



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ALEXANDRE CARREIRA DA CRUZ SOUSA**

**NANOCOMPÓSITO À BASE DE HIDROXIETILAMIDO PARA O CARREAMENTO  
MAGNÉTICO DE ONCOCALIXONA-A E AUMENTO DE PENETRAÇÃO  
DÉRMICA POR MAGNETOFORESE NEGATIVA**

**FORTALEZA**

**2023**

ALEXANDRE CARREIRA DA CRUZ SOUSA

NANOCOMPÓSITO À BASE DE HIDROXIETILAMIDO PARA O CARREAMENTO  
MAGNÉTICO DE ONCOCALIXONA-A E AUMENTO DE PENETRAÇÃO DÉRMICA  
POR MAGNETOFORSE NEGATIVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

Coorientador: Prof. Dr. Yogeshvar N. Kalia.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S696n Sousa, Alexandre Carreira da Cruz.

Nanocompósito à base de hidroxietilamido para o carregamento magnético de oncolixona-a e aumento de penetração dérmica por magnetoforese negativa / Alexandre Carreira da Cruz Sousa. – 2023.  
192 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

Coorientação: Prof. Dr. Yogeshvar N. Kalia.

1. Nanocarreadores magnéticos. 2. Magnetoforese negativa. 3. Nanocápsulas de hidroxietilamido. 4. Penetração transdérmica. 5. SPIONs. I. Título.

CDD 540

---

ALEXANDRE CARREIRA DA CRUZ SOUSA

NANOCOMPÓSITO À BASE DE HIDROXIETILAMIDO PARA O CARREAMENTO  
MAGNÉTICO DE ONCOCALIXONA-A E AUMENTO DE PENETRAÇÃO DÉRMICA  
POR MAGNETOFORSE NEGATIVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química.

Aprovado em: 18/01/2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Yogeshvar N. Kalia (coorientador)  
Université de Genève (UNIGE)

---

Prof. Dr. Juliano Casagrande Denardin  
Universidad de Santiago de Chile (USACH)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

---

Prof. Dr. Antonio Gomes de Souza Filho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A Nelsinho (in memoriam), meu irmão, cúmplice e confidente, melhor amigo e pedaço absoluto de uma eterna e dolorosa saudade, diariamente vencida por um amor imortal. O senhor é teu pastor (Salmos 23:1).

A meu pai (in memoriam), meu herói e maior exemplo de dignidade, retidão de conduta, perseverança e resiliência.

À minha mãe, meu aconchegante reduto de bênçãos eternas, minha primeira bússola moral e meu mais profundo alicerce de valores éticos e humanos.

## AGRADECIMENTOS

Thais, você tem sido mais que uma esposa nesse período tão desafiador. Sempre encontrei em você uma incessante fonte de apoio e incentivo, por vezes, à custa de distâncias e saudades que só nós saberíamos mensurar. Aqui, torno público que você foi a maior impulsionadora para que esse documento e todo esse árduo período fosse iniciado e concluído. Dizia o poeta que o amor só é lindo quando encontramos alguém que nos transforme na melhor versão de nós mesmos. Assim, é a minha melhor versão que te dedica o Céu de Santo Amaro para falar das estrelas e da imensidão do universo em nós.

À Profa. Dra. Nágila Ricardo, por ter sido muito mais que uma orientadora, sempre transbordando dedicação, apoio, incentivo e um irrestrito zelo profissional e pessoal. Professora, muito obrigado por tudo! Terá em mim uma gratidão eterna!

Ao Prof. Dr. Yogeshvar N. Kalia, pelos recursos disponibilizados, apoio científico e parceria internacional que muito contribuíram para esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Juliano Denardin, pelo apoio científico e parceria internacional na disponibilização de recursos instrumentais de análise e caracterização.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite e contribuições prestadas.

Aos amigos Adolfo, Daniel e Pedro pelas contribuições científicas e técnicas.

À Universidade Federal do Ceará – UFC, bem como aos colegas do LabPIM, por todo o apoio nas metodologias, pelo bem estar diário e discussões construtivas, em especial: Rafael, Aiêrta, Débora, Denise, Alessandro, Kamilla, Louhana, Sarah e David.

À Universidade de Genebra e ao Governo Suíço, bem como, aos colegas do Molecular Therapeutics Delivery Group, por todo o apoio, conhecimento compartilhado, apoio nas metodologias, discussões construtivas e pela manutenção de um ambiente de trabalho harmônico e colaborativo, em especial: Laeticia, Jonathan, Si, Leqi, Maria, Gisela, Firdaws, Karen, Martina, Erga, Aditya, Ludovic, Céline and Gavrielle.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE, bem como, aos colegas do *campus* Quixadá, pelo apoio irrestrito e incentivos concedidos para a execução do presente trabalho, em especial: Kamila, Praxedes, Cristiane, Danielle, Guilherme, Mayara, J. Júnior, Cícero, Samuel e Rafael.

Ao povo brasileiro, que custeia a nação através de um perverso modelo tributário incidente no consumo, penalizando demasiada e desproporcionalmente os mais pobres.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”  
(SCHOPENHAUER, 1851, v. 2, p. 115).

## RESUMO

Nanocarreadores magnéticos têm despertado elevado interesse no desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras relacionadas ao direcionamento de biomoléculas através da força gerada por um campo magnético, aumentando a biodisponibilidade de fármacos. Nanocápsulas magnéticas à base de hidroxietilamido foram sintetizadas para o carregamento do bioativo hidrofílico oncoalexina A (onco-A) e sua vetorização pela aplicação de um campo magnético externo, gerando um inédito nanocarreador magnético, cuja síntese por reação de poliadição em miniemulsão inversa, permitiu o encapsulamento simultâneo de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) e do bioativo onco-A, responsáveis, respectivamente, pelo caráter magnético e pela atividade anticancerígena do nanocompósito sintetizado. Por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), observou-se morfologia “core-shell” (casca-núcleo) bem definida e diâmetro médio de 143 nm para as nanocápsulas. A atividade anticancerígena desse nanocompósito foi avaliada *in vitro* mediante determinação da concentração inibitória (IC<sub>50</sub> – 72h) em quatro linhagens de células tumorais humanas: glioblastoma SNB-19 (1,010 µg mL<sup>-1</sup>), carcinoma de cólon HCT-116 (2,675 µg mL<sup>-1</sup>), próstata PC3 (4,868 µg mL<sup>-1</sup>) e leucemia HL-60 (2,166 µg mL<sup>-1</sup>). A toxicidade aguda (96h) e o impacto na atividade locomotora foram avaliados usando zebrafish (*Danio rerio*) como organismo modelo. Assim, o nanocompósito sintetizado neste trabalho exibiu biocompatibilidade (*in vivo*), perfil de liberação prolongada de bioativos, citotoxicidade contra quatro linhagens cancerígenas humanas, além de responder mecanicamente à aplicação de um campo magnético externo, gerando um compósito inédito com perspectivas terapêuticas promissoras no campo da vetorização magnética de bioativos. Adicionalmente, avaliou-se o efeito da aplicação de um campo magnético na penetração transdérmica de fármacos (direcionada ou não ao folículo piloso) por magnetoforese negativa, um estudo inédito. Demonstrou-se que a presença de um campo magnético intensificou a penetração de fluoresceína e adapaleno na pele em até 340%, em média, quando comparada à penetração passiva. Embora o mecanismo de intensificação da penetração não seja ainda elucidado, foi possível demonstrar que esse aumento de penetração ocorre não somente por via folicular, atuando também por vias de penetração transcelular e/ou intercelular do estrato córneo.

**Palavras-chave:** nanocarreadores magnéticos; magnetoforese negativa; oncoalexina A; nanocápsulas de hidroxietilamido; SPIONs; penetração transdérmica.



## ABSTRACT

Magnetic nanocarriers have been adopted as an innovative therapeutic strategy, enabling drug targeting through magnetophoresis on different kinds of therapies, which can improve drug bioavailability. Starch-based magnetic nanocapsules were synthesized for the targeted delivery of a hydrophilic bioactive called oncocalyxone A (onco-A) through the application of an external magnetic field. The synthesis by inverse miniemulsion technique allowed the co-encapsulation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) and onco-A into the same nanostructure, generating a magnetic behavior and anticancer activity, respectively, for the synthesized nanocomposite. The synthesized nanocapsules exhibited a “core-shell” morphology and an average diameter of 143 nm. This nanocomposite showed potential anticancer activity ( $IC_{50} - 72h$ ) against four human tumor cell lines: glioblastoma SNB-19 ( $1.010 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), colon carcinoma HCT-116 ( $2.675 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), prostate PC3 ( $4.868 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and leukemia HL-60 ( $2.166 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). *In vivo* acute toxicity (96h) and locomotor activity were evaluated in a zebrafish (*Danio rerio*) model. Thus, the synthesized nanocomposite exhibited *in vivo* biocompatibility, prolonged drug release profile, *in vitro* antitumor activity, and also responded to an applied magnetic field, generating a promising compound for magnetic vectorization of drugs. Additionally, for the first time, it was evaluated the effect of a magnetic field on the transdermal drug penetration (targeted, or not, to the hair follicle by negative magnetophoresis), demonstrating an average of up to 340% higher skin penetration of adapalene or fluorescein, under magnetophoresis, when compared to the passive penetration. Furthermore, although the mechanism of penetration enhancement has not yet been elucidated, it was evidenced that this penetration increase occurs not only through the follicular pathway, but also through transcellular and/or intercellular routes through the stratum corneum.

**Keywords:** magnetic nanocarriers; negative magnetophoresis; oncocalyxone A; hydroxyethyl starch nanocapsules; superparamagnetic iron oxide nanoparticles; transdermal drug penetration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação estrutural dos componentes do amido (amilose e amilopectina) .....	21
Figura 2 -	Representação estrutural do hidroxietilamido (cadeias de amilose e amilopectina substituídas por grupos hidroxietil em posições C2 e C6) ...	22
Figura 3 -	Representação de ferrofluido aquoso composto por nanopartículas de magnetita superparamagnéticas visualizadas por TEM .....	23
Figura 4 -	Representação das interações envolvidas na funcionalização da superfície das nanopartículas de magnetita ( $Fe_3O_4$ ) por íons citrato (imagens fora de escala) .....	24
Figura 5 -	Comparativo entre o comportamento ferromagnético (com histerese – setas azuis) e superparamagnético (setas pretas) .....	25
Figura 6 -	Estudo sobre hipertermia magnética como estratégia terapêutica anticâncer .....	26
Figura 7 -	Representação de direcionamento magnético de carreadores de fármacos pela aplicação de um campo magnético .....	28
Figura 8 -	Estudo sobre magnetoforese como um método físico de direcionamento de fármacos .....	29
Figura 9 -	Representação esquemática de magnetoforese positiva (a) e negativa (b)	30
Figura 10 -	Estrutura molecular da quinona oncocalixona A, extraída da espécie <i>Auxemma Oncocalyx</i> .....	31
Figura 11 -	Esquema representativo das etapas de síntese de nanopartículas magnéticas de $Fe_3O_4@$ citrato na forma de ferrofluido aquoso .....	36
Figura 12 -	Esquema representativo das etapas de síntese do nanocompósito magnético de HES e magnetita, carreado com oncocalixona A .....	37
Figura 13 -	Padrões de difração de raios-X das nanopartículas de $Fe_3O_4$ e $Fe_3O_4@$ citrato sintetizadas pelo método de coprecipitação .....	43
Figura 14 -	Medições espectroscópicas de FTIR para: a) $Fe_3O_4$ (linha preta), $Fe_3O_4@$ citrato (linha azul) e citrato de sódio (linha verde) .....	44
Figura 15 -	Imagens de TEM com histogramas de distribuição de tamanho de partícula para: a) $Fe_3O_4$ não revestido e b) $Fe_3O_4@$ citrato .....	45
Figura 16 -	Microscopia Eletrônica de Transmissão de nanopartículas de magnetita funcionalizadas com citrato .....	45

Figura 17 -	Representação do processo de formação das nanocápsulas poliméricas de HES por meio de uma reação interfacial em miniemulsão inversa .....	46
Figura 18 -	Representação ilustrativa da formação do nanocompósito magnético carregado com bioativo onco-A e SPIONs (imagens fora de escala) .....	47
Figura 19 -	Medições espectroscópicas de FTIR para: HES livre (linha preta), nanocompósito magnético de HES carregado com onco-A (linha cinza) e onco-A livre (linha rósea) .....	48
Figura 20 -	Cromatograma de Permeação em Gel para o hidroxietilamido (HES) .....	49
Figura 21 -	Espectro $^{13}\text{C}$ -NMR para hidroxietilamido em $\text{D}_2\text{O}$ .....	49
Figura 22 -	Imagens de TEM com histograma de distribuição de tamanho de partícula de nanocompósitos carregados com onco-A e SPIONs (linha vermelha corresponde à distribuição gaussiana) .....	50
Figura 23 -	Distribuição de diâmetro hidrodinâmico por DLS para os nanocompósitos magnéticos carregados com onco-A .....	51
Figura 24 -	Histereses magnéticas a 300 K para a) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (linha preta) e $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato (linha azul); b) Nanocompósito magnético carregado com onco-A (linha vermelha); (Inserido nos painéis: vista ampliada da região do pequeno campo de -400 a 400 Oe) .....	52
Figura 25 -	Visualização macroscópica de a) nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato na presença de um campo magnético externo; b) nanocápsulas magnéticas sem onco-A; c) nanocápsulas magnéticas sem onco-A sob um campo magnético externo; d) nanocápsulas magnéticas com onco-A na presença de um campo magnético externo .....	53
Figura 26 -	a) Varreduras de absorção para onco-A em diferentes concentrações em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 7,4) a 310 K; b) curva de calibração para [onco-A] em 282nm; c) perfil de liberação de onco-A das nanocápsulas, onco-A remanescente (não liberada) e onco-A (bioativo livre) em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 7,4) a 310 K; d) ampliação do perfil de liberação entre 1 a 6 horas para onco-A liberada e remanescente .....	54
Figura 27 -	a) Perfil de liberação (linha preta) e remanescente (linha vermelha) até 72 h de experimento em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 7,4) a 310 K; b) gráfico de $\log(\text{massa onco-A})$ vs tempo; c) Gráfico de massa de onco-A vs $\log(\text{tempo})$ ; d) Gráficos de $\log(\text{massa onco-A})$ vs $\log(\text{tempo})$ .....	55

Figura 28 -	Atividade antiproliferativa de onco-A livre e encapsulada contra quatro linhagens tumorais humanas avaliada pelo ensaio MTT em 72h .....	57
Figura 29 -	a) Representação do tratamento oral realizado em <i>zebrafish</i> ; b) representação de teste de campo aberto (atividade locomotora); c) Efeito das formulações na atividade locomotora de <i>zebrafish</i> adulto: Naive: animais não tratados. Controle: solução SDS 1mg/mL (sem nanocompósito) em água destilada (20 µL) .....	59
Figura 30 -	Corte histológico da pele humana .....	62
Figura 31 -	Métodos ativos de penetração transdérmica de fármacos .....	64
Figura 32 -	Etapas do processamento de pele suína .....	67
Figura 33 -	Adaptação de células de Franz para ensaios de penetração transdérmica .	68
Figura 34 -	Biópsia de discos de pele de 1mm com e sem unidade pilosebácea (PSU) .....	69
Figura 35 -	Obtenção de imagens de CLSM .....	70
Figura 36 -	Penetração transdérmica de fluoresceína por nanocápsulas de HES .....	72
Figura 37 -	Quantificação de fluoresceína em discos de pele de 0,785cm <sup>2</sup> .....	73
Figura 38 -	Quantificação de fluoresceína em biópsias de 1mm .....	74
Figura 39 -	Acompanhamento espectroscópico da transposição de fluoresceína para o meio receptor durante 24h de penetração transdérmica (a). Escala ampliada das 12h iniciais (b). Curva de calibração utilizada no cálculo das concentrações (c) .....	76
Figura 40 -	Acompanhamento espectroscópico da transposição de fluoresceína para o meio receptor durante 24h de penetração transdérmica .....	77
Figura 41 -	Micrografias de CLSM para secções de pele (estrato córneo voltado para o lado esquerdo) submetidas a 24h de penetração transdérmica: controle branco (sem fluoresceína) (a, b); penetração passiva (c, d); magnetoforese (e, f) .....	77
Figura 42 -	Quantificação de ADA em discos de pele de 0,785cm <sup>2</sup> .....	79
Figura 43 -	Quantificação de adapaleno em biópsias de 1mm: sob presença e ausência de campo magnético (n = 5) (a); apenas sob presença de campo magnético (n = 13) (b) .....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Adapaleno
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
CA	Ácido Cítrico
CLSM	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
DAPI	4,6-diamino-2-fenil-indol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DS	Grau de Substituição
FDA	Food and Drug Administration
GBM	Glioblastoma Multiforme
Hc	Campo Coercitivo
HES	Hidroxietilamido
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória 50%
LC <sub>50</sub>	Concentração Letal 50%
MRI	Imagem de Ressonância Magnética
Ms	Magnetização de Saturação
MSNs	Nanopartículas de Sílica Mesoporosa
MM	Massa Molecular
Onc-A	Oncocalixona A
PBS	Solução Salina de Tampão Fosfato
PSU	Unidade Pílossebácea
RNA	Ácido Ribonucleico
SC	Etrato córneo
SPIONs	Nanopartículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TPGS	Succinato de D- $\alpha$ -tocoferol polietilenoglicol
VSM	Magnetometria de Amostra Vibrante

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CAPÍTULO I - NANOCOMPÓSITOS MAGNÉTICOS NA INOVAÇÃO DE ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS: UMA CONTEXTUALIZAÇÃO SOBRE RECENTES AVANÇOS .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>Apresentação.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3</b>	<b>Fundamentação teórica.....</b>	<b>19</b>
<i>1.3.1</i>	<i>Estratégias de carreamento de fármacos.....</i>	<i>19</i>
<i>1.3.2</i>	<i>Nanocápsulas poliméricas de hidroxietilamido .....</i>	<i>20</i>
<i>1.3.3</i>	<i>Nanopartículas superparamagnéticas .....</i>	<i>22</i>
<i>1.3.4</i>	<i>Hipertermia magnética.....</i>	<i>25</i>
<i>1.3.5</i>	<i>Magnetoforese .....</i>	<i>27</i>
<i>1.3.6</i>	<i>Oncocalixona A .....</i>	<i>30</i>
<b>1.4</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>32</b>
<i>1.4.1</i>	<i>Geral.....</i>	<i>32</i>
<i>1.4.2</i>	<i>Específicos .....</i>	<i>32</i>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO II - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO À BASE DE HIDROXIETILAMIDO PARA APLICAÇÕES BIOLÓGICAS NO DIRECIONAMENTO MAGNÉTICO E LIBERAÇÃO PROLONGADA DE ONCOCALIXONA A ..</b>	<b>33</b>
<b>2.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2</b>	<b>Metodologia.....</b>	<b>35</b>
<i>2.2.1</i>	<i>Materiais .....</i>	<i>35</i>
<i>2.2.2</i>	<i>Síntese de nanopartículas de magnetita com superfície modificada por íons citrato (<math>Fe_3O_4@citrato</math>).....</i>	<i>35</i>
<i>2.2.3</i>	<i>Síntese de nanocápsulas magnéticas à base de hidroxietilamido (HES) carregadas com oncocalixona.....</i>	<i>36</i>

2.2.4	<i>Estudos de liberação de onco-calixona A</i> .....	38
2.2.5	<i>Eficiência de encapsulação de onco-A</i> .....	38
2.2.6	<i>Citotoxicidade in vitro (determinação de IC50)</i> .....	39
2.2.7	<i>Toxicidade aguda e atividade locomotora in vivo</i> .....	39
2.2.8	<i>Procedimentos de caracterização</i> .....	40
2.2.8.1	Difração de raio-X .....	40
2.2.8.2	Ressonância magnética nuclear (NMR) .....	40
2.2.8.3	Cromatografia de permeação em gel (GPC) .....	41
2.2.8.4	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) .....	41
2.2.8.5	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) .....	41
2.2.8.6	Magnetometria de amostra vibrante (VSM) .....	41
2.2.8.7	Espalhamento dinâmico de luz (DLS) .....	42
2.2.8.8	Análise Termogravimétrica (TGA) .....	42
2.3	<b>Resultados e discussão</b> .....	42
2.3.1	<i>Obtenção dos SPIONs (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@citrate)</i> .....	42
2.3.2	<i>Obtenção do nanocompósito magnético</i> .....	46
2.3.3	<i>Estudos de liberação</i> .....	53
2.3.4	<i>Ensaio biológico</i> .....	56
3	<b>CAPÍTULO III - MAGNETOFORESE COMO ESTRATÉGIA DE DIRECIONAMENTO MAGNÉTICO DE FÁRMACOS EM APLICAÇÕES TÓPICAS</b> .....	60
3.1	<b>Apresentação</b> .....	61
3.2	<b>Introdução</b> .....	62
3.2.1	<i>Penetração transdérmica de fármacos</i> .....	62
3.2.2	<i>Adapaleno em micelas poliméricas de TPGS</i> .....	65
3.3	<b>Metodologia</b> .....	66
3.3.1	<i>Materiais</i> .....	66

3.3.2	<i>Síntese das formulações</i> .....	66
3.3.2.1	Nanocápsulas poliméricas carregadas com fluoresceína.....	66
3.3.2.2	Micelas de TPGS carregadas com ADA .....	66
3.3.3	<i>Processamento de pele</i> .....	67
3.3.4	<i>Experimentos de penetração transdérmica</i> .....	67
3.3.5	<i>Biópsia de discos de pele de 1mm com e sem unidade pilosebácea (PSU)</i> .....	69
3.3.6	<i>Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)</i> .....	69
3.3.7	<i>Espectroscopia de fluorescência</i> .....	70
3.4	<b>Resultados obtidos e discussão</b> .....	71
3.4.1	<i>Nanocápsulas poliméricas de HES carregadas com fluoresceína</i> .....	71
3.4.2	<i>Micelas poliméricas de TPGS carregadas com adapaleno</i> .....	78
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	82
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	83
	<b>APÊNDICE A - ENGLISH VERSION</b> .....	96



**1 CAPÍTULO I - NANOCOMPÓSITOS MAGNÉTICOS NA INOVAÇÃO DE  
ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS: UMA CONTEXTUALIZAÇÃO SOBRE  
RECENTES AVANÇOS**

## 1.1 Apresentação

O presente trabalho aborda, inicialmente, a síntese de um inédito nanocompósito magnético voltado para aplicações biotecnológicas, visando à inovação e ampliação de estratégias terapêuticas. Na síntese desse nanocompósito, hidroxietilamido foi utilizado como matriz polimérica precursora. Nanopartículas superparamagnéticas de magnetita com superfície funcionalizada por íons citrato ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{cit}$ ) foram empregadas na forma de ferrofluido magnético para incorporação de propriedades magnéticas a esse produto. Como bioativo hidrofílico modelo, utilizou-se a onocalixona A, uma quinona extraída da espécie *Auxemma Oncocalyx*, planta denominada popularmente como “pau branco”, nativa da Caatinga, no nordeste brasileiro.

Posteriormente, em colaboração internacional com a Universidade de Genebra, aborda-se o efeito da aplicação de um campo magnético no direcionamento de nanocarreadores, avaliando-se, de maneira inédita, a intensificação da penetração de fármacos na superfície da pele, por vias foliculares ou não, um fenômeno denominado de magnetoforese, que representa um inovador espectro de possibilidades terapêuticas mediante o uso de nanocarreadores magnéticos.

Para fins didáticos, a divisão deste trabalho está posta em três capítulos:

No primeiro, realiza-se uma contextualização sobre o emprego da nanotecnologia aplicada às ciências biomédicas, abordando-se os fundamentos teóricos pertinentes à execução deste trabalho e apresentando-se os seus objetivos. O segundo capítulo dedica-se aos fundamentos metodológicos dos procedimentos experimentais, bem como, à discussão dos resultados obtidos na síntese, caracterização e ensaios biológicos realizados para o inédito nanocompósito magnético sintetizado neste trabalho. Por fim, o terceiro capítulo discorre sobre experimentos de penetração e quantificação de fármacos na pele, sob aplicação de campo magnético (magnetoforese negativa), e em comparação com a penetração passiva (ausência de campo magnético), considerando, ainda, a penetração direcionada ao folículo piloso.

Espera-se, dessa forma, que o presente trabalho venha a contribuir com o emprego da química nanotecnológica em benefício de soluções terapêuticas para as ciências biomédicas.

## 1.2 Introdução

O advento da nanotecnologia tem impulsionado o surgimento de inovações terapêuticas contra doenças desafiadoras. Estratégias envolvendo a aplicação de nanopartículas multifuncionais têm se mostrado promissoras no combate ao câncer, possibilitando ancoragem de anticorpos, ácidos nucleicos, vitaminas e carboidratos na superfície de nanocarreadores (GREWAL et al., 2021).

Uma variedade de medicamentos baseados em nanopartículas, como doxorrubicina lipossomal (Doxil®) e nanocompósitos de albumina (Abraxane®), já têm sido adotados em uso clínico, enquanto outras centenas de candidatos continuam sendo avaliados pela Food and Drug Administration (FDA) (GAO et al., 2021). Como exemplo, grafeno e seus óxidos têm sido investigados no combate ao câncer como carreadores de vários tipos de fármacos, anticorpos, proteínas, DNA e RNA (JAIN et al., 2021). O uso de nanopartículas de ouro (AuNPs) tem possibilitado o desenvolvimento de várias plataformas nanométricas para a entrega de radioisótopos clinicamente relevantes para terapia e diagnóstico de câncer (SILVA; CAMPELLO; PAULO, 2021). Nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs) têm atuado como plataformas de carregamento de fármacos melhorando a estabilidade, eficiência na administração de doses e liberação dos bioativos (MOODLEY; SINGH, 2021).

Nesse sentido, formulações teranósticas exploram a atuação simultânea de procedimentos diagnósticos e terapêuticos (WANG et al., 2019), desempenhando elevada eficiência em tratamentos anticâncer. Uma única nanoplataforma pode servir como agente de contraste em imagem de ressonância magnética (MRI) e, simultaneamente, entregar agentes quimioterápicos ao tecido alvo. Assim, nanocompósitos teranósticos ganham destaque por seu desempenho, já que as pequenas dimensões permitem que eles penetrem barreiras biológicas e alcancem alta eficiência terapêutica (HADADIAN et al., 2021; JI et al., 2021).

Nanopartículas de óxido de ferro, especialmente nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), já são utilizadas na veiculação de fármacos de platina, em uma estratégia terapêutica na qual nanocarreadores de complexos de platina, não apenas reduzem efeitos colaterais, ao inativarem temporariamente os fármacos durante o transporte no sangue, mas também aumentam a absorção do tumor por carregamento direcionado do fármaco (DUSZYŃSKA et al., 2020; JIA et al., 2021).

Especificamente, no campo dos nanocompósitos magnéticos, nanopartículas de magnetita vêm consolidando-se como promissoras candidatas para incorporação de propriedades magnéticas em formulações terapêuticas, uma vez que essas nanopartículas já são seguramente empregadas em diversas formulações aprovadas pela FDA para uso clínico em humanos de todos os níveis de função renal, tais como Feraheme® (NDC 59338-775-10), Ferumoxytol® (NDC 0781-3154-01) e INFeD® (NDC 0023-6082-10) (AJALLI et al., 2022; COLBERT et al., 2022; ESLAMI et al., 2022).

Dessa forma, evidenciando-se um contexto global de intensa demanda por materiais nanotecnológicos que promovam benefícios terapêuticos, o presente trabalho busca contribuir para o desenvolvimento de um novo nanocompósito magnético com potencial para aplicações biomédicas voltadas ao transporte magneticamente vetorizado de fármacos. Na síntese desse inédito nanocompósito, utilizou-se hidroxietilamido como matriz polimérica precursora para encapsular, simultaneamente, nanopartículas de magnetita e um bioativo hidrofílico com propriedades anticâncer, denominado de oncolixona A, resultando em uma nanocápsula magnética de natureza polimérica e morfologia “core-shell” para estratégias de drug delivery. Posteriormente, também se avaliou qualitativa e quantitativamente o efeito da aplicação de um campo magnético na penetração de fármacos na pele quando carregados por nanocarreadores magnéticos.

### 1.3 Fundamentação teórica

#### 1.3.1 Estratégias de carreamento de fármacos

Estudos relativos a aplicações da nanomedicina em tratamentos quimioterápicos sugerem que, normalmente, apenas cerca de 0,7% de doses administradas por via intravenosa atingem especificamente o tumor, sugerindo que a baixa eficiência de entrega de drogas ao tecido alvo é um importante obstáculo à atuação clínica da nanomedicina (JIANG et al., 2017). Dessa forma, grande parte da medicação aplicada em um paciente se dispersa por diferentes regiões do organismo, possibilitando o surgimento de múltiplos efeitos colaterais. Para superar ou minimizar esses obstáculos, diversas estratégias vêm sendo constantemente desenvolvidas com os avanços nanotecnológicos na produção de biomateriais à base de polissacarídeos (MENG et al., 2022).

Uma grande variedade de plataformas, como microesferas de quitosana carregadas com docetaxel (KANOJIA et al., 2020; WANG; XU; ZHOU, 2014), nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com quinonas (DE ALMEIDA et al., 2017; DE MOURA et al., 2020), micelas e dendrímeros carregados com cianinas e antocianinas (LI et al., 2021), lipossomas (SHUKLA; GUPTA, 2020), bem como nanocápsulas poliméricas (DA SILVA et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2020) vêm sendo desenvolvidas para uma otimização no carreamento e entrega mais eficiente de fármacos, possibilitando uma atuação mais concentrada do princípio ativo no tecido alvo.

Lipossomas, vesículas constituídas por uma bicamada lipofílica e um núcleo hidrofílico, oferecem aplicação como veículo de transporte para agentes hidrofílicos e lipofílicos, aumentando significativamente a eficácia de entrega e a segurança de agentes quimioterápicos em comparação com suas formulações livres (não lipossomais). Em recentes casos clínicos, a doxorrubicina (DOX) tem sido o agente quimioterápico mais explorado para avaliação de diferentes aplicações lipossomais, demonstrando excelentes resultados nos estágios cancerígenos mais avançados, em que a remoção cirúrgica não é mais uma opção viável (CHENG et al., 2022; MAKWANA et al., 2021; SOLEIMANI et al., 2022).

Nanoemulsões têm demonstrado elevada eficiência na proteção oxidativa, veiculação e entrega de fármacos como Clorambucil e TOCOSOL™, potencializando

sua biodisponibilidade e aprimorando resultados contra carcinomas de mama e de ovário (SINGH et al., 2017). Uma vez que diversos fármacos extraídos da natureza possuem natureza lipofílica, sistemas de administração de drogas em nanoemulsão representam uma ferramenta promissora para melhorar a biodisponibilidade desses compostos (KUMAR et al., 2019).

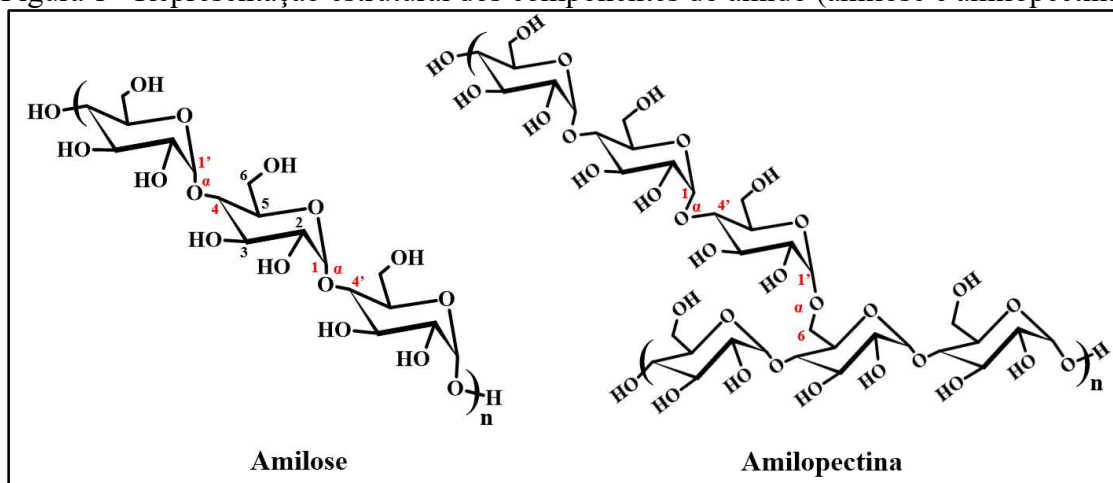
Nanocarreadores magnéticos específicos para veiculação de proteínas, desenvolvidos à base de nanopartículas magnéticas coordenadas a óxido de grafeno e quitosana, tem diminuído a instabilidade oxidativa e degradação no transporte proteico, contribuindo no combate a uma ampla variedade de doenças como câncer, distúrbios metabólicos e doenças autoimunes (REBEKAH et al., 2021).

Dessa forma, evidencia-se, pelo exposto, a existência de uma crescente busca por estratégias que visam o aperfeiçoamento da entrega de bioativos a um tecido alvo, contribuindo na obtenção de melhores resultados terapêuticos. Nesse sentido, novos conceitos de nanocompósitos multifuncionais baseados em estruturas orgânicas de morfologia “core-shell” vêm sendo considerados como bastante promissores para o desenvolvimento de novas plataformas carreadoras, buscando alta área de superfície, alta capacidade de carregamento de fármacos e baixa toxicidade (KRASKOUSKI et al., 2022; ZHAO et al., 2021).

### ***1.3.2 Nanocápsulas poliméricas de hidroxietilamido***

O amido consiste em uma mistura de amilose [ $\alpha(1,4)$ -D-glicopiranoose] linear, e amilopectina [ $\alpha(1,4)$ -D-glicopiranoose ramificada com  $\alpha(1,6)$ -D-glicopiranoose] (KHAN; AHMAD, 2013), conforme ilustrado na Figura 1. A proporção entre esses dois polissacarídeos varia de acordo com a origem botânica do amido. Normalmente, 20 a 35% de amilose é encontrada no amido. Amidos “cerosos” podem conter menos de 15% de amilose e amidos com alto teor de amilose podem ultrapassar 40% deste componente (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Diversos estudos sugerem o desenvolvimento de sistemas à base de amido para administração de fármacos antineoplásicos (TORLOPOV et al., 2020; XU et al., 2018; ZHAO et al., 2017).

Figura 1 - Representação estrutural dos componentes do amido (amilose e amilopectina)



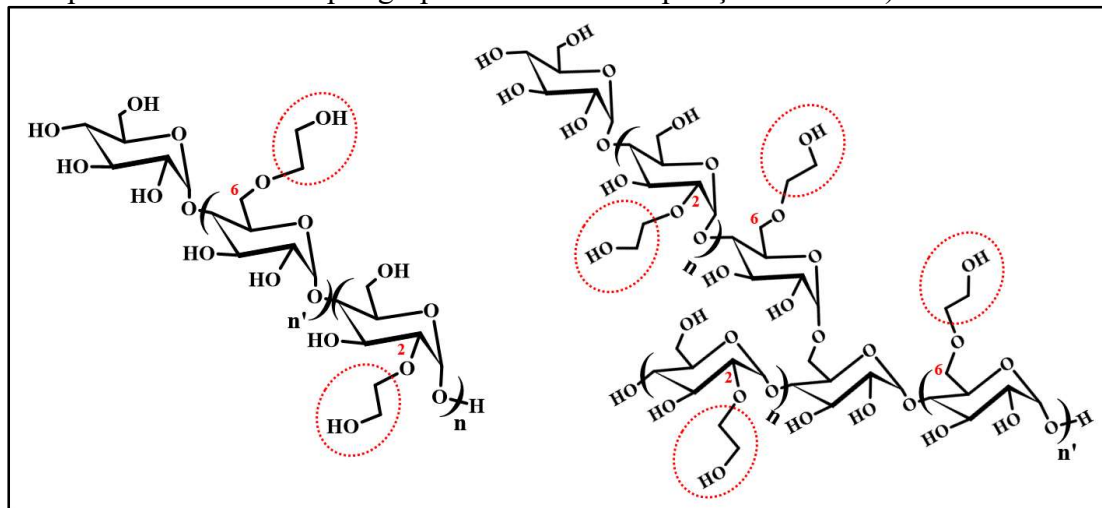
Fonte: Elaborada pelo autor.

O potencial para aplicações biomédicas do amido deve-se, principalmente, a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. No entanto, especialmente no que se refere à liberação prolongada de fármacos, o amido pode não ser uma opção apropriada, já que é rapidamente biodegradado, podendo liberar o bioativo muito rapidamente. Estrategicamente, supera-se essa limitação modificando sua estrutura para alcançar melhores propriedades no seu emprego para liberação prolongada (KANG et al., 2015; YU et al., 2021a). Hidroxietilamido (HES), por exemplo, é mais hidrossolúvel do que o amido, exibe maior estabilidade à hidrólise e maior meia-vida quando *in vivo* (PALEOS; SIDERATOU; TSIOURVAS, 2017).

HES é um polímero derivado do amido em que grupos hidroxila das posições C2 ou C6 são parcialmente funcionalizados por grupos hidroxietila, conforme representado na Figura 2 (KANG et al., 2015; PEREIRA et al., 2020; VON ROTEN et al., 2006). É comumente utilizado com segurança em medicamentos para o tratamento de choque hipovolêmico e isquemia cerebral (BAIER et al., 2012). HES melhora a microcirculação dentro do organismo, devido à regulação da viscosidade do sangue. Seu tempo de retenção no plasma sanguíneo, fígado, pulmões e baço é significativamente maior em comparação com o amido. Seu tempo de eliminação renal também pode ser prolongado com o aumento do grau de substituição molar do grupo hidroxietila em sua cadeia (BAIER et al., 2012). Depois de ser enzimaticamente hidrolisado no sangue pela α-amilase para uma massa molecular (MM) menor que o limite de depuração renal (~70 kDa), pode ser excretado pela urina (WANG et al., 2021). Cada diferente tipo de HES é caracterizado pela sua massa molecular, grau de substituição (DS) e a proporção de substituições entre os carbonos C2 e C6 (HITOSUGI et al., 2007; KANG et al., 2015).

Substituições na posição C3 podem ser raramente observadas (TORLOPOV et al., 2020). Tais características impactam diretamente em uma série de propriedades do polímero, como solubilidade em água, estabilidade da solução, e mais importante, tempo da meia-vida *in vivo* (BESHEER et al., 2007).

Figura 2 - Representação estrutural do hidroxietilamido (cadeias de amilose e amilopectina substituídas por grupos hidroxietil em posições C2 e C6)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Aplicações biológicas do hidroxietilamido em carregamento de fármacos incluem formação de micelas e vesículas carregadas com doxorubicina (DOX), dicitclohexil-carbodiimida e dimetilaminopiridina (YU et al., 2021a; ZHAO et al., 2017). Nanocápsulas e hidrogéis baseados em HES também foram avaliados em sistemas de carregamento de fármacos e proteínas (PALEOS; SIDERATOU; TSIOURVAS, 2017). Nanocápsulas poliméricas à base de HES foram formadas a partir de nanoemulsões múltiplas (Óleo/Água/Óleo), com potencial para carregamento de bioativos hidrofílicos e/ou lipofílicos (PEREIRA et al., 2020).

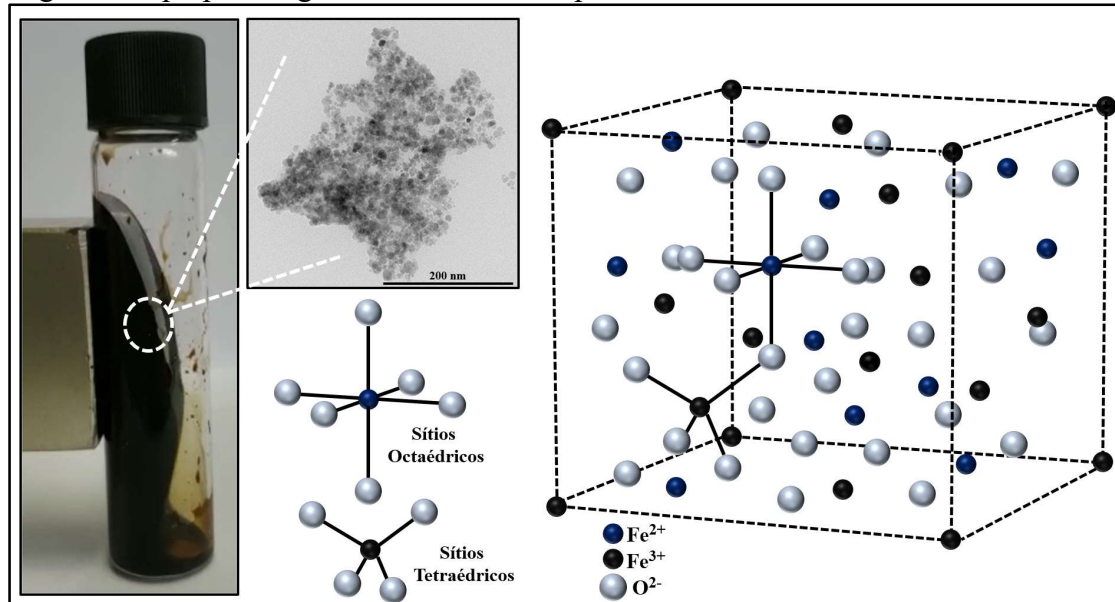
### 1.3.3 Nanopartículas superparamagnéticas

SPIONs (do inglês *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*) são partículas cristalinas em escala nanométrica, geralmente óxidos de ferro como a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou maguemita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) (LI et al., 2020), que podem ter suas superfícies modificadas para aquisição de estabilidade em meio aquoso, conforme ilustrado a seguir na Figura 3. Nanopartículas de magnetita constituem uma das opções mais utilizadas para fins terapêuticos, possuindo sítios de coordenação tetraédrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e octaédrica ( $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$ ) em sua estrutura cristalina. A funcionalização de superfície é comumente realizada com ácidos orgânicos ou polímeros hidrofílicos biocompatíveis,



como polietilenoglicol ou polissacarídeos variados (RAMAZANOV; KARIMOVA; SHIRINOVA, 2021).

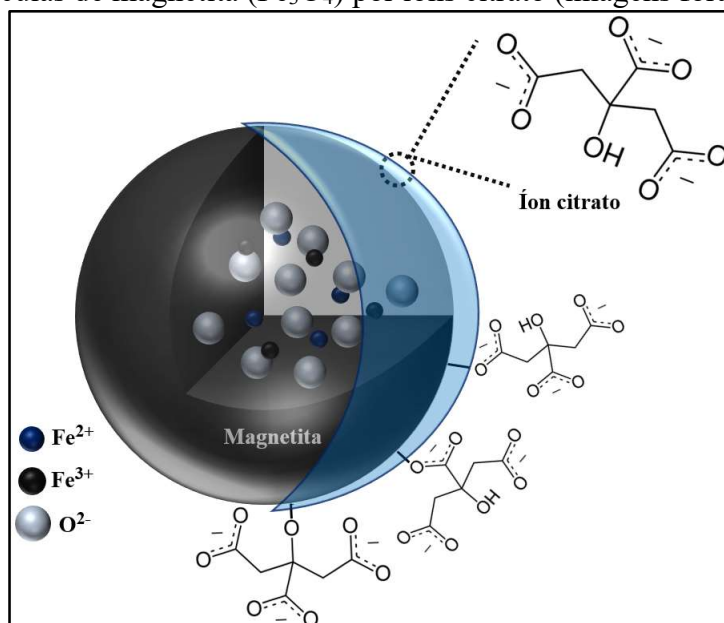
Figura 3 - Representação de ferrofluido aquoso composto por nanopartículas de magnetita superparamagnéticas visualizadas por TEM



Fonte: Elaborada pelo autor.

O ácido cítrico (CA) é um ligante amplamente utilizado para modificar a superfície de nanopartículas de óxido de ferro, onde os grupos COOH ou C–OH do CA tornam o complexo solúvel em água e estável para aplicações biológicas. A molécula de CA possui dois grupos COOH terminais, um grupo COOH central e um grupo C–OH, que podem ser todos ativos no recobrimento de óxidos de ferro por meio de coordenações Fe–OH, conforme ilustrado a seguir na Figura 4 (ZHANG et al., 2019a).

Figura 4 - Representação das interações envolvidas na funcionalização da superfície das nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) por íons citrato (imagens fora de escala)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Devido a sua morfologia, tamanho (geralmente por volta de 20 nm) e características de superfície, SPIONs também podem ser conjugados com fármacos e anticorpos antitumorais, atuando a nível celular e injetando partículas de forma direcionada no tecido alvo, o que amplia significativamente suas aplicações medicinais (DULIŃSKA-LITEWKA et al., 2019).

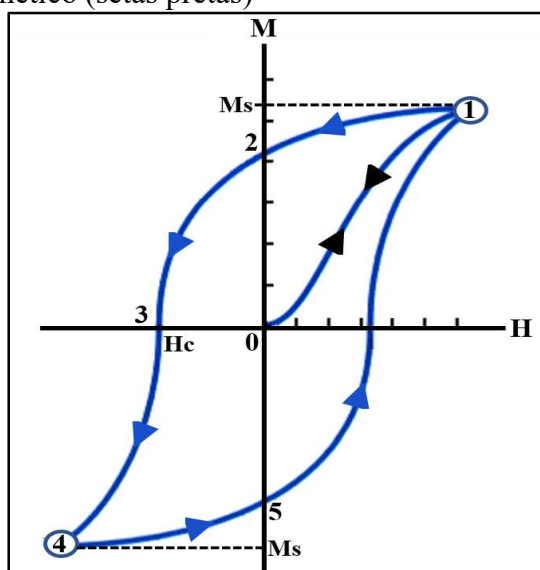
Em câncer ósseo, por exemplo, as terapias mais modernas ainda encontram grandes adversidades na administração adequada de medicamentos anticâncer ao osso, porque as características únicas desse tecido reprimem a eficiência de penetração dos agentes terapêuticos. O desenvolvimento de nanomateriais, incluindo SPIONs, lipossomas e polímeros, atende a plataformas inteligentes e multifuncionais que são capazes de transportar agentes terapêuticos para as células cancerosas alvo e gerar imagens *in vivo* para diagnóstico ósseo (PANG et al., 2021).

O glioblastoma multiforme (GBM) é o mais comum e agressivo, além de ser a variante mais maligna no espectro dos tumores cerebrais. Testes *in vivo* com nanopartículas poliméricas carregadas com SPIONs e doxorrubicina (DOX) demonstraram um aumento da retenção do fármaco no tumor, com uma diminuição significativa na sua taxa de crescimento (LUQUE-MICHEL; LEMAIRE; BLANCO-PRIETO, 2021).

O superparamagnetismo é uma propriedade comumente observada em partículas de monodomínio, caracterizando-se pela ausência de histerese. Histereses são

curvas de magnetização que representam o comportamento magnético de materiais de vários domínios, como se pode observar na Figura 5, a seguir, pelas setas azuis (1 → 2 → 3 → 4 → 5 → 1). Observa-se a formação de uma histerese após a magnetização de saturação ( $M_s$ ) ser atingida e a intensidade do campo magnético ( $H$ ) começar a diminuir (1 → 2). Uma vez que todos os domínios magnéticos da partícula não retornam às suas orientações originais, há magnetização remanescente, mesmo já não havendo campo magnético aplicado (2). A magnetização remanescente pode ser removida (2 → 3) pela aplicação de um campo magnético na direção oposta ao campo original inicial, que é definido como campo coercitivo ( $H_c$ ). Já as nanopartículas superparamagnéticas, diferentemente dos materiais ferromagnéticos, possuem apenas um único domínio (monodomínio), não exibindo um ciclo de histerese (0 → 1 → 0), ou seja, não permanecendo magnetizadas quando o campo magnético é removido (SANDLER; FELLOWS; THOMPSON MEFFORD, 2019).

Figura 5 - Comparativo entre o comportamento ferromagnético (com histerese – setas azuis) e superparamagnético (setas pretas)



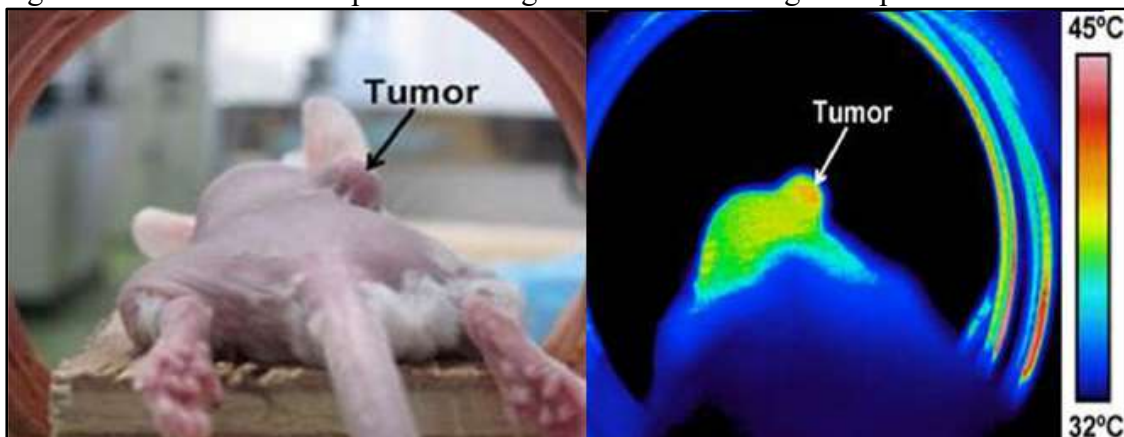
Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 1.3.4 Hipertermia magnética

Terapias baseadas em hipertermia magnética utilizam-se do calor gerado por SPIONs, sob ação de um campo magnético em alternância de sentido em alta frequência, para aumentar a temperatura em áreas específicas do tumor. Como células saudáveis apresentam maior resistência ao calor, as células tumorais podem ser seletivamente induzidas à apoptose em regiões localizadas (entre 42 e 46 °C), sem

danificar os tecidos saudáveis adjacentes, como ilustrado na Figura 6 (CASTELLANOS-RUBIO et al., 2020; PADYA et al., 2021; ZHANG et al., 2019c).

Figura 6 – Estudos sobre hipertermia magnética como estratégia terapêutica anticâncer



Fonte: (DHAR; SIRISHA MAGANTI, 2017).

Dessa forma, a hipertermia magnética representa uma eficaz linha terapêutica anticâncer, com efeitos colaterais mínimos, projetando-se como uma alternativa para quimio e radioterapia. Nanopartículas de magnetita são consideradas uma das melhores escolhas para aplicações biomédicas devido a sua alta resposta magnética e sua boa biocompatibilidade e biodegradabilidade. Formulações à base de magnetita já foram aprovadas para uso em humanos pela Food and Drug Administration (FDA) (PADYA et al., 2021). Nesse contexto, nanocompósitos magnéticos em forma de hidrogel têm apresentado grande potencial para atuação simultânea em quimioterapia e hipertermia magnética de tumores sólidos, exibindo biocompatibilidade, perfil de liberação prolongada e elevada magnetização de saturação para vetorização magnética de bioativos (SOLEIMANI et al., 2021).

A teoria do relaxamento (ILG, 2019) é a mais apropriada para explicar o mecanismo de aquecimento de nanopartículas de monodomínio sob ação de um campo magnético externo. Quando um campo magnético é aplicado, os momentos magnéticos das nanopartículas mudam de direção, alinhando-se no sentido do campo. Quando o campo magnético é posteriormente removido ou tem seu sentido alterado, os momentos magnéticos voltam às suas posições originais ou seguem a alteração, promovendo assim o aquecimento local por meio dos mecanismo de relaxação de Néel e Browniano (ZUVIN et al., 2019). Com base nesse modelo, o calor é gerado pelas perdas de energia dos processos de relaxamento de Néel e Browniano. O relaxamento de Néel compreende a reversão do dipolo magnético, enquanto o relaxamento Browniano resulta

da rotação física das próprias nanopartículas. Assim, o primeiro é caracterizado pelo tempo de retorno ao equilíbrio magnético após cessada a perturbação do campo, ao passo que o relaxamento Browniano caracteriza-se pela viscosidade da rotação física das nanopartículas (LAURENT et al., 2011; YU et al., 2021b).

Para se ter uma ideia dos avanços na aplicação dessa tecnologia nas terapias medicinais, o primeiro ensaio clínico envolvendo hipertermia magnética foi realizado em pacientes com carcinoma de próstata no renomado Charité Hospital em Berlim, Alemanha, em conjunto com a empresa MagForce® em 2006, em que a temperatura intraprostática máxima, a uma intensidade de campo de 4 a 5 kA.m<sup>-1</sup> foi de 48,5 °C. Em 2013, a MagForce® recebeu a aprovação da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e do Instituto Federal Alemão de Fármacos e Dispositivos Médicos (BfArM) para iniciar a utilização da formulação NanoTherm® (ferrofluido magnético a base de SPIONs) para o tratamento de glioblastoma. Mais recentemente, em 2018, a MagForce® recebeu da FDA aprovação para iniciar um ensaio clínico com NanoTherm® em pacientes com câncer de próstata nos Estados Unidos (ETEMADI; PLIEGER, 2020).

Atualmente, a hipertermia magnética vem sendo empregada no tratamento de numerosos casos de câncer, como próstata, útero, pulmão e pescoço (FARZIN et al., 2020).

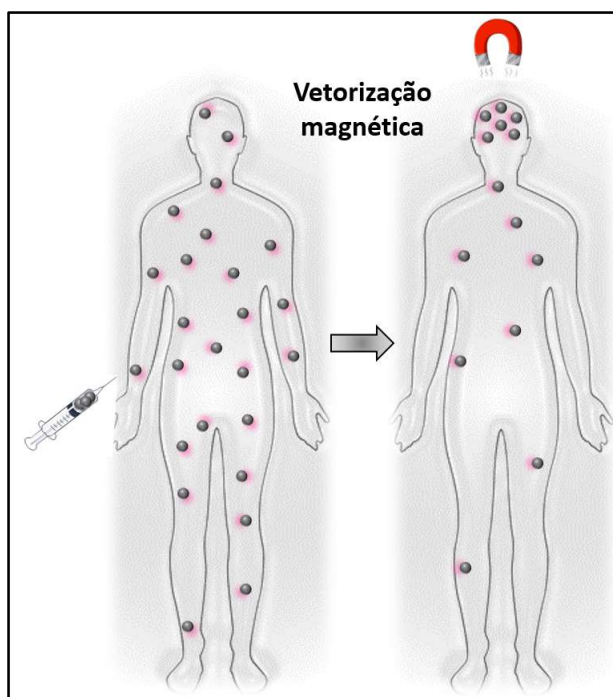
### ***1.3.5 Magnetoforese***

Magnetoforese refere-se ao movimento de partículas em um meio líquido, em uma direção específica, originada pela ação de um campo magnético. A suscetibilidade magnética das partículas, bem como do meio circundante, são parâmetros importantes que afetam a magnetoforese, em que uma das grandes vantagens é a não necessidade de contato físico direto entre as partículas e a fonte geradora de campo magnético. Assim, ímãs podem gerar campos magnéticos que penetram por uma variedade de materiais, incluindo tecidos orgânicos, para promover manipulação indireta de partículas (SU et al., 2021).

O direcionamento magnético de drogas é uma tecnologia promissora para o aperfeiçoamento de terapias de câncer através do direcionamento e acúmulo de SPIONs carregando fármacos para um tecido alvo, pela aplicação de um campo magnético capaz de gerar uma força de atração. Assim, conforme ilustrado na Figura 7, o campo magnético representa potencialmente uma estratégia para exercer uma força atrativa

sobre os SPIONs, concentrando-os no local alvo onde as drogas poderiam ser liberadas (LINDEMANN et al., 2021).

Figura 7 - Representação de direcionamento magnético de carreadores de fármacos pela aplicação de um campo magnético



Fonte: Elaborada pelo autor.

Entretanto, ressalta-se que a entrega de drogas a um tecido alvo frequentemente envolve a transposição de barreiras biológicas, onde o grau de impedimento ao fluxo de movimento dessas drogas, bem como as abordagens para superá-lo, dependem do tecido, da droga, e de muitos outros fatores envolvidos nos complexos ambientes metabólicos. Nesse contexto, a magnetoforese têm sido avaliada como uma opção em potencial para a vetorização magnética de drogas no sentido de aumentar o poder de transposição dessas moléculas frente a barreiras biológicas (YANG et al., 2017). Nesse sentido, estudos *in vivo* demonstraram maiores concentrações de DOX em tumores de camundongos que tiveram o carreamento desse fármaco induzido pela aplicação de um campo magnético (Figura 8), levando à interrupção do crescimento e redução tumoral mais acentuada, em comparação ao grupo controle que teve o carreamento passivo (NIGAM; BAHADUR, 2018).

Figura 8 – Estudos sobre magnetoforese como um método físico de direcionamento de fármacos

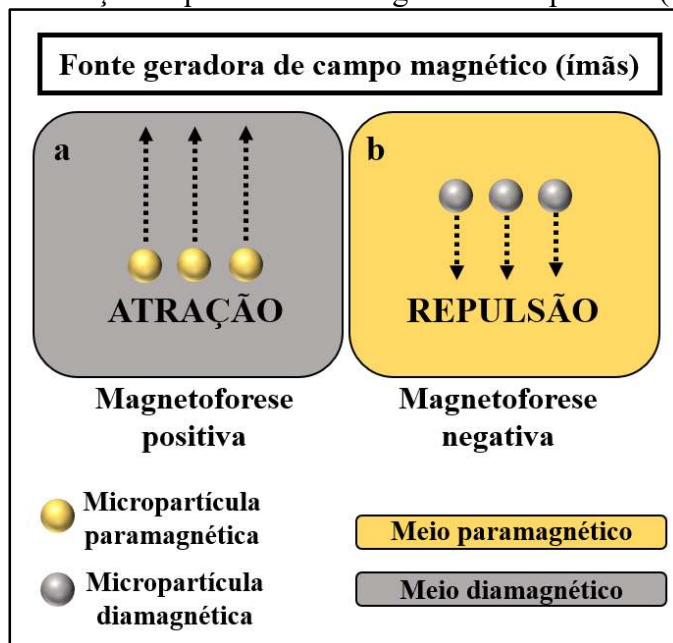


Fonte: adaptada de (NIGAM; BAHADUR, 2018).

Na magnetoforese, a mobilidade de micropartículas, em relação ao meio a sua volta, pode se dar de duas formas, em dois sentidos opostos. A primeira é a magnetoforese positiva, que promove um movimento de atração das micropartículas pela fonte geradora de campo magnético (ilustrado anteriormente pelas Figuras 7 e 8). A magnetoforese positiva envolve micropartículas magnéticas (paramagnéticas ou SPIONs) suspensas em um fluido diamagnético (ou seja, um fluido não magnético) circundante (Figura 9a). A segunda possibilidade é a chamada magnetoforese negativa, que, ao contrário, gera um movimento de repulsão das micropartículas, envolvendo micropartículas diamagnéticas suspensas em um meio paramagnético circundante (Figura 9b) (ALNAIMAT et al., 2018).

Dessa forma, no caso de aplicações sistêmicas, em que o nanocarreador já se encontra disperso na corrente sanguínea, por exemplo, a magnetoforese positiva representaria uma possibilidade de atração dos nanocarreadores para o local de interesse, pela aplicação de um campo magnético externo (ilustrado anteriormente pela Figura 8). Diferentemente, no caso de aplicações tópicas, em que o nanocarreador se encontra na superfície da pele, por exemplo, a magnetoforese negativa representaria uma possibilidade de repulsão dos nanocarreadores no fluxo de penetração da pele.

Figura 9 – Representação esquemática de magnetoforese positiva (a) e negativa (b)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Considerando que a força é uma grandeza vetorial, o significado físico de seu sinal (positivo ou negativo) está relacionado com o sentido de aplicação dessa força. Assim, a força promovida pela magnetoforese pode ser positiva ou negativa dependendo da relação entre a suscetibilidade da partícula e do meio circundante, de acordo com a Equação 1, a seguir, em que a força da magnetoforese será positiva quando  $X_p$  for maior que  $X_f$ , caso em que a partícula será atraída para os máximos do campo magnético. Do contrário, caso  $X_p$  seja menor que  $X_f$ , tem-se a situação de magnetoforese negativa (ALNAIMAT et al., 2018).

$$F_m = \frac{V_p (X_p - X_f)}{\mu_0} (B \cdot \nabla) B \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que  $F_m$  é a força magnética,  $V_p$  é o volume da partícula,  $X_p$  e  $X_f$  são as susceptibilidades magnéticas da partícula e do fluido circundante, respectivamente,  $B$  e  $\nabla B$  são a densidade de fluxo magnético e seu gradiente e  $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7}$  Tesla.metro/Ampere.

### 1.3.6 *Oncocalixona A*

O uso de plantas na medicina tradicional remonta à antiguidade e, ainda hoje, constitui uma importante fonte de novos medicamentos e metabólitos para aplicações farmacológicas e biotecnológicas (MENEZES et al., 2020). Nesse sentido, o prêmio

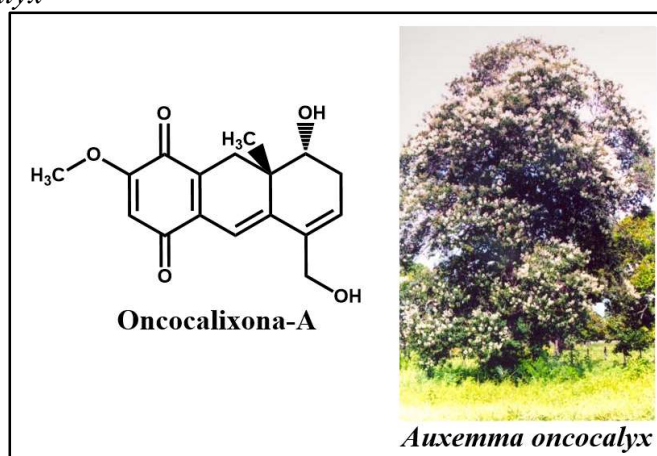


Nobel de medicina e fisiologia em 2015 foi concedido a William C. Campbell e Satoshi Omura, pela descoberta de produtos naturais microbianos (ivermectina) que reduziram radicalmente a incidência de oncocercose (cegueira dos rios) e filariose linfática (elefantíase) e a Youyou Tu, pela descoberta do produto natural vegetal artemisinina, um fármaco que reduziu significativamente as taxas de mortalidade em pacientes portadores de malária (SHEN, 2015).

*Auxemma Oncocalyx* é uma espécie de planta arbórea, pertencente à família Boraginaceae, endêmica da Caatinga no nordeste brasileiro, onde é comumente conhecida como “pau branco”. A casca do seu caule é adstringente e usada popularmente em tratamento de feridas (FERREIRA et al., 2004).

Oncocalixona A (onco-A) é uma quinona obtida da *Auxemma Oncocalyx* (Figura 10), tendo sido selecionada como bioativo hidrofílico para o desenvolvimento deste trabalho devido às suas diversas propriedades farmacológicas, como atividade antiplaquetária, leishmanicida, antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória, hipoglicêmica e antioxidante (TAVARES et al., 2019; XAVIER-JÚNIOR et al., 2019). Além disso, onco-A apresenta atividade anticâncer contra várias linhagens de células tumorais humanas (sarcoma 180, leucemia HL-60, leucemia L1210, pulmão SW1573 e pele CCD922) (PESSOA et al., 2000; XAVIER-JÚNIOR et al., 2019). Assim, o presente trabalho busca dar ênfase e projeções de aplicabilidade para esse bioativo natural oriundo da flora nordestina brasileira, visto que o mesmo apresenta tais atividades farmacológicas.

Figura 10 - Estrutura molecular da quinona oncocalixona A, extraída da espécie *Auxemma Oncocalyx*



Fonte: adaptada de (CARVALHO, 2008).

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Geral

Sintetizar e caracterizar nanocompósitos magnéticos à base de hidroxietilamido e magnetita, para aplicações em liberação prolongada de onocalixona A, bem como em direcionamento magnético por magnetoforese.

### 1.4.2 Específicos

Sintetizar nanopartículas de magnetita por coprecipitação química e modificação de sua superfície por íons citrato ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ citrato) para aquisição de estabilidade hidrofílica na forma de ferrofluido magnético aquoso;

Caracterizar o hidroxietilamido utilizado como matriz polimérica quanto ao tamanho de cadeia e grau de substituição;

Examinar o tamanho de partícula, perfil de distribuição, estabilidade coloidal e morfologia das nanopartículas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ citrato) e dos nanocompósitos magnéticos, bem como o perfil magnético de suas respectivas histereses;

Acompanhar a ocorrência da reação química de polimerização interfacial e formação das nanocápsulas poliméricas;

Avaliar a eficiência de encapsulamento de onocalixona A, bem como o perfil de liberação desse bioativo pelo nanocompósito magnético;

Performar testes de citotoxicidade *in vitro* dos nanocompósitos sintetizados frente a linhagens celulares cancerígenas;

Analisar a toxicidade *in vivo* (biocompatibilidade) dos nanocompósitos contendo onocalixona A;

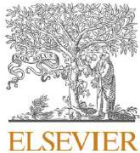
Verificar o efeito da aplicação de um campo magnético no direcionamento de compostos para penetração do estrato córneo da pele, quando carregados por formulações magnéticas;

Examinar o efeito da aplicação de um campo magnético no perfil de penetração de fluoresceína na pele, considerando a biodistribuição em unidades de pele com presença e ausência de unidade pilosebácea;

Avaliar o efeito da magnetoforese negativa na penetração de adapaleno na pele, considerando a presença ou ausência de unidade pilosebácea.

## 2 CAPÍTULO II - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO À BASE DE HIDROXIETILAMIDO PARA APLICAÇÕES BIOLÓGICAS NO DIRECIONAMENTO MAGNÉTICO E LIBERAÇÃO PROLONGADA DE ONCOCALIXONA A


Carbohydrate Polymers 264 (2021) 118017



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

### Carbohydrate Polymers

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/carbpol](http://www.elsevier.com/locate/carbpol)



---

### Starch-based magnetic nanocomposite for targeted delivery of hydrophilic bioactives as anticancer strategy

Alexandre C.C. Sousa<sup>a,b</sup>, Adolfo I.B. Romo<sup>c</sup>, Raimundo R. Almeida<sup>a</sup>, Aiêrta C.C. Silva<sup>a</sup>, Lillian M.U. Fechine<sup>a</sup>, Débora H.A. Brito<sup>a</sup>, Rafael M. Freire<sup>d,e</sup>, Daniel P. Pinheiro<sup>f</sup>, Larissa M. R. Silva<sup>g</sup>, Oflia D.L. Pessoa<sup>c</sup>, Juliano C. Denardin<sup>d</sup>, Claudia Pessoa<sup>f</sup>, Nágila M.P.S. Ricardo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Polymers and Materials Innovation, Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza – CE, Zip Code 60440-900, Brazil

<sup>b</sup> Federal Institute of Education, Science and Technology of Ceará, Quixadá – CE, Zip Code 63902-580, Brazil


<sup>c</sup> Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza – CE, Zip Code 60440-900, Brazil

<sup>d</sup> University of Santiago of Chile (USACH), Physics Department and CEDDENA, Santiago, Zip Code 9170-124, Chile

<sup>e</sup> Institute of Applied Chemical Sciences, Universidad Autónoma de Chile, Zip Code 8910-060, Chile

<sup>f</sup> Laboratory of Experimental Oncology, Center for Research and Drug Development, Federal University of Ceará, Fortaleza – CE, Zip Code 60430-275, Brazil

<sup>g</sup> Department of Food Engineering, Federal University of Ceará, Fortaleza – CE, Zip Code 60356-000, Brazil



## 2.1 Introdução

Recentes avanços nanotecnológicos têm fomentado o desenvolvimento de nanocompósitos magnéticos com aplicações biomédicas extremamente promissoras e inovadoras, tais como o carregamento e rastreamento de RNA interferente em vacinas contra câncer de mama (WU et al., 2021).

Além disso, conforme abordado no capítulo anterior, crescentes esforços vêm buscando a viabilização de nanocompósitos magnéticos que promovam sinergismos, atuando, simultaneamente, em quimioterapia, terapia fotodinâmica e terapia fototérmica (CHENG et al., 2021), gerando assim melhores resultados terapêuticos.

Dessa forma, em um evidente contexto global de crescente demanda por novos materiais nanotecnológicos, o foco deste trabalho concentra-se no desenvolvimento de uma nanocápsula magnética à base de hidroxietilamido com potencial para direcionamento magnético de compostos hidrofílicos, gerando perspectivas de maior concentração de fármacos em um tecido alvo, por meio de vetorização magnética e, simultaneamente, possibilitando atuação terapêutica por liberação prolongada e hipertermia magnética. Oncocalixona A foi o bioativo hidrofílico selecionado para o desenvolvimento deste trabalho.

## 2.2 Metodologia

### 2.2.1 Materiais

Hidroxiethylamido (HES) [ $\geq 99\%$ , massa molecular (MM) = 260 kDa, grau de substituição (DS) = 0,15], cloreto de ferro (II) tetra-hidratado ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99,0\%$ ), cloreto de ferro (III) hexa-hidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99,0\%$ ), citrato de sódio di-hidratado [ $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99,0\%$ ], tolueno-2,4-diisocianato (TDI,  $\geq 95,0\%$ ), dodecil sulfato de sódio (SDS, 99%), solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4), nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ , 99%), brometo de potássio (KBr, 99%), óxido de deutério (99,9%  $\text{D}_2\text{O}$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® e utilizados como recebidos. Hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , 30%) e ciclo-hexano (99%) foram adquiridos da Synth® e usados como recebidos. Poliricinoleato de poliglicerol (PGPR Grindsted®) foi doado pela DuPont Danisco®. Água destilada e ultrapura (sistema Milli-Q Advantage A-10, Millipore®) foi utilizada neste trabalho. O bioativo oncocalixona A foi extraído e isolado como um pó vermelho escuro a partir do extrato de etanol do caule de *A. Oncocalyx*, conforme previamente descrito (FERREIRA et al., 2008), e gentilmente cedido pela Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, coordenadora do Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais II (LAFIPLAM II) da UFC.

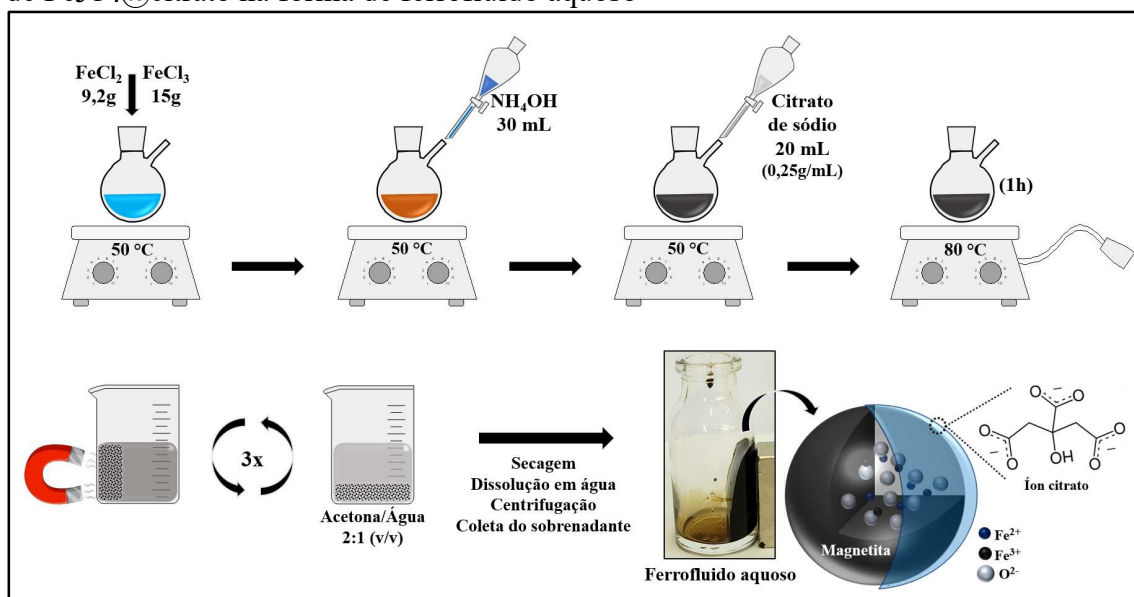
### 2.2.2 Síntese de nanopartículas de magnetita com superfície modificada por íons citrato ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ citrato)

Nanopartículas de magnetita funcionalizadas com íons citrato ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ citrato) foram obtidas pelo método de coprecipitação química, adaptado de metodologias previamente adotadas (DE ALMEIDA et al., 2017; DUSZYŃSKA et al., 2020), conforme ilustrado na Figura 11.

Assim, sob agitação constante, 9,2 g de cloreto de ferro (II) tetra-hidratado e 15 g de cloreto de ferro (III) hexa-hidratado foram dissolvidos em 250 mL de água deionizada à temperatura de 50 °C, durante 10 min. Posteriormente, foram adicionados 30 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (12 mol/L), formando um precipitado escuro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Em seguida, 20 mL de solução aquosa contendo 5 g de citrato de sódio foram adicionados. Essa mistura foi aquecida a 80 °C durante 1 h. Com auxílio de um íman, foi efetuada uma separação magnética de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ citrato, seguido da retirada do sobrenadante e da redispersão do sólido em solução acetona/água (2:1 v/v). Esse procedimento foi repetido três vezes para eliminar o excesso de citrato de sódio e amônia. Finalmente, as

nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrato}$  foram submetidas a secagem em dessecador e posteriormente redispersadas no menor volume possível de água deionizada. Centrifugou-se essa solução final para retirada de quaisquer nanopartículas precipitadas, armazenando-se o sobrenadante, na forma de ferrofluido (Figura 11), à temperatura ambiente. As nanopartículas de magnetita foram analisadas quanto a sua estabilidade coloidal, morfologia, distribuição de tamanho, estrutura cristalina e propriedades magnéticas.

Figura 11 - Esquema representativo das etapas de síntese de nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrato}$  na forma de ferrofluido aquoso



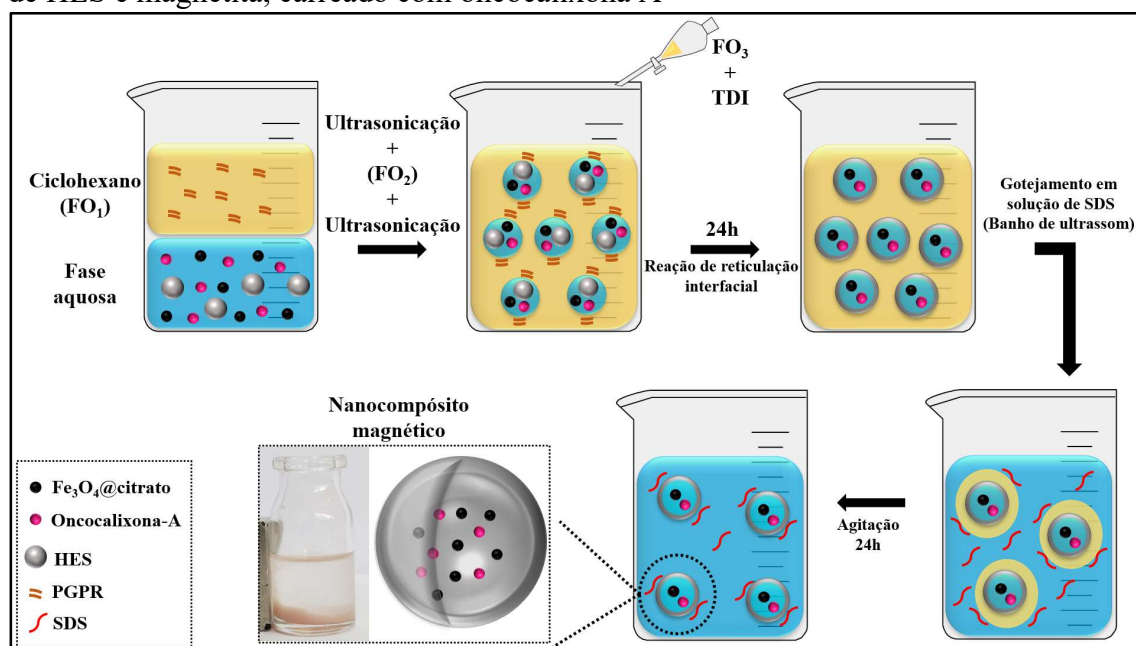
Fonte: Elaborada pelo autor.

### 2.2.3 Síntese de nanocápsulas magnéticas à base de hidroxietilamido (HES) carregadas com oncolixona A

As nanocápsulas de HES foram sintetizadas em um sistema de miniemulsão inversa (água em óleo), com adaptações realizadas a partir de metodologias prévias (KANG et al., 2015), conforme ilustrado na Figura 12. Assim, a fase orgânica (FO) foi preparada dissolvendo-se 50 mg de PGPR (surfactante hidrofóbico) em 14,5 g de ciclohexano. A fase orgânica foi homogeneizada em banho de ultrassom por 5 min e separada em três porções distintas ( $\text{FO}_1 = 7,5$  g;  $\text{FO}_2 = 5,0$  g e  $\text{FO}_3 = 2$  g). A fase aquosa foi preparada pela dissolução, em 4mL de água deionizada, de 100 mg de HES, 2 mg de oncolixona A e 30  $\mu\text{L}$  (2,7 mg) de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrato}$ . A fase aquosa foi gotejada sobre a  $\text{FO}_1$  a 500 rpm, seguido por emulsificação em ultrassom de sonda a 70% de amplitude por 3 min em regime de pulsos (Branson Sonifier W-450-Digital com ponta de  $\frac{1}{2}$ ”).

Na emulsão resultante deste processo foi gotejada a  $FO_2$  e repetido o procedimento de ultrassom. Em seguida, 50 mg de TDI (agente reticulante) foram adicionados a  $FO_3$ , e gotejados à emulsão final. Esse sistema, então, foi mantido sob agitação mecânica de 500 rpm por 24 horas à temperatura ambiente. Após esse período, ocorrida a reação de poliadção interfacial, a dispersão de nanocápsulas em ciclo-hexano foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min, descartando-se o sobrenadante a fim de se remover o excesso de PGPR e TDI. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes e o precipitado final de nanocápsulas foi redispersado em 20 mL de ciclo-hexano. Posteriormente, em banho de sonicção (Bandelin Sonorex, tipo RK 52H), 1 mL da dispersão de nanocápsulas em ciclo-hexano foi gotejada em 5 mL de solução aquosa de surfactante hidrofílico SDS (0,1% m/m) sob agitação de 500 rpm. Essa agitação foi mantida por 24 horas à temperatura ambiente para permitir a evaporação do ciclo-hexano, resultando em uma formulação aquosa do nanocompósito magnético.

Figura 12 - Esquema representativo das etapas de síntese do nanocompósito magnético de HES e magnetita, carregado com oncolixona A



Fonte: Elaborada pelo autor.

As nanocápsulas magnéticas foram analisadas quanto a sua estabilidade coloidal, morfologia, distribuição de tamanho, composição química, perfil de liberação de onco-A, propriedades magnéticas, atividade citotóxica (*in vitro*) e toxicidade aguda (*in vivo*).

#### 2.2.4 Estudos de liberação de onco-calixona A

O perfil de liberação de onco-A das nanocápsulas foi avaliado através da utilização de células verticais de difusão de Franz, adaptadas de protocolos anteriores (MARTO et al., 2018). Uma membrana de diálise (área de permeação: 1,75 cm<sup>2</sup>) com massa molecular de corte (*cutoff*) de cerca de 12 kDa foi fixada entre o compartimento receptor e doador. 2 mL de amostra foram adicionados ao compartimento doador. O compartimento receptor foi preparado com 14 mL de solução tamponada (tampão fosfato, pH = 7,4). O ensaio de liberação foi realizado, de forma independente para as nanocápsulas e para onco-A livre, na mesma solução tamponada. As amostras retiradas do compartimento receptor foram analisadas por espectroscopia UV-Vis. Os estudos de liberação foram desenvolvidos em dois experimentos independentes realizados em triplicata. A absorbância foi interpolada em curva de calibração previamente construída, respeitando-se as mesmas condições de análise (Absorbância = 0,02775 [onco-A] - 0,00134; com R<sup>2</sup> = 0,9992). Os espectros eletrônicos de UV-vis foram obtidos usando um espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8453 Diode-Array.

#### 2.2.5 Eficiência de encapsulação de onco-A

A avaliação da eficiência de encapsulação de bioativos foi realizada baseando-se em metodologias previamente publicadas (DA SILVA et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2020). A formulação final de nanocápsulas foi centrifugada a 9000 rpm por 10 min, usando um filtro de ultracentrifugação de tamanho de poro de 3 kDa para separar as nanocápsulas magnéticas da onco-A livre em solução. Em seguida, em ensaios independentes realizados em triplicata, o filtrado aquoso não magnético foi analisado por espectroscopia UV-Vis. Assim, a eficiência de encapsulação de onco-A foi determinada pela diferença entre a quantidade inicial de bioativo adicionado para a síntese da formulação de nanocápsulas e a quantidade livre, observada após o processo de filtração na fração não magnética, conforme representado pela Eq.1:

$$EE(\%) = [(M(\text{total}) - M(\text{onco livre})]/M(\text{total})] \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Onde M (total) representa a concentração total de onco-A adicionada à formulação de nanocápsulas e M (onco livre) representa a fração não encapsulada de onco-A obtida na fração filtrada e não magnética.



### 2.2.6 Citotoxicidade *in vitro* (determinação de IC<sub>50</sub>)

A atividade citotóxica do nanocompósito foi avaliada (*in vitro*) pela determinação da concentração inibitória IC<sub>50</sub> em 72h (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) contra quatro linhagens de células tumorais humanas: glioblastoma SNB-19, carcinoma de cólon HCT-116, próstata PC3 e leucemia HL-60, fornecidas pelo National Cancer Institute (Bethesda, MD, EUA).

Todas as linhagens de células tumorais foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100 µg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina, a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Para os ensaios de MTT, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (0,1 x 10<sup>6</sup> células/poço para as linhagens PC3 e SNB-19; 0,3 x 10<sup>6</sup> células/poço para HL-60; e 0,7 x 10<sup>5</sup> células/poço para HCT-116). Oncocalyxone A (bioativo livre e nanoencapsulado) foi testada em concentrações crescentes (maior concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup> para bioativo livre ou 12 µg.mL<sup>-1</sup> para todos os sistemas). A concentração final de dimetilsulfóxido (DMSO) no meio de cultura foi sempre mantida abaixo de 0,1% v/v.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT, no qual o corante amarelo 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazólio brometo (MTT) é reduzido a um produto de formazan azul por células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). Após incubação (72h a 37°C / 5% CO<sub>2</sub>), as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi substituído por meio fresco (100 µL) contendo 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de MTT. Três horas depois, as placas foram centrifugadas e o produto MTT formazan foi dissolvido em 100 µL de DMSO. A absorbância foi medida em um leitor multiplaca (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Califórnia, EUA) a 525 nm. As absorbâncias obtidas foram utilizadas para calcular os valores de IC<sub>50</sub> de cada amostra por regressão não linear, utilizando o programa GraphPad Prism® 8.0. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata em pelo menos quatro experimentos independentes.

### 2.2.7 Toxicidade aguda e atividade locomotora *in vivo*

Todos os procedimentos experimentais *in vivo* com *zebrafish* (*Danio rerio*) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA nº 5639090320).

*Zebrafish* com idade de 60 a 90 dias para ambos os sexos (fenótipo de nadadeira curta), com tamanhos de 3,5 a 1,5 cm e pesando de 0,3 a 0,5 g foram

adquiridos da Agroquímica Comércio de Produtos Veterinários LTDA (Fortaleza, Ceará, Brasil). Os peixes foram aclimatados por 24 h a 25 °C em aquários de vidro com pH = 7,0 contendo água desclorada (ProtecPlus®) e bombas de ar com filtros submersos, sob ciclo circadiano de 14:10 h (claro/escuro). Os peixes receberam ração *ad libitum* 24 h antes dos experimentos. Após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (4 °C) por 10 min até a perda dos movimentos operculares (SILVA et al., 2020). O estudo de toxicidade aguda (96 h) foi realizado de acordo com as metodologias propostas por (HUANG et al., 2014). O teste de campo aberto (AHMAD; RICHARDSON, 2013), foi realizado para avaliar a coordenação motora dos animais. Após 1 hora dos tratamentos orais, os animais foram transferidos para placas de Petri marcadas com quatro quadrantes, contendo a mesma água do aquário. A atividade locomotora foi analisada pela contagem do número de cruzamentos de linha (LC) por 5 min, utilizando o valor LC do grupo Naive como referência (100%). Os resultados biológicos são expressos como a média ± erro padrão para cada grupo testado. Após a confirmação da distribuição normal e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (one-way ANOVA), seguida do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando GraphPad Prism v. 8.0. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ( $P < 0,05$ ).

## 2.2.8 Procedimentos de caracterização

### 2.2.8.1 Difração de raio-X

A difração de raio-X foi realizada para avaliar as fases cristalinas das nanopartículas de magnetita sintetizadas (SPIONs). Os padrões de raios-X foram coletados em um difratômetro Bruker D2 Phaser. O software de medição foi operado a 30 kV e 10 mA com geometria de reflexão Bragg-Brentano com radiação  $\text{CoK}\alpha$  ( $\lambda = 1,7880 \text{ \AA}$ ), usando uma faixa de  $2\Theta$  de  $10^\circ$  a  $90^\circ$  em uma taxa de varredura de  $2^\circ \text{ min}^{-1}$ .

### 2.2.8.2 Ressonância magnética nuclear (NMR)

O grau de substituição (DS) do HES (Eq.2) foi avaliado por  $^{13}\text{C}$ -RMN (CHEN et al., 2020; CUENCA; FERRERO; ALBANI, 2020). Para o experimento de  $^{13}\text{C}$ -RMN, 30 mg de HES foram dissolvidos em 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  e registrados em um Avance DPX de 500 MHz (Bruker) com um total de 16.000 transientes. O espectro final foi processado usando o software TopSpin 3.6.2.

$$DS = X_2 + X_6 ; X_n = \frac{A(X_{ns})}{A(X_{ns} + X_{nus})} \quad \text{Eq.2}$$

Onde  $n$  é o número do carbono;  $ns$  é o número do carbono substituído,  $nus$  é o número do carbono não substituído e  $A$  representa a área de cada pico.

#### 2.2.8.3 *Cromatografia de permeação em gel (GPC)*

A massa molecular do hidroxietilamido (HES) foi avaliada por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC). As amostras foram preparadas em água deionizada, solubilizadas por 24h na concentração de 0,2 % (m/m) e filtradas em membrana Millipore® de 0,45  $\mu\text{m}$ . O volume injetado de amostra foi de 20  $\mu\text{L}$ , eluída a 40 °C por uma fase móvel de  $\text{NaNO}_3$  0,1 M a uma taxa de fluxo de 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  em coluna Ultrahydrogel (7,8 x 300 mm - PolySep-GFC-P Linear) em um equipamento SHIMADZU LC- 10AD com detector de índice de refração RID-10A. A massa molecular média (MM) foi obtida a partir da equação  $\log(\text{MM}) = -0,96V_e + 13,49$ ;  $r^2 = 0,9987$ .

#### 2.2.8.4 *Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)*

Os espectros de FTIR foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu IRTracer-100, com amplitude de varredura de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras foram dispersas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) e os espectros foram capturados em temperatura ambiente pela média de 64 varreduras.

#### 2.2.8.5 *Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)*

Todas as medições de TEM foram realizadas em um equipamento Hitachi HT7700 TEM no Laboratório de Microscopia do Centro para el Desarrollo de la Nanociencia y la Nanotecnología (CEDENNA) na Universidade de Santiago do Chile, operando a uma tensão de aceleração de 120 keV. As amostras foram depositadas em um suporte de amostra de grade de cobre revestido de carbono (Formvar Carbon F/C 200Cu). O histograma de distribuição de tamanho de partículas foi gerado pela medição de 200 partículas escolhidas aleatoriamente, utilizando o software ImageJ.

#### 2.2.8.6 *Magnetometria de amostra vibrante (VSM)*

As histereses magnéticas foram obtidas no Laboratório de Magnetismo da Universidade de Santiago, utilizando um magnetômetro de amostra vibrante caseiro a 300 K. O equipamento foi calibrado utilizando um material de referência padrão (Yttrium Iron Garnet Sphere) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST). Após a calibração, quando todas as amostras estão centralizadas na posição correta, a repetibilidade é semelhante a equipamentos comerciais (melhor que 2%), a

sensibilidade é  $1E^{-5}$  emu, a frequência de oscilação é 37 Hz e a amplitude é 2 mm para tal equipamento. Para todas as medições, o momento magnético obtido para cada campo aplicado foi normalizado pela massa da amostra.

#### 2.2.8.7 *Espalhamento dinâmico de luz (DLS)*

Distribuição de tamanho hidrodinâmico de partícula, medições de índice de polidispersividade (PDI) e Potencial Zeta foram realizadas utilizando-se um Zetasizer Nano ZS, modelo ZEN 3600, Malvern Instruments, Reino Unido, equipado com tecnologia de espalhamento dinâmico de luz (DLS). As medidas de DLS foram realizadas a 25 °C e em um ângulo fixo de 90°. Todas as amostras foram dispersas em solução SDS a 1mg / mL em água deionizada.

#### 2.2.8.8 *Análise Termogravimétrica (TGA)*

A análise termogravimétrica (TGA) foi conduzida em equipamento de análise termogravimétrica/térmica diferencial modelo DTG – 60H Shimadzu®, em fluxo de ar sintético ( $40 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) à taxa de aquecimento constante de  $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , até à temperatura máxima de 800 °C, utilizando cadinho de alumina como porta amostra.

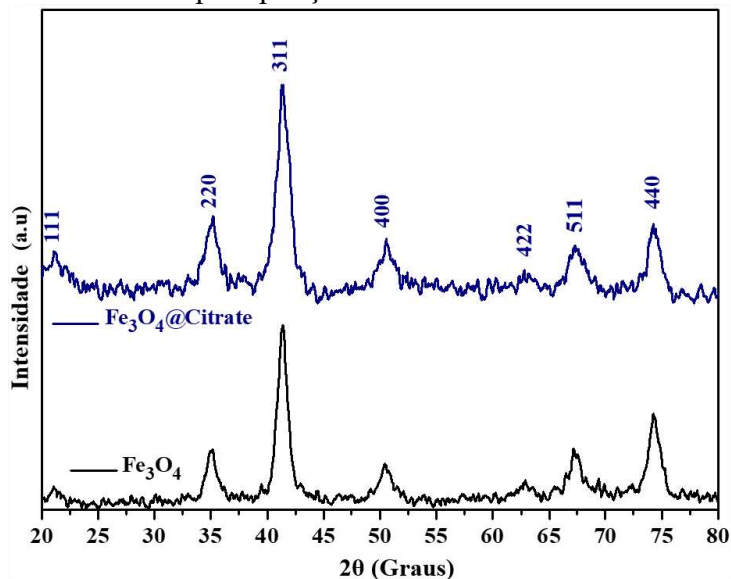
### 2.3 **Resultados e discussão**

#### 2.3.1 *Obtenção dos SPIONs ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato)*

A fim de se confirmar a identidade estrutural das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato, sintetizadas pelo método de coprecipitação, procedeu-se com avaliações por difração de raios-X (Figura 13). As nanopartículas de magnetita foram sintetizadas com e sem superfície modificada por íons citrato, procedendo-se com a análise de ambas para fins de comparação. Sinais de XRD com picos agudos foram exibidos, indicando uma alta cristalinidade para as amostras de magnetita obtidas. Os picos foram comparados com padrões comerciais, sendo observados em (111), (220), (311), (400), (422), (511) e (440), que podem ser atribuídos aos planos cristalinos de uma estrutura cúbica do tipo espinélio inverso (ICSD número 065339) (HRDINA et al., 2010; LI et al., 2017; PAREDES-GARCÍA et al., 2013). Observou-se ainda, conforme abordado na Figura 13, que a funcionalização de íons citrato na superfície das nanopartículas de magnetita não promoveu alterações da natureza cristalina do composto, indicando a preservação de suas propriedades magnéticas originais (LATHA et al., 2021; MOSIVAND, 2021). Além disso, é possível constatar que não foram observados picos

adicionais, revelando a ausência de fases secundárias relacionadas à presença de impurezas ou processos de oxidação relativamente comuns em nanopartículas de óxido de ferro, indicando, dessa forma, boa eficiência do método de coprecipitação utilizado para a síntese de SPIONs.

Figura 13 - Padrões de difração de raios-X das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato sintetizadas pelo método de coprecipitação



Fonte: Elaborada pelo autor.

O íon citrato é um ligante amplamente utilizado para modificar a superfície de nanopartículas de óxido de ferro, uma vez que os grupos COOH e OH do citrato tornam o complexo mais hidrofílico e estável quando as ligações Fe-OH são formadas na funcionalização de revestimento das nanopartículas (DUSZYŃSKA et al., 2020).

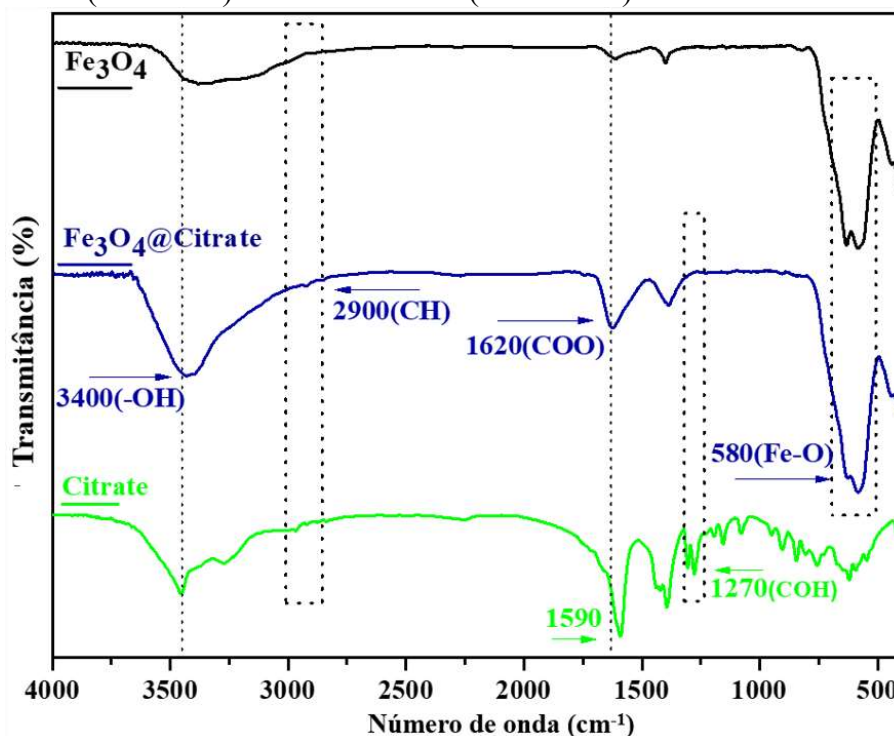
Os ensaios de FTIR mostrados na Figura 14, revelaram uma pequena banda em  $1270\text{ cm}^{-1}$ , associado à vibrações C-OH do íon citrato não coordenado (Figura 14, linha verde), que desapareceu quando o citrato foi coordenado nas nanopartículas de óxido de ferro (Figura 14, linha azul) (ZHANG et al., 2019b). Conforme esperado para magnetitas, vibrações de estiramento dos sítios tetraédricos de Fe-O foram identificadas em  $580\text{ cm}^{-1}$  (HRDINA et al., 2010; SLAVOV et al., 2010). Os grupos OH do citrato que recobriram as nanopartículas de magnetita (Figura 14, linha azul) puderam ser observados em torno de  $3400\text{ cm}^{-1}$  (BARRETO et al., 2013; ZHAO et al., 2019).

Além disso, íons citrato apresentam uma banda intensa em  $1590\text{ cm}^{-1}$  (Figura 14, linha verde) que pode ser atribuída ao estiramento assimétrico de grupos COO, no entanto, quando o citrato é funcionalizado na superfície das nanopartículas de magnetita, esse estiramento assimétrico de COO é representado em torno de  $1620\text{ cm}^{-1}$  (Figura 14, linha azul), o que explica o aumento da intensidade relativa desta banda para

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato quando comparado com o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  não revestido (Figura 14, linha preta) (DUSZYŃSKA et al., 2020).

Finalmente, as vibrações de estiramento CH do citrato são vistas em torno de  $2900\text{ cm}^{-1}$  (Figura 14, linha azul) que, aliado aos resultados obtidos pela difração de raios-X, sugerem que os íons citrato funcionalizaram com sucesso a superfície das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sem afetar estruturalmente essas nanopartículas (HUI et al., 2008).

Figura 14 - Medições espectroscópicas de FTIR para: a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (linha preta),  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato (linha azul) e citrato de sódio (linha verde)

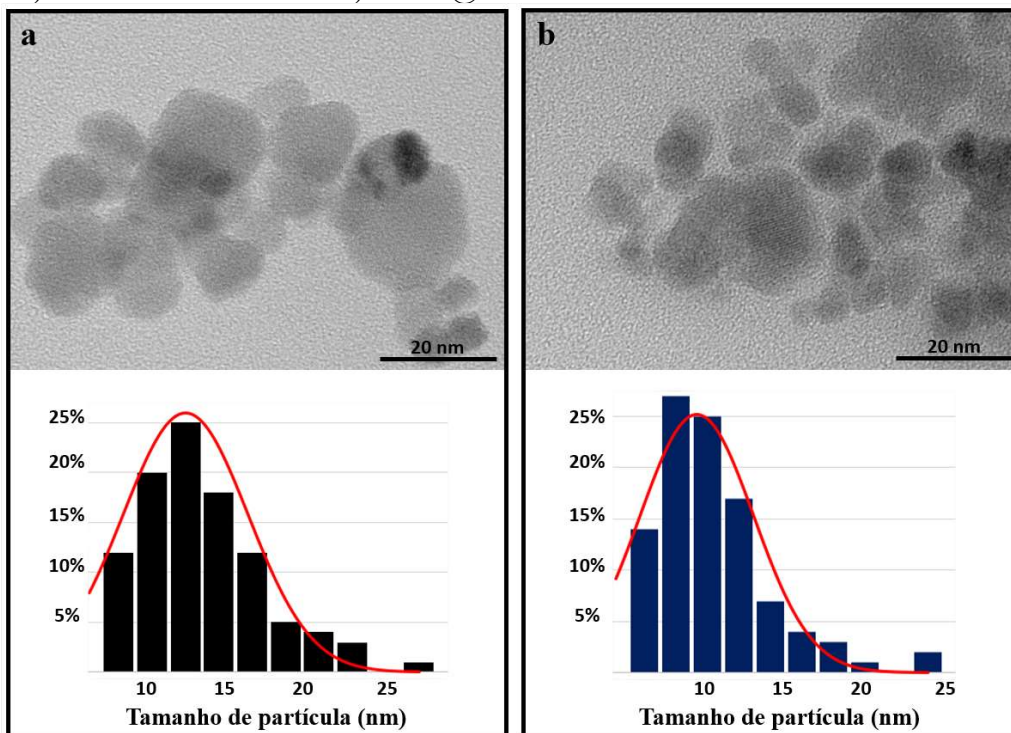


Fonte: Elaborada pelo autor.

A avaliação morfológica e de distribuição de tamanho de partículas foi realizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). As nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato mostraram uma distribuição de tamanho de partículas que predominou entre 12 e 10 nm, conforme abordado nas Figuras 15a e 15b, respectivamente. Sugere-se ainda que a modificação da superfície pelo recobrimento com íons citrato ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato) evita pequenas agregações do nanomaterial. Em ambos os casos, foi possível observar um perfil morfológico relativamente esférico e uma distribuição polidispersa de tamanho de partícula (BARRETO et al., 2013). Salienta-se ainda que cada histograma de distribuição de tamanho de partículas foi gerado pela medição de pelo menos 200 partículas escolhidas aleatoriamente em

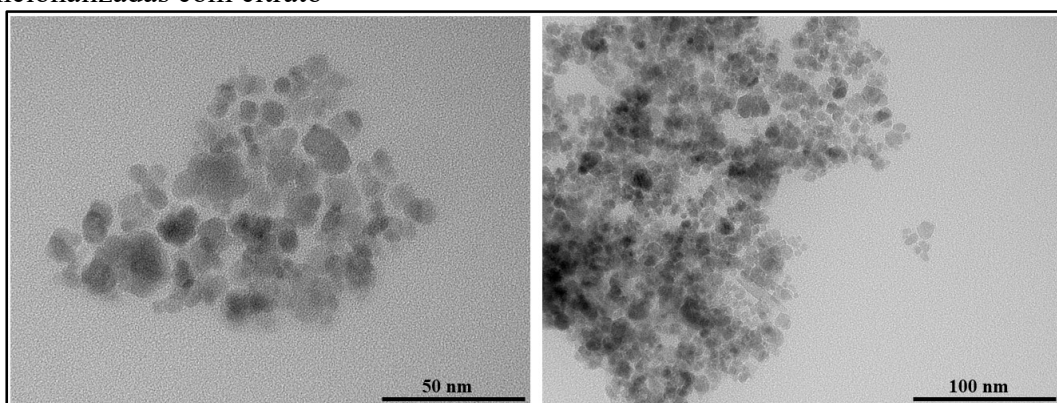
diferentes imagens obtidas da mesma amostra, conforme ilustrado na Figura 16, utilizando-se o software ImageJ.

Figura 15 - Imagens de TEM com histogramas de distribuição de tamanho de partícula para: a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  não revestido e b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 16 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de nanopartículas de magnetita funcionalizadas com citrato



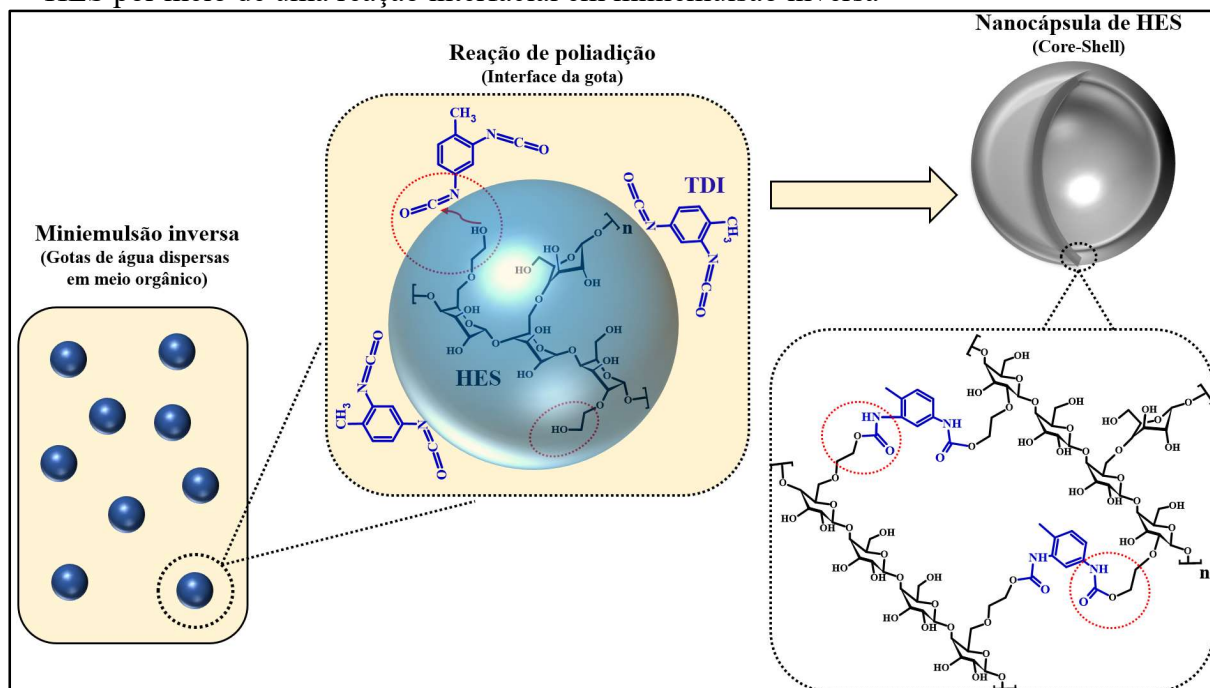
Fonte: Elaborada pelo autor.

### 2.3.2 Obtenção do nanocompósito magnético

No que se refere à síntese das nanocápsulas poliméricas de hidroxietilamido, salienta-se que, visando maior estabilidade em meio aquoso, apenas as nanopartículas de magnetita funcionalizadas com íons citrato ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrato}$ ) foram utilizadas para a incorporação de caráter magnético ao nanocompósito.

A técnica denominada de síntese em miniemulsão inversa (gotículas de água dispersas em um meio orgânico) possibilita a formação de nanocápsulas poliméricas de estrutura “core-shell” por meio de uma reação de poliadição na interface das gotículas (FICHTER et al., 2013; TAHERI et al., 2014; WANG et al., 2021). Nesta reação interfacial, os grupos OH estericamente mais disponíveis do hidroxietilamido (solubilizado no núcleo aquoso das gotas) reagem com grupos NCO de um agente reticulante (TDI) previamente solubilizado no meio orgânico em que as gotas estão dispersas (face externa das gotas). Assim, conforme ilustrado na Figura 17, as gotas da miniemulsão atuam como nanoreatores para a reação química de formação das nanocápsulas poliméricas e, dessa forma, a síntese do nanocompósito magnético permitiu o encapsulamento simultâneo das nanopartículas de magnetita e do bioativo onco-A, representado na Figura 18.

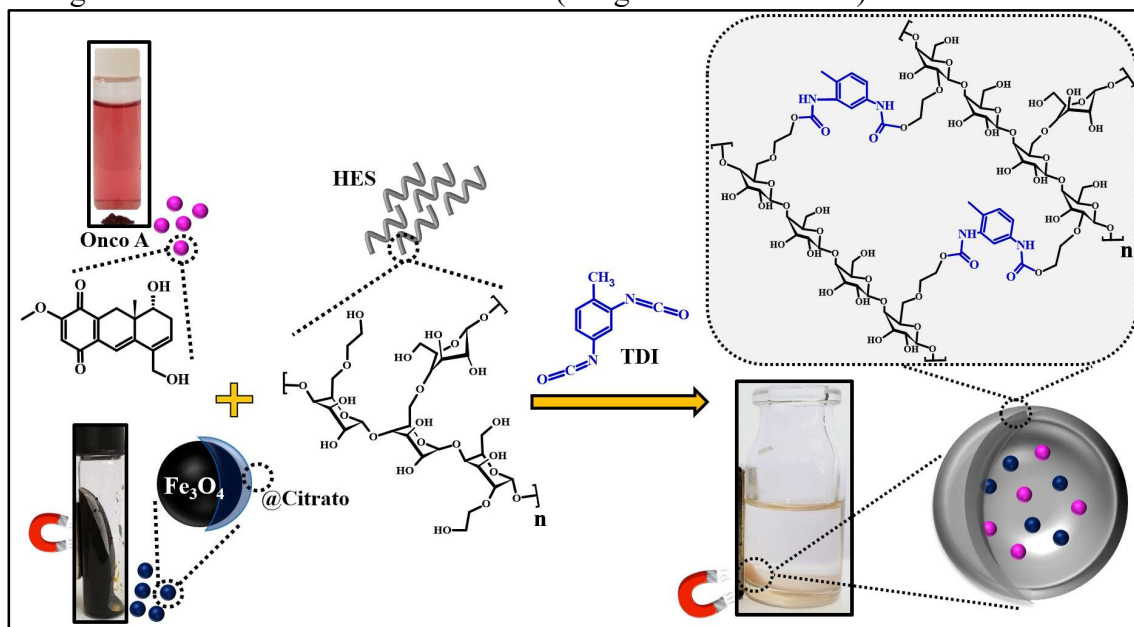
Figura 17 - Representação do processo de formação das nanocápsulas poliméricas de HES por meio de uma reação interfacial em miniemulsão inversa



Fonte: Elaborada pelo autor.



Figura 18 – Representação ilustrativa da formação do nanocompósito magnético carregado com bioativo onco-A e SPIONs (imagens fora de escala)

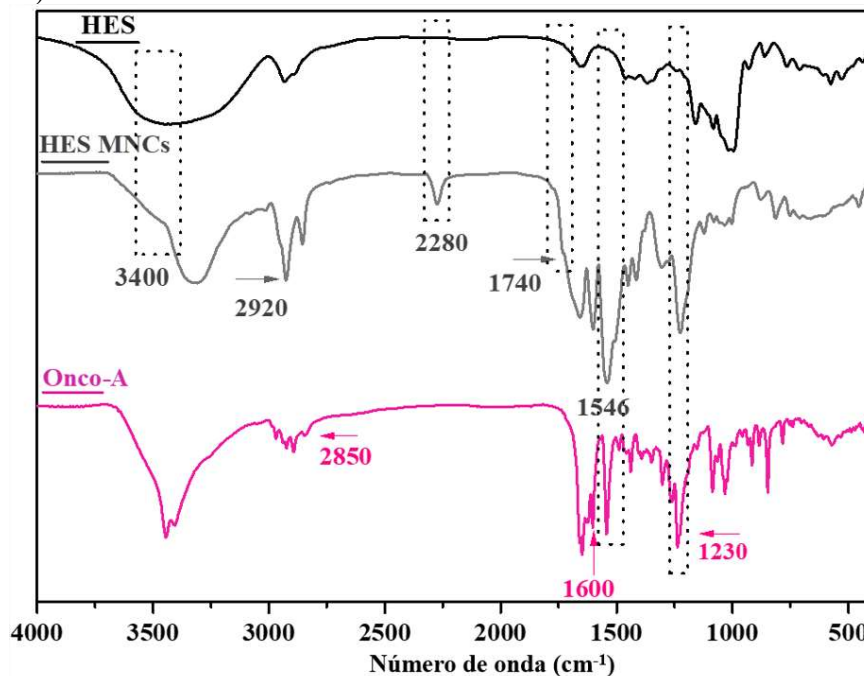


Fonte: Elaborada pelo autor.

Esse processo de formação das nanocápsulas foi avaliado por FTIR (Figura 19). A casca (*shell*) polimérica da nanocápsula foi gerada pela reação química entre o agente reticulante (TDI) e uma porção dos grupos OH do HES. Isso levou ao consumo de parte dos grupos OH do HES que pode ser observado pela diminuição da intensidade relativa da banda em torno de  $3400\text{ cm}^{-1}$  (Figura 19, linha cinza), que está relacionada ao modo vibracional de estiramento assimétrico de grupos OH (TORLOPOV et al., 2020). Além disso, o aparecimento de bandas em  $1740\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=O dos grupos carbonila) e  $1546\text{ cm}^{-1}$  (deformação NH) sugere a formação de ligações de uretano, principal grupo constituinte das nanocápsulas (DOS SANTOS et al., 2020; STEINMACHER et al., 2017; ZHANG et al., 2017), não sendo observados nas moléculas de HES antes da reação (Figura 19, linha preta). A banda intensa em  $2.920\text{ cm}^{-1}$  é característica de estiramento C-H ( $sp^3$ ) (TAHERI et al., 2014; ZHANG et al., 2017). A banda em  $2280\text{ cm}^{-1}$  é atribuída aos grupos NCO do TDI (STEINMACHER et al., 2017; TAHERI et al., 2014), podendo sugerir algum excesso de agente reticulante. Várias bandas presentes na onco-A livre (Figura 19, linha rósea), como bandas de estiramento CH em torno de  $2850\text{ cm}^{-1}$ , vibrações de estiramento C=C e C=O em  $1600$  e  $1230\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente (HADJ-HAMOU et al., 2014), também foram observadas

no nanocompósito magnético final (Figura 19, linha cinza), sugerindo a presença de onco-A no nanocompósito magnético sintetizado.

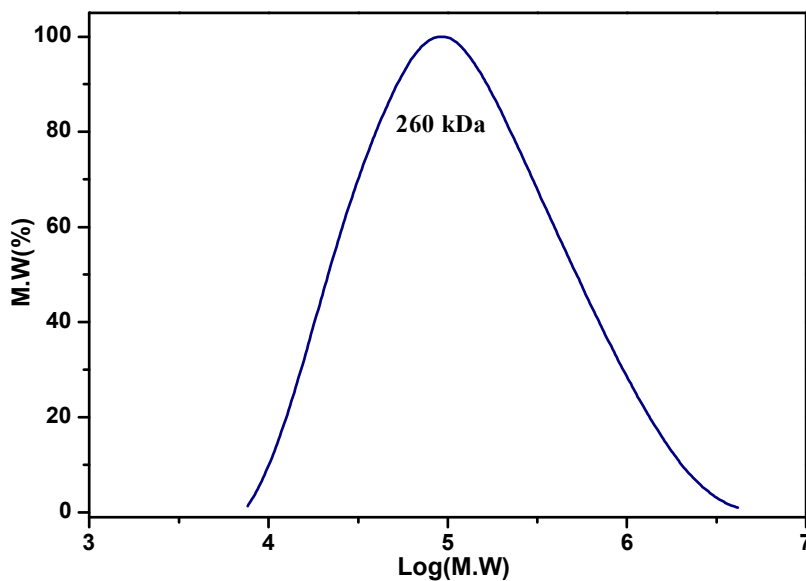
Figura 19 - Medições espectroscópicas de FTIR para: HES livre (linha preta), nanocompósito magnético de HES carregado com onco-A (linha cinza) e onco-A livre (linha rósea)



Fonte: Elaborada pelo autor.

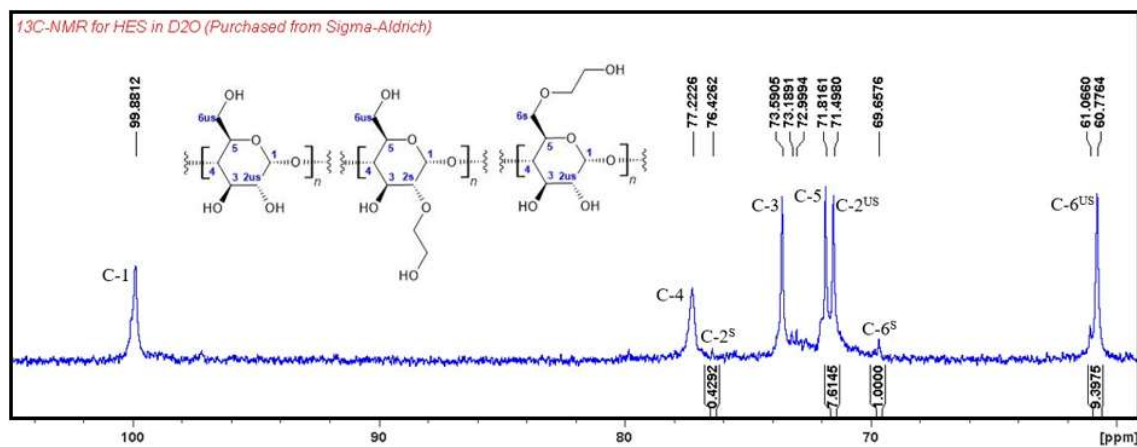
A massa molecular do HES utilizado na síntese das nanocápsulas foi avaliada por GPC, resultando em um valor médio de 260 kDa (Figura 20) (KILICARISLAN OZKAN; OZGUNAY; AKAT, 2019), enquanto o grau de substituição foi determinado por  $^{13}\text{C}$ -RMN, resultando em 0,15 de acordo com a Figura 21 e aplicação da Eq.2 (CHEN et al., 2020; CUENCA; FERRERO; ALBANI, 2020). Portanto, a partir desses resultados, concluiu-se que as características estruturais do HES utilizado como matriz polimérica neste trabalho assemelham-se às mesmas características de formulações que já encontram amplo emprego para fins medicinais, tais como PENTASPAN® (Pentastarch) que é indicado para expansão do volume plasmático em casos de hemorragias e traumas diversos (GOI et al., 2015; RIOUX et al., 2009).

Figura 20 - Cromatograma de Permeação em Gel para o hidroxietilamido (HES)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 21 - Espectro  $^{13}\text{C}$ -NMR para hidroxietilamido em  $\text{D}_2\text{O}$



Carbono	$\delta$	$\delta$ de referência*
C-1	99.98	99.90
C-2 <sup>S</sup>	76.42	69.75
C-2 <sup>US</sup>	71.49	72.03
C-3	73.49	73.01
C-4	77.22	78.82
C-5	71.81	71.38
C-6 <sup>S</sup>	60.77	60.48
C-6 <sup>S</sup>	69.65	62.70

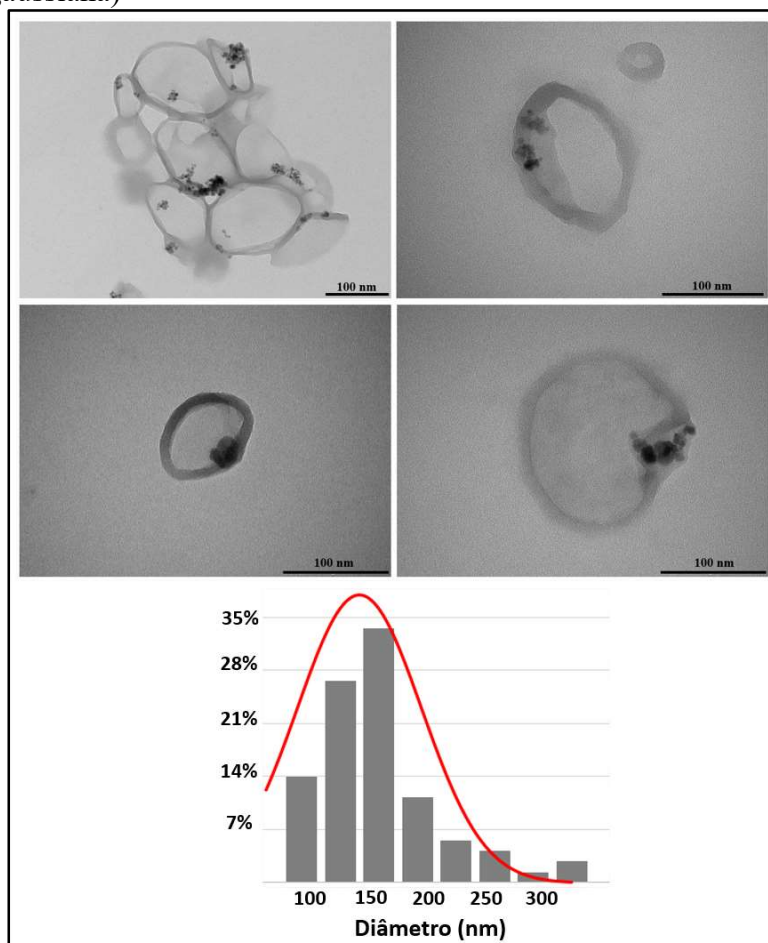
\* CUENCA, FERRERO, ALBANI, 2020.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para as nanocápsulas magnéticas, obteve-se uma morfologia “core-shell” bem definida em que os SPIONs ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato) puderam ser observados dentro do núcleo como pontos mais escuros, e a nanocápsula como uma estrutura esférica carreadora. Essas estruturas foram observadas em diferentes imagens de TEM, apresentando um diâmetro médio de 143 nm (Figura 22).

A morfologia “core-shell” observada condiz com a natureza do processo de formação da nanocápsula (síntese em miniemulsão inversa). Nesse processo, como a reação de polimerização ocorre na interface de gotículas nanométricas, obtidas por ultrassom (KANG et al., 2015; SINGH et al., 2017), o agente reticulante (TDI) reage com os grupos hidroxila do HES, gerando a casca polimérica da nanocápsula por ligações de uretano no formato da própria gota, detalhado anteriormente na Figura 17 (DOS SANTOS et al., 2020; KANG et al., 2015).

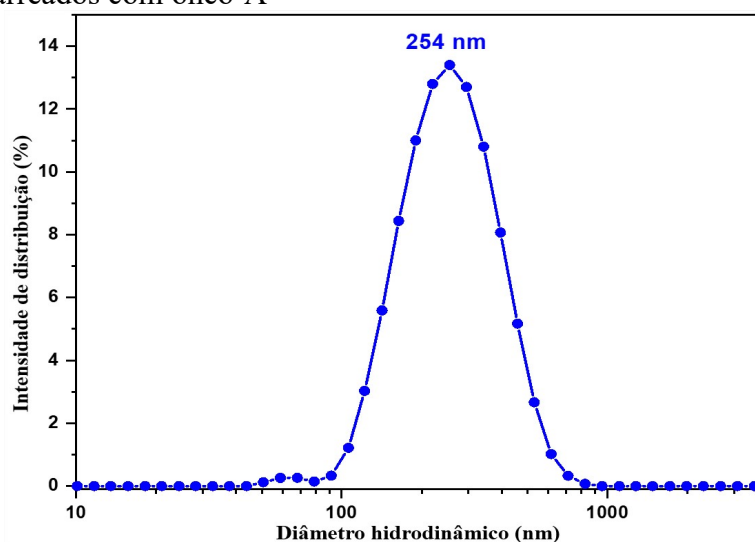
Figura 22 - Imagens de TEM com histograma de distribuição de tamanho de partícula de nanocompósitos carregados com onco-A e SPIONs (linha vermelha corresponde à distribuição gaussiana)



Fonte: Elaborada pelo autor.

As nanocápsulas também foram avaliadas em solução por espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Figura 23), apresentando um diâmetro hidrodinâmico médio de 264 nm. Este diâmetro médio está relacionado com as flutuações brownianas em solução e o raio hidrodinâmico (SOARES et al., 2020), sendo, portanto, esperado um valor superior ao observado por TEM, onde as nanocápsulas foram medidas em condições de secagem completa (CHAMORRO RENGIFO et al., 2019; ZHANG et al., 2019c). Em solução, o índice de polidispersividade (PDI) e o potencial zeta, resultaram em 0,307 e -37 mV, respectivamente, sugerindo uma amostra polidispersa e com alta carga elétrica superficial, que contribui para minimizar o processo de agregação de partículas em suspensão.

Figura 23 - Distribuição de diâmetro hidrodinâmico por DLS para os nanocompósitos magnéticos carregados com onco-A



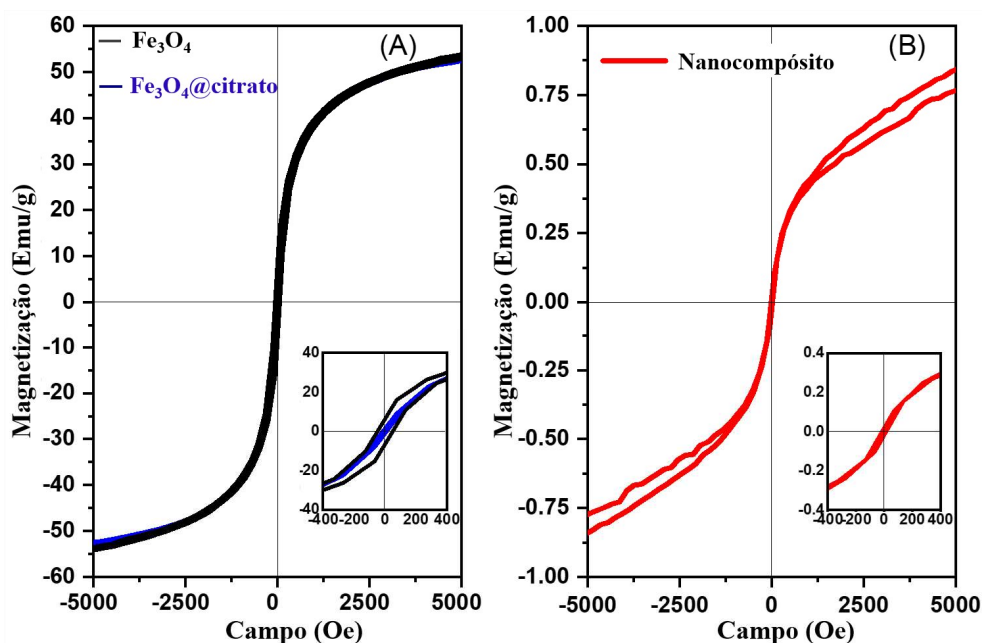
Fonte: Elaborada pelo autor.

As propriedades magnéticas observadas em nanopartículas são altamente influenciadas pelos seus tamanhos da partícula e estruturas de domínio. Um único domínio permite que essas nanopartículas possam exibir um comportamento denominado de superparamagnético (sem magnetização remanescente após a ação de um campo magnético) (MOGHADAM ZIABARI et al., 2020), conforme foi observado em loops de histerese obtidos por medições de VSM em temperatura ambiente (Figura 24). A superfície orgânica revestida nas nanopartículas de magnetita agregou a elas uma massa de grupos citrato, entretanto, é possível supor que essa massa é relativamente pequena, já que não levou a uma mudança significativa nas histereses das nanopartículas magnéticas (Figura 24a). Os valores de magnetização de saturação

obtidos foram 58,98 e 56,21 emu/g para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato, respectivamente, que corresponde com a faixa de valores (30 a 80 emu/g) relatados para pós de magnetita sintética (NOVAL; CARRIAZO, 2019).

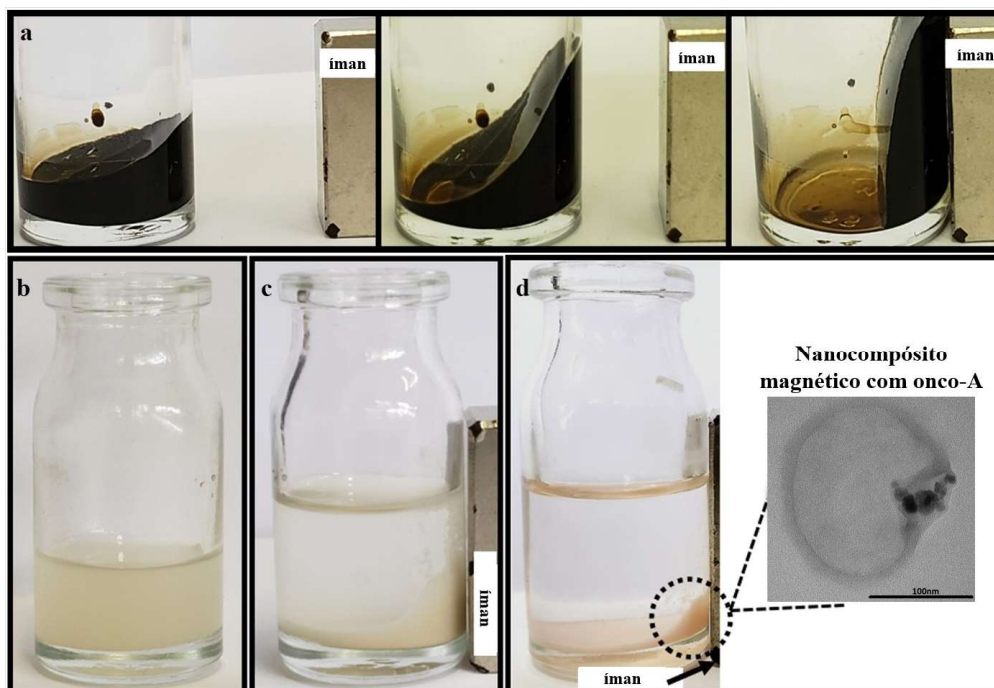
Já no caso das nanocápsulas magnéticas, evidenciou-se um valor de magnetização muito menor (Figura 24b) quando comparado às amostras de magnetita. Isso é esperado devido à incorporação dos materiais orgânicos não magnéticos formadores da nanocápsula, o que reduz a porcentagem de massa magnética na amostra, enquanto aumenta a massa total (efeito denominado de diluição de massa). Porém, apesar da menor magnetização de saturação obtida para as amostras de nanocompósitos, as nanocápsulas ainda mantiveram o caráter magnético, respondendo a uma vetorização magnética pela aplicação de um campo magnético externo (Figura 25).

Figura 24 - Histereses magnéticas a 300 K para a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (linha preta) e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato (linha azul); b) Nanocompósito magnético carregado com onco-A (linha vermelha); (Inserido nos painéis: vista ampliada da região do pequeno campo de -400 a 400 Oe).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 25 - Visualização macroscópica de a) nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato na presença de um campo magnético externo; b) nanocápsulas magnéticas sem onco-A; c) nanocápsulas magnéticas sem onco-A sob um campo magnético externo; d) nanocápsulas magnéticas com onco-A na presença de um campo magnético externo.

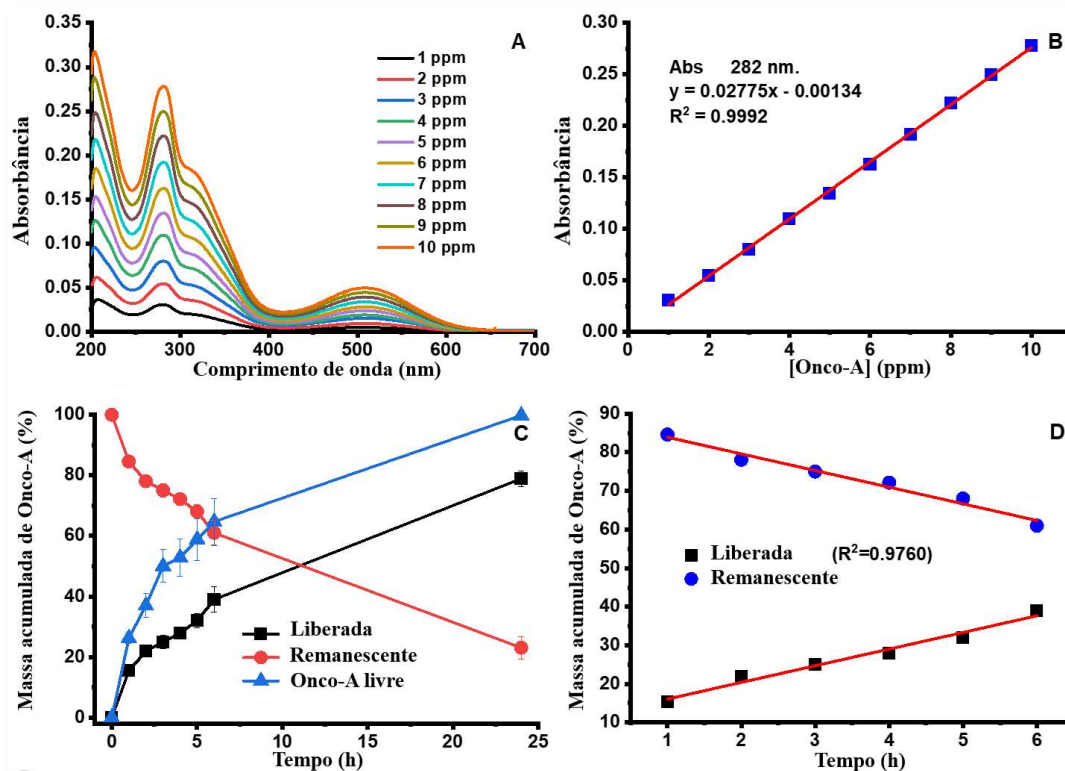


Fonte: Elaborada pelo autor.

### 2.3.3 Estudos de liberação

Para quantificação da liberação de bioativo do nanocompósito, medições de absorvância do espectro eletrônico da onco-A foram realizadas em diferentes concentrações conhecidas através de varreduras de absorção no comprimento de onda UV-Vis (Figura 26a). Assim, construiu-se uma curva de calibração (Figura 26b) para quantificação de onco-A em solução. De acordo com a Eq.1, a eficiência de encapsulamento da onco-A foi  $EE = 92,43\%$ . Portanto, essa elevada EE (%) sugere que o mecanismo sintético proposto de miniemulsão inversa foi eficaz para o co-encapsulamento de onco-A e nanopartículas magnéticas em uma única nanoplataforma de liberação de fármacos.

Figura 26 - a) Varreduras de absorção para onco-A em diferentes concentrações em PBS 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH = 7,4) a 310 K; b) curva de calibração para [onco-A] em 282nm; c) perfil de liberação de onco-A das nanocápsulas, onco-A remanescente (não liberada) e onco-A (bioativo livre) em PBS 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH = 7,4) a 310 K; d) ampliação do perfil de liberação entre 1 a 6 horas para onco-A liberada e remanescente



Fonte: Elaborada pelo autor.

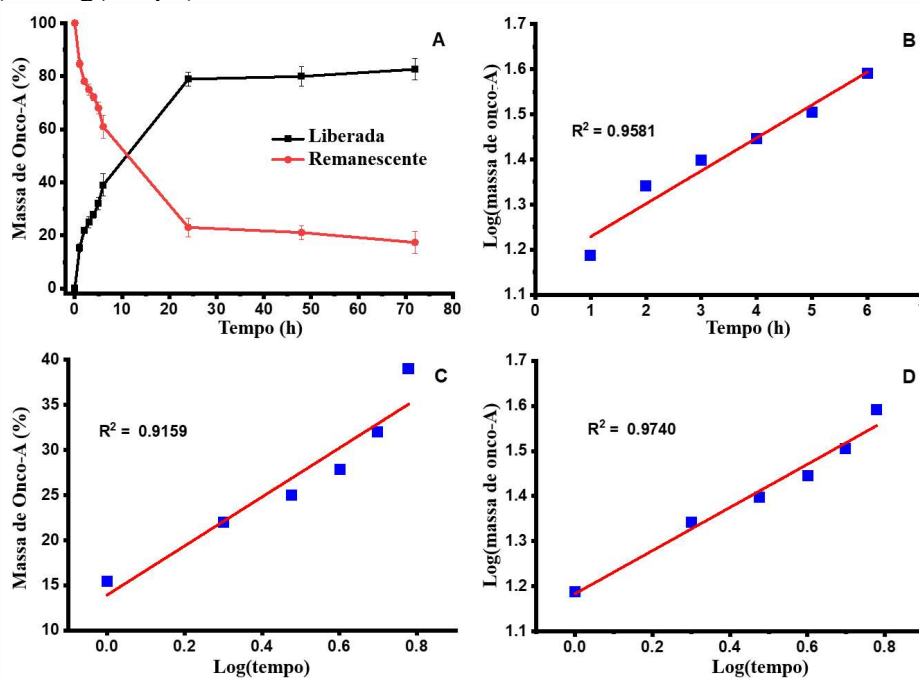
O perfil de liberação de onco-A a partir dos nanocompósitos foi avaliado por 72 horas em meio PBS, usando uma célula de difusão vertical de Franz equipada com uma membrana de diálise. Em seguida, o comportamento de liberação das nanocápsulas foi comparado com o comportamento da onco-A livre (Figura 26c, linhas pretas e azuis). Assim, constatou-se que durante as 6 horas iniciais do experimento, cerca de 65% da onco-A livre foi liberada do compartimento doador para o receptor (Figura 26c, linha azul). No mesmo período, apenas 40% do fármaco foi liberado das nanocápsulas (linha preta). Adicionalmente, concluiu-se que após 24 horas, a liberação de onco-A das nanocápsulas é mínima, já que um patamar de estabilização é atingido em torno de 80% do fármaco liberado (Figura 27). A casca polimérica da nanocápsula desempenha um papel significativo no perfil de liberação, protegendo o bioativo incorporado e prolongando o processo de liberação. Nesse contexto, comportamento muito semelhante já foi relatado em outros sistemas de nanocápsulas de parede polimérica, onde



aproximadamente 70% do fármaco foi liberado dos nanocarreadores em até 30 horas após o início dos testes de liberação (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Os dados coletados em todos os experimentos de liberação foram ajustados a diferentes modelos cinéticos, obtendo-se valores representativos tanto para um comportamento cinético condizente ao modelo de Higuchi (Figura 26d), como também ao modelo de Korsmeyer-Peppas (Figura 27d), com  $R^2$  igual a 0,9760 e 0,9740, respectivamente. No entanto, o modelo de Higuchi encontraria aplicação mais adequada para o estudo do perfil de liberação de fármacos sólidos incorporados a matrizes sólida (liberação de uma superfície plana ou pastilhas esféricas de matriz homogênea), em que a taxa de liberação diminui com o tempo (HIGUCHI T., 1963). Por outro lado, para sistemas de liberação de nanocápsulas à base de HES (PEREIRA et al., 2020), o comportamento de liberação é afetado por mudanças conformacionais, intumescimento/desintegração ou solubilização das cadeias poliméricas dos nanocarreadores pela clivagem hidrolítica ou pela introdução de grupos ionizáveis, o que expande o volume, gerando maior porosidade à liberação do fármaco (PEREIRA et al., 2020; PRAMANIK et al., 2018), seguindo assim Korsmeyer-Peppas como modelo cinético mais adequado.

Figura 27 - a) Perfil de liberação (linha preta) e remanescente (linha vermelha) até 72 h de experimento em PBS  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  (pH = 7,4) a 310 K; b) gráfico de  $\log(\text{massa onco-A})$  vs tempo; c) Gráfico de massa de onco-A vs  $\log(\text{tempo})$ ; d) Gráficos de  $\log(\text{massa onco-A})$  vs  $\log(\text{tempo})$



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 2.3.4 Ensaios biológicos

Para se avaliar o potencial anticâncer da formulação de nanocompósito magnético com onco-A, procedeu-se com teste de citotoxicidade *in vitro* pelo método de redução do MTT. Dessa forma, através do ensaio MTT foram determinados os valores de IC50 para onco-A livre e encapsulada, contra quatro linhagens de células tumorais humanas (Tabela 1). Os dados são representados em valores de IC50 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e correspondem à média  $\pm$  Desvio Padrão de pelo menos quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

De acordo com os resultados da Tabela 1, a onco-A livre exibiu citotoxicidade para todas as linhagens de células tumorais testadas, apresentando maior eficácia contra linhagens leucêmicas, ou seja, menores valores de IC50 para células HL-60. Observou-se, ainda, que a atividade citotóxica foi maior para os nanocompósitos magnéticos carregados com onco-A, em comparação com o bioativo livre. Além disso, a ação anticâncer foi ainda maior para as nanocápsulas carregadas com onco-A sem  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrato (sistema C). Consequentemente, o sistema C exibiu a maior atividade antitumoral em todas as linhagens testadas, o que pode sugerir que os SPIONs incorporados à nanocápsula parecem diminuir a citotoxicidade dos nanocompósitos (comparando os sistemas B e C). No entanto, apesar de que essa constatação não possa ser descartada, a influência dos SPIONs nos valores de IC50 não é preocupante, uma vez que o sistema B ainda apresenta baixos valores de IC50 (na ordem de  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e, consequentemente, um grande potencial para aplicações anticâncer. Portanto, o principal objetivo desempenhado pelos SPIONs no nanocompósito sintetizado é responder a um campo magnético externo, gerando perspectivas de direcionamento magnético de fármacos encapsulados.

Além disso, uma amostra de controle branco (sistema D), consistindo na formulação de nanocompósitos magnéticos sem onco-A também foi avaliada. O sistema D também exibiu citotoxicidade, mas com menos potência do que as nanocápsulas carregadas com onco-A (sistema C), para todas as linhagens de células tumorais testadas. Dessa forma, a citotoxicidade observada no sistema D (sem onco-A) pode ser explicada provavelmente pela concentração de SDS remanescente (0,1% p/p) na formulação do nanocompósito, podendo atuar como um detergente, rompendo a membrana celular e causando, consequentemente, a morte celular (AVILA-CALDERÓN et al., 2020). Qualquer TDI residual do processo de síntese também pode

estar contribuindo para a citotoxicidade do sistema branco, embora o poliuretano (composição da parede da nanocápsula) seja um reticulante biocompatível (BARMAN et al., 2020).

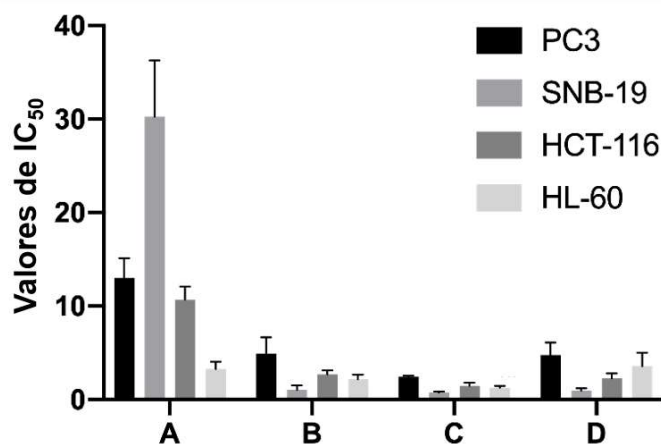
Quando a toxicidade aguda da formulação final foi avaliada por um ensaio de toxicidade *in vivo* (modelo *zebrafish*), nenhuma morte foi observada em nenhum dos grupos testados (Tabela 1), mesmo em uma concentração muito maior ( $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do que aquelas testadas nos experimentos *in vitro*, enfatizando a biocompatibilidade e o potencial da formulação para futuras aplicações anticâncer *in vivo*. Os dados da Tabela 1 encontram-se representados de forma comparativa na Figura 28.

Tabela 1 - Atividade antiproliferativa de onco-A livre e encapsulada contra quatro linhagens tumorais humanas avaliada pelo ensaio MTT em 72h. Estudo de toxicidade aguda (96) de nanocompósito magnético à base de HES carregado com onco-A em modelo *zebrafish*

		MTT ( $\text{IC}_{50} \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) – 72 h				Mortalidade de Zebrafish ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) – 96 h				
Sistemas		PC3	SNB-19	HCT-116	HL-60	Controle	25	50	75	$\text{LC}_{50}$
A	Onco A (livre)	$12.99 \pm 2.13$	$30.26 \pm 6.03$	$10.68 \pm 1.42$	$3.26 \pm 0.75$					
B	Nanocompósito magnético com onco-A	$4.87 \pm 1.77$	$1.01 \pm 0.48$	$2.68 \pm 0.44$	$2.17 \pm 0.49$	0	0	0	0	>75
C	Nanocápsulas com onco-A (sem SPIONS)	$2.50 \pm 0.431$	$0.71 \pm 0.14$	$1.45 \pm 0.34$	$1.24 \pm 0.21$					
D	Nanocompósito magnético (sem onco-A)	$4.76 \pm 1.33$	$0.95 \pm 0.23$	$2.25 \pm 0.55$	$3.56 \pm 1.44$					

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 28 - Atividade antiproliferativa de onco-A livre e encapsulada contra quatro linhagens tumorais humanas avaliada pelo ensaio MTT em 72h

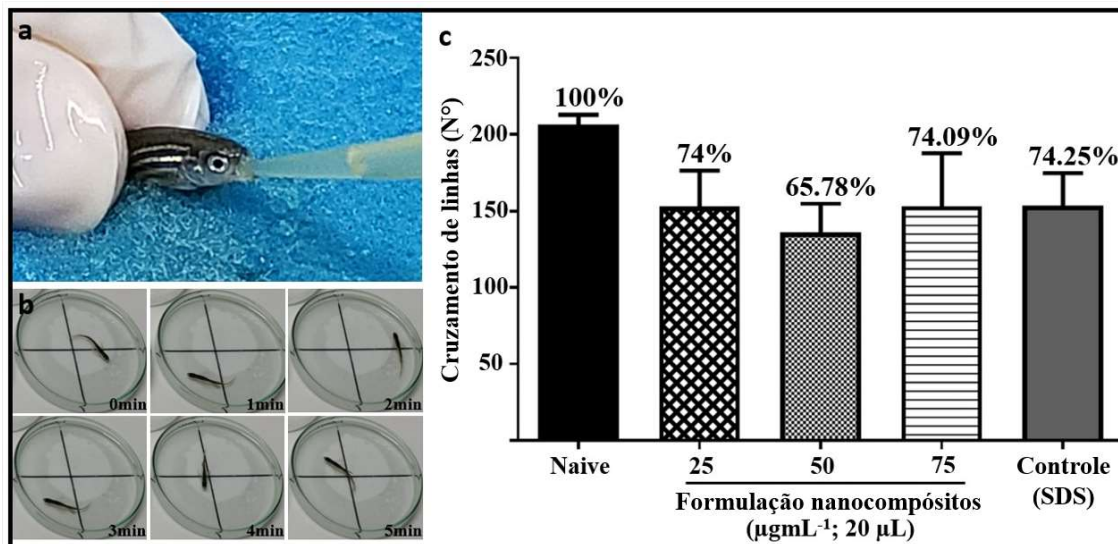


Fonte: Elaborada pelo autor.

A toxicidade *in vivo* da formulação aquosa de nanocompósitos foi avaliada pela primeira vez utilizando o modelo *zebrafish*. Os peixes (n = 8/grupo) foram selecionados aleatoriamente e tratados oralmente (Figura 29a) com 20  $\mu\text{L}$  das formulações de nanocompósito (25, 50 ou 75  $\mu\text{g onco-A} / \text{mL}$ ) ou 20  $\mu\text{L}$  da amostra de controle que consiste em uma solução apenas de SDS (veículo de formulação 0,1% p / p, sem nanocompósito). Um grupo de animais sem nenhum tratamento foi incluído (Naive). Após 96 h, foi registrado o número de peixes mortos em cada grupo e determinada a concentração letal capaz de matar 50% dos animais ( $\text{LC}_{50}$ ). Para todos os grupos testados, nenhuma morte foi observada (Tabela 1), sugerindo uma potencial biocompatibilidade da formulação desenvolvida para futuras aplicações *in vivo*.

A atividade locomotora é um importante indicador para a análise comportamental de fármacos que afetam o sistema nervoso central, avaliando se a amostra testada pode causar comprometimento locomotor (Lira et al., 2020). Os efeitos dos nanocompósitos na atividade locomotora do *zebrafish* adulto foram avaliados (Figura 29b). Os resultados sugerem que, para o grupo controle (ausência de nanocompósitos), a solução de SDS causou impacto moderado no sistema nervoso central dos animais, promovendo uma ação calmante. No entanto, para as formulações de nanocompósitos, esse impacto foi mantido, não se observando qualquer aumento de ação calmante pela presença dos nanocompósitos nas concentrações testadas (25, 50 e 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figura 29c), sugerindo que o impacto observado na atividade locomotora é devido ao agente surfactante, mas não diretamente relacionado aos nanocompósitos. Assim, a diminuição da concentração de SDS remanescente na formulação final de nanocompósitos é desejável no sentido de se minimizar os impactos da formulação na atividade locomotora.

Figura 29 - a) Representação do tratamento oral realizado em *zebrafish*; b) representação de teste de campo aberto (atividade locomotora); c) Efeito das formulações na atividade locomotora de *zebrafish* adulto: Naive: animais não tratados. Controle: solução SDS 1mg/mL (sem nanocompósito) em água destilada (20  $\mu$ L)



Fonte: Elaborada pelo autor.

### **3 CAPÍTULO III - MAGNETOFORRESE COMO ESTRATÉGIA DE DIRECIONAMENTO MAGNÉTICO DE FÁRMACOS EM APLICAÇÕES TÓPICAS**

### 3.1 APRESENTAÇÃO

Os resultados obtidos e abordados nos capítulos anteriores serviram de base, juntamente com os conceitos relativos a direcionamento magnético de fármacos, para elaboração de um projeto de pesquisa independente, submetido ao Departamento Federal de Assuntos Econômicos, Educação e Pesquisa do governo da Suíça. O referido projeto foi então selecionado e contemplado pelo programa “Swiss Government Excellence Scholarships”, resultando em um estágio de pesquisa em parceria internacional com o *Molecular Therapeutics Delivery Group*, da Universidade de Genebra, Suíça, grupo detentor de renomada expertise de excelência no desenvolvimento de novas estratégias de entrega de drogas em diferentes barreiras biológicas, tais como a pele, o olho, o intestino e a mucosa bucal.

Assim, o Capítulo III deste trabalho dedica-se à abordagem dos aspectos envolvidos nesse estágio de pesquisa, conciliando a aplicabilidade de nanocarreadores magnéticos com estratégias de potencialização da biodisponibilidade de fármacos frente a barreiras biológicas, especificamente, o estrato córneo.

De maneira inédita, o presente estudo avaliou a penetração transdérmica de fármacos, direcionada, ou não, ao folículo piloso, por influência do fenômeno da magnetoforese negativa.

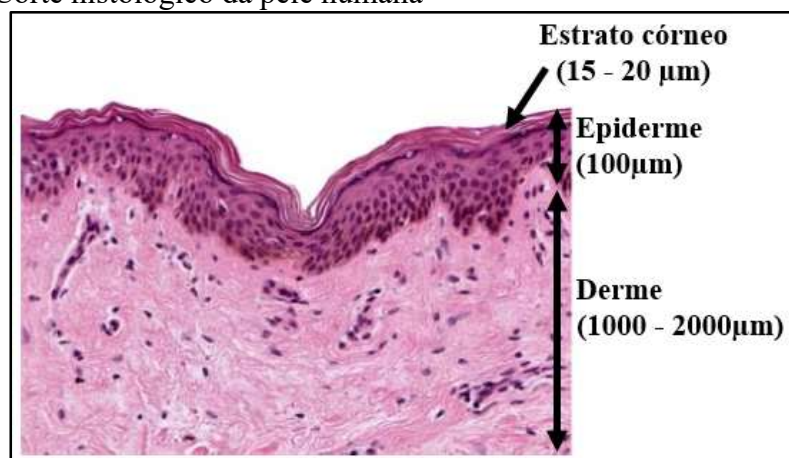
## 3.2 INTRODUÇÃO

### 3.2.1 Penetração transdérmica de fármacos

A pele é o maior órgão do corpo, tendo como principais funções a regulação da temperatura corporal, redução de perda de água e proteção do organismo através de mecanismos de controle de transporte, impedindo a entrada de matéria exógena (inclusive microrganismos patógenos) e regulando a saída de moléculas endógenas. A epiderme fornece essa função protetora através da estrutura de tijolo e argamassa de sua camada mais externa, o estrato córneo (SC), onde os corneócitos proteináceos são incorporados em uma matriz lipídica multilamelar (modelo brick & mortar), representado a seguir pela Figura 30 (SINGHAL et al., 2019).

Doenças de pele representam um problema de saúde pública global que, frequentemente, geram impactos fisiológicos, psicológicos e sociais. Algumas das doenças de pele mais comuns incluem acne, alopecia, dermatite atópica, pigmentação facial, psoríase e diferentes tipos de câncer de pele (QU et al., 2022).

Figura 30 – Corte histológico da pele humana



Fonte: adaptada de (SINGHAL et al., 2019).

Terapias tópicas, em geral, apresentam elevados níveis de adesão terapêutica pelos pacientes, sendo muitas vezes a modalidade mais recomendada e eficaz, em comparação com administração oral de medicamentos. No entanto, no que se refere à administração transdérmica de fármacos, o SC constitui uma poderosa barreira de difusão cuja arquitetura molecular e composição garantem que apenas fármacos extremamente potentes possam penetrar a pele em doses farmacologicamente relevantes (GRATIERI et al., 2013). Aliado ao impedimento imposto pelo estrato córneo, diversas propriedades como massa molecular, solubilidade aquosa e coeficiente de partição



octanol/água (logP) influenciam na disponibilidade de uma molécula para aplicação transdérmica. Por esse motivo, o mercado de adesivos terapêuticos transdérmicos compreendia, ainda recentemente, produtos baseados em apenas 18 fármacos (PASTORE et al., 2015).

Sistemas nanocarreadores para entrega transdérmica de drogas oferecem múltiplas vantagens ao fármaco encapsulado, tais como aumento de solubilidade, maior estabilidade físico-química, aumento da biodistribuição, maior permeação na pele, acumulação direcionada e entrega controlada de medicamentos. Assim, nanomateriais podem efetivamente aumentar a permeação de moléculas ativas através do SC e permitir sua penetração nas camadas mais profundas da pele (ZOABI; TOUITOU; MARGULIS, 2021). Os nanocarreadores tópicos mais amplamente explorados para entrega de drogas incluem lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, microemulsões, nanogéis, dendrímeros e micelas (QU et al., 2022).

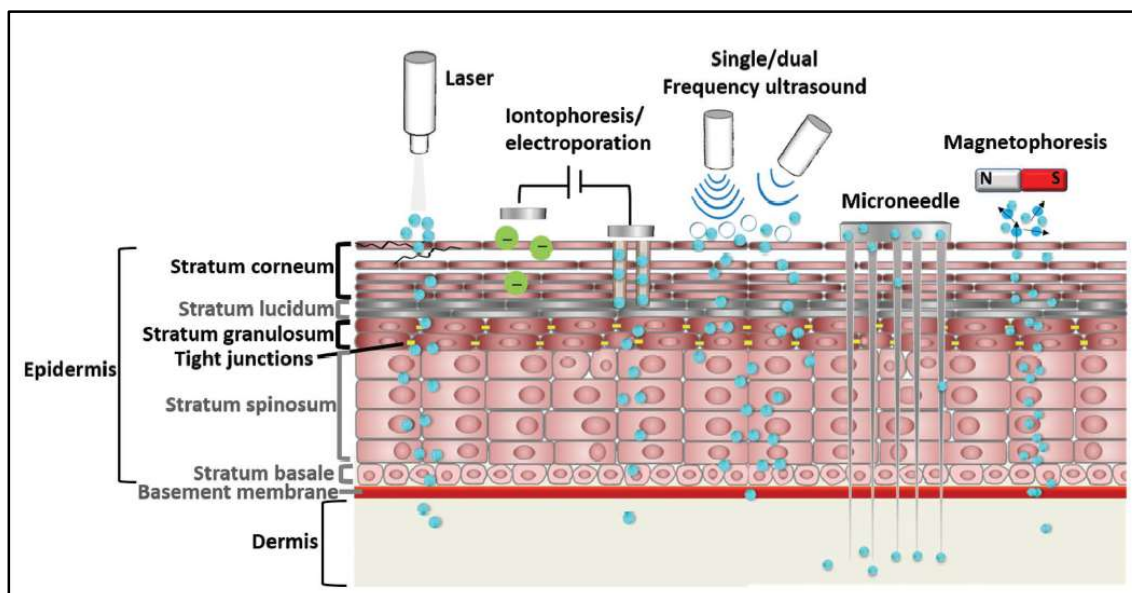
Recentemente, micelas poliméricas têm ganhado destaque como nanocarreadores para aplicações tópicas na pele (BANGIA et al., 2019; LAPTEVA et al., 2019; QUARTIER et al., 2021). Especialmente, nanocarreadores baseados em micelas poliméricas podem ser aplicados na entrega direcionada ao folículo piloso para melhorar os resultados de tratamentos tópicos de algumas doenças de pele de origem folicular, tais como alopecia e acne (DAHMANA et al., 2021; KANDEKAR et al., 2018; LAPTEVA et al., 2015). O folículo piloso, a haste capilar e a glândula sebácea formam, coletivamente, a unidade pilossebácea (PSU) (WEINER, 1998).

Além das contribuições oriundas da utilização de sistemas nanocarreadores, métodos ativos, como iontoforese e eletroporação, têm demonstrado resultados significativamente melhores para penetração na pele de drogas de elevado peso molecular, ou para moléculas com estruturas acentuadamente polares (NIKOLIĆ et al., 2022). Nesse contexto, diferentes métodos de penetração ativa, como ablação por laser, ultrassom, iontoforese, microagulhamento e magnetoforese (Figura 31) têm sido investigados e aperfeiçoados para fornecerem uma variedade de terapias tópicas de penetração do estrato córneo da pele (YANG et al., 2017).

A magnetoforese (especialmente abordada no tópico 1.3.5 do capítulo I) se trata de um método completamente não invasivo, já que consiste na aplicação de um campo magnético que, ao contrário de outras técnicas, não gera qualquer dano ao tecido. O efeito do campo magnético no fluxo de difusão transdérmica do medicamento pode

ser aumentado com o respectivo aumento de intensidade do campo. Assim, o aumento da penetração de lidocaína na pele foi demonstrado em diferentes intensidades de campo magnético (30, 150 e 300 mT) (AKHTAR et al., 2020; MURTHY; SAMMETA; BOWERS, 2010).

Figura 31 – Métodos ativos de penetração transdérmica de fármacos



Fonte: (YANG et al., 2017).

O campo magnético constitui, portanto, uma possibilidade de ação externa que tem sido explorada em aplicações de entrega de medicamentos, oferecendo penetração tecidual profunda com perfil de segurança confirmado clinicamente. Em comparação com outras formas de estímulos físicos, a magnetoforese se destaca pelo fato que o tecido biológico é magneticamente inerte e, portanto, ao contrário da luz, ultrassom ou corrente elétrica, os campos magnéticos normalmente não agem diretamente nas barreiras biológicas. Assim, as forças magnéticas normalmente não seriam tão atenuadas pelo tecido, o que é benéfico para evitar a deposição excessiva de energia e consequentes danos físicos no tecido saudável (FARZIN et al., 2020; SUN et al., 2020).

Nanocarreadores magnéticos podem atuar fortemente como veículos para acumulação aprimorada e liberação controlada de drogas. Estudos transdérmicos *in vitro* demonstram que compósitos magnéticos podem penetrar profundamente na pele através da ação de um campo magnético externo. (RAO et al., 2015).

Com base no exposto, o presente trabalho busca, pela primeira vez, avaliar o efeito da aplicação de um campo magnético na penetração transdérmica direcionada, ou não, ao folículo piloso, investigando-se, especificamente, a penetração sob condições de

magnetoforese negativa em comparação com a penetração passiva. As nanocápsulas abordadas no capítulo II, bem como outra formulação à base de micelas poliméricas, serão objeto da presente investigação.

### 3.2.2 Adapaleno em micelas poliméricas de TPGS

O succinato de D- $\alpha$ -tocoferol polietilenoglicol 1000 (TPGS) é um derivado da vitamina E conjugado com polietilenoglicol já aprovado pela Food and Drug Administration como ingrediente farmacêutico, tendo sido utilizado como excipiente em diversos produtos comercializáveis. Também já foi aprovado pela Agência Europeia de Medicamentos para o tratamento de colestase crônica congênita ou hereditária (Vedrop®). Recentemente, resultados encorajadores confirmaram que micelas poliméricas de TPGS proporcionaram o desenvolvimento de formulações aquosas para distribuição epidérmica direcionada de sirolimo (droga imunossupressora) em angiofibromas faciais (QUARTIER et al., 2021).

Adapaleno (ADA) é um retinóide de 3ª geração, derivado do ácido naftóico, usado no tratamento tópico de acne (*acne vulgaris*) leve a moderada (MILLIKAN, 2000). Contudo, ADA é excepcionalmente lipofílico ( $\log P = 8,1$ ) e praticamente insolúvel em água ( $<4 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), encorajando o desenvolvimento de formulações em estratégias de solubilização e veiculação para seu uso tópico. Nesse contexto, nanocarreadores a base de micelas poliméricas de TPGS permitiram a entrega direcionada de ADA ao folículo piloso, gerando melhores perspectivas para terapias de doenças foliculares (KANDEKAR et al., 2018).

ADA mostra uma forte fluorescência nativa em 389 nm (emissão) quando excitado em 312 nm. Métodos fluorimétricos demonstraram elevada sensibilidade para quantificação de ADA, mesmo em pequenas concentrações na faixa de  $\text{ng.mL}^{-1}$ , em alternativa a métodos sofisticados e de alto custo, como cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (TOLBA; EL-GAMAL, 2016).

Dessa forma, considerando formulações de micelas poliméricas à base de TPGS carregadas com ADA, já desenvolvidas e investigadas pelo grupo de pesquisa parceiro (KANDEKAR et al., 2018), o presente trabalho avaliou, de maneira inédita, o efeito da magnetoforese negativa no direcionamento magnético de adapaleno para o folículo piloso, utilizando métodos fluorimétricos de quantificação.

### 3.3 METODOLOGIA

#### 3.3.1 *Material*

Fluoresceína foi obtido da Sigma Aldrich (Buchs, Suíça). ADA foi adquirido da Hangzhou Dayangchem Co. Ltd, (Hangzhou, PR China). TPGS, cloreto de sódio e potássio, fosfato de sódio e potássio e Tween 80 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Buchs, Suíça). Eukitt® foi adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Dodecil sulfato de sódio (SDS) e 4,6-diamino-2-fenil-indol (DAPI) foram adquiridos de Applichem Axon lab AG (Baden-Dättwil, Suíça). Solução Dulbecco (salina tamponada com fosfato sem cloreto de cálcio e cloreto de magnésio; DPBS) foi obtida da Life Technologies™ (Zug, Suíça). Acetona grau HPLC foi adquirida da Fisher Scientific (Reinach, Suíça). Água ultrapura (Millipore Milli-Q Gard 1 Purification Pack resistividade > 18 MΩ cm; Zug, Suíça) foi usada para preparar todas as soluções.

#### 3.3.2 *Síntese das formulações*

##### 3.3.2.1 *Nanocápsulas poliméricas carregadas com fluoresceína*

Nanocápsulas de hidroxietilamido (HES) foram sintetizadas em um sistema de miniemulsão inversa (água em óleo), conforme descrito no tópico 2.2.3 do capítulo II. Adaptações foram realizadas para estudos da viabilidade desse nanocarreador em aplicações de penetração transdérmica por magnetoforese negativa. Assim, encapsulou-se o composto fluoresceína ao invés de onco-A. Além disso, os SPIONs não foram coencapsulados na estrutura polimérica, sendo adicionados livres na solução final das nanocápsulas, formando assim uma formulação de nanocápsulas diamagnéticas envoltas em um meio paramagnético (0,45 mg SPIONs/mL<sub>formulação</sub>), ideal para aplicações em magnetoforese negativa, conforme abordado no capítulo I, tópico 1.3.5, Figura 9b.

##### 3.3.2.2 *Micelas de TPGS carregadas com ADA*

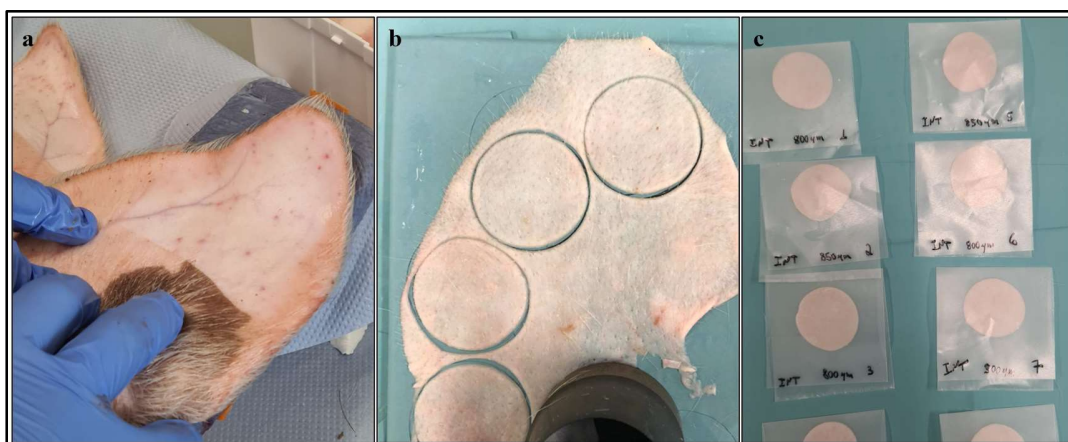
Micelas à base de TPGS carregadas com adapaleno foram desenvolvidas e otimizadas pelo grupo parceiro em estudos anteriores pelo método de evaporação do solvente (KANDEKAR et al., 2018). Resumidamente, adapaleno e TPGS foram dissolvidos em 4 mL de acetona. A mistura foi adicionada, gota a gota, a 4 mL de água ultrapura sob sonicação (Branson Digital Sonifier® S-450D; Carouge, Suíça). Posteriormente, a acetona foi lentamente evaporada a 40 °C por rotaevaporação (Büchi RE 121 Rotavapor®; Flawil, Suíça). Após repouso de 12h para equilíbrio, a solução micelar foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 min (Eppendorf Centrifuge 5804;

Hamburgo, Alemanha) para remoção de possíveis quantidades de fármaco precipitado, coletando-se cuidadosamente o sobrenadante. Ao sobrenadante final, SPIONs foram solubilizados a uma concentração de 0,45 mg/mL<sub>formulação</sub>.

### 3.3.3 *Processamento de pele*

Pele de orelha suína foi processada e usada para estudos in vitro em células de difusão de Franz. O fornecimento se deu a partir de um abatedouro local (CARRE; Rolle, CH) sempre no mesmo dia de abate dos animais. Resumidamente ilustrado a seguir pela Figura 32, as amostras de pele foram processadas com um dermatomo elétrico Zimmer® (Münsingen, Suíça), acoplado a tubulação de ar pressurizado, coletando-se amostras de pele com espessura próxima a 800 µm (32a). Excesso de pelos foi removido cuidadosamente da superfície da pele com auxílio de um aparelho de barbear elétrico e discos circulares de 220 mm de diâmetro foram então selecionados (32b) para armazenamento em película Parafilm® a -20 °C por um período não superior a 3 meses (32c).

Figura 32 – Etapas do processamento de pele suína



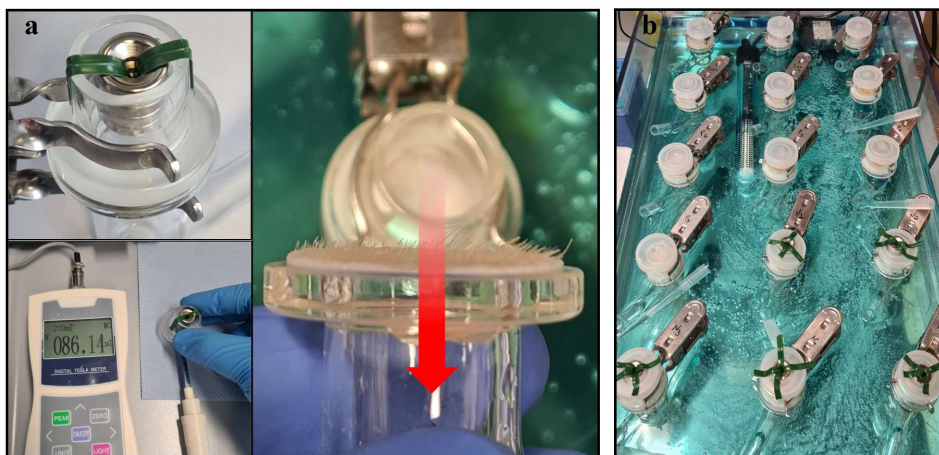
Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.3.4 *Experimentos de penetração transdérmica*

O perfil de penetração transdérmica foi avaliado através da utilização de células verticais de difusão de Franz, adaptadas de protocolos anteriores (LAPTEVA et al., 2020). Discos de pele de orelha suína foram fixados entre o compartimento receptor e doador (área de permeação: 2,0 cm<sup>2</sup>) com a face do estrato córneo voltada para o compartimento doador. Ao compartimento doador foram adicionadas alíquotas de 0,4 mL das amostras a serem analisadas. Ao compartimento doador também foi adaptado a

fixação de ímãs, quando necessário, promovendo um campo magnético de aproximadamente 85mT sobre a superfície da pele (Figura 33a). O compartimento receptor foi preparado com 10 mL de solução tamponada (tampão fosfato, pH = 7,3), sob agitação magnética constante e banho termostaticado a  $33\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ . Para os testes envolvendo ADA utilizou-se ainda Tween 80 (1%) no compartimento receptor. Ensaios foram realizados em quintuplicata, sempre de forma independente para experimentos de penetração passiva (ausência de campo magnético) e penetração com aplicação de campo magnético externo (magnetoforese negativa) (Figura 33b). Os experimentos de penetração foram realizados por 24h ou 8h, depois do que as células de Franz foram desmontadas e os discos de pele lavados cuidadosamente com água corrente e algodão umedecido com solução tampão PBS pH 7,3 para remoção de eventual formulação remanescente na superfície do estrato córneo.

Figura 33 – Adaptação de células de Franz para ensaios de penetração transdérmica



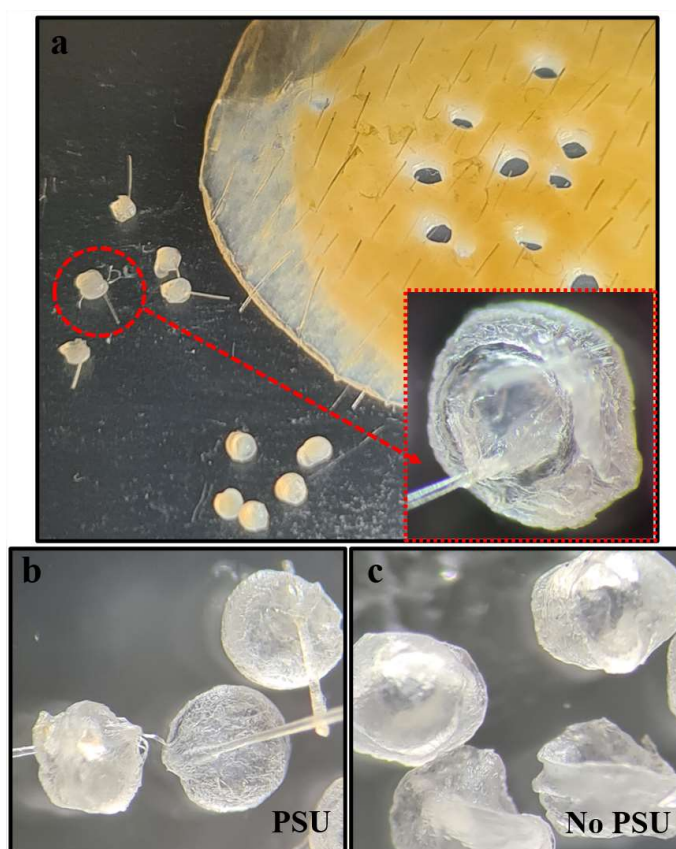
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para extração da droga penetrada na pele, os discos de pele foram então seccionados em pequenos pedaços e acondicionados por 12h em tubo Falcon ou Eppendorf, sob agitação em vórtex, com 7,5 mL de tampão PBS (extração de fluoresceína) ou 4,0 mL de etanol (extração de ADA). Extrações referentes a PSU foram realizadas sempre com 1 mL do respectivo solvente. As soluções então passaram por filtros Millipore 0,22  $\mu\text{m}$  para remoção de possíveis partículas em suspensão provenientes da pele e a quantificação se deu por espectroscopia de fluorescência.

### 3.3.5 *Biópsia de discos de pele de 1mm com e sem unidade pilossebácea (PSU)*

Amostras de pele foram cuidadosamente manipuladas, de acordo com procedimentos previamente desenvolvidos pelo grupo parceiro (LAPTEVA et al., 2020), de modo que a extremidade da PSU, a raiz do pelo e o seu ângulo de implantação na pele pudessem ser considerados no procedimento de punção de porções epiteliais (1mm) contendo ou não PSU, conforme representado pela Figura 34a. A coleta foi então verificada quanto à integridade e quanto à presença ou ausência de PSU por meio de um estereomicroscópio Leica S6D (Leica; Heerbrugg, Suíça) (34b e 34c).

Figura 34 – Biópsia de discos de pele de 1mm com e sem unidade pilossebácea (PSU)



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.3.6 *Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)*

Após 24h de experimento de penetração transdérmica, amostras foram seccionadas em espessura de 20  $\mu\text{m}$  através de um Criotome (Thermo Scientific CryoStar<sup>TM</sup> NX70; Reinach, Switzerland) (Figura 35a). As secções transversais de 20  $\mu\text{m}$  de pele foram fixadas em lâminas de microscópio Superfrost<sup>TM</sup> Plus com formaldeído 4% por 15 minutos, lavadas em PBS e permeabilizadas em metanol por 5 min. Após a remoção do metanol por lavagem em PBS, os núcleos das células foram

corados com 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DAPI (marcador fluorescente) por 5 min. As lâminas foram então finalizadas com meio de montagem Eukitt e uma lâmina de cobertura (35b). A aquisição das imagens foi realizada no Bioimaging Core Facility, Faculdade de Medicina, Universidade de Genebra. Seções de pele foram examinadas com um microscópio Axio Scan.Z1 (Zeiss, Alemanha) (35c), em que cada imagem foi obtida pela média de dez varreduras repetidas. O processamento das imagens foi realizado através do ZEN 3.2 Imaging Software Blue edition. Comprimentos de onda de excitação e emissão para DAPI foram de 353 e 465 nm, respectivamente.

Figura 35 – Obtenção de imagens de CLSM



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.3.7 Espectroscopia de fluorescência

Espectros de fluorescência, bem como medidas de intensidade de fluorescência foram obtidas a partir de um leitor de microplaca de alto desempenho BMG CLARIOstar® Plus (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemanha). As amostras foram acondicionadas em microplacas de poliestireno preto de 96 poços (OptiPlate-96), sempre em volumes de 200 $\mu\text{L}$  em cada análise. Diferentes curvas de calibração, abrangendo faixas de concentração de interesse, foram construídas sempre de forma simultânea às análises das amostras, garantindo semelhantes condições de temperatura e parâmetros técnicos das lâmpadas e sensores ópticos. Softwares SMART Control e MARS data analysis foram utilizados no tratamento de dados. Fluoresceína e adapaleno foram excitados em 480 e 320 nm, respectivamente, tendo suas emissões medidas em 530 e 370nm, respectivamente.



### 3.4 RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1 *Nanocápsulas poliméricas de hidroxietilamido (HES) carregadas com fluoresceína*

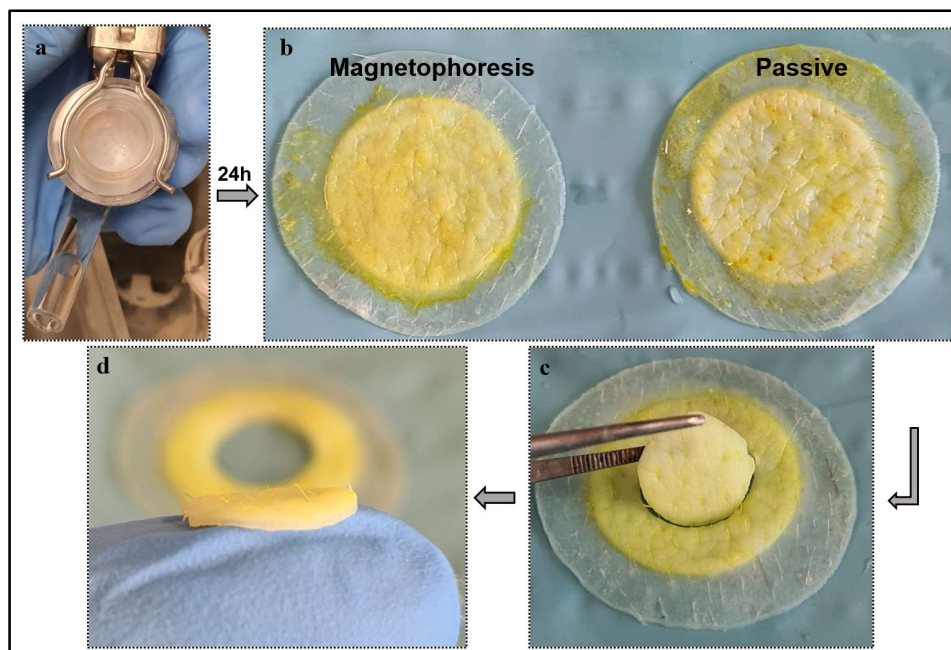
Com o objetivo de se avaliar a possibilidade de direcionamento magnético das nanocápsulas de HES abordadas no capítulo II, investigou-se a performance desses nanocarreadores na veiculação de um composto hidrofílico em penetração transdérmica, sob presença e ausência de campo magnético. Fluoresceína é um composto amplamente empregado como sonda fluorescente para diversas moléculas, tendo sido selecionada como composto hidrofílico modelo para o presente estudo, devido a suas propriedades luminescentes, como picos de emissão de alta intensidade e altos coeficientes de absorção molar, que lhe conferem fácil detecção, quantificação e geração de imagem (YAN et al., 2017). Espectros de absorção e emissão para solução de fluoresceína em tampão PBS demonstraram 480 nm e 530 nm, respectivamente, como regiões de comprimento de onda de máxima intensidade.

Os experimentos de penetração transdérmica de fluoresceína foram realizados por 24h em células de Franz com área de permeação de 2 cm<sup>2</sup>, com aplicação inicial de 400 µL de formulação magnética de nanocápsulas poliméricas de HES carregadas com fluoresceína em concentração de 300 µg/mL, totalizando, dessa forma, uma aplicação de fluoresceína na pele de 60 µg/cm<sup>2</sup>.

Transcorridas as 24h de experimento, as células de Franz foram desmontadas e os discos de pele cuidadosamente lavados para se remover excesso de formulação da superfície. Devido à coloração bastante característica da fluoresceína, foi possível se observar visualmente uma penetração mais acentuada nos discos de pele mantidos sob campo magnético, em comparação com os discos mantidos em condições de penetração passiva (ausência de campo magnético), conforme ilustrado pela Figura 36 (a e b).

Em seguida, procedeu-se com a quantificação da fluoresceína por meio de processo de padronização de sua extração da pele em discos de 0,785cm<sup>2</sup>, priorizando-se as regiões mais centrais (Figura 36c e 36d), em detrimento das regiões periféricas, por estarem mais alinhadas com os ímãs afixados na parte central superior do compartimento doador das células de Franz, para posterior quantificação por espectroscopia de fluorescência.

Figura 36 – Penetração transdérmica de fluoresceína por nanocápsulas de HES



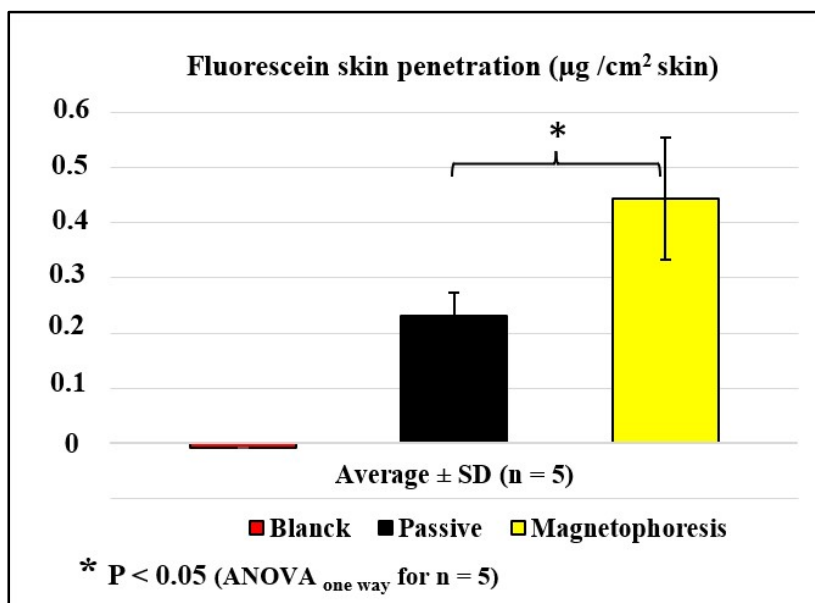
Fonte: Elaborada pelo autor.

Testes de padronização de extração de fluoresceína foram realizados para garantir a eficiência da metodologia de extração adotada. Concentrações conhecidas de fluoresceína livre, solubilizada em tampão PBS, foram aplicadas em amostras de pele a uma concentração de  $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e deixadas penetrar até completa secagem da superfície e estabilização por 6h. Os solventes DMSO e tampão PBS foram então testados em triplicata como candidatos à extração, observando-se uma eficiência de extração de  $84,37\% (\pm 0,58)$  e  $72,33\% (\pm 1,76)$ , respectivamente (valores expressos em %média  $\pm$  SD). Embora DMSO tenha apresentado uma maior eficiência, PBS também demonstrou uma eficiência aceitável de extração de fluoresceína da pele, tendo esse segundo candidato sido escolhido devido a suas propriedades de menor volatilidade, odor e, principalmente, menor risco de provocar intoxicação acidental.

Os resultados da quantificação da penetração de fluoresceína na pele (Figura 37) demonstraram que nos experimentos de magnetoforese negativa foi possível observar uma penetração de  $0,44 \mu\text{g}/\text{cm}^2 (\pm 0,11 \text{ SD})$ . Nos experimentos de penetração passiva, observou-se uma menor penetração de  $0,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2 (\pm 0,04 \text{ SD})$ . Esses resultados indicam uma penetração de fluoresceína, em média, 91% mais intensa para discos de pele de  $0,785\text{cm}^2$  (Figura 36d) com a aplicação de um campo magnético de 85 mT sobre a superfície da pele. A constatação desses resultados condiz com o raciocínio teórico que sustenta a escolha da magnetoforese negativa como um método de auxílio à

aplicação tópica de medicamentos (BANI; BHARDWAJ, 2021), devido a sua possibilidade de repelir nanopartículas (ALNAIMAT et al., 2018; KUMAR et al., 2016). Portanto, a hipótese aqui avaliada é se essa repulsão gerada por magnetoforese, quando aplicada em favor de um fluxo de penetração transdérmica, partindo de uma fonte geradora de campo magnético na superfície externa da pele, poderia intensificar a penetração de drogas de uso tópico.

Figura 37 – Quantificação de fluoresceína em discos de pele de 0,785cm<sup>2</sup>



Fonte: Elaborada pelo autor.

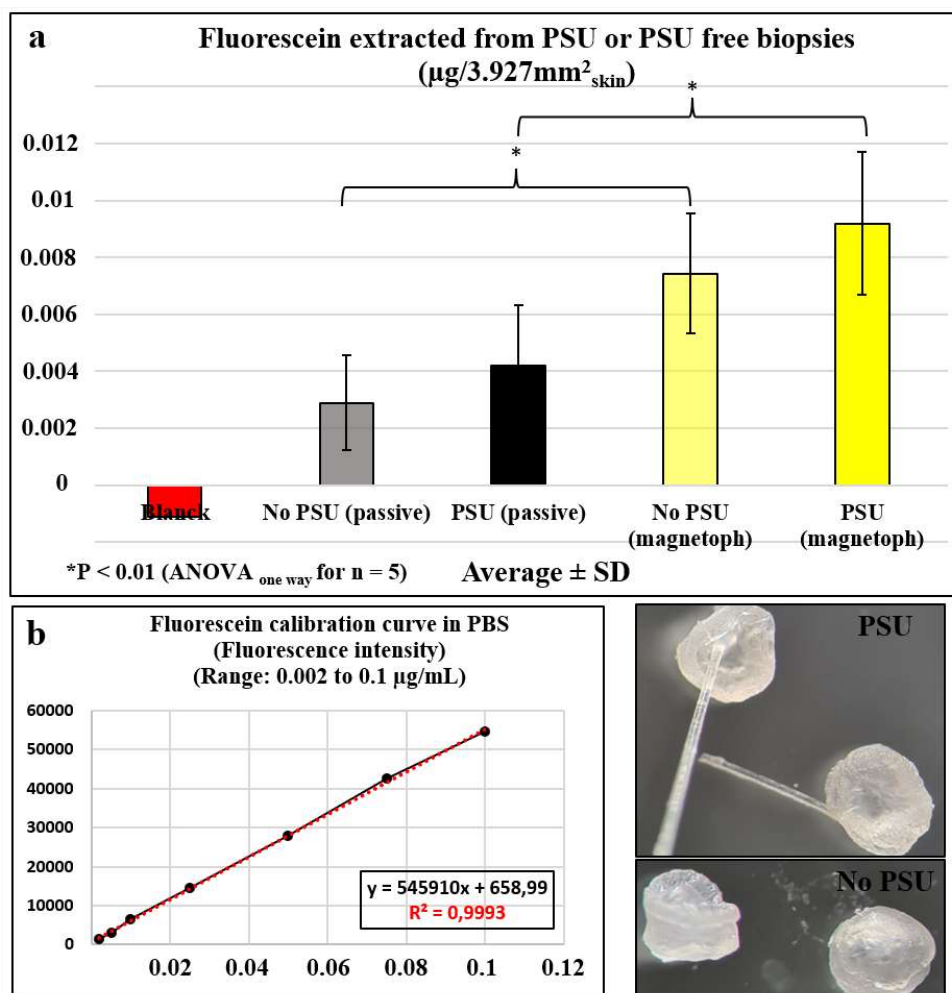
O desvio padrão observado de forma mais acentuada nos sistemas envolvendo a magnetoforese pode ser explicado pela limitação operacional de se garantir, para todos os experimentos, a mesma distância entre a superfície da pele e o ímã adaptado ao compartimento doador da célula de Franz. Uma diferença micrométrica já poderia interferir na intensidade do campo magnético (LINDEMANN et al., 2021) na superfície da pele e, conseqüentemente, gerar uma maior variação de resultados entre os diferentes experimentos envolvendo magnetoforese, ou seja, maior desvio padrão.

Experimentos de penetração também foram realizados em grupos de controle branco, aplicando-se formulações de nanocápsulas de HES sem fluoresceína durante as 24h de penetração. Nesses casos, a quantificação por espectroscopia de fluorescência não observou, nos comprimentos de onda de interesse, sinais de emissão de intensidade relevante para as amostras do grupo controle branco (Figura 37, barra vermelha), demonstrando que nem a pele e nem qualquer outro constituinte das

formulações, além da fluoresceína, poderiam ser responsáveis pelos sinais de emissão observados e utilizados para quantificação da penetração de fluoresceína.

Além da quantificação de fluoresceína em discos de pele de  $0,785\text{cm}^2$ , também se investigou a quantificação em biópsias pele de 1mm com e sem PSU (ilustrado anteriormente pela Figura 34). Nesses casos, os valores obtidos em cada leitura espectroscópica refletem a extração de fluoresceína acumulada em 5 biópsias de 1mm ( $3,927\text{mm}^2$ ) para cada um dos experimentos realizados em quintuplicata de forma independente (Figura 38a). As concentrações foram calculadas a partir de curva de calibração construída simultaneamente às medições com  $R^2$  de 0,999 para a faixa de concentração aferida (38b).

Figura 38 – Quantificação de fluoresceína em biópsias de 1mm



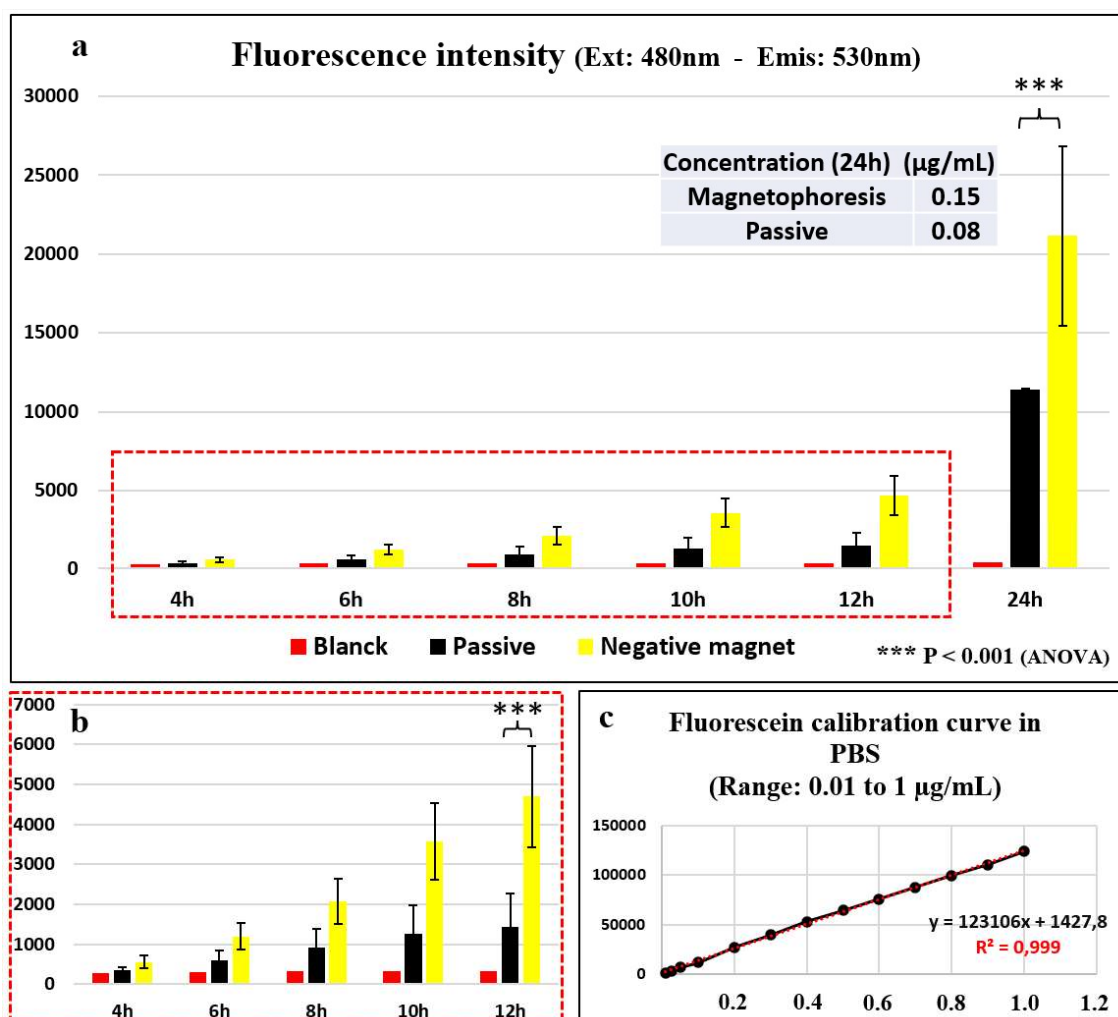
Fonte: Elaborada pelo autor.

A quantificação de fluoresceína em biópsias de 1mm também indicou, para todos os experimentos, uma maior penetração quando o experimento se deu em condições de magnetoforese negativa. Para as biópsias contendo PSU a média

observada foi de 0,0092  $\mu\text{g}$  de fluoresceína ( $\pm 0,0025$  SD) para cada 3,927mm<sup>2</sup> de pele, na presença de campo magnético, enquanto observou-se apenas 0,0042  $\mu\text{g}$  de fluoresceína ( $\pm 0,0021$  SD) nos casos de penetração passiva, indicando que para essas unidades contendo PSU a magnetoforese negativa proporcionou um aumento de 119% da capacidade de penetração de fluoresceína, em média. Para as biópsias que não continham PSU observou-se 0,0074  $\mu\text{g}$  ( $\pm 0,0021$  SD) e 0,0028  $\mu\text{g}$  ( $\pm 0,0017$  SD), respectivamente, para magnetoforese negativa e penetração passiva, revelando que nesses casos o campo magnético promoveu um aumento de 164% de penetração. Dessa forma, ao contrário do que se poderia supor, os resultados sugerem que o aumento observado na capacidade de penetração de fluoresceína pela ação do campo magnético, parece não ter exclusiva relação com entrega direcionada pelas vias de folículo piloso, já que a intensificação de penetração foi maior nas biópsias sem folículo piloso. No entanto, os resultados ainda permitem observar que, tanto nos experimentos de penetração passiva quanto em penetração por magnetoforese, as médias de fluoresceína detectadas nas biópsias contendo PSU foram superiores às médias detectadas nas biópsias sem PSU, sugerindo que os nanocarreadores, tanto para penetração passiva como para magnetoforese, experimentaram uma penetração mais acentuada pelas vias de folículo piloso, condizente com o que já se encontra amplamente estabelecido em estudos anteriores (DAHMANA et al., 2021; OTBERG et al., 2008; WEINER, 1998). No presente estudo, contudo, considerando-se o desvio padrão dos experimentos em mesmo regime de penetração (passivo ou magnetoforese), a diferença de concentração entre as biópsias com e sem PSU não apresentou uma qualidade estatística significativa quando submetida ao teste ANOVA ( $P > 0,05$ ). Uma possível explicação seria pelo fato de que os experimentos foram realizados durante 24h, tempo suficiente para que a fluoresceína acumulada em PSU pudesse então se difundir de forma lateral na pele para regiões com ausência de PSU, mascarando então essa diferença. Qualidade estatística superior foi obtida em experimentos envolvendo a penetração de adapaleno, abordado no próximo tópico.

A possibilidade de difusão de fluoresceína através da pele foi constatada pelo acompanhamento das concentrações de fluoresceína no compartimento receptor da célula de Franz, indicando que a fluoresceína foi capaz de transpor toda a espessura de pele que separava o meio doador do receptor, conforme abordado pela Figura 39.

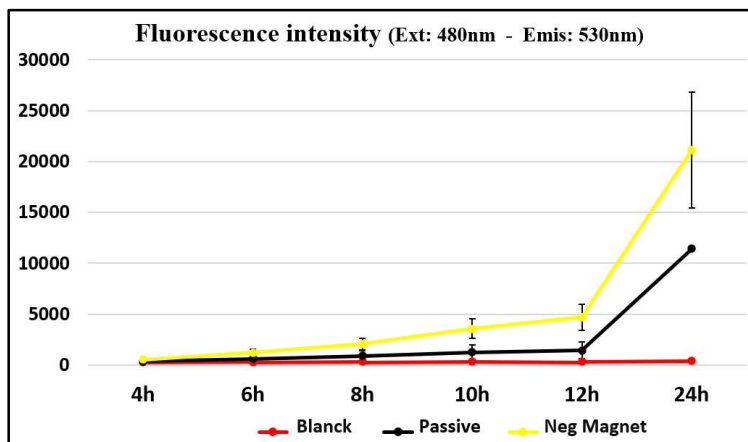
Figura 39 – Acompanhamento espectroscópico da transposição de fluoresceína para: a) o meio receptor durante 24h de penetração transdérmica; b) Escala ampliada das 12h iniciais; c) Curva de calibração utilizada no cálculo das concentrações



Fonte: Elaborada pelo autor.

Durante as 24h de penetração transdérmica, foram coletadas amostras de solução tampão PBS do compartimento receptor das células de Franz, de tempos em tempos, para análise por espectroscopia de fluorescência (Figuras 39 e 40). Os resultados indicaram que os experimentos de penetração transdérmica envolvendo a magnetoforese negativa apresentaram uma transposição de fluoresceína para o meio receptor 87% mais acentuada, quando comparada à penetração passiva, depois de 24h, constatando-se ao final desse período uma concentração de 0,15 e 0,08  $\mu\text{g/mL}$ , em média, na presença e ausência do campo magnético, respectivamente (Figura 39a).

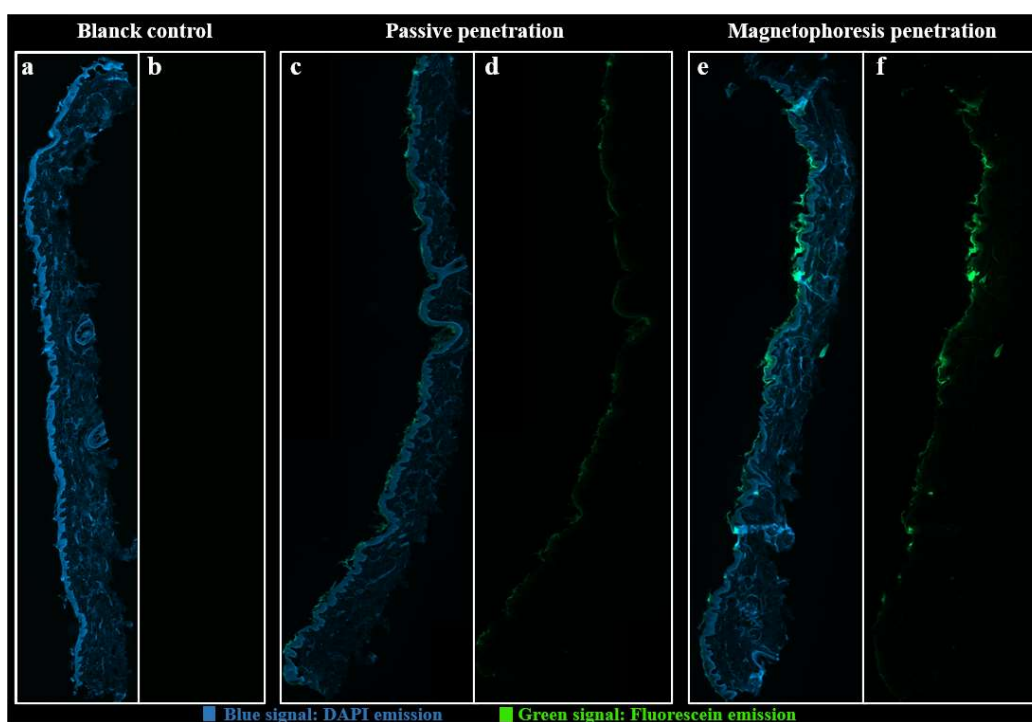
Figura 40 – Acompanhamento espectroscópico da transposição de fluoresceína para o meio receptor durante 24h de penetração transdérmica



Fonte: Elaborada pelo autor.

Corroborando os resultados anteriores, imagens de CLSM indicaram uma maior intensidade de emissão, referente à detecção de fluoresceína, em secções de pele submetidas à magnetoforese negativa (41f), em detrimento da penetração passiva (41d) (plano-XZ, considerando a superfície da pele como plano-XY).

Figura 41– Micrografias de CLSM (estrato córneo voltado para o lado esquerdo): (a, b) branco (sem fluoresceína); (c, d) penetração passiva; (e, f) magnetoforese; (b, d, f) filtrada a emissão referente ao corante celular DAPI, mantendo-se apenas a emissão proveniente da fluoresceína.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Dessa forma, todos os experimentos realizados para penetração de fluoresceína, demonstraram uma intensificação da capacidade de penetração transdérmica sob condições de magnetoforese negativa, em comparação com a penetração passiva. Os resultados sugerem ainda que essa intensificação pode não estar exclusivamente relacionada com as vias foliculares. De fato, vias de penetração para substâncias fortemente hidrofílicas ainda estão em discussão, de modo que alguns autores sugerem como vias preferenciais a penetração intercelular e/ou folicular, enquanto outros autores hipotetizam um transporte transcelular de substâncias hidrofílicas (PATZELT; LADEMANN, 2020).

#### ***3.4.2 Micelas poliméricas de TPGS carregadas com adapaleno***

Com o objetivo de se avaliar o potencial da magnetoforese negativa em aplicações relacionadas a penetração transdérmica de drogas direcionadas ao folículo piloso, investigou-se a capacidade de penetração do composto hidrofóbico adapaleno (ADA) carregado por micelas poliméricas de TPGS, sob presença e ausência de campo magnético, avaliando-se então, de forma comparativa, o impacto promovido pela aplicação de um campo magnético na capacidade de um fármaco transpor o estrato córneo.

Os experimentos de penetração transdérmica de ADA foram realizados por 8h em células de Franz com área de permeação de 2 cm<sup>2</sup>, com aplicação inicial de 200 µL de formulação magnética de micelas de TPGS carregadas com ADA em concentração de 250 µg/mL, totalizando uma aplicação de ADA na pele de 25 µg/cm<sup>2</sup>. Transcorridas as 8h de experimento, as células de Franz foram desmontadas e os discos de pele cuidadosamente lavados para se remover excesso de formulação em contato com o estrato córneo. Testes realizados em triplicata demonstraram que foi possível extrair ADA dos discos de pele com etanol por agitação em vórtex por 12h em um rendimento de 75,81% ± 2,02 (média ± SD).

Na sequência, procedeu-se com a quantificação de ADA por espectroscopia de fluorescência. Espectros de absorção e emissão para solução de ADA em etanol demonstraram, respectivamente, 320 nm e 370 nm como regiões de comprimento de onda de máxima intensidade.

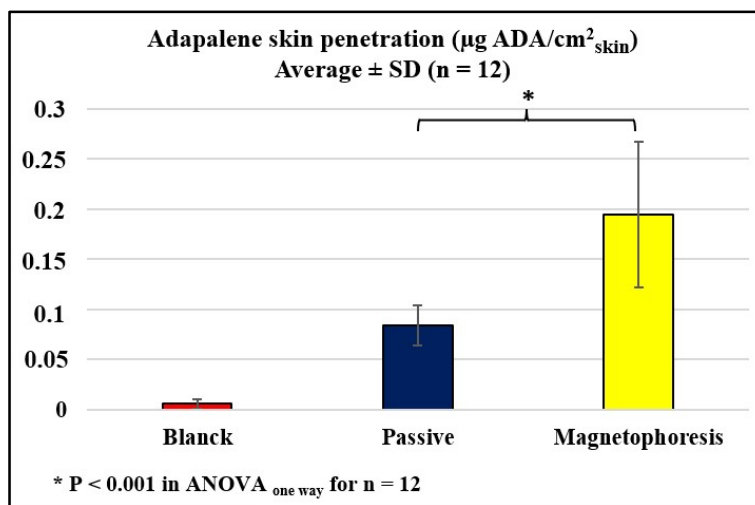
Nos experimentos anteriores, envolvendo fluoresceína, obteve-se a desafiadora constatação de que valores de desvio padrão (SD) foram mais elevados em experimentos envolvendo a fixação de ímãs no compartimento doador da célula de



Franz. Desse modo, uma vez que o objetivo do presente estudo foi avaliar a possibilidade prática da magnetoforese negativa intensificar a penetração tópica de uma droga já aprovada comercialmente para uso clínico, adotou-se a execução de um maior número de repetições na experimentação para se obter resultados com validação estatística de maior qualidade.

Assim, resultados esquematizados na Figura 42 resumem a experimentação de 27 ensaios independentes, sendo 12 para penetração passiva, 12 para penetração com aplicação de campo magnético e 03 para o controle branco, revelando que a magnetoforese negativa foi capaz de promover uma penetração de adapaleno, em média, 130% maior em discos de pele de 0,785 cm<sup>2</sup>, quando aplicado um campo magnético de aproximadamente 85 mT sobre a superfície da pele ( $P < 0,001$  em teste ANOVA). Em média, observou-se a penetração de 0,19 µgADA/cm<sup>2</sup> ( $\pm 0,07$  SD) na presença do campo magnético e 0,08 µgADA/cm<sup>2</sup> ( $\pm 0,02$  SD) nas condições de penetração passiva.

Figura 42 – Quantificação de ADA em discos de pele de 0,785cm<sup>2</sup>



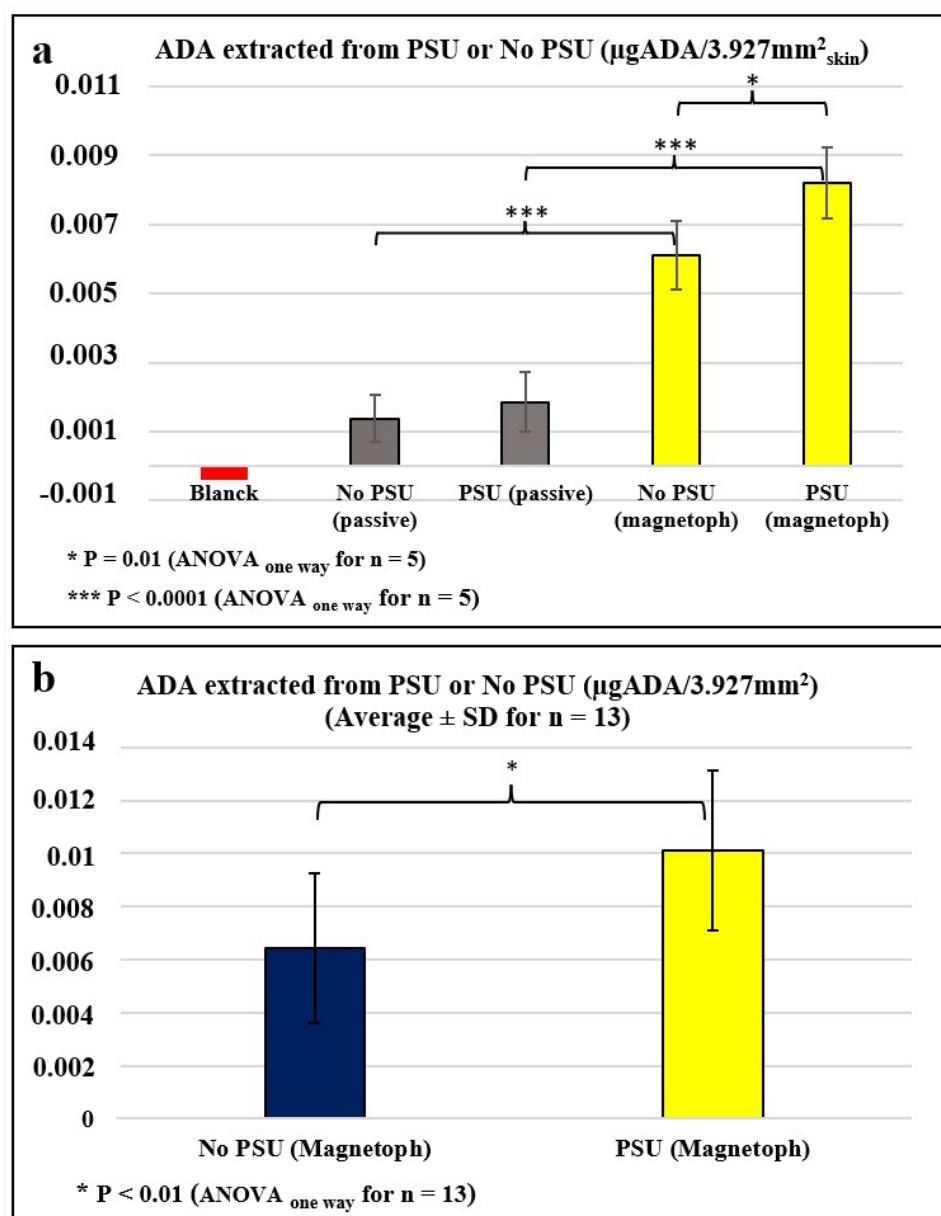
Fonte: Elaborada pelo autor.

Experimentos de penetração também foram realizados em grupos de controle branco, aplicando-se formulações de micelas de TPGS sem adapaleno durante as 8h de experimento. Nesses casos, a quantificação por espectroscopia de fluorescência não observou, na faixa espectroscópica de interesse, sinais de emissão relevantes para as amostras do grupo controle branco (Figura 42, barra vermelha), sugerindo que, além de ADA, nem a pele e nem qualquer outro constituinte das formulações, poderiam impactar significativamente os sinais de emissão utilizados na quantificação.

Além da quantificação de ADA em discos de pele de  $0,785\text{cm}^2$ , também se investigou a quantificação em biópsias de discos de pele de 1mm com e sem PSU. Nesse caso, os valores obtidos em cada leitura espectroscópica refletem a extração de ADA acumulada em 5 biópsias de 1mm ( $3,927\text{mm}^2$ ) para cada um dos experimentos realizados, independentemente, em quintuplicata (Figura 43a).

A quantificação de ADA em biópsias de 1mm demonstrou, para todos os experimentos, uma penetração mais acentuada quando o experimento se deu em condições de magnetoforese negativa.

Figura 43 – Quantificação de adapaleno em biópsias de 1mm: a) presença e ausência de campo magnético (n = 5); b) apenas sob presença de campo magnético (n = 13)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para as biópsias contendo PSU, a média de penetração observada foi de 0,0082  $\mu\text{gADA}$  ( $\pm 0,001$  SD) para cada 3,927 $\text{mm}^2$  de pele, na presença de campo magnético, enquanto que na penetração passiva, observou-se apenas 0,0018  $\mu\text{gADA}/3,927\text{mm}^2$  ( $\pm 0,0008$  SD), indicando que, para essas unidades contendo PSU, a magnetoforese negativa proporcionou um aumento de 340%, em média, da capacidade de penetração de ADA em 8h. Para as biópsias que não continham PSU, observaram-se médias de 0,0061  $\mu\text{gADA}/3,927\text{mm}^2$  ( $\pm 0,0009$  SD) e 0,0014  $\mu\text{gADA}/3,927\text{mm}^2$  ( $\pm 0,0007$  SD) para magnetoforese negativa e penetração passiva, respectivamente, revelando que nesses casos de ausência de PSU, o campo magnético, surpreendentemente, proporcionou o mesmo aumento de 340%, em média, da capacidade de penetração de adapaleno.

Dessa forma, os resultados mais uma vez sugerem que o aumento observado na capacidade de penetração de adapaleno, parece não ter exclusiva relação com entrega direcionada de drogas pelas vias de folículo piloso, já que um aumento de 340% de capacidade de penetração foi observado tanto na presença quanto na ausência de PSU. Não obstante, a capacidade de nanocarreadores à base de micelas poliméricas de atingir preferencialmente os folículos pilosos já foi demonstrada em estudos anteriores (DAHMANA et al., 2021; LAPTEVA et al., 2014, 2015). Nesse sentido, investigações adicionais do presente estudo, envolvendo 13 experimentos independentes, demonstraram que, na presença de campo magnético, vias de penetração relacionadas ao folículo piloso continuam se confirmando como rota preferencial de penetração para as micelas poliméricas, uma vez que foi possível se detectar, nas biópsias contendo PSU, uma concentração de ADA 57% superior, em média (0,0101  $\mu\text{gADA}/3,927\text{mm}^2$  e 0,0064  $\mu\text{gADA}/3,927\text{mm}^2$ , respectivamente, para biópsias com presença e ausência de PSU), conforme observado na Figura 43b.

Portanto, avaliando-se os resultados compilados nas Figuras 42 e 43, é possível demonstrar que a magnetoforese negativa exerceu um efeito intensificador na penetração transdérmica de adapaleno carregado por micelas poliméricas de TPGS, em média, 130% (até 340%) superior quando comparado com a penetração passiva. Adicionalmente, é possível sugerir, ainda, que esse efeito intensificador da penetração ocorreu de maneira generalizada na superfície da pele, ou seja, não apresentando uma relação exclusiva com vias de penetração folicular, muito embora, essas vias foliculares tenham se mostrado como vias de penetração mais acentuada.

#### 4 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que um inédito nanocompósito magnético à base de hidroxietilamido foi sintetizado com sucesso através de um método de síntese em miniemulsão inversa. A natureza desse nanocompósito consiste em nanocápsulas poliméricas de morfologia “core-shell” bem definida, com diâmetro médio de 143 nm, variando de 100 a 340 nm, o que permitiu o co-encapsulamento do bioativo hidrofílico oncocalixona A com SPIONs no núcleo dessa nanoestrutura. Exibindo um perfil de liberação prolongada de fármacos, o nanocompósito demonstrou citotoxicidade *in vitro* contra quatro linhagens de células tumorais humanas, ao mesmo tempo em que não promoveu a ocorrência de mortes em ensaios de toxicidade aguda *in vivo* (modelo zebrafish), gerando perspectivas para a vetorização magnética de fármacos hidrofílicos anticâncer. Por Microscopia Eletrônica de Transmissão, demonstrou-se que os SPIONs foram incorporados às nanocápsulas formando um sistema carreador capaz de responder mecanicamente e ser induzido ao movimento pela ação de um campo magnético externo. Assim, o nanocompósito sintetizado neste trabalho representa uma perspectiva inteligente para o carregamento de fármacos/bioativos, uma vez que pode transportar compostos hidrofílicos por vetorização magnética. Adicionalmente, nanocarreadores magnéticos foram testados quanto à capacidade de direcionamento de fármacos contra a barreira do estrato córneo. Foi possível demonstrar que a magnetoforese negativa exerceu um efeito intensificador na penetração transdérmica de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos de até 340%, em média, quando comparado com a penetração passiva. É possível sugerir, ainda, que esse efeito intensificador da penetração ocorreu de maneira geral na superfície da pele, ou seja, não apresentando uma relação exclusiva com vias de penetração folicular, muito embora, essas vias foliculares tenham se mostrado como vias de penetração mais acentuada, tanto para os compostos hidrofílicos como hidrofóbicos avaliados. Desta forma, o presente trabalho não apenas sintetizou um novo nanocompósito magnético, mas também avaliou possíveis aplicações no direcionamento magnético de fármacos por meio de interações com campos magnéticos.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, Farooq; RICHARDSON, Michael K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: Impact of environmental complexity. **Behavioural Processes**, [S. l.], v. 92, p. 88–98, 2013.

AJALLI, Narges; POURMADADI, Mehrab; YAZDIAN, Fatemeh; RASHEDI, Hamid; NAVAEI-NIGJEH, Mona; DÍEZ-PASCUAL, Ana. Chitosan/Gamma-Alumina/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@5-FU Nanostructures as Promising Nanocarriers: Physicochemical Characterization and Toxicity Activity. **Molecules**, [S. l.], v. 5369, 2022.

AKHTAR, Naseem; SINGH, Varsha; YUSUF, Mohammad; KHAN, Riaz A. Non-invasive drug delivery technology: Development and current status of transdermal drug delivery devices, techniques and biomedical applications. **Biomedizinische Technik**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 243–272, 2020.

ALNAIMAT, Fadi; DAGHER, Sawsan; MATHEW, Bobby; HILAL-ALNQBI, Ali; KHASHAN, Saud. Microfluidics Based Magnetophoresis: A Review. **Chemical Record**, [S. l.], v. 18, n. 11, p. 1596–1612, 2018.

AVILA-CALDERÓN, Eric Daniel et al. Outer Membrane Vesicles From *Brucella melitensis* Modulate Immune Response and Induce Cytoskeleton Rearrangement in Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, n. October, p. 1–18, 2020.

BAIER, Grit; BAUMANN, Daniela; SIEBERT, Jörg Max; MUSYANOVYCH, Anna; MAILÄNDER, Volker; LANDFESTER, Katharina. Suppressing unspecific cell uptake for targeted delivery using hydroxyethyl starch nanocapsules. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 2704–2715, 2012.

BANGIA, Riya; SHARMA, Gajanand; DOGRA, Sunil; KATARE, Om Prakash. Nanotechnological interventions in dermatophytosis: from oral to topical, a fresh perspective. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 377–396, 2019.

BANI, Kamal Singh; BHARDWAJ, Khushboo. Topical Drug Delivery Therapeutics, Drug Absorption and Penetration Enhancement Techniques. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 105–110, 2021.

BARMAN, Ranajit; MONDAL, Tathagata; SARKAR, Jayita; SIKDER, Amrita; GHOSH, Suhrit. Self-Assembled Polyurethane Capsules with Selective Antimicrobial Activity against Gram-Negative *E. coli*. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 654–663, 2020.

BARRETO, Antônio C. H. et al. Magnetic nanosystem for cancer therapy using oncocalyxone A, an antitumour secondary metabolite isolated from a Brazilian plant. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 14, n. 9, p. 18269–18283, 2013.

BESHEER, Ahmed; HAUSE, Gerd; KRESSLER, Jörg; MÄDER, Karsten. Hydrophobically modified hydroxyethyl starch: Synthesis, characterization, and aqueous self-assembly into nano-sized polymeric micelles and vesicles.

**Biomacromolecules**, [*S. l.*], v. 8, n. 2, p. 359–367, 2007.

CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. Pau-Branco-do-Sertão (*Auxemma oncocalyx*). **Circular Técnica - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, [*S. l.*], n. 153, p. 6, 2008.

CASTELLANOS-RUBIO, Idoia et al. Highly Reproducible Hyperthermia Response in Water, Agar, and Cellular Environment by Discretely PEGylated Magnetite Nanoparticles. **ACS applied materials & interfaces**, [*S. l.*], v. 12, n. 25, p. 27917–27929, 2020.

CHAMORRO RENGIFO, Andrés Felipe; STEFANES, Natalia; TOIGO, Jessica; MENDES, Cassiana; SANTOS-SILVA, Maria C.; NUNES, Ricardo J.; PARIZE, Alexandre Luis; MINATTI, Edson. A new and efficient carboxymethyl-hexanoyl chitosan/dodecyl sulfate nanocarrier for a pyrazoline with antileukemic activity. **Materials Science and Engineering C**, [*S. l.*], v. 105, n. July, p. 110051, 2019.

CHEN, Lei; XIONG, Zhouyi; XIONG, Hanguo; DIN, Zia ud. Investigating the structure and self-assembly behavior of starch-g-VAc in starch-based adhesive by combining NMR analysis and multi-scale simulation. **Carbohydrate Polymers**, [*S. l.*], v. 246, n. June, p. 116655, 2020.

CHENG, Han Long; GUO, Hai Ling; XIE, An Jian; SHEN, Yu Hua; ZHU, Man Zhou. 4-in-1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>@PPy-DOX nanocomposites: Magnetic targeting guided trimode combinatorial chemotherapy/PDT/PTT for cancer. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [*S. l.*], v. 215, n. November 2020, p. 111329, 2021.

CHENG, Sinan et al. A novel navigated doxorubicin delivery formulation to breast cancer therapy. **Materials Today Advances**, [*S. l.*], v. 14, p. 100235, 2022.

COLBERT, Caroline M.; MING, Zhengyang; POGOSYAN, Arutyun; FINN, J. Paul; NGUYEN, Kim Lien. Comparison of Three Ultrasmall, Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for MRI at 3.0 T. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, [*S. l.*], p. 1–11, 2022.

CUENCA, Pamela; FERRERO, Sergio; ALBANI, Oscar. Preparation and characterization of cassava starch acetate with high substitution degree. **Food Hydrocolloids**, [*S. l.*], v. 100, n. August 2019, p. 105430, 2020.

DA SILVA, Aiêrta C. C.; ALMEIDA, Rafael R.; SOUSA, Alexandre C. C.; MARTÍNEZ, Fabián N. A.; DENARDIN, Juliano C.; MORAIS, Selene M.; RICARDO, Nágila M. P. S. International Journal of Biological Macromolecules Xyloglucan-based hybrid nanocomposite with potential for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*S. l.*], n. xxx, 2020.

DAHMANA, Naoual; MUGNIER, Thibault; GABRIEL, Doris; FAVEZ, Tatiana; KOWALCZUK, Laura; BEHAR-COHEN, Francine; GURNY, Robert; KALIA, Yogeshvar N. Polymeric micelle mediated follicular delivery of spironolactone: Targeting the mineralocorticoid receptor to prevent glucocorticoid-induced activation and delayed cutaneous wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 604, p. 120773, 2021.

DE ALMEIDA, Raimundo R. et al. Preliminary evaluation of novel triglyceride-based nanocomposites for biomedical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 28, n. 8, p. 1547–1556, 2017.

DE MOURA, Carolina L.; GALLO, Juan; GARCÍA-HEVIA, Lorena; PESSOA, Otília D. L.; RICARDO, Nágila M. P. S.; BAÑOBRE-LÓPEZ, Manuel. Magnetic Hybrid Wax Nanocomposites as Externally Controlled Theranostic Vehicles: High MRI Enhancement and Synergistic Magnetically Assisted Thermo/Chemo Therapy. **Chemistry - A European Journal**, [S. l.], v. 26, n. 20, p. 4531–4538, 2020.

DHAR, Purbarun; SIRISHA MAGANTI, Lakshmi. Predicting thermal history a-priori for magnetic nanoparticle hyperthermia of internal carcinoma. **Journal of Applied Physics**, [S. l.], v. 122, n. 5, p. 054902, 2017.

DOS SANTOS, Sarah B. F. et al. Antibacterial activity of fluoxetine-loaded starch nanocapsules. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 164, p. 2813–2817, 2020.

DULIŃSKA-LITEWKA, Joanna; ŁAZARCZYK, Agnieszka; HAŁUBIEC, Przemysław; SZAFRAŃSKI, Oskar; KARNAS, Karolina; KAREWICZ, Anna. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles-current and prospective medical applications. **Materials**, [S. l.], v. 12, n. 4, 2019.

DUSZYŃSKA, Angelika; DANIELEWICZ, Agnieszka; KADŁUBOWSKI, Sławomir; KOZANECKI, Marcin; MANIUKIEWICZ, Waldemar; SOWIŃSKI, Przemysław; SZADKOWSKA – NICZE, Magdalena. Influence of electron-beam irradiation on surface properties of magnetic iron oxide nanoparticles stabilized with citrate. **Radiation Physics and Chemistry**, [S. l.], v. 169, n. March, p. 107796, 2020.

ESLAMI, Parisa et al. Smart Magnetic Nanocarriers for Multi-Stimuli On-Demand Drug Delivery. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 1–21, 2022.

ETEMADI, Hossein; PLIEGER, Paul G. Magnetic fluid hyperthermia based on magnetic nanoparticles: Physical characteristics, historical perspective, clinical trials, technological challenges, and recent advances. **Advanced Therapeutics**, [S. l.], v. 3, n. 11, 2020.

FARZIN, Ali; ETESAMI, Seyed Alireza; QUINT, Jacob; MEMIC, Adnan; TAMAYOL, Ali. Magnetic Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. **Advanced Healthcare Materials**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 1–29, 2020.

FERREIRA, M. A. D.; DO NASCIMENTO, N. R. F.; DE SOUSA, C. M.; PESSOA, O. D. L.; DE LEMOS, T. L. G.; VENTURA, J. S.; SCHATTNER, M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Oncocalyxone A inhibits human platelet aggregation by increasing cGMP and by binding to GP Iba glycoprotein. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 154, n. 6, p. 1216–1224, 2008.

FERREIRA, M. A. D.; NUNES, Osmar D. R. H.; FONTENELE, Juvenia B.; PESSOA, Otília D. L.; LEMOS, Telma L. G.; VIANA, Glauce S. B. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx*. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 315–322, 2004.

FICHTER, Michael; BAIER, Grit; DEDTERS, Marvin; PRETSCH, Leah; PIETRZAK-NGUYEN, Anette; LANDFESTER, Katharina; GEHRING, Stephan. Nanocapsules generated out of a polymeric dexamethasone shell suppress the inflammatory response of liver macrophages. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [*S. l.*], v. 9, n. 8, p. 1223–1234, 2013.

GAO, Xin; LI, Lin; CAI, Xiaopan; HUANG, Quan; XIAO, Jianru; CHENG, Yiyun. Targeting nanoparticles for diagnosis and therapy of bone tumors: Opportunities and challenges. **Biomaterials**, [*S. l.*], v. 265, n. September 2020, p. 120404, 2021.

GOI, Universidade Federal D. E.; VETERIN, Escola D. E.; DE, Zootecnia Programa; CI, E. M.; ANIMAL, Ncia; ANDR, Thiago; ORIENTADOR, Carreo Costa; CARLOS, Juan; MORENO, Duque. Ressuscitação volêmica com diferentes soluções em modelo murino de choque hemorrágico. [*S. l.*], 2015.

GRATIERI, Taís; ALBERTI, Ingo; LAPTEVA, Maria; KALIA, Yogeshvar N. Next generation intra- and transdermal therapeutic systems: Using non- and minimally-invasive technologies to increase drug delivery into and across the skin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], v. 50, n. 5, p. 609–622, 2013.

GREWAL, Ikmeet Kaur; SINGH, Sukhbir; ARORA, Sandeep; SHARMA, Neelam. Polymeric nanoparticles for breast cancer therapy: A comprehensive review. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [*S. l.*], v. 11, n. 4, 2021.

HADADIAN, Yaser; ULIANA, Joao H.; CARNEIRO, Antonio A. O.; PAVAN, Theo Z. A Novel Theranostic Platform: Integration of Magnetomotive and Thermal Ultrasound Imaging with Magnetic Hyperthermia. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, [*S. l.*], v. 68, n. 1, p. 68–77, 2021.

HADJ-HAMOU, Assia Siham; MATASSI, Sabiha; ABDERRAHMANE, Habi; YAHIAOUI, Farida. Effect of cloisite 30B on the thermal and tensile behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate)/poly(vinyl chloride) nanoblends. **Polymer Bulletin**, [*S. l.*], v. 71, n. 6, p. 1483–1503, 2014.

HIGUCHI T. Mechanism of Sustained- Action Medication. **Journal of pharmaceutical sciences**, [*S. l.*], v. 52, p. 1145–1149, 1963.

HITOSUGI, Takashi; SAITO, Toshiyuki; SUZUKI, Sono; KUBOTA, Ieko; SHODA, Emi; SHIMIZU, Toru; OI, Yoshiyuki. Hydroxyethyl starch: The effect of molecular weight and degree of substitution on intravascular retention in vivo. **Anesthesia and Analgesia**, [*S. l.*], v. 105, n. 3, p. 724–728, 2007.

HRDINA, Amy; LAI, Edward; LI, Chunsheng; SADI, Baki; KRAMER, Gary. A comparative study of magnetic transferability of superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [*S. l.*], v. 322, n. 17, 2010.

HUANG, Shi Ying et al. A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema. **PLoS ONE**, [*S. l.*], v. 9, n. 8, 2014.

HUI, Chao; SHEN, Chengmin; YANG, Tianzhong; BAO, Lihong; TIAN, Jifa; DING,



Hao; LI, Chen; GAO, H. J. Large-scale Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles soluble in water synthesized by a facile method. **Journal of Physical Chemistry C**, [S. l.], v. 112, n. 30, 2008.

ILG, Patrick. Diffusion-jump model for the combined Brownian and Néel relaxation dynamics of ferrofluids in the presence of external fields and flow. **Physical Review E**, [S. l.], v. 100, n. 2, p. 22608, 2019.

JAIN, Vijay Prakash; CHAUDHARY, Shivani; SHARMA, Deepa; DABAS, Neeru; LALJI, Ram Sunil Kumar; SINGH, Brajendra Kumar; JAISWAR, Gautam. Advanced functionalized nanographene oxide as a biomedical agent for drug delivery and anti-cancerous therapy: A review. **European Polymer Journal**, [S. l.], v. 142, n. November 2020, p. 110124, 2021.

JI, Chendong; CHENG, Wenyu; HU, Yiseng; LIU, Yunfang; LIU, Fengyong; YIN, Meizhen. A nano vector with photothermally enhanced drug release and retention to overcome cancer multidrug resistance. **Nano Today**, [S. l.], v. 36, p. 101020, 2021.

JIA, Chunyan; DEACON, Glen B.; ZHANG, Yingjie; GAO, Chuanzhu. Platinum(IV) antitumor complexes and their nano-drug delivery. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 429, p. 213640, 2021.

JIANG, Wen; VON ROEMELING, Christina A.; CHEN, Yuanxin; QIE, Yaqing; LIU, Xiujie; CHEN, Jianzhu; KIM, Betty Y. S. Designing nanomedicine for immunology. **Nature Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 1–11, 2017.

KANDEKAR, Somnath G.; DEL RÍO-SANCHO, Sergio; LAPTEVA, Maria; KALIA, Yogeshvar N. Selective delivery of adapalene to the human hair follicle under finite dose conditions using polymeric micelle nanocarriers. **Nanoscale**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 1099–1110, 2018.

KANG, Biao et al. Tailoring the stealth properties of biocompatible polysaccharide nanocontainers. **Biomaterials**, [S. l.], v. 49, p. 125–134, 2015.

KANOJIA, Neha; SINGH, Sukhbir; SINGH, Jitender; SHARMA, Neelam; GREWAL, Ajmer Singh; RANI, Lata; THAPA, Komal; ARORA, Sandeep. Recent advancements and applications of inhalable microparticles based drug delivery systems in respiratory disorders. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [S. l.], v. 11, n. 3, 2020.

KHAN, Ferdous; AHMAD, Sheikh Rafi. Polysaccharides and Their Derivatives for Versatile Tissue Engineering Application. **Macromolecular Bioscience**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 395–421, 2013.

KILICARISLAN OZKAN, Cigdem; OZGUNAY, Hasan; AKAT, Hakan. Possible use of corn starch as tanning agent in leather industry: Controlled (gradual) degradation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 122, 2019.

KRASKOUSKI, Aliaksandr; HILEUSKAYA, Kseniya; LADUTSKA, Alena; KABANAVA, Volha; LIUBIMAU, Aliaksandr; NOVIK, Galina; NHI, Tran Thi Y.; AGABEKOV, Vladimir. Multifunctional biocompatible films based on pectin-Ag nanocomposites and PVA: Design, characterization and antimicrobial potential.

**Journal of Applied Polymer Science**, [*S. l.*], n. March, p. 2–6, 2022.

KUMAR, Manish; BISHNOI, Ram Singh; SHUKLA, Ajay Kumar; JAIN, Chandra Prakash. Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review. **Preventive Nutrition and Food Science**, [*S. l.*], v. 24, n. 3, p. 225–234, 2019.

KUMAR, Sunny; ALI FARIDI, Md Rashid; DASMAHAPATRA, Ashok Kumar; BANDYOPADHYAY, Dipankar. Magnetic field induced push-pull motility of liqubits. **RSC Advances**, [*S. l.*], v. 6, n. 108, p. 107049–107056, 2016.

LAPTEVA, Maria; MIGNOT, Margaux; MONDON, Karine; MÖLLER, Michael; GURNY, Robert. Self-assembled mPEG-hexPLA polymeric nanocarriers for the targeted cutaneous delivery of imiquimod. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [*S. l.*], v. 142, n. September 2018, p. 553–562, 2019.

LAPTEVA, Maria; MÖLLER, Michael; GURNY, Robert; KALIA, Yogeshvar N. Self-assembled polymeric nanocarriers for the targeted delivery of retinoic acid to the hair follicle. **Nanoscale**, [*S. l.*], v. 7, n. 44, p. 18651–18662, 2015.

LAPTEVA, Maria; MONDON, Karine; MÖLLER, Michael; GURNY, Robert; KALIA, Yogeshvar N. Polymeric micelle nanocarriers for the cutaneous delivery of tacrolimus: A targeted approach for the treatment of psoriasis. **Molecular Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 11, n. 9, p. 2989–3001, 2014.

LAPTEVA, Maria; SALLAM, Marwa A.; GOYON, Alexandre; GUILLARME, Davy; VEUTHEY, Jean Luc; KALIA, Yogeshvar N. Non-invasive targeted iontophoretic delivery of cetuximab to skin. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [*S. l.*], v. 17, n. 4, p. 589–602, 2020.

LATHA, S.; SELVAMANI, P.; SUGANYA, G.; THIMIRI GOVINDA RAJ, Deepak B.; PAL, T. K. Preparation and In-vitro Evaluation of Pantoprazole Sodium Magnetic Microspheres by Emulsion Solvent Evaporation Method. **BioNanoScience**, [*S. l.*], 2021.

LAURENT, Sophie; DUTZ, Silvio; HÄFELI, Urs O.; MAHMOUDI, Morteza. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, [*S. l.*], v. 166, n. 1–2, p. 8–23, 2011.

LI, Qing; KARTIKOWATI, Christina W.; HORIE, Shinji; OGI, Takashi; IWAKI, Toru; OKUYAMA, Kikuo. Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **Scientific Reports**, [*S. l.*], v. 7, n. 1, p. 1–4, 2017.

LI, Xiuying et al. Magnetic targeting enhances the cutaneous wound healing effects of human mesenchymal stem cell-derived iron oxide exosomes. **Journal of Nanobiotechnology**, [*S. l.*], v. 18, n. 1, p. 1–14, 2020.

LI, Yang; ZHOU, Yiming; YUE, Xiuli; DAI, Zhifei. Cyanine conjugates in cancer theranostics. **Bioactive Materials**, [*S. l.*], v. 6, n. 3, p. 794–809, 2021.

LINDEMANN, Max C.; LUTTKE, Till; NOTTRODT, Nadine; SCHMITZ-RODE, Thomas; SLABU, Ioana. FEM based simulation of magnetic drug targeting in a

multibranched vessel model. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, [S. l.], v. 210, p. 106354, 2021.

LUQUE-MICHEL, Edurne; LEMAIRE, Laurent; BLANCO-PRIETO, Maria J. SPION and doxorubicin-loaded polymeric nanocarriers for glioblastoma theranostics. **Drug Delivery and Translational Research**, [S. l.], n. 0123456789, 2021.

MAKWANA, Vivek; KARANJIA, Jasmine; HASELHORST, Thomas; ANOOPKUMAR-DUKIE, Shailendra; RUDRAWAR, Santosh. Liposomal doxorubicin as targeted delivery platform: Current trends in surface functionalization. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 593, n. November 2020, p. 120117, 2021.

MARTO, J. et al. Starch nanocapsules containing a novel neutrophil elastase inhibitor with improved pharmaceutical performance. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 127, n. November 2017, p. 1–11, 2018.

MENEZES, Regina et al. Bioprospection of natural sources of polyphenols with therapeutic potential for redox-related diseases. **Antioxidants**, [S. l.], v. 9, n. 9, 2020.

MENG, Qingye; ZHONG, Shuangling; XU, Lifeng; WANG, Jingfei; ZHANG, Zhenqian; GAO, Yan; CUI, Xuejun. Review on design strategies and considerations of polysaccharide-based smart drug delivery systems for cancer therapy. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 279, n. December 2021, p. 119013, 2022.

MILLIKAN, L. E. Adapalene: An update on newer comparative studies between the various retinoids. **International Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 39, n. 10, p. 784–788, 2000.

MOGHADAM ZIABARI, Seyed Ashkan; BABAMORADI, Mohsen; HAJIZADEH, Zoleikha; MALEKI, Ali. The effect of magnetic field on the magnetic and hyperthermia properties of bentonite/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite. **Physica B: Condensed Matter**, [S. l.], v. 588, p. 456–464, 2020.

MOODLEY, Thashini; SINGH, Moganavelli. Polymeric mesoporous silica nanoparticles for combination drug delivery in vitro. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 11905–11919, 2021.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 2010.

MOSIVAND, Saba. Effect of mineral additives on magnetite nanoparticles prepared in an electrolytic cell. **Advanced Powder Technology**, [S. l.], v. 32, n. 2, 2021.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MURTHY, S. Narasimha; SAMMETA, Srinivasa M.; BOWERS, C. Magnetophoresis for enhancing transdermal drug delivery: Mechanistic studies and patch design. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 148, n. 2, p. 197–203, 2010.

- NIGAM, Saumya; BAHADUR, D. Doxorubicin-loaded dendritic-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> supramolecular nanoparticles for magnetic drug targeting and tumor regression in spheroid murine melanoma model. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [*S. l.*], v. 14, n. 3, p. 759–768, 2018.
- NIKOLIĆ, Ines; SIMIĆ, Mitar; PANTELIĆ, Ivana; STOJANOVIĆ, Goran; STANKOVIĆ, Jelena Antić; MARKOVIĆ, Bojan; SAVIĆ, Snežana. Chemical vs. Physical Methods to Improve Dermal Drug Delivery: A Case Study with Nanoemulsions and Iontophoresis. **Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 14, n. 6, 2022.
- NOVAL, Virginia E.; CARRIAZO, Jose G. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> Core-shell Powders Synthesized from Industrially Processed Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Microparticles. [*S. l.*], v. 22, n. 3, 2019.
- OTBERG, Nina; PATZELT, Alexa; RASULEV, Utkur; HAGEMEISTER, Timo; LINSCHIED, Michael; SINKGRAVEN, Ronald; STERRY, Wolfram; LADEMANN, Jürgen. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [*S. l.*], v. 65, n. 4, p. 488–492, 2008.
- PADYA, Bharath Singh; PANDEY, Abhijeet; PISAY, Muralidhar; KOTESHWARA, K. B.; CHANDRASHEKHAR HARIHARAPURA, Raghu; BHAT, Kuruveri Udaya; BISWAS, Swati; MUTALIK, Srinivas. Stimuli-responsive and cellular targeted nanoplatforms for multimodal therapy of skin cancer. **European Journal of Pharmacology**, [*S. l.*], v. 890, n. September 2020, p. 173633, 2021.
- PALEOS, Constantinos M.; SIDERATOU, Zili; TSIOURVAS, Dimitris. Drug Delivery Systems Based on Hydroxyethyl Starch. **Bioconjugate Chemistry**, [*S. l.*], v. 28, n. 6, p. 1611–1624, 2017.
- PANG, Yichuan et al. Inhibition of furin by bone targeting superparamagnetic iron oxide nanoparticles alleviated breast cancer bone metastasis. **Bioactive Materials**, [*S. l.*], v. 6, n. 3, p. 712–720, 2021.
- PAREDES-GARCÍA, Verónica; TOLEDO, Néstor; DENARDIN, Juliano; VENEGAS-YAZIGI, Diego; CRUZ, Carlos; SPODINE, Evgenia; LUO, Zhiping. One pot Solvothermal synthesis of organic acid coated magnetic iron oxide Nanoparticles. **Journal of the Chilean Chemical Society**, [*S. l.*], v. 58, n. 4, p. 2011–2015, 2013.
- PASTORE, Michael N.; KALIA, Yogeshvar N.; HORSTMANN, Michael; ROBERTS, Michael S. Transdermal patches: History, development and pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, [*S. l.*], v. 172, n. 9, p. 2179–2209, 2015.
- PATZELT, Alexa; LADEMANN, Juergen. Recent advances in follicular drug delivery of nanoparticles. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [*S. l.*], v. 17, n. 1, p. 49–60, 2020.
- PEREIRA, Stéfano A. et al. Hydroxyethyl starch nanocapsules by multiple nanoemulsions for carrying and controlled release of lapachol. **Materials Letters**, [*S. l.*], v. 274, p. 1–3, 2020.
- PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; LEMOS, T. L. G.; WETMORE, L. A.; MORAES, M. O.; LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of

Northeast Brazil. **Phytotherapy Research**, [*S. l.*], v. 14, n. 3, p. 187–191, 2000.

PRAMANIK, Sumit Kumar; SENECA, Senne; PETERS, Martijn; D'OLIESLAEGER, Lien; REEKMANS, Gunter; VANDERZANDE, Dirk; ADRIAENSENS, Peter; ETHIRAJAN, Anitha. Morphology-dependent pH-responsive release of hydrophilic payloads using biodegradable nanocarriers. **RSC Advances**, [*S. l.*], v. 8, n. 64, p. 36869–36878, 2018.

QU, Fei; GENG, Rui; LIU, Yijing; ZHU, Jintao. Advanced nanocarrier- and microneedle-based transdermal drug delivery strategies for skin diseases treatment. **Theranostics**, [*S. l.*], v. 12, n. 8, p. 3372–3406, 2022.

QUARTIER, Julie; LAPTEVA, Maria; BOULAGUIEM, Younes; GUERRIER, Stéphane; KALIA, Yogeshvar N. Polymeric micelle formulations for the cutaneous delivery of sirolimus: A new approach for the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis complex. **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 604, 2021.

RAMAZANOV, Mahammadali; KARIMOVA, Aynura; SHIRINOVA, Habiba. Magnetism for drug delivery, mri and hyperthermia applications: A review. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [*S. l.*], v. 11, n. 2, p. 8654–8668, 2021.

RAO, Yue Feng et al. Epirubicin-loaded superparamagnetic iron-oxide nanoparticles for transdermal delivery: Cancer therapy by circumventing the skin barrier. **Small**, [*S. l.*], v. 11, n. 2, p. 239–247, 2015.

REBEKAH, A.; SIVASELVAM, S.; VISWANATHAN, C.; PRABHU, D.; GAUTAM, Ravi; PONPANDIAN, N. Magnetic nanoparticle-decorated graphene oxide-chitosan composite as an efficient nanocarrier for protein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [*S. l.*], v. 610, n. November 2020, p. 125913, 2021.

RIOUX, Jean Philippe; LESSARD, Myriam; DE BORTOLI, Bruno; ROY, Patrick; ALBERT, Martin; VERDANT, Colin; MADORE, François; TROYANOV, Stéphan. Pentastarch 10% (250 kDa/0.45) is an independent risk factor of acute kidney injury following cardiac surgery. **Critical Care Medicine**, [*S. l.*], v. 37, n. 4, 2009.

SANDLER, Sarah E.; FELLOWS, Benjamin; THOMPSON MEFFORD, O. Best Practices for Characterization of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. **Analytical Chemistry**, [*S. l.*], v. 91, n. 22, p. 14159–14169, 2019. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b03518.

SHEN, Ben. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, [*S. l.*], v. 163, n. 6, p. 1297–1300, 2015.

SHUKLA, Snehal K.; GUPTA, Vivek. Utilizing nanotechnology to recuperate sorafenib for lung cancer treatment: Challenges and future perspective. **Therapeutic Delivery**, [*S. l.*], v. 11, n. 4, p. 213–215, 2020.

SILVA, Larissa Morais Ribeiro Da et al. Graviola Fruit Bar Added Acerola By-Product Extract Protects Against Inflammation and Nociception in Adult Zebrafish (*Danio*

erio). **Journal of Medicinal Food**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 173–180, 2020.

SILVA, Francisco; CAMPELLO, Maria Paula Cabral; PAULO, António. Radiolabeled gold nanoparticles for imaging and therapy of cancer. **Materials**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–32, 2021.

SINGH, Yuvraj; MEHER, Jaya Gopal; RAVAL, Kavita; KHAN, Farooq Ali; CHAURASIA, Mohini; JAIN, Nitin K.; CHOURASIA, Manish K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 252, p. 28–49, 2017.

SINGHAL, Mayank; JIMENEZ, César E. S.; LAPTEVA, Maria; KALIA, Yogeshvar N. Transdermal medical devices: Formulation aspects. **Innovative Dosage Forms: Design and Development at Early Stage**, [S. l.], p. 245–279, 2019.

SLAVOV, L.; ABRASHEV, M. V.; MERODIISKA, T.; GELEV, Ch; VANDENBERGHE, R. E.; MARKOVA-DENEVA, I.; NEDKOV, I. Raman spectroscopy investigation of magnetite nanoparticles in ferrofluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [S. l.], v. 322, n. 14, p. 1904–1911, 2010.

SOARES, Daniel Cristian Ferreira; ARRIBADA, Raquel Gregorio; DE BARROS, Andre Luis Branco; TEBALDI, Marli Luiza. Polymeric nanoblends compatibilization: a strategic design to enhance the effectiveness of nanocarriers for biomedical applications. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, [S. l.], v. 69, n. 9, p. 567–579, 2020.

SOLEIMANI, Anvar; MIRZAVI, Farshad; NIKOOFAL-SAHLABADI, Sara; NIKPOOR, Amin Reza; TAGHIZADEH, Bitia; BARATI, Mehdi; SOUKHTANLOO, Mohammad; JAAFARI, Mahmoud Reza. CD73 downregulation by EGFR-targeted liposomal CD73 siRNA potentiates antitumor effect of liposomal doxorubicin in 4T1 tumor-bearing mice. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–17, 2022.

SOLEIMANI, Khadijeh; ARKAN, Elham; DERAKHSHANKHAH, Hossein; HAGHSHENAS, Babak; JAHANBAN-ESFAHLAN, Rana; JAYMAND, Mehdi. A novel bioreducible and pH-responsive magnetic nanohydrogel based on  $\beta$ -cyclodextrin for chemo/hyperthermia therapy of cancer. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 252, n. September 2020, p. 117229, 2021.

STEINMACHER, Fernanda R.; BAIER, Grit; MUSYANOVYCH, Anna; LANDFESTER, Katharina; ARAÚJO, Pedro H. H.; SAYER, Claudia. Design of cross-linked starch nanocapsules for enzyme-triggered release of hydrophilic compounds. **Processes**, [S. l.], v. 5, n. 2, 2017.

SU, Peng; REN, Chunhui; FU, Yusheng; GUO, Jinhong; GUO, Jiuchuan; YUAN, Qi. Magnetophoresis in microfluidic lab : Recent advance. [S. l.], v. 332, 2021.

SUN, Tao; DASGUPTA, Anshuman; ZHAO, Zongmin; NURUNNABI, Md; MITRAGOTRI, Samir. Physical triggering strategies for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 158, p. 36–62, 2020.

TAHERI, Shima; BAIER, Grit; MAJEWSKI, Peter; BARTON, Mary; FÖRCH, Renate;

LANDFESTER, Katharina; VASILEV, Krasimir. Synthesis and antibacterial properties of a hybrid of silver-potato starch nanocapsules by miniemulsion/polyaddition polymerization. **Journal of Materials Chemistry B**, [S. l.], v. 2, n. 13, p. 1838–1845, 2014.

TAVARES, Cybelle Alves; XAVIER-JÚNIOR, Francisco Humberto; PESSOA, Otilia Deusdênia Loiola; XIMENES, Rafael Matos; SANTOS-MAGALHÃES, Nereide Stela. Validation of an HPLC–UV Method for Quantifying Oncocalyxone A in Different Media and Nanocapsules. **Chromatographia**, [S. l.], v. 82, n. 5, p. 809–818, 2019.

TESTER, Richard F.; KARKALAS, John; QI, Xin. Starch - Composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 151–165, 2004.

TOLBA, M. M.; EL-GAMAL, R. M. Determination of adapalene in gel formulation by conventional and derivative synchronous fluorimetric approaches. Application to stability studies and in vitro diffusion test. **Chemistry Central Journal**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2016.

TORLOPOV, Mikhail A.; DROZD, Natalia N.; TARABUKIN, Dmitriy V.; UDORATINA, Elena V. Synthesis and hemocompatibility of amino (di-)butyldeoxy modified hydroxyethyl starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 145, p. 936–943, 2020.

VON ROTEN, I.; MADJDPOUR, C.; FRASCAROLO, P.; BURMEISTER, M. A.; FISCH, A.; SCHRAMM, S.; BOMBELLI, T.; SPAHN, Donat R. Molar substitution and C2/C6 ratio of hydroxyethyl starch: Influence on blood coagulation. **British Journal of Anaesthesia**, [S. l.], v. 96, n. 4, p. 455–463, 2006.

WANG, Hao; XU, Yongdong; ZHOU, Xiao. Docetaxel-loaded chitosan microspheres as a lung targeted drug delivery system: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 3519–3532, 2014.

WANG, Huimin; HU, Hang; YANG, Hai; LI, Zifu. Hydroxyethyl starch based smart nanomedicine. **RSC Advances**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 3226–3240, 2021.

WANG, Yinghui; SONG, Shuyan; ZHANG, Songtao; ZHANG, Hongjie. Stimuli-responsive nanotheranostics based on lanthanide-doped upconversion nanoparticles for cancer imaging and therapy: current advances and future challenges. **Nano Today**, [S. l.], v. 25, p. 38–67, 2019.

WEINER, Norman. Targeted follicular delivery of macromolecules via liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 162, n. 1–2, p. 29–38, 1998.

WU, Changqiang; ZHU, Wencheng; JIN, Rongrong; AI, Hua; XU, Ye. The MRI-Visible Nanocomposite Facilitates the Delivery and Tracking of siRNA Loaded DC Vaccine in the Breast Cancer Model. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 10, n. February, p. 1–12, 2021.

XAVIER-JÚNIOR, F. H.; TAVARES, C. T.; RABELLO, M. M.; HERNANDES, M. Z.; BEZERRA, B. P.; AYALA, A. P.; PESSOA, O. D. L.; XIMENES, R. M.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Elucidation of the mechanism of complexation

between oncocalyxone A and cyclodextrins by isothermal titration calorimetry and molecular modeling. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 274, p. 165–172, 2019.

XU, Lifeng; ZHONG, Shuangling; SHI, Chao; SUN, Yuexin; ZHAO, Shengnan; GAO, Yan; CUI, Xuejun. Sonochemical fabrication of reduction-responsive magnetic starch-based microcapsules. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 49, n. March, p. 169–174, 2018.

YAN, Fanyong; FAN, Keqing; BAI, Zhangjun; ZHANG, Ruiqi; ZU, Fanlin; XU, Jinxia; LI, Xiang. Fluorescein applications as fluorescent probes for the detection of analytes. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 97, p. 15–35, 2017.

YANG, Rong; WEI, Tuo; GOLDBERG, Hannah; WANG, Weiping; CULLION, Kathleen; KOHANE, Daniel S. Getting Drugs Across Biological Barriers. **Advanced Materials**, [S. l.], v. 29, n. 37, 2017.

YU, Mengting; JI, Na; WANG, Yanfei; DAI, Lei; XIONG, Liu; SUN, Qingjie. Starch-based nanoparticles: Stimuli responsiveness, toxicity, and interactions with food components. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1075–1100, 2021.

YU, Xiang; WANG, Lichen; LI, Kai; MI, Yan; LI, Zhengrui; WU, Di'an; SUN, Fan; HE, Shuli; ZENG, Hao. Tuning dipolar effects on magnetic hyperthermia of Zn<sub>0.3</sub>Fe<sub>2.7</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanoparticles by silica shell. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [S. l.], v. 521, n. September 2020, p. 1–7, 2021.

ZHANG, Jieyu; XU, Hongping; HU, Ling; YANG, Yao; LI, Houbin; HUANG, Chi; LIU, Xinghai. Novel Waterborne UV-Curable Hyperbranched Polyurethane Acrylate/Silica with Good Printability and Rheological Properties Applicable to Flexographic Ink. **ACS Omega**, [S. l.], v. 2, n. 11, p. 7546–7558, 2017.

ZHANG, Xiaorui; CHEN, Lan; LIU, Renxiao; LI, Dexing; GE, Xiujie; GE, Guanglu. The Role of the OH Group in Citric Acid in the Coordination with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. **Langmuir**, [S. l.], 2019.

ZHANG, Xiaorui; CHEN, Lan; LIU, Renxiao; LI, Dexing; GE, Xiujie; GE, Guanglu. The Role of the OH Group in Citric Acid in the Coordination with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. **Langmuir**, [S. l.], v. 7, p. 3–10, 2019.

ZHANG, Xuejing; NIU, Shiwei; WILLIAMS, Gareth R.; WU, Jianrong; CHEN, Xia; ZHENG, Hong; ZHU, Li Min. Dual-responsive nanoparticles based on chitosan for enhanced breast cancer therapy. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 221, n. December 2018, p. 84–93, 2019.

ZHAO, Changhong; SONG, Xuebin; JIN, Weiguang; WU, Fan; ZHANG, Qicheng; ZHANG, Ming; ZHOU, Ninglin; SHEN, Jian. Image-guided cancer therapy using aptamer-functionalized cross-linked magnetic-responsive Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@carbon nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 1056, p. 108–116, 2019.

ZHAO, Kai et al. Fluorescence turn-off magnetic COF composite as a novel nanocarrier for drug loading and targeted delivery. **Microporous and Mesoporous Materials**, [S. l.],



*l.*], v. 311, n. October 2020, p. 110713, 2021.

ZHAO, Kaidong; LI, Di; XU, Weiguo; DING, Jianxun; JIANG, Weiqian; LI, Mingqiang; WANG, Chunxi; CHEN, Xuesi. Targeted hydroxyethyl starch prodrug for inhibiting the growth and metastasis of prostate cancer. **Biomaterials**, [*S. l.*], v. 116, p. 82–94, 2017.

ZOABI, Amani; TOUITOU, Elka; MARGULIS, Katherine. Recent Advances in Nanomaterials for Dermal and Transdermal Applications. **Colloids and Interfaces**, [*S. l.*], v. 5, n. 1, p. 18, 2021.

ZUVIN, Merve; KOÇAK, Muhammed; ÜNAL, Özlem; AKKOÇ, Yunus; KUTLU, Özlem; YAĞCI ACAR, Havva; GÖZÜAÇIK, Devrim; KOŞAR, Ali. Nanoparticle based induction heating at low magnitudes of magnetic field strengths for breast cancer therapy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [*S. l.*], v. 483, n. August 2018, p. 169–177, 2019.

**APPENDIX A – ENGLISH VERSION**



**FEDERAL UNIVERSITY OF CEARÁ  
SCIENCE CENTER  
CHEMISTRY POSTGRADUATE PROGRAM**

**ALEXANDRE CARREIRA DA CRUZ SOUSA**

**HYDROXYETHYL STARCH-BASED NANOCOMPOSITE FOR THE MAGNETIC  
TARGETING OF ONCOCALYXONE-A AND SKIN DRUG PENETRATION  
ENHANCEMENT BY NEGATIVE MAGNETOPHORESIS**

**FORTALEZA**

**2023**

ALEXANDRE CARREIRA DA CRUZ SOUSA

HYDROXYETHYL STARCH-BASED NANOCOMPOSITE FOR THE MAGNETIC  
TARGETING OF ONCOCALYXONE-A AND SKIN DRUG PENETRATION  
ENHANCEMENT BY NEGATIVE MAGNETOPHORESIS

This thesis is presented to the Chemistry Postgraduate Program at the Federal University of Ceará, as part of the requirements for obtaining the title of Doctor in Chemistry. Area of concentration: Chemistry.

Supervisor: Professor Dr. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

Co-supervisor: Professor Dr. Yogeshvar N. Kalia.

FORTALEZA

2023

ALEXANDRE CARREIRA DA CRUZ SOUSA

HYDROXYETHYL STARCH-BASED NANOCOMPOSITE FOR THE MAGNETIC  
TARGETING OF ONCOCALYXONE-A AND SKIN DRUG PENETRATION  
ENHANCEMENT BY NEGATIVE MAGNETOPHORESIS

This thesis is presented to the Chemistry Postgraduate Program at the Federal University of Ceará, as part of the requirements for obtaining the title of Doctor in Chemistry. Area of concentration: Chemistry.

Approved on: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

JURY MEMBERS

---

Professor Dr. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (supervisor)  
Federal University of Ceará (UFC)

---

Professor Dr. Yogeshvar N. Kalia (co-supervisor)  
University of Geneva (UNIGE)

---

Professor Dr. Juliano Casagrande Denardin  
University of Santiago (USACH)

---

Professor Dr. Sílvia Stanisçuaski Guterres  
Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS)

---

Professor Dr. Antonio Gomes de Souza Filho  
Federal University of Ceará (UFC)

---

Professor Dr. Marcos Carlos de Mattos  
Federal University of Ceará (UFC)

To God.

To Nelsinho (in memoriam), my brother, accomplice, and confidant; best friend, and absolute piece of painful and eternal longing, overcome daily by an immortal love. The Lord is your shepherd (Psalm 23:1).

To my father (in memoriam), my hero, and the greatest example of dignity, uprightness of conduct, perseverance, and resilience.

To my mother, my warm haven of eternal blessings, my first moral compass, and my deepest foundation of ethical and human values.

## ACKNOWLEDGMENT

Thais, you have been more than a wife in this very challenging period. I have always found in you an incessant source of support and encouragement, sometimes at the expense of distances and nostalgia that only we would know. Here, I make it public that you were the biggest driver for this document and this entire arduous period. A poet said that love is beautiful only when we find someone who transforms us into the best version of ourselves. Thus, it is my best version that dedicates to you “O Céu de Santo Amaro” to talk about the stars and the universe’s immensity inside us.

To Prof. Dr. Nágila Ricardo, for being much more than a supervisor, always overflowing with dedication, support, affection, encouragement, and unrestricted professional and personal care. Thank you very much for everything, I hope you know that you will always have my gratitude!

To Prof. Dr. Yogeshvar N. Kalia, for the available resources, scientific support, and international partnership that greatly contributed to this work and also for providing me with one of the deeper professional and personal experiences of my life.

To Prof. Dr. Juliano Denardin, for scientific support and international partnership in providing analysis and characterization resources.

To the members of the jury, for their acceptance and contributions.

To my friends Adolfo and Pedro for their scientific and technical contributions.

To the Federal University of Ceará – UFC, as well as, my colleagues from the LabPIM, for the support in the methodologies and discussions, in particular: Rafael, Aiêrta, Débora, Denise, Alessandro, Kamilla, Louhana, Sarah, and David.

To the Swiss Government, the University of Geneva, and all colleagues from the Molecular Therapeutics Delivery Group, for the shared knowledge, support in methodologies, constructive discussions, and also for maintaining a harmonious and collaborative work environment, in particular: Laeticia, Jonathan, Si, Leqi, Maria, Gisela, Firdaws, Karen, Martina, Erga, Aditya, Ludovic, Céline and Gavrielle.

To the Federal Institute of Education, Science and Technology of Ceará – IFCE, as well as, to my colleagues from the Quixadá *campus*, for the unrestricted support and incentives granted for the execution of this work, in particular: Kamila, Praxedes, Cristiane, Danielle, Guilherme, Mayara, J Junior, Cicero, Samuel, and Raphael.

This work was carried out with the support of the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” – Brazil (CAPES) – Financing Code 001.

“So the problem is not so much to see what nobody has yet seen, as to think what nobody has yet thought concerning that which everybody sees.” (SCHOPENHAUER, Parerga und Paralipomena, 1851, v.2, p.115).

## ABSTRACT

Magnetic nanocarriers have been adopted as an innovative therapeutic strategy, enabling drug targeting through magnetophoresis in different kinds of therapies, which can improve drug bioavailability. Starch-based magnetic nanocapsules were synthesized for the targeted delivery of a hydrophilic bioactive called oncoalyxone A (onco-A) through the application of an external magnetic field. Synthesis by the inverse miniemulsion technique allowed the co-encapsulation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) and onco-A into the same nanostructure, generating a magnetic behavior and anticancer activity, respectively, for the synthesized nanocomposite. The synthesized nanocapsules exhibited a core-shell morphology and an average diameter of 143 nm. This nanocomposite showed potential anticancer activity ( $IC_{50} - 72h$ ) against four human tumor cell lines: glioblastoma SNB-19 ( $1.010 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), colon carcinoma HCT-116 ( $2.675 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), prostate PC3 ( $4.868 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and leukemia HL-60 ( $2.166 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). *In vivo* acute toxicity (96h) and locomotor activity were evaluated in a zebrafish (*Danio rerio*) model. Thus, the synthesized nanocomposite exhibited *in vivo* biocompatibility, a prolonged drug release profile, *in vitro* antitumor activity, and also responded to an applied magnetic field, generating a promising compound for magnetic vectorization of drugs. Additionally, for the first time, it was evaluated the effect of a magnetic field on the transdermal drug penetration (targeted, or not, to the hair follicle by negative magnetophoresis), demonstrating an average of up to 340% higher skin penetration of adapalene or fluorescein, under magnetophoresis, when compared to the passive penetration. Furthermore, although the mechanism of penetration enhancement has not yet been elucidated, it was evidenced that this penetration increase occurs not only through the follicular pathway, but also through transcellular and/or intercellular routes through the stratum corneum.

**Keywords:** magnetic nanocarriers; negative magnetophoresis; oncoalyxone A; hydroxyethyl starch nanocapsules; superparamagnetic iron oxide nanoparticles; transdermal drug penetration.



## RESUMO

Nanocarreadores magnéticos têm despertado elevado interesse no desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras relacionadas ao direcionamento de biomoléculas através da força gerada por um campo magnético, aumentando a biodisponibilidade de fármacos. Nanocápsulas magnéticas à base de hidroxietilamido foram sintetizadas para o carregamento do bioativo hidrofílico oncoalexina A (onco-A) e sua vetorização pela aplicação de um campo magnético externo, gerando um inédito nanocarreador magnético. A metodologia de síntese de nanocápsulas por reação de poliadicação em miniemulsão inversa (A/O), permitiu o encapsulamento simultâneo de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) e do bioativo onco-A, responsáveis, respectivamente, pelo caráter magnético e pela atividade anticancerígena do nanocompósito sintetizado. Por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), observou-se morfologia core-shell (casca-núcleo) bem definida e diâmetro médio de 143 nm para as nanocápsulas. A atividade anticancerígena desse nanocompósito foi avaliada *in vitro* mediante determinação da concentração inibitória (IC<sub>50</sub> – 72h) em quatro linhagens de células tumorais humanas: glioblastoma SNB-19 (1,010 µg mL<sup>-1</sup>), carcinoma de cólon HCT-116 (2,675 µg mL<sup>-1</sup>), próstata PC3 (4,868 µg mL<sup>-1</sup>) e leucemia HL-60 (2,166 µg mL<sup>-1</sup>). A toxicidade aguda (96h) e o impacto na atividade locomotora foram avaliados usando zebrafish (*Danio rerio*) como organismo modelo. Assim, o nanocompósito sintetizado neste trabalho exibiu biocompatibilidade (*in vivo*), perfil de liberação prolongada de bioativos, citotoxicidade contra quatro linhagens cancerígenas, além de responder mecanicamente à aplicação de um campo magnético externo, gerando um composto inédito com perspectivas terapêuticas promissoras no campo da vetorização magnética de bioativos. Adicionalmente, avaliou-se o efeito da aplicação de um campo magnético na penetração transdérmica de fármacos (direcionada ou não ao folículo piloso) por magnetoforese negativa, um estudo inédito. Demonstrou-se uma penetração até 340% superior, em média, sob efeito da magnetoforese quando comparado à penetração passiva. Embora o mecanismo de intensificação da penetração não seja ainda elucidado, foi possível demonstrar que esse aumento de penetração ocorre não somente por via folicular, atuando também por vias de penetração transcelular e/ou intercelular do estrato córneo.

**Palavras-chave:** nanocarreadores magnéticos; magnetoforese negativa; oncoalexina A; nanocápsulas de hidroxietilamido; SPIONs; penetração transdérmica.

## LIST OF FIGURES

Figure 1 - Structural representation of starch components (amylose and amylopectin) .....	117
Figure 2 - Structural representation of hydroxyethyl starch (amylose and amylopectin chains substituted by hydroxyethyl groups at positions C2 and C6) .....	118
Figure 3 - Representation of aqueous ferrofluid composed by magnetite superparamagnetic nanoparticles visualized by TEM .....	119
Figure 4 - Representation of the interactions involved in the functionalization of the magnetite nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) surface by citrate ions (images out of scale) .....	120
Figure 5 - Comparison between ferromagnetic (with hysteresis – blue arrows) and superparamagnetic (black arrows) behavior .....	121
Figure 6 - Magnetic hyperthermia as an anticancer therapeutic strategy .....	122
Figure 7 - Representation of magnetic targeting of drug carriers through the application of a magnetic field .....	124
Figure 8 - Magnetophoresis as a physical method of drug targeting .....	125
Figure 9 - Schematic representation of positive (a) and negative (b) magnetophoresis .....	126
Figure 10 - Molecular structure for the quinone oncocalyxone A, extracted from the species <i>Auxemma Oncocalyx</i> .....	127
Figure 11 - Scheme for the synthesis steps of magnetic nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrate) in aqueous ferrofluid form .....	132
Figure 12 - Scheme for the synthesis steps of the magnetic nanocomposite based on HES and magnetite, loaded with oncocalyxone A .....	133
Figure 13 - X-ray diffraction patterns for $\text{Fe}_3\text{O}_4$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrate nanoparticles synthesized by the coprecipitation method .....	139
Figure 14 - FTIR spectroscopic measurements for: a) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (black line), $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrate (blue line), and sodium citrate (green line) .....	141
Figure 15 - TEM images (with particle size distribution histograms) for: a) uncoated $\text{Fe}_3\text{O}_4$ and b) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrate .....	142
Figure 16 - TEM images for magnetite nanoparticles functionalized with citrate .....	142
Figure 17 - Representation of the HES polymeric nanocapsule formation process through an interfacial reaction on inverse miniemulsion .....	143

Figure 18 - Illustrative representation of the formation process for the magnetic nanocomposite loaded with the bioactive onco-A and SPIONs (images out of scale) .....	144
Figure 19 - FTIR spectroscopic measurements for: free HES (black line), HES magnetic nanocomposite loaded with onco-A (grey line) and free onco-A (pink line) .....	145
Figure 20 - Gel Permeation Chromatogram for HES .....	146
Figure 21 - <sup>13</sup> C-NMR spectrum for HES in D <sub>2</sub> O .....	146
Figure 22 - TEM images (with histogram of particle size distribution) of nanocomposites loaded with onco-A and SPIONs (red line corresponds to the Gaussian distribution) .....	147
Figure 23 - Hydrodynamic diameter distribution by DLS for magnetic nanocomposites loaded with onco-A .....	148
Figure 24 - Magnetic hysteresis at 300 K for: a) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (black line) and Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @citrate (blue line); b) Magnetic nanocomposite loaded with onco-A (red line); (Inserted in the panels: enlarged view for the small field region from -400 to 400 Oe) .....	149
Figure 25 - Macroscopic view of a) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @citrate nanoparticles under an external magnetic field; b) magnetic nanocapsules without onco-A; c) magnetic nanocapsules without onco-A under an external magnetic field; d) magnetic nanocapsules with onco-A under an external magnetic field .....	150
Figure 26 - a) Absorption scans for onco-A at different concentrations in PBS 0.1 mol.L <sup>-1</sup> (pH = 7.4) at 310 K; b) calibration curve for onco-A at 282nm; c) onco-A release profile from nanocapsules, remaining onco-A (not released) and onco-A (free bioactive) in PBS 0.1 mol.L <sup>-1</sup> (pH = 7.4) at 310 K; d) enlarged view for the release profile between 1 and 6 hours for released and remaining onco-A .....	151
Figure 27 - a) Release profile (black line) and reminiscent (red line) up to 72 h of experiment in PBS 0.1 mol.L <sup>-1</sup> (pH = 7.4) at 310 K; b) log(onco-A weight) vs time; c) onco-A weight vs log(time); d) log(onco-A weight) vs log(time) .....	152
Figure 28 - Antiproliferative activity of free and encapsulated onco-A against four human tumor cell lines evaluated by the MTT assay through 72h.....	154

Figure 29 - a) Representation of the oral treatment performed on zebrafish; b) representation of open field test (locomotor activity); c) Effect of the formulations on the locomotor activity of adult zebrafish: Naive: untreated animals. Control: 1mg/mL SDS solution (without nanocomposite) in distilled water (20 $\mu$ L) .....	155
Figure 30 - Histological section of human skin .....	158
Figure 31 - Active methods of transdermal drug penetration .....	160
Figure 32 - Steps concerned to the porcine skin processing.....	163
Figure 33 - Adaptation of Franz cells for transdermal penetration assays .....	164
Figure 34 - 1mm skin biopsies with and without the pilosebaceous unit (PSU) .....	165
Figure 35 - Obtaining CLSM images .....	166
Figure 36 - Fluorescein transdermal penetration carried by HES nanocapsules .....	168
Figure 37 - Quantification of fluorescein in 0.785 cm <sup>2</sup> skin discs .....	169
Figure 38 - Quantification of fluorescein in 1mm biopsies .....	170
Figure 39 - a) Spectroscopic monitoring of fluorescein transposition into the receptor medium during 24 hours of transdermal penetration; b) expanded scale for the initial 12 hours; calibration curve concerned to the calculation of concentrations .....	172
Figure 40 - Spectroscopic monitoring of the transposition of fluorescein to the receptor medium during 24 hours of transdermal penetration.....	173
Figure 41 - CLSM micrographs of skin sections (stratum corneum facing left) subjected to 24h of transdermal penetration: (a, b) white control (without fluorescein); (c, d) passive penetration; (e, