASPAR; HOCHULI-VIEIRA, 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

Essas propriedades têm destaque em produtos com aplicação médica. Existem tipos variados de cianoacrilato, tendo como diferencial o tamanho da cadeia, tais como: metil ($R=CH_3$), etil ($R=C_2H_5$), butil e isobutil ($R=C_4H_9$) e octil-cianoacrilato ($R=C_8H_{17}$). Os cianoacrilatos quando entram em contato com água, ou em qualquer parte do corpo, acabam se degradando em cianoacetato e formaldeído. Sabe-se que quanto maior for a cadeia lateral, menor a velocidade de degradação e menor a histotoxicidade (SASKA; GASPAR; HOCHULI-VIEIRA, 2009; LIRA-NOGUEIRA et al., 2022).

Figura 2 - Representação química do alquilcianoacrilato.



Fonte: Autora, 2022.

Procurando obter nanopartículas matriciais oriundas de outros derivados do alquil cianoacrilato, foi desenvolvida uma técnica simples para a produção das nanopartículas, e que despertou o interesse por esses polímeros na obtenção de sistemas de liberação de inúmeros agentes farmacológicos, proteínas, peptídeos e DNA (COUVREUR et al. 1979, HUANG; CHEN; LEE, 2009; REN et al., 2011;). Além da obtenção dessas nanopartículas apresentar um preparo simples e ser possível a transposição em escala industrial, esses monômeros são biocompatíveis e biodegradáveis, que segundo a FDA (FOOD AND DRUG

ADMINISTRATION) são características fundamentais para um monômero (BEHAN; BIRKINSHAW; CLARKE, 2001; VAUTHIER et al., 2003; SASKA; GASPAR; HOCHULI-VIEIRA, 2009; CAVALCANTI et al., 2022).

A característica de biodegradação do monômero sintético é de suma importância, pois garante que, após a liberação do fármaco, o monômero seja degradado e não se acumule no organismo, o que minimiza os efeitos de toxicidade. No caso do poli(n-butil-cianoacrilato) sua degradação ocorre através da hidrólise dos grupos alquil devido a ação das esterases, com isso aumentando a hidrofilicidade do monômero até ele que se torne totalmente solúvel em água (HILLIAIREAU; COUVREUR, 2009; LIRA-NOGUEIRA et al., 2022; CAVALCANTI et al., 2022).

As nanopartículas de IBCA podem ser obtidas a partir de três métodos:

- Polimerização por emulsão aniônica (AEP) - É uma técnica que se baseia na solubilização do polissacarídeo em água, sob agitação (tendo como função de doar íons hidroxilas que servirão como iniciadores, assim como os íons hidroxilas da água). O pH do meio deve ser ácido para favorecer a formação dos íons, podendo ser utilizado para corrigir o pH (ideal que o pH seja entre 2 a 3) alguns ácidos (tais como o clorídrico, nítrico, cítrico, entre outros). De forma que sob agitação o polímero é adicionado ao meio para iniciar o processo de polimerização (BERTHOLON et al., 2006; BOUCHEMAL et al., 2008; LIRA et al., 2011).
- Polimerização por emulsão de radicais redox (RREP) – Essa é uma técnica de polimerização em cadeia que utiliza de radicais livres para a formação das nanopartículas (HILLIAIREAU; COUVREUR, 2009). A RREP ocorre em um meio ácido com a presença de ácido nítrico, o polissacarídeo e o agente iniciador. Devido ao pH extremamente ácido, os monômeros do açúcar ficam em uma conformação parcialmente aberta, possibilitando a reação de oxidação causada por um iniciador. Quando ocorre a oxidação, a cadeia do polissacarídeo se divide criando radicais livres em suas extremidades, possibilitando que os monômeros do polímero se liguem e comecem o processo de alongamento da cadeia desse novo co-polímero (BERTHOLON et al., 2006; CHAUVIERRE et al., 2007).
- Nanoprecipitação - Nessa técnica o óleo e o composto ativo são dissolvidos em uma solução orgânica (normalmente, miscíveis em água em todas as proporções, como a acetona por exemplo) contendo o polímero. Logo após, a solução vai para a fase aquosa

com um surfactante hidrofílico e sob agitação. Então, instantaneamente, são formadas as nanopartículas através do efeito da difusão do solvente para a fase aquosa e da insolubilidade do polímero e do óleo. No caso das nanoesferas o polímero insolúvel na mistura água-solvente precipita, e há a incorporação do princípio ativo. Por outro lado, para as nanocápsulas o deslocamento do solvente para a fase aquosa faz com que o polímero deposite na interface das gotículas emulsificadas, tendo assim a formação da parede polimérica e assim o solvente é retirado por evaporação (BERTHOLON et al., 2006; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; LIRA et al., 2011).

Dessa forma, é sabido que cada técnica pode originar nanopartículas com características estruturais diferentes, podendo influenciar no tamanho e nas interações das nanopartículas com o fluido biológico (BERTHOLON et al., 2006; LIRA et al., 2011). Ainda é importante destacar que para a obtenção dessas nanopartículas é necessária a utilização de polímeros que estarão presentes na superfície das nanopartículas e irão influenciar na sua carga superficial, como também podem agir como agentes direcionadores a sítios-alvo e auxiliar na atividade do fármaco (NEMATİ et al., 1994; CHAUVIERRE et al., 2007; BOUCHEMAL et al., 2008; LIRA-NOGUEIRA et al., 2022; CAVALCANTI et al., 2022).

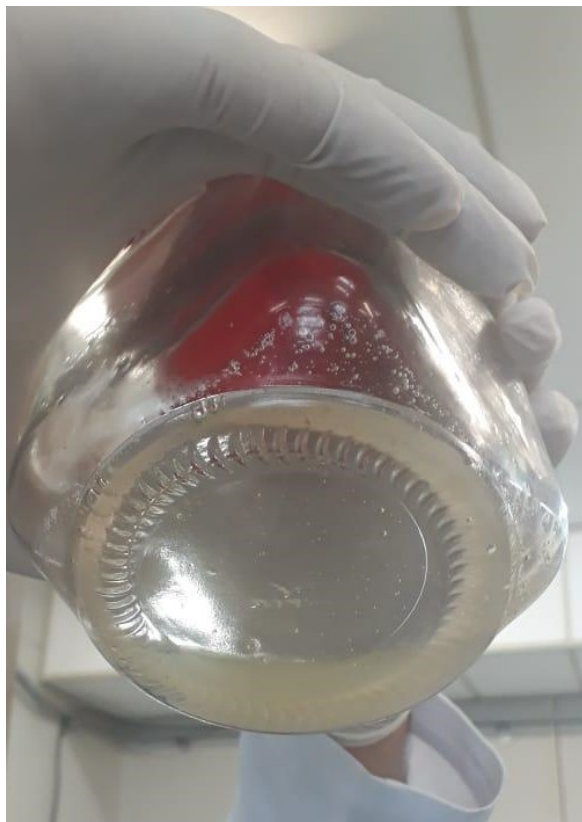
2.4 Levana

Vários materiais têm sido utilizados como carreadores de fármacos, como polímeros naturais e sintéticos, lipídeos e surfactantes. Dentre eles, os polissacarídeos têm ganhado uma maior atenção devido suas propriedades físico-químicas e biológicas (DALAGNOL, 2011). A levana difere dos outros exopolissacarídeos (EPS) por causa de sua estabilidade em vários meios (estável em meios químicos, como em meios ácidos e alcalinos), possui compatibilidade com sais e alta capacidade de retenção de água, além de boa biocompatibilidade (CHEN; GAO; PLOEHN, 2014; SIQUEIRA et al., 2020).

É obtida pela reação de transfrutossilacção (ou seja, quando ocorre a transferência do grupo frutossil da sacarose para uma cadeia de frutanas através da enzima Levanasacarase) durante a fermentação de culturas crescidas em meios ricos em sacarose. Esse EPS é encontrado em micro-organismos, como forma de reserva energética e defesa (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009; SANTOS; CAVALCANTI; CELLIGOI, 2011). Pode ser sintetizado por vários micro-organismos, tais como *Acetobacter suboxydans*, *Aerobacter levanicum*, *Erwinia herbicola*, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus*

polymyxa, *Pseudomonas syringae* e *Zymomonas mobilis* (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005). Na Figura 3 é observada a levana obtida pela fermentação da *Zymomonas mobilis*.

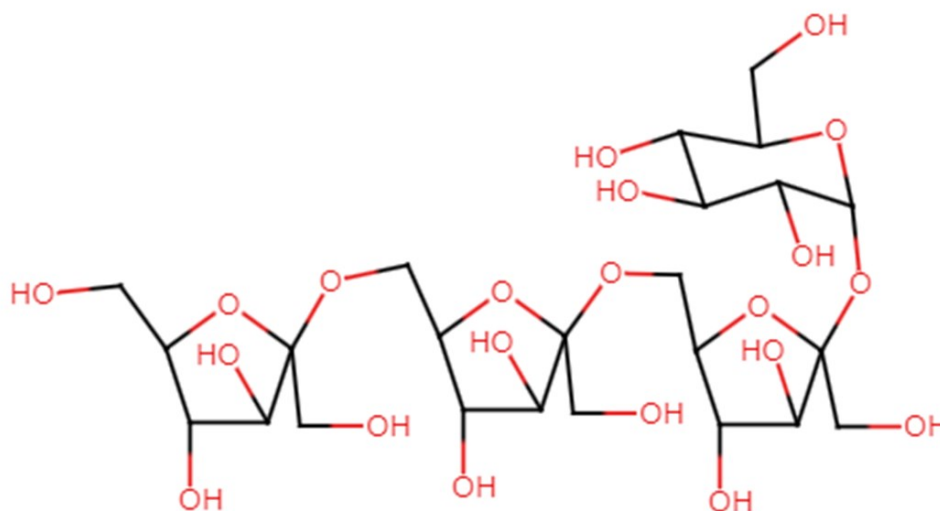
Figura 3 - Levana após sua purificação.



Fonte: Autora, 2022.

Por ser de origem microbiana, esse polímero apresenta maior uniformidade nas suas propriedades físico-químicas. Além disso, tem em sua estrutura carboidrato na forma furanose (o que permite a adequação final nas moléculas das reações) e tem maior flexibilidade desse anel, o que acaba conferindo uma maleabilidade adicional a frutana, em contraste com a maioria dos polissacarídeos de reserva por terem rígido anel de piranose (MACIEL, 2008). Possui massa molecular de cerca de 10^7 Daltons (ERNANDES; GARCIA-CRUZ 2005) e aproximadamente 60.000 unidades de frutose unidas por ligações β (2 $\rightarrow$ 6) sendo ilustrada na Figura 4. Além disso, apresenta alta viscosidade, solubilidade em água e óleo, estabilidade ao calor, aos ácidos e bases (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005; MACIEL, 2008).

Figura 4 – Estrutura β (2 $\rightarrow$ 6) da ramificação principal da levana.



Fonte: Adaptado de Ernandes e Garcia-Cruz, 2005.

Este biopolímero é conhecido por possuir várias propriedades funcionais, sendo assim bastante utilizado pelas indústrias por suas características de fixador de cores e sabores, espessante, emulsificante e estabilizante (SANTOS; CAVALCANTI; CELLIGOI, 2011), e sua hidrólise produz frutose cujo potencial de adoçar é maior que a sacarose. Além disso, é conhecido por apresentar diversas atividades biológicas como imunoestimulante, substituto de plasma sanguíneo, agente prolongador da ação de fármacos (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005), característica funcional devido aos seus benefícios ao trato intestinal (SILVA et al., 2020), agente hipocolesterolêmico (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005; SILVA et al., 2020), atividade antitumoral *in vivo* (contra tumores como sarcoma 180 e carcinoma de *Erhlich* em ratos), e *in vitro* contra linhagens de células tumorais humanas (HepG2 e SNU-1, células do fígado e do sistema gástrico humano, respectivamente) sem acarretar a citotoxicidade desenvolvida pelos agentes antineoplásicos tradicionais utilizados (BEZERRA, 2018; AKTURK, 2022).

Esse EPS já vem sendo utilizado para a obtenção de nanopartículas e micropartículas (SIQUEIRA et al., 2020). A levana foi utilizada no revestimento de nanopartículas magnéticas para a imobilização de tripsina, também para a purificação de lectinas como a *Cramoll* e *Con A* e imobilização de enzimas (ANDRADE, 2009; SILVA, 2015; ESKANDARI et al., 2021; MUTLU et al., 2021). Costa e colaboradores (2019) verificaram através de um ensaio *in vitro*

com macrófagos J774 que nanopartículas poliméricas de levana apresentaram baixa citotoxicidade. Assim, a levana é um polissacarídeo atrativo no desenvolvimento de nanossistemas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver nanopartículas de PIBCA e revestidas com levana.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram divididos em quatro grandes áreas:

→ Obtenção da Levana

- Produzir e purificar o exopolissacarídeo levana;
- Caracterizar a levana utilizando as técnicas termogravimétricas, espectroscopia de infravermelho (IV) e difração de raio-X;

→ Obtenção das Nanopartículas

- Desenvolver nanopartículas de PIBCA revestidas com levana;
- Caracterizar as nanopartículas obtidas quanto ao tamanho, potencial zeta, IV, análises termogravimétricas, difração de raio-X, análise morfológica e espectroscopia de energia dispersiva (EDS);
- Avaliar a estabilidade das nanopartículas de levana: a longo prazo, sob condições forçadas e estabilidade preliminar (ciclo congelamento/descongelamento);

→ Avaliação *in vitro* das nanopartículas

- Analisar a citotoxicidade das nanopartículas em linhagem B16F10 e MDA-MB-231;
- Avaliar a captura celular das nanopartículas em linhagem B16F10 e MDA-MB-231.

→ Realizar um artigo de revisão da literatura voltado para o desenvolvimento de nanopartículas de Poli(isobutilcianoacrilato).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e purificação da levana

4.1.1 Manutenção e cultivo do micro-organismo

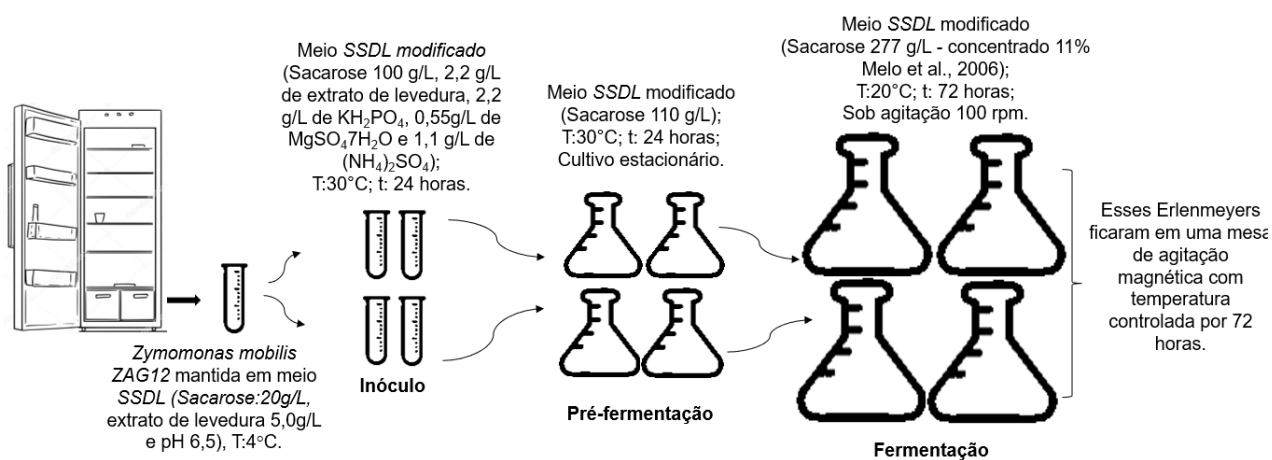
A linhagem de *Zymomonas mobilis* utilizada foi a ZAG 12, pertencente à Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE. Essa linhagem é identificada no laboratório como UFPEDA241, seu cultivo é em meio *Standard de Swings & De Ley* (SSDL) (sacarose a 20,0 g/L, extrato de levedura 5,0g/L e pH 6,5), sob refrigeração (4°C) e sua manutenção é realizada por meio de repique a cada dois meses pelas profissionais técnicas do Laboratório de Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

4.1.2 Obtenção da levana

Para produção do inóculo com a linhagem de *Zymomonas mobilis* ZAG 12 foi utilizado o meio SSDL modificado (100g/L de sacarose, 2,2 g/L de extrato de levedura, 2,2 g/L de KH_2PO_4 , 0,55g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Entretanto, o meio utilizado para pré-fermentação e fermentação tiveram suas concentrações de sacarose aumentadas para 110 g/L e 277 g/L, respectivamente (concentrando 11% baseado no meio do inóculo e na melhor condição para obtenção da levana, segundo Melo e colaboradores (2006) que foi de 250g/L de sacarose) (LIMA, 2016; MELO et.al, 2006; CALAZANS et. al, 2000).

Em todas as passagens para o aumento do volume do inóculo foi mantida a proporção de 10% (v/v) até se obter volume suficiente para inocular o meio de fermentação. Para esta etapa, o caldo foi esterilizado nos respectivos frascos, para só então receber o volume de inóculo correspondente aos 10% do volume final. A pré-fermentação e fermentação foram realizadas em Erlenmeyers com volume de trabalho de 63,33 % (v/v). Após a inoculação, na pré-fermentação o meio foi incubado a 30°C, tendo seu cultivo estacionário e mantido por 24 horas. Já na fermentação o meio foi incubado a 20°C, sob agitação 100 rpm, por 72 horas (Figura 5), de acordo com o trabalho de Melo et. al. (2006), sendo esta a condição estabelecida como a melhor para a produção da levana. Todo esse processo segue ilustrado na Figura 5.

Figura 5 – Processo da fermentação da *Zymomonas mobilis* para obtenção da levana. SSDL: meio *Standard de Swings & De Ley*; T: temperatura; t: tempo.



Fonte: Autora, 2022.

4.1.3 Extração e purificação de levana

Após 72 horas de cultivo o caldo foi levado para a centrifugação a 25°C e 10.000 rpm por 15 minutos (LIMA, 2016), para remoção da massa celular, e logo após foi submetido à extração e purificação da levana pela adição de etanol a 70 % (m/m) previamente resfriado a 4°C e deixado precipitar por 72 horas. As etapas de obtenção e extração da levana foram realizadas no laboratório de Genética de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE em colaboração com as professoras Cynthia Gisele de Oliveira Coimbra e Gláucia Manoella de Souza Lima.

Uma solução concentrada de levana foi transferida para tubos Falcon, que foram congelados por 12 horas em freezer a -80 °C e após colocados no liofilizador (Liotop L108) por 24 horas, a -50 °C, com vácuo a 1720 mT. A liofilização da levana foi realizada no Laboratório de Enzimologia-LABENZ da UFPE.

4.2 Desenvolvimento de nanopartículas de PIBCA revestidas com levana

As nanopartículas foram obtidas pelo método de polimerização em emulsão aniônica *in situ*, como realizado por Lira et al. (2011). A levana (50mg), previamente obtida, foi solubilizada em 5mL de água ultrapura (*Milli Q[®]*, Millipore, USA) e acidificada com HCl (pH

2,5). A solução ficou sob agitação magnética (1200 rpm), em temperatura ambiente, e logo em seguida foram adicionados 50 μ L do monômero isobutircianoacrilato (IBCA). O material permaneceu sob agitação, durante três horas, para polimerização e formação das nanopartículas de PIBCA revestida por levana. As nanopartículas obtidas foram purificadas pelo método de diálise (LIRA et al., 2011), através de membrana de diálise (*Spectra-por® membrane 100.000 g/mol molecular weight cutoff, Biovalley, Marne la Vallée, France*) em 1 litro de água ultrapura. A troca de água foi realizada a cada 30 minutos (três vezes), o sistema ficou sob agitação (300 rpm) *overnight*. O mesmo processo foi realizado para a obtenção das nanopartículas de dextrana.

As nanopartículas de levana (Np-Lev) e as nanopartículas de Dextrana (Np-Dex) foram liofilizadas utilizando o liofilizador (Liotop L108) por 24 horas, a -50 °C, com vácuo a 1720 mT, sendo essa etapa realizada no Laboratório de Enzimologia-LABENZ-UFPE.

4.3 Caracterização da levana e nanopartículas de PIBCA revestidas com levana

4.3.1 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros vibracionais da levana e das Np-Lev foram obtidos pelo espectrofotômetro com transformada de *Fourier, Bruker (PerkinElmer, Spectrum 400)* abrangendo a região de 4000 a 400 cm^{-1} . Essa etapa foi realizada no Laboratório de Polímeros e Nanoestruturas (DEN-UFPE).

4.3.2 Análise termogravimétrica

As curvas termogravimétricas (TG) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) (NETZSCH STA 449F3) da levana e das Np-Lev foram obtidas a partir da análise térmica simultânea. Em cadinhos de alumínio, foram inseridos 5 mg das amostras, selados e analisados na faixa da temperatura de 25°C a 500°C, usando taxa de aquecimento de 10°C/min. Os resultados foram processados no *Software Origin 8 (OriginLab Northampton, USA)*. As análises foram realizadas no Laboratório multiusuário do INTM na UFPE.

4.3.3 Difração de Raio-X

Os difractogramas de raios X das amostras de levana e Np-Lev foram obtidos usando um *Shimadzu* modelo XRD-7000, equipado com um goniômetro theta/theta e fonte de radiação Cu Ka (0,15419 nm). A tensão e a corrente elétrica aplicadas foram de 40 kV e 30 mA, respectivamente. A abertura da fenda utilizada para o feixe incidente na amostra foi de 0,6mm com varredura de $2\Theta = 5^\circ$ a 50° numa razão de 2°min^{-1} . Essa técnica é utilizada para conhecer o tipo de estrutura cristalina de um polímero podendo levar a composição química desse cristal. A análise foi realizada no Laboratório multiusuário do INTM – UFPE.

4.4 Caracterização das nanopartículas de PIBCA revestida com levana

4.4.1 Tamanho

O tamanho das nanopartículas desenvolvidas foi analisado utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da UFPE), sendo usado o ângulo de 90° e temperatura de 25°C . As nanopartículas de levana foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1:20 v/v (triplicata). Os dados foram evidenciados pelo valor médio e desvio padrão.

4.4.2 Potencial Zeta

O potencial Zeta refere-se a carga de superfície das nanopartículas sendo, juntamente com o tamanho, dados importantes na caracterização de nanossistemas. O potencial zeta foi determinado pelo equipamento Zetasizer Nano ZS90, a 25°C . As nanopartículas foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1:20 v/v (triplicata). Os dados foram evidenciados pelo valor médio e desvio padrão.

4.4.3 Análise morfológica e Espectroscopia de Energia Dispersiva

Para a análise morfológica das Np-Lev foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (TESCAN, MIRA3). As nanopartículas de PIBCA revestidas com levana foram diluídas em água ultrapura (Milli Q[®], Millipore, USA) na proporção de 1:10 v/v. Onde em

placa de silício, as nanopartículas foram espalhadas e mantidas em dessecador à temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida a secagem, o *wafer* de silício foi fixado em *stubs* contendo fita de carbono e metalizados com ouro e paládio com a utilização do metalizador (FINE COAT, ION SPUTTER JFC-1100). Para a espectroscopia de energia dispersiva foi utilizado o mesmo microscópio eletrônico de varredura com o acessório de EDS. Sendo realizada a metalização no Laboratório de Microscopia Eletrônica do iLIKA – UFPE e a visualização pelo microscópio eletrônico de varredura do Laboratório de microscopia do INTM – UFPE.

4.5 Estudo de estabilidade a longo prazo

A verificação da estabilidade a longo prazo foi realizada nas formulações de Np-Lev sob as condições de temperatura ambiente (20 a 25°C) e temperatura de geladeira (4 a 6°C), durante 7 meses, para conferir a vida de prateleira dessas formulações. Desse modo, foram realizadas análises periódicas (mensal) no Malvern Zetasizer que mostraram resultados do tamanho (em nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV) das nanopartículas. Os resultados foram analisados em triplicata e os valores foram retirados através da média e desvio padrão, utilizando para a análise dos dados o *GraphPad Prism8*.

4.6 Estudo de estabilidade sob condições forçadas

Para esse estudo as nanopartículas de PIBCA revestidas com levana, após serem liofilizadas (liofilizador Liotop L108, por 24 horas, a -50 °C, com vácuo a 1720 mT) e ressuspensas em água ultrapura, foram realizadas análises no Malvern Zetasizer, também para verificar o tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das Np-Lev após a submissão a condições forçadas como estresse mecânico (centrifugação, 4000 rpm durante 10 minutos), térmico (Banho com agitador, sob 37°C, durante 24 horas). Esse estudo teve duração de 6 meses, sendo analisados os resultados a cada três meses, analisados em triplicata e os valores foram retirados através da média e desvio padrão, utilizando para a análise dos dados o *GraphPad Prism8*.

4.7 Estudo de estabilidade preliminar (ciclo congelamento/descongelamento)

No estudo de estabilidade preliminar as Np-Lev foram submetidas ao estresse em estufa a 37 °C e na geladeira com faixa de temperatura de 2 a 5 °C. Este estudo, realizado em duplicata,

levou um período de 12 dias para cada produto, onde a cada 24 horas a formulação, foi transferida para uma condição de temperatura diferente (geladeira ou estufa) e a cada 48 horas foram avaliadas quanto aos aspectos macroscópicos, tamanho, PDI e potencial zeta. Este estudo seguiu as recomendações do guia de estabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004).

4.8 Avaliação *in vitro* das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana

4.8.1 Estudo de citotoxicidade em células MDA-MB-231 e B16F10

A citotoxicidade das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana foi estudada em células MDA-MB-231 e B16F10 (essas células foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro – Instituição?) a partir do ensaio da redução do sal de tetrazólio MTT (LIRA et al., 2011) o qual avalia o funcionamento da enzima mitocondrial Succinato Desidrogenase. O resultado expressa a redução do corante MTT em células tratadas relacionado ao controle (células não tratadas) *versus* a concentração da amostra em teste. Assim, as células foram inicialmente cultivadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e incubadas a 37°C, em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) para a linhagem B16F10 e meio Leibovitz's *L-15 Medium* e F-12 *Nutrient Mixture* na proporção de 1:1 para as células MDA-MB-231 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) durante 24 horas. Após adesão celular às nanopartículas, em diferentes concentrações (15,62; 31,25; 62,5; 125 e 250 µg/mL), foram adicionadas e incubadas por 24 horas a 37°C. Após incubação, foram adicionados 20 µL da solução de MTT (4 mg/mL), em cada poço, e as amostras novamente incubadas durante 3 horas. O sobrenadante foi então retirado e adicionado 100 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan formados pelas células viáveis. O resultado foi obtido a partir da leitura das placas em leitor de microplaca no comprimento de onda de 630nm. O estudo foi realizado em triplicata.

4.8.2 Estudo da captura celular das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana

A captura celular das nanopartículas pelas células MDA-MB-231 e B16F10 foi avaliada em placas de 24 poços, contendo lamínula de vidro (diâmetro 8mm), até atingir 80-90% de confluência. Em seguida, foi adicionado uma alíquota de 20 µL das nanopartículas de levana (Np-Lev) contendo a oncocalexona A encapsulada (marcador fluorescente) (CAVALCANTI et

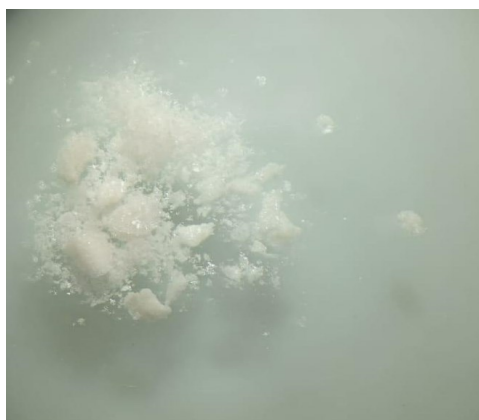
al., 2022) em cada poço e em seguida o volume do poço foi completado para 400 μ L com meio de cultura específico de cada linhagem. As placas foram incubadas durante 15 minutos, 1 e 3 horas, a 37°C. Após a incubação nos tempos determinados, o meio foi retirado, as células foram lavadas com tampão PBS e fixadas com o paraformaldeído a 4% (400 μ L) por 20 minutos. Então, as células foram lavadas novamente com tampão PBS e adicionadas 400 μ L de cloreto de amônio 50 mM, para bloqueio da reatividade do aldeído, sendo incubadas por aproximadamente 10 minutos. Estas foram novamente lavadas, a lamínula retirada do poço foi transferida e selada na lâmina. Logo após, foram armazenadas até análise da captura no microscópio de fluorescência, para observar a forma celular (LIRA et al., 2011). Os estudos *in vitro* foram realizados no Laboratório NanoBioCel (CAV-UFPE).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Obtenção da Levana após fermentação com *Zymomonas mobilis*

Em relação a produção de levana foi possível obter o polissacarídeo por meio da fermentação da *Zymomonas mobilis* ZAG 12, em meio SSDL modificado (concentrado 11% de sacarose), sendo obtido 24g de levana liofilizada por litro de caldo fermentado. Esse resultado foi superior ao obtido pelo estudo referência (MELO et al., 2006), ao qual tivemos um aumento de rendimento em 71,4%. Acredita-se que esse resultado se deve ao aumento na concentração da sacarose utilizada, já que é através da degradação desse dissacarídeo que se forma a levana (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009; SANTOS; CAVALCANTI; CELLIGOI, 2011). Os resultados foram bem promissores, visto que para a obtenção das nanopartículas é necessário por experimento apenas 50 mg do polissacarídeo. A Figura 6 mostra parte da levana liofilizada obtida neste estudo.

Figura 6- Levana liofilizada



Fonte: Autora, 2022.

5.2 Desenvolvimento das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana

As nanopartículas de PIBCA revestidas com o polissacarídeo levana foram obtidas, sendo nanopartículas poliméricas inéditas pela técnica utilizada para a formação e o polímero de IBCA. Os valores médios dos resultados de 243,9 nm e -12 mV são apresentados na Tabela 1, onde é possível observar que há uma diferença no tamanho e potencial zeta quando comparados as nanopartículas revestidas com dextrana, isso pode estar relacionado aos

polímeros serem diferentes. Lira e colaboradores (2011) realizaram nanopartículas de dextrana e também de fucana e verificaram que houve diferença no tamanho e carga de ambas as partículas.

O tamanho da Np-Lev foi de $243,9 \pm 2,3$ nm, um pouco maior que as nanopartículas revestidas com levana obtida por Costa e colaboradores (2019) que teve tamanho de 205 ± 7 nm. Já o potencial zeta obtido na Np-Lev foi de $-12 \pm 0,7$ mV, um pouco maior que dos autores citados acima, que foi -10 ± 7 mV. Essa diferença no tamanho e potencial zeta das Np-Lev pode estar relacionada a técnica de obtenção utilizada que no presente estudo foi a técnica de polimerização por emulsão aniônica e o polímero utilizado foi o IBCA, já as nanopartículas obtidas por Costa e colaboradores (2019) foram por nanoprecipitação e o polímero PLGA. Segundo Silva e colaboradores (2005) o revestimento pode influenciar no tamanho. A velocidade de agitação e o peso molecular do polissacarídeo utilizado também podem influenciar nesse parâmetro (SIQUEIRA et al., 2020).

As Np-Lev obtidas no presente estudo, de acordo com o tamanho, podem ser administradas por via endovenosa, dérmica ou oral. Segundo Cancino, Marangoni e Zucolotto (2014) nanopartículas menores que 300 nm podem atingir o sistema linfático e entrar na corrente sanguínea. Pela aplicação dérmica, partículas podem permear a pele e atingir a corrente sanguínea se espalhando pelo corpo e podendo atingir até o cérebro.

Tabela 1. Tamanho, PDI e potencial zeta das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana (Np-Lev) obtidos após recém preparo e nanopartículas padrão - Dextrana (Np-Dex).

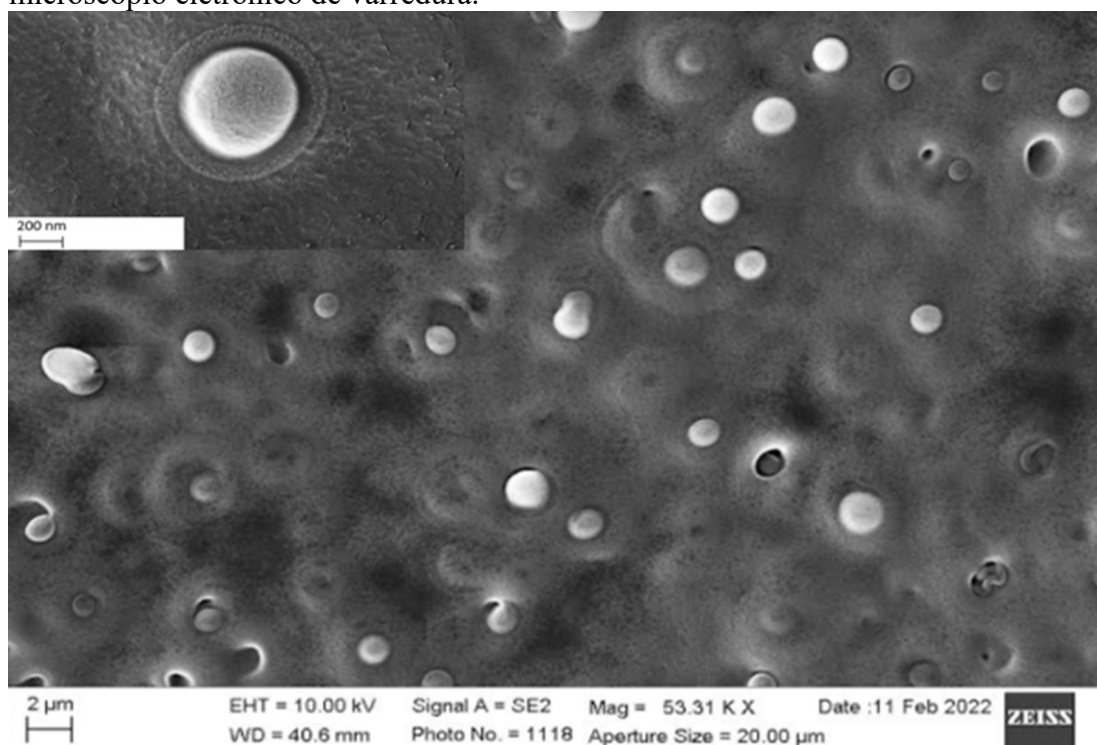
Formulação	Diâmetro da partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
Np-Lev	$243,9 \pm 2,3$	0,122	$-12 \pm 0,7$
Np-Dex	$121,1 \pm 0,7$	0,160	$-15,18 \pm 0,3$

5.3 Análise morfológica e espectroscopia de energia dispersa das Np-Lev

As imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura, demonstradas na Figura 7, evidenciaram partículas esféricas, apresentando distribuição do tamanho homogênea, sem agregados. Estes resultados semelhantes ao trabalho de Costa e colaboradores (2019) verificado em nanopartículas poliméricas de levana e corroboram com os resultados do PDI

que ficou abaixo de 0,2 que normalmente é encontrado nas nanopartículas de PIBCA como visto por Lira e colaboradores (2011) e Cavalcanti e colaboradores (2022).

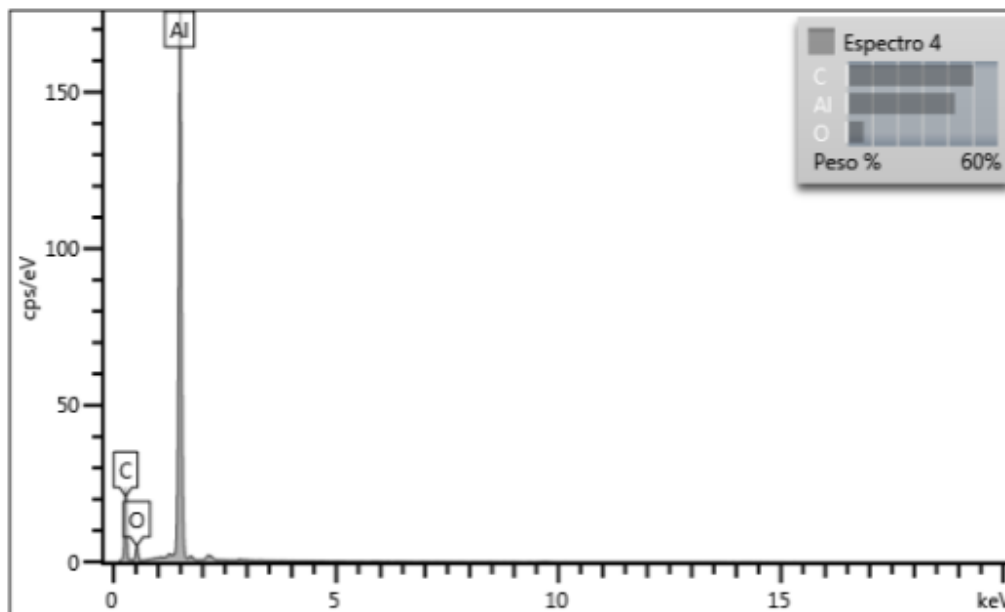
Figura 7 – Morfologia das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana verificadas pelo microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: Autora, 2022.

Pela técnica de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) é possível verificar alguns elementos químicos encontrados na amostra de Np-Lev. Na Figura 8 é observado a presença do carbono (50,21%) e oxigênio (6,84%) nas nanopartículas verificadas, o que coincide com a estrutura molecular da levana que é composta por carbono, oxigênio e hidrogênio (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005; THAKHAM et al., 2020). Entretanto, o hidrogênio não foi identificado pela técnica devido às limitações do equipamento utilizado. O alumínio (42,94%) que também aparece é devido ao material que é feito o *Stub* onde as amostras foram secadas para a realização do estudo.

Figura 8 – Componentes químicos encontrados nas nanopartículas de PIBCA revestidas com levana (Np-Lev).

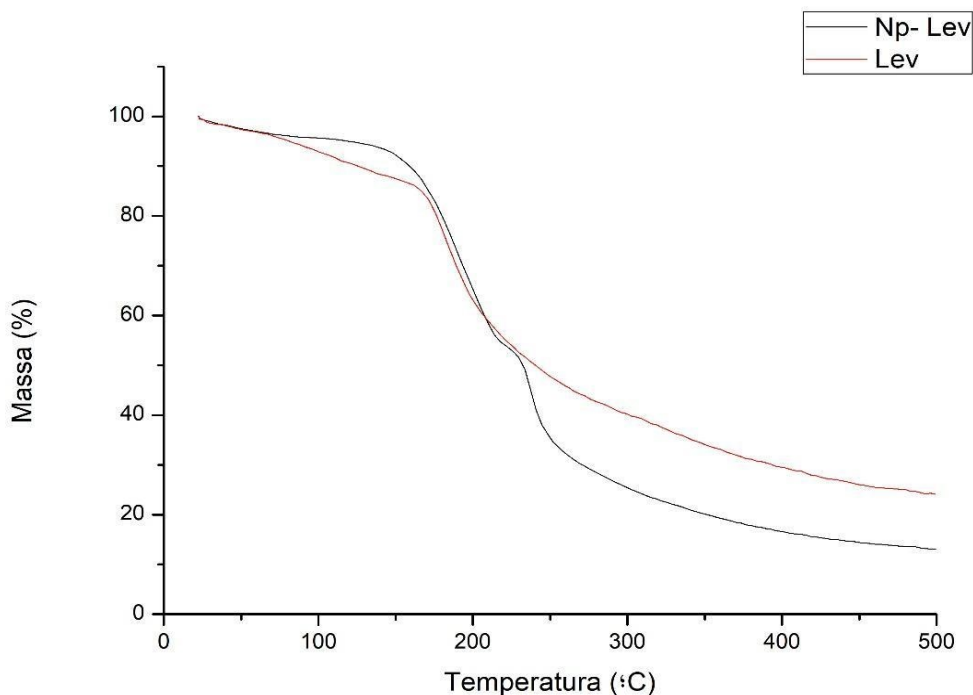


Fonte: Autora, 2022.

5.4 Análise termogravimétrica

A análise TGA da levana e das Np-Lev também foram obtidas para caracterizar ambas amostras. A Figura 9 mostra a degradação de massa ao decorrer do aumento da temperatura, de forma que ambas amostras apresentam perda de massa significativa (de 33 a 35%) até os 200°C. Também, observa-se que as Np-lev parecem resistir a temperatura um pouco mais alta, devido ao aumento da temperatura no início da degradação térmica (em torno de 5–6°C) comparada a levana. As características da decomposição térmica da levana obtidas são semelhantes aos observados por Chen, Gao e Ploehn (2014) que verificaram em novos nanocompósitos de argila montmorilonita contendo levana que à medida que a temperatura aumenta, as ligações da levana de pontos (2→1) quebram primeiro, seguidas pelas ligações da cadeia principal (2→6) e anéis de piranose e furanose. Vale ressaltar que a presença de PIBCA nas nanopartículas parece reduzir as taxas de reações de decomposição da levana. É provável que uma barreira seja criada para impedir a entrada de oxigênio e a fuga de produtos de decomposição, tendo assim o retardo na degradação nas Np-Lev.

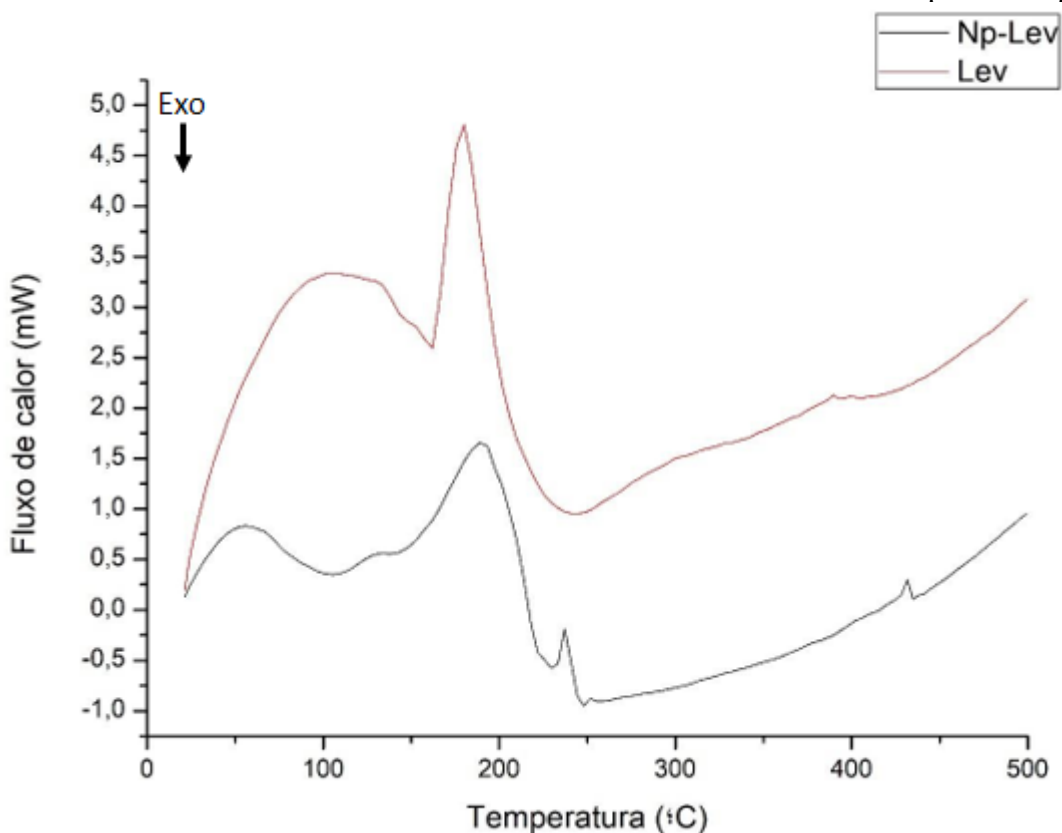
Figura 9 - Gráfico das curvas termogravimétricas da levana e das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana. A linha vermelha simboliza a levana e a linha preta as Np-Lev.



Fonte: Autora, 2022.

Em relação ao DSC, como é verificado na Figura 10, é possível observar que tanto a levana como as Np-Lev apresentam curvas características de eventos endotérmicos e exotérmicos. A Np-Lev apresentou evento endotérmico discreto inicialmente em temperatura em torno de 50-80°C seguido de evento exotérmico (80-150°C), com evento endotérmico posterior em torno de 150-220°C com degradação total. Já para a levana houve inicialmente um evento endotérmico (50-150°C), seguido de discreto evento exotérmico (150°C), seguido de outro evento endotérmico (160-250°C), com degradação total. Os resultados foram semelhantes ao estudo de Mantovan et al. (2018), relata que o primeiro pico endotérmico (50-100°C) refere-se a perda de água, e que a degradação da levana está relacionada ao segundo pico endotérmico que no caso do autor, ocorreu na temperatura em torno de 200-225 °C.

Figura 10 - Gráfico da calorimetria diferencial exploratória da levana e da nanopartícula de PIBCA revestidas com levana. A linha vermelha simboliza a levana e a linha preta as Np-Lev.



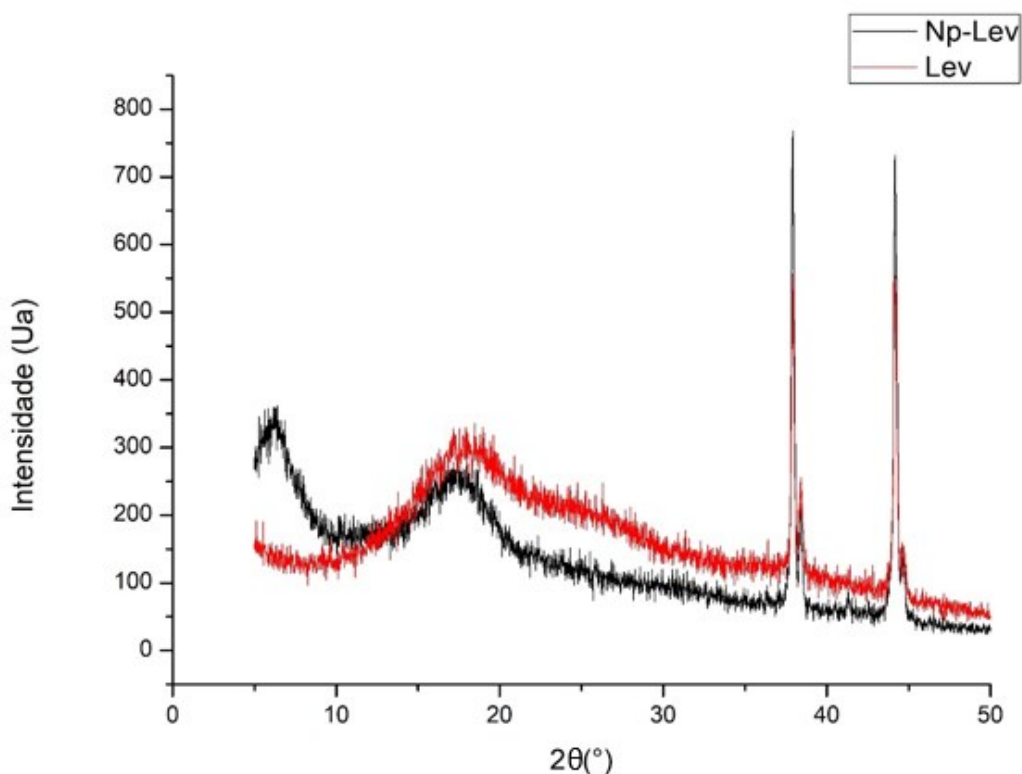
Fonte: Autora, 2022.

5.5 Difração de raio-X

Ainda para caracterizar a levana e as nanopartículas revestidas por esse exopolissacarídeo também foi realizada a análise de difração de raio X. Na Figura 11 são apresentados o DRX para essas amostras. Em ambas observamos que é um DRX com picos de cristalinidade semelhantes, sendo que a levana não apresentou pico abaixo dos 10θ , uma característica particular da levana (CHEN; GAO; PLOEHN, 2014). Por outro lado, as Np-Lev apresentaram um pico a $6,18\theta$, resultado semelhante foi encontrado por Chen, Gao e Ploehn (2014) que compararam o DRX da levana com de nanocompósitos de argila montmorilonita contendo levana, os autores relatam que o pico abaixo de 10θ pode estar relacionado ao outro polímero utilizado na nanopartícula, que pode levar ao acúmulo de partículas. De forma que, neste presente estudo foi utilizado o PIBCA, assim parece que quando há adição desse faz com que a adsorção de levana ao PIBCA resulta em floculação, levando ao re-empilhamento de partículas, entretanto é necessário mais estudo.

Os demais três picos observados na amostra de Np-Lev foram semelhantes para a levana (18,46°, 37,92° e 44,2°) e Np-Lev (18,28°, 37,9° e 44,18°) sendo coincidentes aos encontrados por Chen, Gao e Ploehn (2014).

Figura 11 – Gráfico de difração de raio X da levana e das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana. A linha vermelha representa a levana e a preta simboliza as Np-Lev.



Fonte: Autora, 2022.

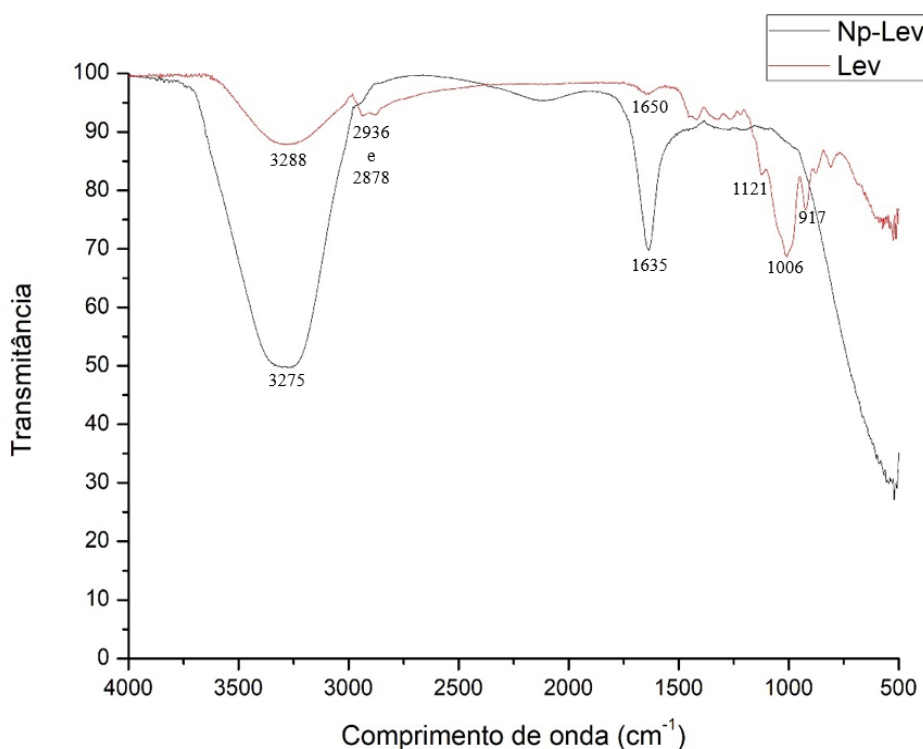
5.6 Espectroscopia de infravermelho

A análise de espectros de infravermelho foi conduzida para a determinação da deposição dos grupos funcionais da estrutura para produção de levana pela cepa *Zymomonas mobilis* ZAG 12. Foi registrado no modo de transmitância do número de onda de 4.000 a 400 cm^{-1} e foi comparado com as nanopartículas de PIBCA revestidas por levana (Figura 12). Dessa forma, avaliando os espectros adquiridos, as bandas com mais intensidades registradas no intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} para a levana foi referente ao estiramento de OH, especificamente em 3288 cm^{-1} , a presença de bandas referentes ao CH em 2936 e 2878 cm^{-1} , um banda referente a água ligada em 1650 cm^{-1} . A vibração de estiramento CO-H aparece em 1121 cm^{-1} , e a forte banda em 1006 cm^{-1} foi caracterizado por vibração de estiramento de ligação glicosídica (C-O-C) em

piranose ou furanose que é característico dos carboidratos. Entretanto, a banda em 917 cm^{-1} é uma confirmação da furanose (BEZERRA, 2018). Esses resultados foram bem semelhantes com os encontrados por Thakham e colaboradores (2020), em levana produzida por *Bacillus siamesis*, e Bezerra (2018) com levana produzida por *Zymomonas mobilis*.

O que chama atenção nos espectros das Np-Lev em comparação aos da levana pura, é uma grande banda referente ao grupamento OH em 3275 cm^{-1} e um pico em 1636 cm^{-1} que deve-se a água formada, ambas bandas são também evidenciadas nos espectros da levana.

Figura 12 – Gráfico da análise de infravermelho da levana e das nanopartículas de PIBCA revestidas com levana. A linha vermelha simboliza a levana e a linha preta a Np-Lev.



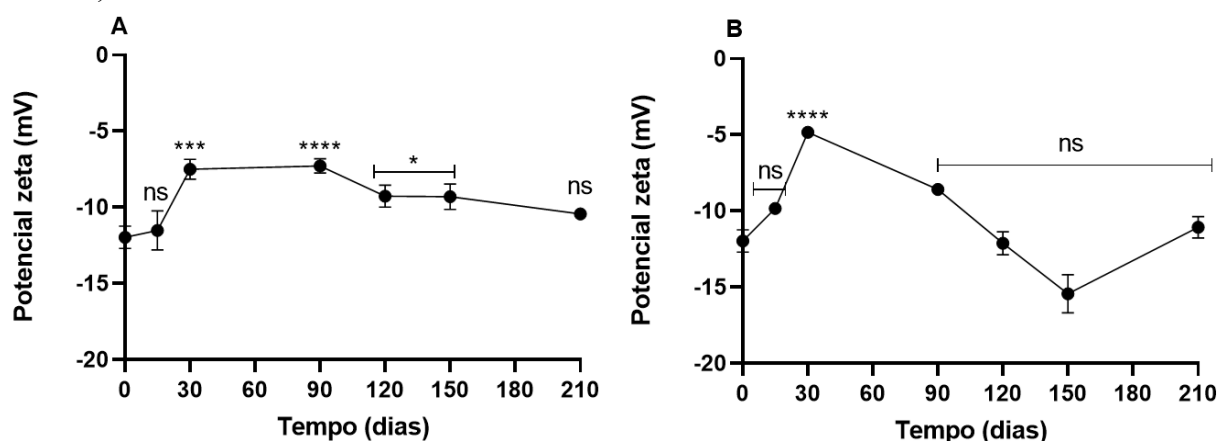
Fonte: Autora, 2022.

5.7 Estudo de estabilidade a longo prazo

O estudo de estabilidade a longo prazo foi realizado através da análise de nanopartículas mantidas em temperaturas diferentes (ambiente e sob refrigeração), durante sete meses, sendo analisado potencial zeta, tamanho e PDI. A estabilidade das nanopartículas de PIBCA são importantes serem observadas pois permite o desenvolvimento de nanocarreadores estáveis para uma possível administração (CHEN; GAO; PLOEHN, 2014; LIU; THAYUMANAVAN; 2017; PALANIKUMAR et al., 2020).

Na Figura 13A, pode-se observar que o potencial zeta das nanopartículas mantidas sob temperatura ambiente aumentou até os 30 dias 37% (4,5mV), se manteve até os 90 dias, depois caiu 24% (1,8mV) até os 120 dias de armazenamento e se manteve até os 210 dias. Por outro lado, as mantidas sob refrigeração aumentou 58% (7mV) até os primeiros 30 dias e depois regrediu 79% (3,8mV) no terceiro mês, 58% (7mV) no quarto mês e 234% (10mV) no quinto mês até voltar novamente -12mV no último mês, sendo expressa na Figura 13B. O potencial zeta depende principalmente da natureza química do polímero, do estabilizador e em alguns casos do pH do meio (TAVARES, 2011). Jacome-Júnior (2006) analisou o potencial zeta em lipossomas com levana em diferentes concentrações, e observou que conforme o aumento na concentração de levana menor foi a carga de superfície, entretanto ele correlacionou a alteração na carga aos fosfolipídios.

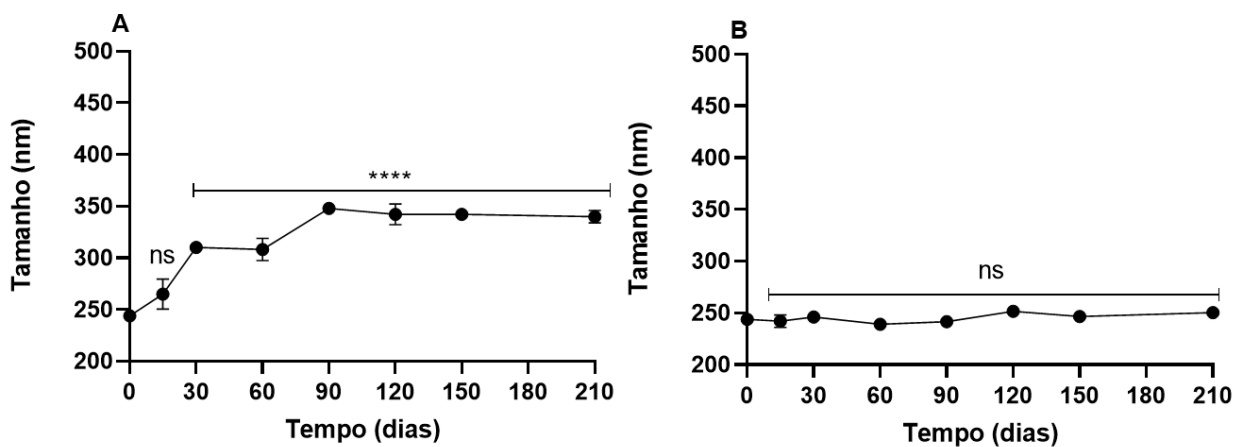
Figura 13- Estabilidade a longo prazo das Np-Lev:(A) Potencial zeta temperatura ambiente (20 a 25°C); (B) Potencial zeta sob refrigeração (4 a 6°C). **** = P valor < 0.0001; ** = P valor 0.0012; ns = > 9.999



Fonte: Autora, 2022.

Em relação ao tamanho, é observado na Figura 14A que quando as nanopartículas são mantidas sob temperatura ambiente há um aumento no tamanho dessas nanopartículas, sendo de 27% nos primeiros 30 dias, se mantém aos 60 dias, aumenta 42% aos 90 dias e se mantém até os 210 dias. Ao contrário das Np-Lev mantidas sob sob refrigeração, mostrada na Figura 14B que o tamanho praticamente se mantém, tendo o tamanho inicial de 243,9 nm e o final de 250,4 nm.

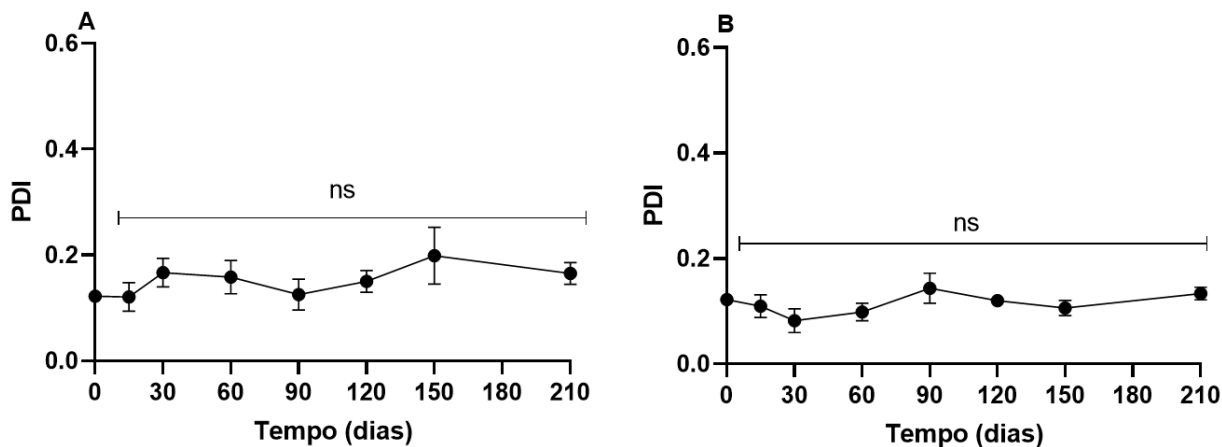
Figura 14 – Estabilidade a longo prazo das Np-Lev: (A) Tamanho temperatura ambiente (20 a 25°C); (B) Tamanho sob refrigeração (4 a 6°C). **** = P valor < 0.0001; ** = P valor 0.0012; ns = > 9.999



Fonte: Autora, 2022.

Na Figura 15 é observado que o PDI das Np-Lev mantidas tanto em temperatura ambiente (PDI inicial 0,122 e PDI final 0,165) como sob refrigeração (PDI inicial 0,122 e PDI final 0,134) se mantém, entretanto, apresentam discretas variações.

Figura 15 – Estabilidade a longo prazo das Np-Lev: (A) PDI temperatura ambiente (20 a 25°C); (B) PDI sob refrigeração (4 a 6°C). **** = P valor < 0.0001; ** = P valor 0.0012; ns = > 9.999



Fonte: Autora, 2022.

Diante dos resultados obtidos neste estudo de estabilidade foi possível observar que as alterações no potencial zeta das nanopartículas armazenadas sob refrigeração parecem resultar na manutenção do tamanho das Np-Lev. As amostras mantidas sob temperatura ambiente tiveram alterações no tamanho, entretanto mantiveram estabilidade sendo confirmadas pelo PDI. E em ambas temperaturas podem ser armazenadas as amostras durante os 7 meses,

entretanto dependendo da via de administração das nanopartículas as amostras sob refrigeração apresentaram melhor estabilidade.

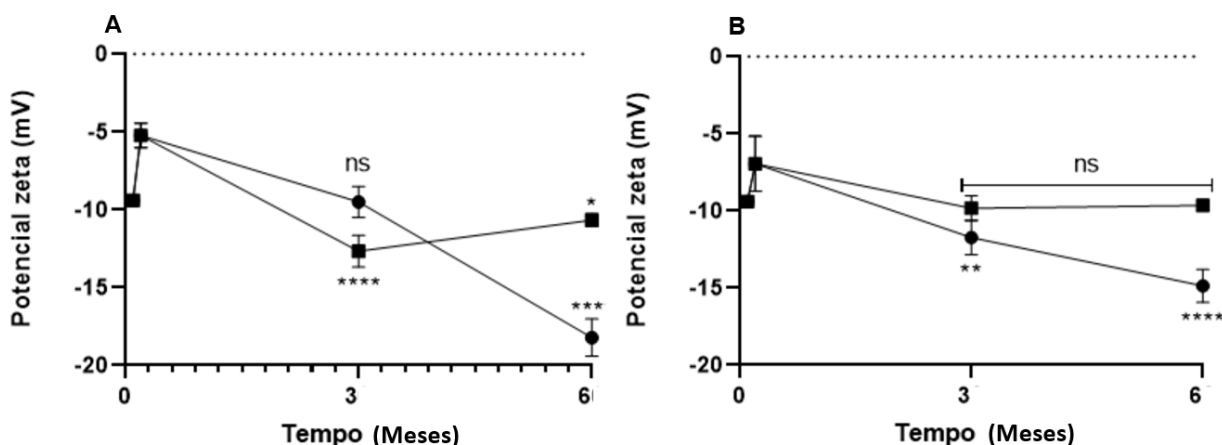
Jácome-Júnior (2006) realizou um estudo de estabilidade a longo prazo e sob condições forçadas, em lipossomas com levana, e verificou que quanto maior a concentração de levana nos lipossomas maior precipitação havia e alteração no pH em ambos estudos. Entretanto, não foi observado quanto a diferença de temperatura: o tamanho, potencial zeta e PDI. Cavalcanti e colaboradores (2022) avaliaram durante 7 meses as nanopartículas de PIBCA revestidas por fucana, mantidas sob refrigeração, se mantiveram estáveis com poucas variações no tamanho, potencial zeta e PDI.

5.8 Estudo de estabilidade sob condições forçadas

Esse estudo foi realizado através das Np-Lev submetidas a condições forçadas de estresse mecânico (centrifugação) e térmico (em banho com agitador sob 37°C) além de serem armazenadas sob temperatura ambiente e refrigeradas. Como demonstrado na Figura 16A o potencial zeta aumentou 50% após a centrifugação inicial, 3 meses após armazenamento sob temperatura ambiente e sob refrigeração o potencial zeta caiu. Entretanto, 6 meses após a amostra ser mantida sob temperatura ambiente o potencial continuou a cair (para aproximadamente -18 mV), por outro lado a amostra armazenada sob refrigeração durante os 180 dias, praticamente se manteve (-10 mV). Na Figura 16B observa-se aumento de aproximadamente 25% após a agitação inicial, a queda desse potencial zeta após 3 meses de armazenamento sob ambas temperaturas e depois de 6 meses sob temperatura ambiente continuou a cair (-15mV) e se manteve as que estavam armazenadas sob refrigeração (-9mV).

Observa-se que em relação ao potencial zeta, a temperatura de armazenamento das nanopartículas parece influenciar mais que a diferença de estresse submetidos, devido resultados semelhantes em submissão a ambos estresses.

Figura 16 - Estabilidade sob condições forçadas (estresse mecânico – centrifugação e térmico - banho com agitador sob 37°C) das Np-Lev: (A) Potencial zeta sob estresse mecânico – centrifugação: temperatura ambiente X sob refrigeração; (B) Potencial zeta sob estresse térmico – agitador: temperatura ambiente X sob refrigeração. Temperatura Ambiente (-●-) e sob refrigeração (-■-). **** = P valor < 0.0001; ** = P valor 0.0012; ns = > 9.999

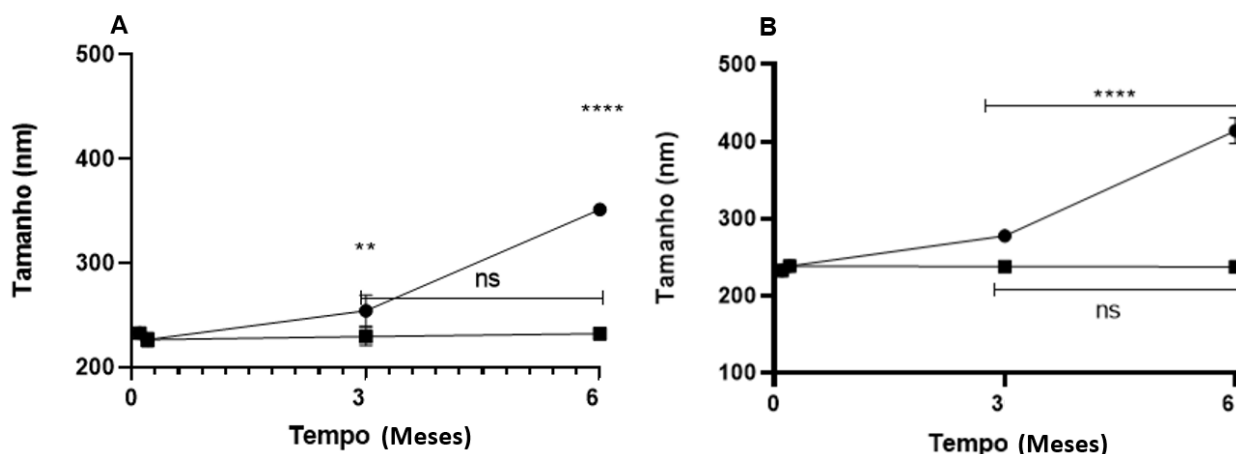


Fonte: Autora, 2022.

Verifica-se na Figura 17A, o tamanho dessas Np-Lev praticamente se manteve (232 - 234 nm) após a centrifugação inicial, 3 meses após o armazenamento sob temperatura ambiente houve aumento (10%) e 6 meses após seguiu aumentando. Entretanto, sob refrigeração o tamanho se manteve durante os 6 meses de armazenamento (234 nm). Na Figura 17B observa-se perfil semelhante, onde praticamente o tamanho se manteve (232 - 238 nm) após a agitação inicial em ambas temperaturas, já após 3 meses sob temperatura ambiente houve aumento (19%) e duplicou o aumento até os 6 meses, já sob refrigeração o tamanho se manteve (237 nm) durante todo o período de armazenamento.

Então, o tamanho também parece ser influenciado pela temperatura e não pelo estresse.

Figura 17 - Estabilidade sob condições forçadas (estresse mecânico – centrifugação e térmico – banho com agitador sob 37°C) das Np-Lev: (A) Tamanho sob estresse mecânico – centrifugação: temperatura ambiente *versus* sob refrigeração; (B) Tamanho sob estresse térmico – agitador: temperatura ambiente *versus* sob refrigeração. Temperatura Ambiente (-●-) e sob refrigeração (-■-). **** = P valor < 0.0001; ** = P valor 0.0012; ns = > 9.999

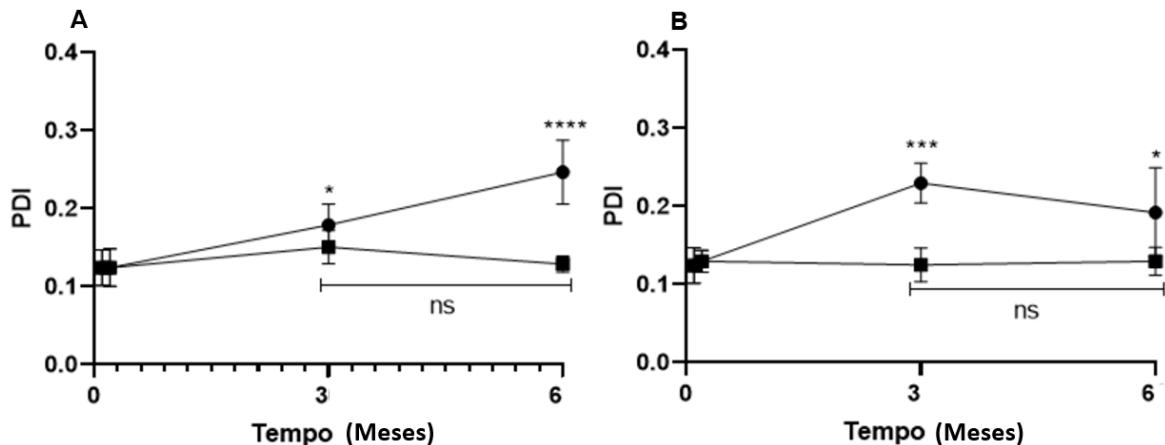


Fonte: Autora, 2022.

Quanto ao PDI, também apresentou resultado semelhante ao potencial zeta e tamanho, constata-se na Figura 18, que após ambos estresses inicial ele se mantém. Entretanto, após 3 meses de armazenamento sob diferentes temperaturas, como mostra a Figura 18A, há um aumento (44%) sob temperatura ambiente e sob refrigeração (20%) após centrifugação, e 6 meses de armazenamento o PDI das em temperatura ambiente seguiu aumentando, já as sob refrigeração se mantiveram. Na Figura 18B, em banho-maria, após 3 meses de armazenamento sob temperatura ambiente há um aumento (85%) e no sexto mês tem uma leve queda, já sob refrigeração praticamente se mantém durante todo o período de armazenamento (0,124).

Dessa forma, neste estudo foi possível verificar que ao longo dos 6 meses o que parece influenciar no potencial zeta, tamanho e PDI das Np-Lev foi a temperatura de armazenamento, sendo a de refrigeração a melhor temperatura para conservação.

Figura 18 - Estabilidade sob condições forçadas (estresse mecânico – centrifugação e térmico – banho com agitador sob 37°C) das Np-Lev: (A) PDI sob estresse mecânico – centrifugação: temperatura ambiente X sob refrigeração; (B) PDI sob estresse térmico – agitador: temperatura ambiente X sob refrigeração. Temperatura Ambiente (-●-) e sob refrigeração (-■-). **** = P valor < 0.0001; ** = P valor 0.0012; ns = > 9.999

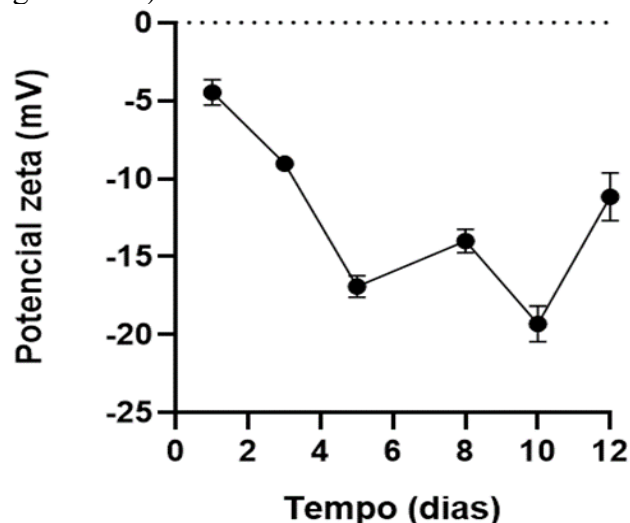


Fonte: Autora, 2022.

5.9 Estudo de estabilidade preliminar (ciclo congelamento/descongelamento)

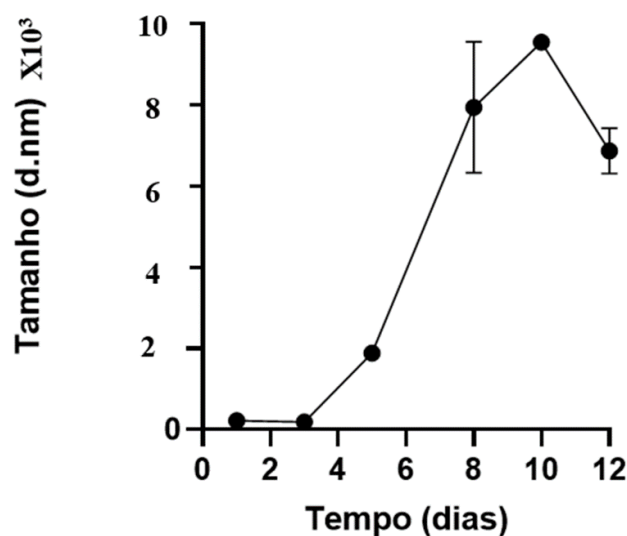
Nesse estudo as Np-Lev foram submetidas ao estresse 24 horas em estufa (37°C) e 24 horas na geladeira (2 a 5°C) durante 12 dias. E como é observado na Figura 19, o potencial zeta sob essas condições teve queda para -18mV (até o quinto dia), chegou até -20,9 mV. Essa instabilidade acredita-se que se deve a alteração de temperatura.

Figura 19 – Potencial zeta das Np-Lev no estudo de estabilidade preliminar (ciclo congelamento/descongelamento).



Em relação ao tamanho, na Figura 20 verificamos que no dia 01 até o dia 03 praticamente se mantém (219 – 185 nm respectivamente). Entretanto, a partir do dia 05 o tamanho aumentou 900% (1844 nm), no décimo dia o aumento foi para mais de 4000% (9543 nm). Após as 72 horas provavelmente houve o aumento da agregação de partículas devido a mudança de temperatura, gerando instabilidade.

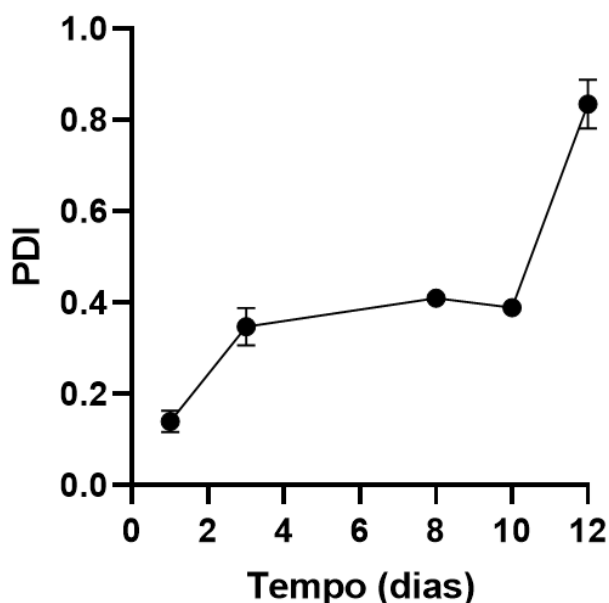
Figura 20 – Tamanho das Np-Lev no estudo de estabilidade preliminar (ciclo congelamento/descongelamento).



Fonte: Autora, 2022.

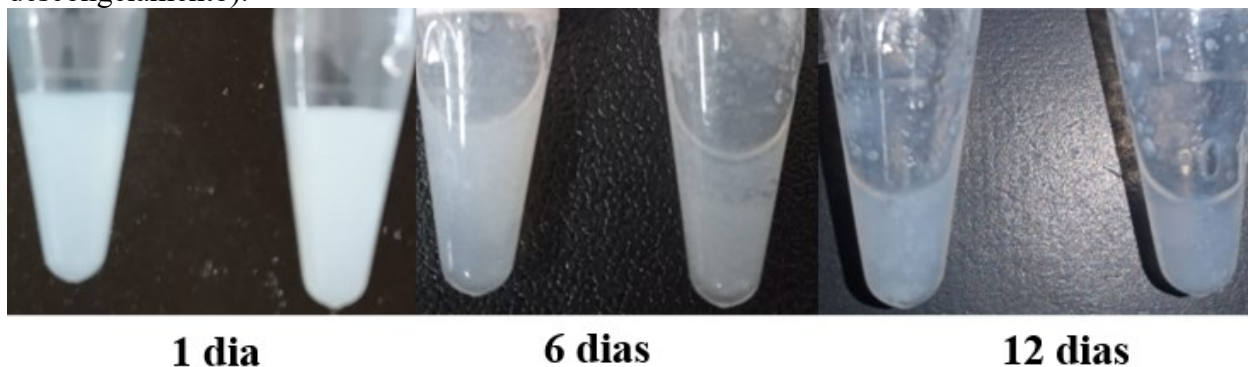
Já o PDI dessas Np-Lev, sob esses estresses, observado na Figura 21, houve o aumento até o terceiro dia de mais de 200% (0,37 PDI). Chegando a conclusão nesse estudo, que as nanopartículas submetidas a essa variação de temperatura se mostraram instáveis já nas primeiras 48 horas, ao qual nas imagens macroscópicas (Figura 22) podemos observar a presença de aglomerados e precipitados.

Figura 21 – PDI das Np-Lev no estudo de estabilidade preliminar (ciclo congelamento/descongelamento).



Fonte: Autora, 2022.

Figura 22 – Np-Lev durante o estudo de estabilidade preliminar (ciclo congelamento/descongelamento).



Fonte: Autora, 2022.

5.10 Estudo de citotoxicidade em MDA-MB-231 e B16F10

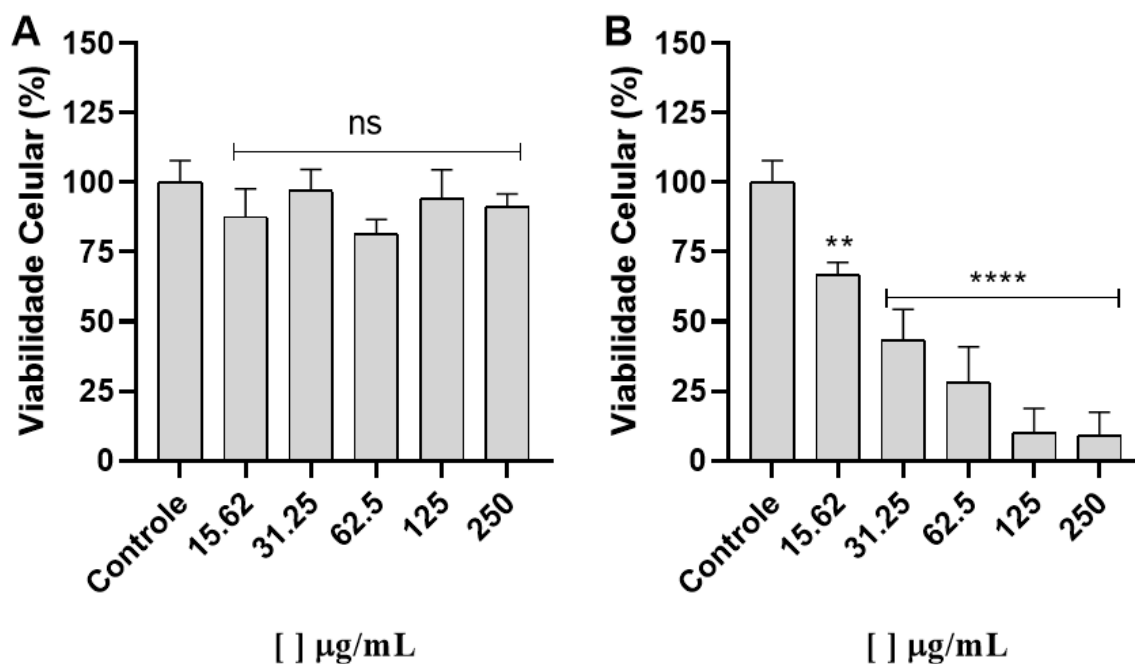
O estudo de citotoxicidade foi realizado em dois tipos de células diferentes, um em células do tipo MDA-MB-231, que são células de câncer de mama humano, e outro em linhagem B16F10, células de melanoma. No que diz respeito a MDA-MB-231 é observado na Figura 23 a sua viabilidade celular quando submetidas a levana e as Np-Lev. De forma que é verificado na Figura 23A que a levana pura nas diferentes concentrações em $\mu\text{g/mL}$ apresentou

viabilidade celular acima de 75% comparada ao grupo controle. Sabe-se que a levana apresentou atividade antitumoral (em torno de 50% a 60%) *in vitro* contra linhagens de células tumorais humanas (HepG2 e SNU-1, células do fígado e do sistema gástrico humano, respectivamente) de acordo com Yoo et al. (2004), sendo que eles utilizaram a levana com modificações, em sua estrutura de ramificação, e obtida por outro micro-organismo.

Todavia, as nanopartículas de levana (Figura 23B) resultaram em viabilidade celular abaixo de 75% em todas as concentrações, ficando abaixo de 50% na maioria das concentrações, sendo as concentrações de 125 e 250 µg/mL as que apresentaram viabilidade abaixo de 25%. O efeito antiproliferativo das Np-Lev parece estar relacionado a presença de levana e possível internalização dessas nanopartículas. Pois como já citado, a levana já apresentou atividade antitumoral em células (HepG2 e SNU-1) (YOO et al., 2004) e segundo Calazans e colaboradores (2000) a levana apresentou atividade também *in vivo* contra tumores (como sarcoma 180 e carcinoma de *Erhlich* em ratos), os autores correlacionaram esse efeito antitumoral ao peso molecular da levana, tendo a média de 210.000 g/mol o melhor resultado para a inibição de proliferação celular 72%.

No que diz respeito a relação entre a levana e as células de câncer de mama, foi observado por Queiroz e colaboradores (2017) que esse exopolissacarídeo apresentou atividade antiproliferativa frente as células MCF-7, células de câncer de mama não metastático, tendo morte celular em mais de 50% nas concentrações de 250 a 1500 µg/mL. Kim, Bae e Chung (2015) realizaram um estudo com nanopartículas de levana e indocianina em células MDA-MB-231 e verificaram que nas concentrações de 0,5 e 1 mg/mL as nanopartículas foram citotóxicas para essas células. Dessa forma, as nanopartículas de levana parecem potencializar o efeito antiproliferativo da levana.

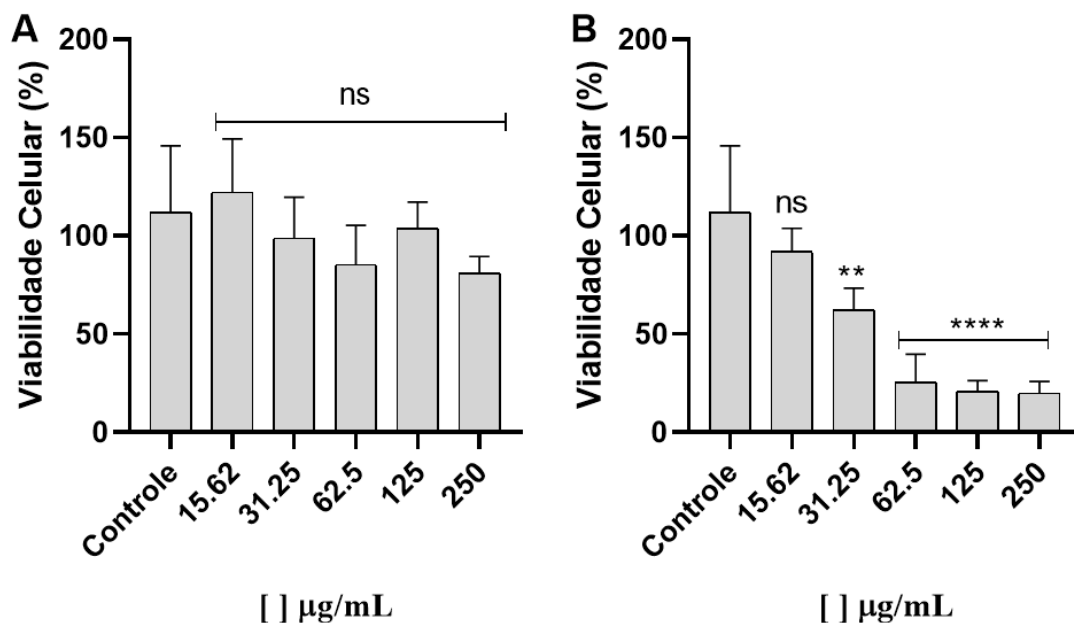
Figura 23 – Viabilidade das células MDA-MB-231 expostas a levana (A) e as Np-Lev (B) após 24 horas: **** = P valor < 0.0001; ** = P valor 0.0012; ns = > 9.999



Fonte: Autora, 2022.

A segunda linhagem de células utilizada para a verificação da viabilidade foi a B16F10, células de melanoma, são observados na Figura 24 resultados semelhantes aos encontrados frente a MDA-MB-231. Na Figura 24A é observado que a levana quando exposta a essas células, apresentou viabilidade celular acima de 75% até em sua maior concentração (250 µg/mL). Enquanto as células quando submetidas as Np-Lev (Figura 24B) apresentaram viabilidade celular abaixo de 75% a partir da concentração de 31,25 µg/mL, tendo viabilidade celular abaixo de 25% nas concentrações 62,5, 125 e 250 µg/mL.

Figura 24 – Viabilidade das células B16F10 expostas a levana (A) e as Np-Lev (B) após 24 horas: **** = P valor < 0.0001; ** = P valor 0.0012; ns = > 9.999



Fonte: Autora, 2022.

5.11 Captura celular em MDA-MB-231 e B16F10

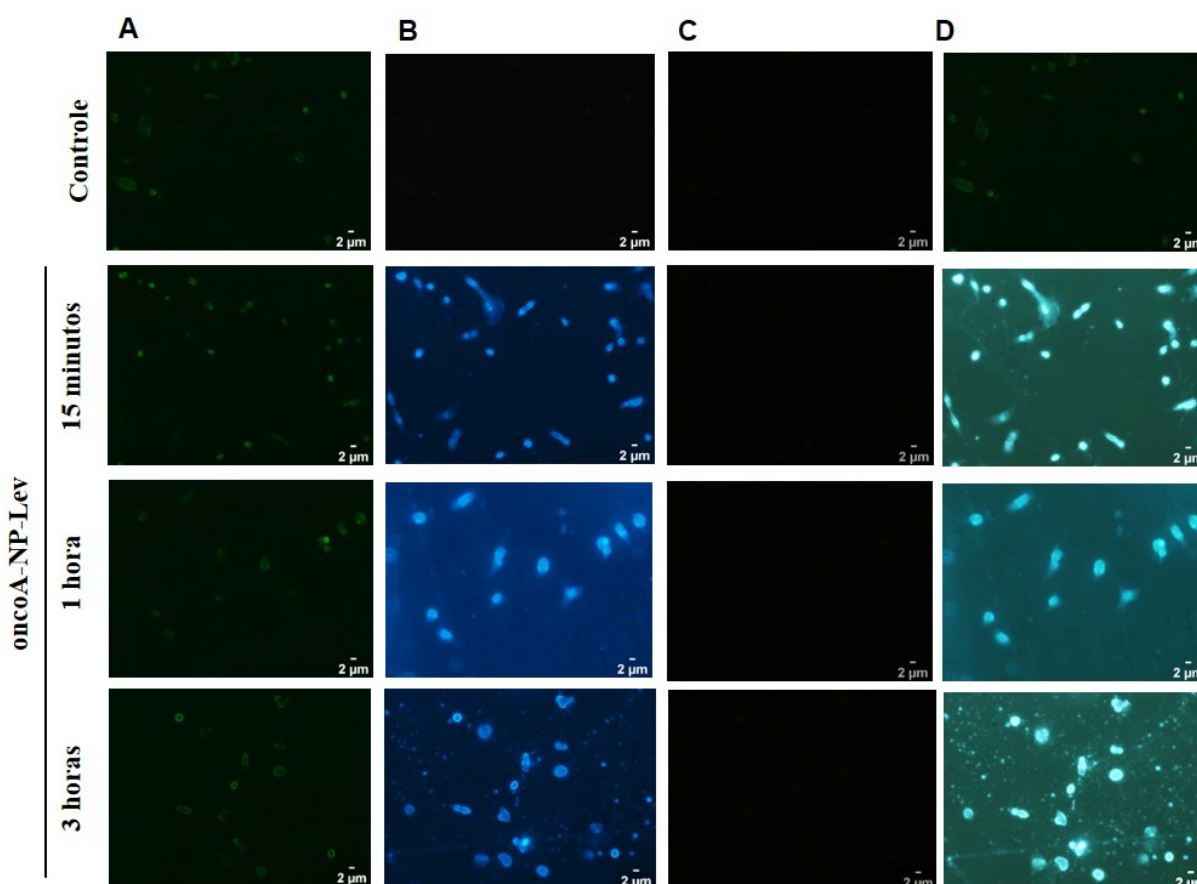
As nanopartículas de PIBCA revestidas com levana foram avaliadas quanto à captura celular em linhagem MDA-MB-231 usando a oncoalexona A (onco-A) na concentração de 50 µg/mL. Segundo verificado por Cavalcanti e colaboradores (2022) a OncoA é uma quinona, que apresenta autofluorescência e que pode ser utilizada como marcador fluorescente de nanopartículas em estudo de captura celular.

Na Figura 25 é observado que as células MDA-MB-231 apresentam fluorescência no grupo controle do filtro Alexa flúor, pois essas células contêm autofluorescência na cor verde por isso não se verificam nos demais grupos controle. Nos grupos tratados com as oncoA-Np-Lev podemos observar que as células capturaram as nanopartículas a partir de 15 minutos devido a fluorescência no filtro DAPI (coloração azul), sendo característico da fluorescência da oncoA ser multicolor (fluoresce no azul e pouca fluorescência no vermelho) apresentado por Cavalcanti e colaboradores (2022).

Kim, Bae e Chung (2015) realizaram um estudo com nanopartículas de levana e indocianina em células MDA-MB-231, e verificaram que essas nanopartículas podem carrear

fármaco para essas células cancerígenas. Sendo observado pelos autores que houve adsorção das nanopartículas nessas células, isso foi correlacionado a uma interação da frutose da levana com o transportador de glicose 5 (GLUT5), esse por sua vez é mais encontrado em células de câncer de mama.

Figura 25 – Células MDA-MB-231 antes e após a incubação em diferentes tempos com o sistema oncoA-Np-Lev. Coluna A: filtro de Alexa fluor; Coluna B: filtro DAPI; Coluna C: Filtro de Rodamina; Coluna D: Sobreposição das imagens A, B e C. Células controle da linha 1 em meio de cultura; linha 2, 3 e 4: após 15 min, 1 e 3 h de incubação com oncoA-Np-Lev, respectivamente. Barra de escala: 2 μ m.

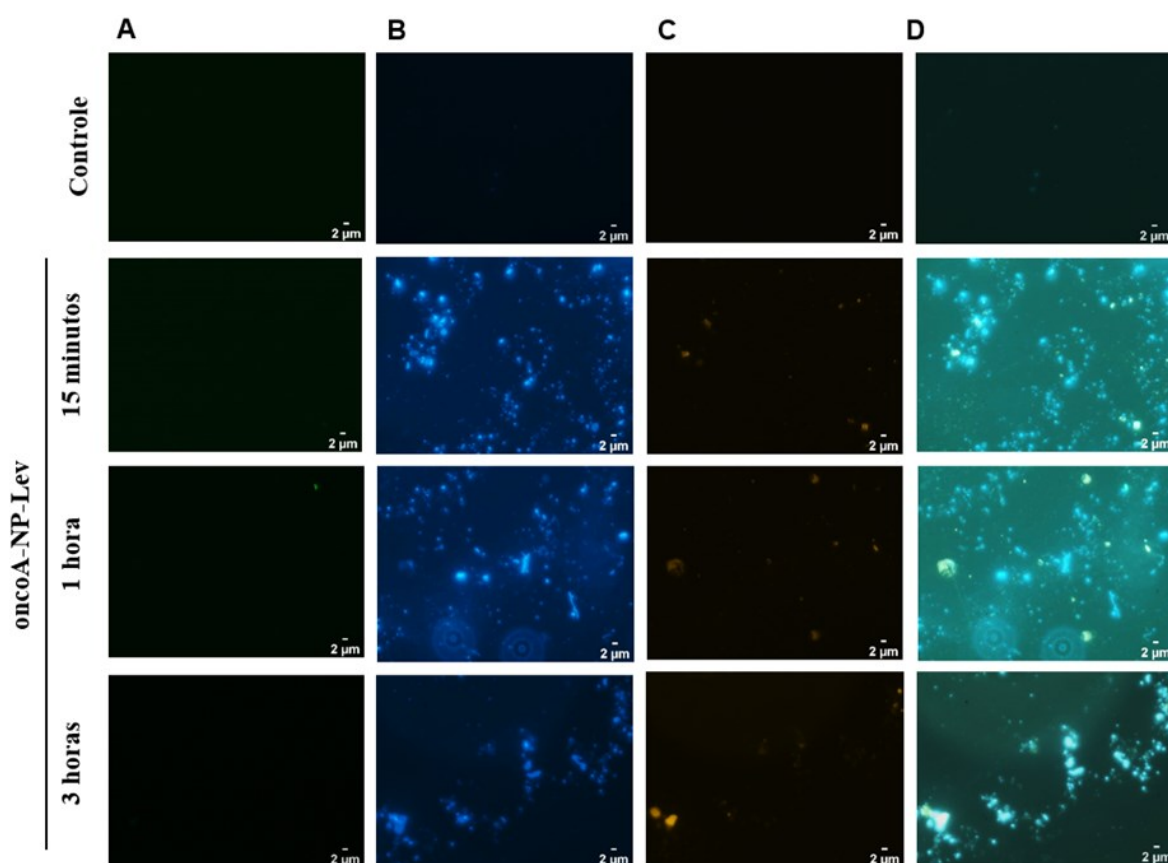


Fonte: Autora, 2022.

Também foi verificada a captura celular das oncoA-Np-Lev em células B16F10. Na Figura 26 é observado que as células B16F10 não apresentam autofluorescência no grupo controle, assim como foi apresentado pelas células MDA-MB-231. Já a captura das nanopartículas com oncoA é evidenciada no filtro DAPI que as nanopartículas são capturadas

nos primeiros 15 minutos, podemos observar a fluorescência menos intensa no filtro da rodamina também logo após os primeiros 15 minutos de incubação. Essa fluorescência no filtro da rodamina pode estar relacionado a oncoA, por que de acordo com os resultados de Cavalcanti e colaboradores (2022), a oncoA é um marcador multicolor, podendo apresentar fluorescência no laranja e azul.

Figura 26 - Células B16F10 antes e após a incubação em diferentes tempos com o sistema oncoA-Np-Lev. Coluna A: filtro de Alexa fluor; Coluna B: filtro DAPI; Coluna C: Filtro de Rodamina; Coluna D: Sobreposição das imagens A, B e C. Células controle da linha 1 em meio de cultura; linha 2, 3 e 4: após 15 min, 1 e 3 h de incubação com oncoA-Np-Lev, respectivamente. Barra de escala: 2 μ m.



Fonte: Autora, 2022.

6 CONCLUSÃO

Em síntese, neste estudo, através da caracterização da levana confirmou-se a produção deste polissacarídeo por *Zymomonas mobilis* com alto rendimento (71,4% maior que o estudo de referência devido aumento da sacarose), proporcionando uma produção segura e eficiente desse exopolissacarídeo. Além disso, a partir dessa levana pôde ser elaborada Np-Lev inéditas de PIBCA, com tamanho de 243,9 nm e potencial zeta de $-12 \pm 0,73$, com distribuição homogênea e formato esférico, comprovado pelos resultados de caracterização. Foi verificado que essas Np-Lev apresentaram estabilidade ao longo de sete meses armazenadas sob temperatura ambiente e sob refrigeração, e quando submetidas a condições forçadas apresentaram estabilidade durante 6 meses sob temperatura refrigerada e ambiente (em ambas condições), entretanto a refrigeração apresentou melhores resultados para melhor armazenamento. Essas Np-Lev apresentaram instabilidade quando submetidas a alterações de temperaturas durante as primeiras 48 horas (ciclo congelamento/descongelamento). Finalmente foi verificado ainda que essas nanopartículas apresentaram atividade antiproliferativa frente as linhagens MDA-MB-231 e B16F10 com atividade citotóxica superior a levana livre, essa atividade pode estar relacionada ao fato das nanopartículas auxiliarem a internalização da levana no interior das células e potencializar seu efeito citotóxico.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1 ed., Brasília: ANVISA, 2004. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-de-estabilidade-de-cosmeticos.pdf/view> Acesso em: 21 abr. 2022.
- AKTURK, O. The anticancer activity of doxorubicin-loaded levan-functionalized gold nanoparticles synthesized by laser ablation. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.196, n. 111061, p.72-85, Ago. 2020. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.12.030. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776520302915?via%3Dihub> Acesso em: 08 maio 2022.
- ALEXANDER, A.; PATEL, R. J.; SARAF, S.; SARAF, S. Recent expansion of pharmaceutical nanotechnologies and targeting strategies in the field of phytopharmaceuticals for the delivery of herbal extracts and bioactives. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.241, p.110-124, Nov. 2016. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.09.017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27663228/> Acesso em: 08 maio 2022.
- ALVARENGA, G. H. F. et al. Avanços e benefícios da nanotecnologia no desenvolvimento das vacinas contra Sars-Cov-2: Uma revisão integrativa. **Recima 21-Revista científica multidisciplinar**, Jundiaí-SP, v.3, n.2, p. e321111, 2022. doi: 10.47820/recima21.v3i2.1111. Disponível em: <https://recima21.com.br/index.php/recima21/article/view/1111>. Acesso em: 10 maio 2022.
- ANDRADE, P. L. **Síntese e caracterização da magnetita revestida por polímeros naturais (fucana e levana) para imobilização de enzimas**. 2009. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciências de materiais) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009. Disponível em: https://attena.ufpe.br/bitstream/123456789/1703/1/arquivo878_1.pdf Acesso em: 11 mar. 2021.
- APOLINÁRIO, A. C.; SALATA, G. C.; BIANCO, A. F. R.; FUKUMORI, C.; LOPES, L. B. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais ‘espaço lá embaixo’ Revisão. **Quím. Nova**, São Paulo, v.43, n.2, p.212-225, fev. 2020. doi: 10.21577/0100-4042.20170481. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/6kBXtzscWhJD7Fff57qVkmq/abstract/?lang=en> Acesso em: 28 mar. 2022.
- BEHAN, N.; BIRKINSHAW, C.; CLARKE, N. Poly n-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerization and particle formation. **Biomaterials**, Amsterdam, v.22, n.11, p.1335-1344, jun. 2001. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00286-6. Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961200002866>. Acesso em: 9 maio 2022.

BERTHOLON, I.; LESIEUR, S.; LABARRE, D.; BESNARD, M.; VAUTHIER, C. Characterization of dextran-poly(isobutylcyanoacrylate) copolymers obtained by redox radical and anionic emulsion polymerization. **Macromolecules**, Washington, v.39, p.3559-3567, abr. 2006. doi: 10.1021/ma060338z. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ma060338z>. Acesso em: 08 maio 2022.

BEZERRA, A. G. S. **Avaliação da atividade antineoplásica e antimicrobiana de levanas modificadas**. 2018. 91p. Tese (Doutorado em Ciências de materiais) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/32151> Acesso em: 22. Abr. 2021.

BHAT, E.A. et al. SARS-CoV-2: insight in genome structure, pathogenesis and viral receptor binding analysis – an updated review. **Int Immunopharmacol**, Amsterdam, v.95, p. 107493, Fev. 2021. doi:10.1016/j.intimp.2021.107493. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33721758/> . Acesso em 08 maio 2022.

BOUCHEMAL, K. et al. A new approach to determine loading efficiency of Leu-enkephalin in poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles coated with thiolated chitosan. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Amsterdam, v.18, n.6, p.392-397, 2008. doi: 10.1016/S1773-2247(08)50077-3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1773224708500773> Acesso em: 09 maio 2022.

BRASSEUR, N.; BRAULT, D.; COUVREUR, P. Adsorption of hematoporphyrin onto polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: carrier capacity and drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.70, n.1-2, p.129-135, mar. 1991. doi: 10.1016/0378-5173(91)90172-K. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/037851739190172K>. Acesso em: 07 maio 2022.

BRAMMER, S.P.; TONIAZZO, C.; POERSCH, L. B. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal. **Scientific Communication, Arq. Inst. Biol.** São Paulo-SP, v.82, mai. 2015. doi: 10.1590/1808-1657000192013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/BR9kNBm3frLTYZCMz9h4Qgr/?lang=pt> Acesso em: 10 mai.2022.

CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E.; LIMA, R.M.O.C.; FRANÇA, F. P. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levan. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v.27, n. 4, p. 245-247, jul. 2000. doi: 10.1016/s0141-8130(00)00125-2. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813000001252> Acesso em: 08 maio 2022

CANCINO, J.; MARANGONI, V.S.; ZUCOLOTTO, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Química nova**, São Paulo -SP, v.37, n.3,

jun. 2014. doi: 10.5935/0100-4042.20140086. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/qn/a/dcxWV4RTSSjxDK3SsbdR8rR/abstract/?lang=en> Acesso em: 11 maio 2022

CAVALCANTI, I. D. L. et al. Oncocalyxone A (oncoA) has intrinsic fluorescence? **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v.39, p.102869, set. 2022. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102869. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572100022001570> Acesso em: 05 maio 2022.

CAVALCANTI, I. D. L.; NOGUEIRA, M. C. B. L. Pharmaceutical nanotechnology: which products are been designed Against COVID-19? **Journal of Nanoparticle Research**, Heidelberg, v.22, n.9, p. 276, set. 2020. doi:10.1007/s11051-020-05010-6. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-020-05010-6> Acesso em: 09 maio 2022.

CHAN, J.M.; VALENCIA, P.M.; ZHANG, L.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O.C. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. **Methods in Molecular Biology**, Clifton- NJ, v. 624, p. 163-75, jan. 2010. doi: 10.1007/978-1-60761-609-2_11. Disponível em:
https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-609-2_11 Acesso em: 01 Jun. 2022.

CHAUDHARY, V.; ROYAL, A.; CHAVALI, M.; YADAV, S.K. Advancements in research and development to combat COVID-19 using nanotechnology. **Nanotechnology for Environmental Engineering**, Heidelberg, v.6, p.8, jan. 2021. doi:10.1007/s41204-021-00102-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s41204-021-00102-7> Acesso em: 03 abr. 2022.

CHAUVIERRE, C.; LECLERC, L.; LABARRE, D.; APPEL, M.; MARDEN, M. C.; COUVREUR, P. et al. Enhancing the tolerance of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles with a modular surface design. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.338, p.327-332, jun. 2007. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.01.034. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517307000452> Acesso em: 05 mar. 2022.

CHEN, X.; GAO, H.; PLOEHN, H. J. Montmorillonite–levan nanocomposites with improved thermal and mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v.101, p.565–573, jan. 2014. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.09.073 Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014486171300965X> Acesso em: 05 abr. 2022.

CODEVILLA, C. F.; SILVA, C., B.; MENEZES, C. R.; BARIN, J. S; SILVA, T. M. Incorporação de curcumina em sistemas nanoestruturados: Revisão. **Ciência e Natura**, Santa Maria - RS, v.37, p.152-163, Dez. 2015. doi:10.5902/2179-460x19744 Disponível em:
<https://periodicos.ufsm.br/cienciaenatura/article/view/19744> Acesso em: 03 mar. 2022.

COSTA, M. S. B.; CORREIA, M. F. A. S.; PASCOAL, I. M.; ARAÚJO, J. V. V.; REBOUÇAS, J. S. Avaliação da atividade biológica e citotoxicidade de proteínas alergênicas encapsuladas em nanopartículas poliméricas. Alergenos encapsulados em nanopartículas poliméricas. Apresentação: Pôster. I Congresso das Ciências da Saúde - COINTER – PDVS, 2019. Disponível em: <https://cointer.institutoidv.org/inscricao/pdvs/uploadsAnais2020/AVALIA%C3%87%C3%83O-DA-ATIVIDADE-BIOL%C3%93GICA-E-CITOTOXICIDADE-DE-PROTE%C3%8DNAS-ALERG%C3%8ANICAS-ENCAPSULADAS-EM-NANOPART%C3%8DCULAS-POLIM%C3%89RICAS..pdf> Acesso em: 25 maio 2022.

COUVREUR, P.; KANTE, B.; ROLAND, M.; GUIOT, P.; BAUDUIN, P.; SPEISER, P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, v.31, n.5, p.331-332, set. 1979. doi:10.1111/j.2042-7158.1979.tb13510.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37304/> Acesso em 22 nov. 2021.

CUNHA, P.L.R.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Quím Nova**, São Paulo-SP, v.32, n.3, p. 649-660, mar. 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/6B3tdbxBNNzrvYvZHDKBtXQ/?lang=pt&format=pdf> Acesso em: 05 mai. 2022.

DAI, L.; GAO, G.F. Viral targets for vaccines against COVID-19. **Nat Rev Immunol**, Londres, v.21, n.2, p.73–82, dez. 2021. doi:10.1038/s41577-020-00480-0 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33340022/> Acesso em: 03 mar. 2022.

DALAGNOL, M. **Desenvolvimento de sistemas de liberação nano e microestruturados constituídos de complexos de lecitina e quitosana para a liberação colônica da naringenina**. 2011. 156p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

ELMOWAFY, E. M.; TIBONI, M.; SOLIMAN, M. E. Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles. **J. Pharm. Investig.** Heidelberg, v.49, p.347–380, abr. 2019. doi:10.1007/s40005-019-00439-x. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40005-019-00439-x> Acesso em: 03 mar. 2022.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.26, n.1, p.69-80, jan/mar. 2005. Disponível em: https://www.ibilce.unesp.br/Home/Departamentos/EngeTecAlimentos/Levana_Bacteriana.pdf Acesso em: 05 jun. 2021.

ESKANDARI, Z.; BAHADORI, F.; YENIGUN, V. B.; DEMIRAY, M.; EROGLU, M. S.; KOCYIGIT, A. et al. Levan enhanced the NF- κ B suppression activity of an oral nano PLGA-curcumin formulation in breast cancer treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.189, p.223-231, out. 2021.

doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.08.115 Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34419542/> Acesso em: 05 abr. 2022.

FERREIRA C.T.G. **Nanopartículas poliméricas para inclusão de compostos de origem natural**. 2013. 41p. Monografia (Graduação em Farmácia) - Instituto Federal do Rio de Janeiro Realengo, 2013. Disponível em: [https://revistascientificas.ifrj.edu.br > download](https://revistascientificas.ifrj.edu.br/download) Acesso em: 06 jun. 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. Drug products, including biological products, that contain nanomaterials - Guidance for Industry, 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/drug-products-including-biological-products-contain-nanomaterials-guidance-industry> Acesso em: 04 jun. 2022

GARCIA, F. M. Nanomedicina e terapia de doenças pulmonares. **Avanços médicos**, São Paulo - SP, v.12, n.4, Dez. 2014. doi: 10.1590/S1679-45082014MD3113 Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eins/a/ySqH5pp8nPSdJw3wQxjYFVz/abstract/?lang=pt> Acesso em: 06 mar. 2022.

GERASSI, L. R. M. **Nanoemulsão contendo os fármacos miltefosina e tamoxifeno com possível aplicação para tratamento da leishmaniose**. 2016. 71p. Dissertação (mestrado em farmácia) - Universidade Anhanguera. São Paulo, 2016. Disponível em: <https://docplayer.com.br/75622866-Nanoemulsao-contendo-os-farmacos-miltefosina-e-tamoxifeno-com-possivel-aplicacao-para-tratamento-da-leishmaniose-sao-paulo-2016.html> Acesso em: 05 abr. 2022.

HASHEMI, S.A.. et al. Ultra-sensitive viral glycoprotein detection NanoSystem toward accurate tracing SARS-CoV-2 in biological/non-biological media. **Biosens Bioelectron**, [s. l.], v.171, p.112731, jan. 2021. doi:10. 1016/j.bios.2020.112731 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33075725/> Acesso em: 01 fev. 2022.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v.66, n.17, p.2873-2896, set. 2009. doi: 10.1007/s00018-009-0053-z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19499185/> Acesso em: 06 mar. 2022

HUANG, C.H.; CHEN, C. M.; LEE, Y. D. Synthesis of high loading and encapsulation efficient paclitaxel-loaded poly(n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.338, n.1-2, p.267-275, jun. 2009. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.01.052 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17368981/> Acesso em: 02 jan. 2022.

JÁCOME-JÚNIOR, A. T. **Desenvolvimento de formas lipossomais contendo levana**. 2006. 87p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006. Disponível em: https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/1750/1/arquivo4532_1.pdf Acesso em: 18 out. 2021.

JEANES, A. R.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M. C.; SILMAN, R. W.; KNUSTSON, C. A. Polysaccharides (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL-B 1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. In: Department of Agriculture. *ARS-NC-51, Agriculture Research Service*, Washington, n. 51, p.14, 1976.

JIN, C.; WANG, K.; OPPONG-GYEBO, A.; HU, J. Application of Nanotechnology in Cancer Diagnosis and Therapy - A Mini-Review. **Int J Med Sci**. Australia, v.17, n.18, p.2964-2973, out. 2020. doi:10.7150/ijms.49801 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33173417/> Acesso em: 02 nov. 2021.

KIM, S.J; BAE, P. K.; CHUNG, B.H. Self-assembled levan nanoparticles for targeted breast cancer imaging. **Chem. commun**, Cambridge, v.51, p.107-110, set-nov. 2015. doi:10.1039/C4CC07679F Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25383444/> Acesso em: 02 ago. 2021.

KUMAR, C. S. S. R. Nanotechnology tools in pharmaceutical R&D. **Materials today**, Londres, v.12, n. Supplement 1, p.24-30, 2010. doi:10.1016/S1369-7021(10)70142-5 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702110701425> Acesso em: 11 jun. 2021.

LIMA, L.S.G.S. **Desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos platínicos conjugados a matrizes inócuas**. 2016. 93p. Tese (Doutorado em Inovações Tecnológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE, 2016. Disponível em: <http://www.tede2.ufpe.br:8080/tede2/handle/tede2/7557> Acesso em: 02 ago. 2021

LIRA, M. C. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; NICOLAS, V.; MARSAUD, V.; SILVA, M.P.C.; PONCHEL, G. et al. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v.79, n.1, p.162-170, set. 2011. doi: 10.1016/j.ejpb.2011.02.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641111000798> Acesso em: 08 maio 2021.

LIRA-NOGUEIRA, M. C. B; GIBSON, V. P.; NICOLAS, V.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; VAUTHIER, C. Defining endocytic pathways of fucoidan-coated PIBCA nanoparticles from the design of their surface architecture. **Pharmaceutical Research**, New York, v.39, p.

1135–1150, mar. 2022. doi:10.1007/s11095-022-03202-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-022-03202-4> Acesso em: 08 maio 2022.

LIU, B.; THAYUMANAVAN, S. Substituent Effects on the pH Sensitivity of Acetals and Ketals and Their Correlation with Encapsulation Stability in Polymeric Nanogels. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.139, n. 6, p. 2306-2317, fev. 2017. doi: 10.1021/jacs.6b11181 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28106385/> Acesso em: 06 out. 2021.

MACIEL, J. C. **Síntese e caracterização de partículas de levana – magnetita e sua utilização como matriz para imobilização de tripsina**. 2008. 94p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/1326> Acesso em: 16 out. 2021.

MANTOVAN, J.; BERSANETI, G. T.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; CELLIGOI, M. A. P. C.; MALI, S. Use of microbial levan in edible films based on cassava starch. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v.18, p.31-36, dez. 2018. doi: 10.1016/j.fpsl.2018.08.003 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S221428941830053X> Acesso em: 08 out. 2021.

MEHTA, M.; PRASHER, P.; SHARMA, M.; SHASTRI, M. D.; KHURANA, N.; VYAS, M.; et al. Advanced drug delivery systems can assist in targeting coronavirus disease (COVID-19): A hypothesis. **Medical hypotheses**, New York, v.144, p.110254, nov. 2020. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110254 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33254559/> Acesso em: 06 maio 2021.

MELO, I. R.; PIMENTEL, M. F.; LOPES, C. E.; CALAZANS, G. M. T. Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian journal of Microbiology**, São Paulo - SP, v. 38, p 45-51, 2006. doi: 10.1590/S1517-83822007000100010 Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/ycJjMbMtKZCRQ3GyQHKLzHm/?lang=en> Acesso em: 03 mar. 2021.

MUTLU, E. C.; BAHADORI, F.; BOSTAN, M. S.; SARILMISER, H. K.; ONER, E. T.; EROĞLU, M.S. Halomonas levan-coated phospholipid based nano-carrier for active targeting of A549 lung cancer cells. **European Polymer Journal**, Amsterdam, v.144, p.110239, fev. 2021. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.110239 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001430572031956X> Acesso em: 08 abr. 2022.

NÉMATI, F.; DUBERNET, C.; VERDIÈRE, A. C.; POUPON, M. F.; TREUPEL-ACAR, L.; PUISIEUX, F. et al. Some parameters influencing cytotoxicity of free doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoparticles in sensitive and multidrug resistant leucemic murine cells: incubation time, number of nanoparticles per cell. **International Journal of Pharmaceutics**,

Amsterdam, v.102, n.1-3, p.55-62, fev. 1994. doi: 10.1016/0378-5173(94)90039-6.
Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0378517394900396>
Acesso em: 11 jun. 2021.

NOVOCHIZOL. Formulação de aerossol de COVID-19. 2020. *Online*. Disponível em:
<https://www.novochizol.ch/> Acesso em: 15 set. 2021.

OLIVEIRA, C. L.; SANTOS, C. H. M.; BEZERRA, F. M. M.; BEZERRA, M. M.;
RODRIGUES, L. L. Utilização de adesivos de cianoacrilato em suturas de pele. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo - SP, v.25, n.3, p.573-6, set. 2010. doi:
10.1590/S1983-51752010000300030 Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/rbcp/a/4KZNXSJpKFzsGmhCh7B94Pp/?lang=pt> Acesso em: 05 maio 2021

OOWAKI, H.; MATSUDA, S.; SAKAI, N.; OHTA, T.; IWATA, H.; SADATO, A. et al.
Non-adhesive cyanoacrylate as an embolic material for endovascular neurosurgery.
Biomaterials, Amsterdam, v.21, n. 10, p.1039-1046, mai. 2000. doi: 10.1016/s0142-
9612(99)00278-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10768756/> Acesso em: 02 maio 2021

PALANIKUMAR, L.; AL-HOSANI, S.; KALMOUNI, M.; NGUYEN, V.P.; ALI, L.;
PASRICHA, R. et al. pH-responsive high stability polymeric nanoparticles for targeted
delivery of anticancer therapeutics. **Commun Biol**, Londres, v.3, n.1, p.95, mar. 2020. doi:
10.1038/s42003-020-0817-4 Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s42003-020-0817-4> Acesso em: 08 maio 2021

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JÚNIOR, A.T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-
MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo - SP, v.43, n.4, p.503-514, dez.
2007. doi:10.1590/S1516-93322007000400003. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/rbcp/a/rbPrCJhs8ZZdhqk8WWVfC6N/abstract/?lang=pt> Acesso em:
18 jun. 2021.

PRASAD, M.; LAMBE, U. P.; BRAR, B.; SHAH, I.; MANIMEGALAI J.; RANJAN, K. et
al. Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in
medical sector of the modern world. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v.97,
p.1521-1537, jan. 2018. doi: 10.1016/j.biopha.2017.11.026. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29793315/> Acesso em: 04 maio 2021.

QUEIROZ, E. A. I. F.; FORTES, Z. B.; CUNHA, M. A. A.; SARILMISER, H. K;
BARBOSA, A. M.; ONER, E. T. et al. Levan promotes antiproliferative and pro-apoptotic
effects in MCF-7 breast cancer cells mediated by oxidative stress. **International Journal of
Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.102, p.565-570, set. 2017. doi:

10.1016/j.ijbiomac.2017.04.035 Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813016320657> Acesso em: 06 maio 2021.

REECE, T. B.; MAXEY, T. S.; KRON, I. L. A prospectus on tissue adhesives. **American Journal of Surgery**, New York, v.182, n. (suplementar 2), p.40S-44S, ago. 2001. doi: 10.1016/s0002-9610(01)00742-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11566476/> Acesso em: 06 abr. 2022

REN, F.; CHEN, R.; WANG, Y.; SUN, Y.; JIANG, Y.; LI, G. Paclitaxel-loaded poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticle delivery system to overcome multidrug resistance in ovarian cancer. **Pharmaceutical Research**, New York, v.28, n.4, p.897-906, abr. 2011. doi: 10.1007/s11095-010-0346-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21184150/> Acesso em: 02 jul. 2021.

SANTOS, L. F.; CAVALCANTI, O. A.; CELLIGOI, M. A. P. C. Produção e aplicação de exopolissacarídeos: um enfoque na levana e os potenciais dispositivos. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá-PR, v.4, n.2, p. 254-270, mai-ago. 2011. ISSN 1983-1870. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/256980823_Producao_e_Aplicacao_de_Exopolissacarideos_Um_enfoque_na_levana_e_os_potenciais_dispositivos_de_liberacao_modificada_de_farmacos Acesso em: 02 jun 2022.

SARGI, N.; VAUTHIER, C.; DIDIERLAURENT, A.; THAO, T. X.; DEVISSAGUET, J.P.; COUVREUR, P. Adsorption of Allergen Extracts onto Colloidal Particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v.166, n.2, p.294-301, set. 1994. doi:10.1006/jcis.1994.1298. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021979784712987> Acesso em: 05 maio 2021.

SASKA, S.; GASPAR, A. M. M.; HOCHULI-VIEIRA, E. Adesivos à base de cianoacrilato para síntese de tecido mole. **Investigação Anais. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro -RJ, v.84, n.6, dez. 2009. doi:10.1590/S0365-05962009000600003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/pKjHJscqP3tSLspfv8n46Hx/abstract/?lang=en> Acesso em 11 maio 2021.

SHIN, M. D.; SHUKLA, S.; CHUNG, Y. H.; BEISS, V.; CHAN, S. K.; ORTEGARIVERA, O. A. et al. COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward. **Nat Nanotechnol**, Londres, v.15, n.8, p.646–655, ago. 2020. doi: 10.1038/s41565-020-0737-y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32669664/> Acesso em: 19 maio 2021.

SILVA, A. T. A; CAVALCANTI, I. D. L.; FERNANDES, M. A. L; COIMBRA, C. G. O.; LIMA, G. M. S. Effect of zymomonas mobilis probiotic on cholesterol and its lipoprotein fractions and the intestinal regulation. **Clinical Nutrition**, Oxford, v.39, n.12, p. 3750-3755,

dez. 2020. doi:10.1016/j.clnu.2020.04.002 Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32471645/> Acesso em: 02 jun. 2021.

SILVA, D. L. **Caracterização e emprego de nanopartículas magnéticas revestidas com levana como matriz de purificação de lectinas.** 2015. 93p. Dissertação (Mestrado em Biologia aplicado a saúde) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/17154> Acesso em: 02 mar. 2022.

SILVA, F. D.; COUCEIRO, P. R. C.; FABRIS, J. D.; GOULART, A. T.; KER, J. C. Magnesioferrita e caminho pedogenético de transformação de óxidos de ferro magnéticos em dois perfis de solo derivados de tufito da região do Alto Paranaíba (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa - MG, v.29, n.5, p.763-775, out. 2005. doi: 10.1590/S0100-06832005000500012 Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/rbcs/a/D9pY8vGGnT7CPsSWFkCSHNy/abstract/?lang=pt> Acesso em: 01 jul. 2021.

SINGH, H. Nanotechnology Applications in Functional Foods; Opportunities and Challenges. **Prev Nutr Food Sci.** Pusan, v.21, n.1, p.1-8, mar. 2016. doi: 10.3746/pnf.2016.21.1.1 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27069899/> Acesso em: 05 mar. 2022.

SIQUEIRA, E. C.; REBOUÇAS, J. S.; PINHEIRO, I. O.; FORMIGA, F. R. Levan-based nanostructured systems: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.580, p. 119242, abr. 2020. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119242 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851732030226X> Acesso em: 06 abr. 2022.

SONG, W.; ANSELMO, A. C.; HUANG, L. Nanotechnology intervention of the microbiome for cancer therapy. **Nat. Nanotechnol.**, Londres, v.14, n.12, p.1093–1103, dez. 2019. doi: 10.1038/s41565-019-0589-5 Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41565-019-0589-5> Acesso em: 12 abr. 2022.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados – parte I. **Polímeros**, São Carlos -SP, v.22, 2012. doi: 10.1590/S0104-14282012005000005 Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/po/a/MQ8KgmbmVvgxg75jjmx4DLK/abstract/?lang=pt> Acesso em: 06 jul. 2021.

TAVARES, I. S. **Obtenção e caracterização das nanopartículas de quitosana.** 2011. 56p. Dissertação (Mestrado em química), UFRN- Natal, 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/17651> Acesso em: 08 mar. 2021.

TAVARES, J. L.; CAVALCANTI, I. D. L.; MAGALHÃES, N. S. S.; NOGUEIRA, M. B. C. L. Nanotechnology and COVID-19: quo vadis? **J. Nanopart. Res.**, Londres, v.24, n.3, p.62, mar. 2022. doi:10.1007/s11051-022-05452-0 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35283662/> Acesso em: 06 maio 2022.

THAKHAM, N.; THAWEESEK, S.; TEERAKULKITTIPONG, N.; TRAIOSOT, N.; KAIKAEW, A.; LIRIO, G. A. et al. Structural Characterization of Functional Ingredient Levan Synthesized by *Bacillus siamensis* Isolated from Traditional Fermented Food in Thailand. **International Journal of Food Science**, Londres, v.2020, p.12, jun. 2020. doi.org/10.1155/2020/7352484 Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijfs/2020/7352484/> Acesso em: 14 mar. 2022.

VELAVAN, T. P.; MEYER, C. G. The COVID-19 epidemic. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, [s. l.], v.25, n.3, p. 278–280, mar. 2020. doi:10.1111/tmi.13383. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32052514/> Acesso em: 06 mar. 2022.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, São Carlos - SP, v.20, n.1, 2010. doi: 10.1590/S0104-14282010005000009 Disponível em: <https://www.scielo.br/j/po/a/Hnm4dHq9jxZYhDXXf3G3g8M/?lang=pt> Acesso em: 08 maio 2021.

YADAV, H. K.; ALMOKDAD, A. A.; SUMIA, I. M.; DEBE, M. S. Polymer-based nanomaterials for drug-delivery carriers. **Nanocarriers for Drug Delivery**, Amsterdam, p.531-556, 2019. doi: 10.1016/B978-0-12-814033-8.00017-5 Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/330049863_Polymer-Based_Nanomaterials_for_Drug-Delivery_Carriers Acesso em: 14 mar. 2022

YANG, D. Application of nanotechnology in the COVID19 pandemic. **Int J Nanomed**, Auckland, v.16, p.623–649, jan. 2021. doi:10.2147/IJN.S296383 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33531805/> Acesso em: 15 mar. 2022.

YOO, S.H.; YOON, E. J.; CHA, J.; LEE, H. G. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules.**, Amsterdam, v.34, n.1-2, p.37-41, abr. 2004. doi: Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813004000030> Acesso em: 18 mar. 2022.

ZHANG, Q.; HONKO, A.; ZHOU, J.; GONG, H.; DOWNS, S.N.; VASQUEZ, J.H. et al. Cellular nanosponges inhibit SARS-CoV-2 infectivity. **Nano Lett**, Washington, v.20, n.7, p.5570–5574, jul. 2020. doi: 10.1021/acs.nanolett.0c02278 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32551679/> Acesso em: 11 abr. 2022.

ZHANG, Y.; LI, M.; GAO, X.; CHEN, Y.; LIU, T. Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities. **J Hematol Oncol**, Londres, v.12, p.137, dez. 2019. doi:10.1186/s13045-019-0833-3 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31847897/> Acesso em: 22 abr. 2022

ANEXO A – IS POLYISOBUTYL CYANOACRYLATE NANOPARTICLES A PROMISING NANOSYSTEM?

❖ ARTIGO DE REVISÃO

Is polyisobutyl cyanoacrylate nanoparticles a promising nanosystem?

Iago Dillion Lima Cavalcanti^{1,2}, Andreza Tallyne de Aguiar Silva², Vinícius da Silva Maciel¹, João Lima Tavares², Nereide Stela Santos Magalhães¹, Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira^{1,2}

¹ Instituto Keizo-Asami (iLIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil;

² Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (CAV/UFPE), Recife, Brazil;

**ANEXO B – DEVELOPMENT OF LEVAN-COATED PIBCA
NANOPARTICLES AND THEIR ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY
AGAINST MDA-MB-231 AND B16F12 CELLS**

❖ ARTIGO DA DISSERTAÇÃO

Development of levan-coated PIBCA nanoparticles and their antiproliferative activity against MDA-MB-231 and B16F12 cells

Andreza Tallyne de Aguiar Silva¹, Iago Dillion Lima Cavalcanti^{1,2}, Marcela de Araújo Sobral³, Gláucia Manoella de Souza Lima³, Otilia Deusdênia Loiola Pessoa⁴, Nereide Stela Santos Magalhães¹, Cynthia Gisele Oliveira Coimbra⁵, Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira^{*1,2}

¹ Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (CAV/UFPE), Recife, Brazil;

² Instituto Keizo-Asami (iLIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil;

³ Laboratório Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil;

⁴ Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais II, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil;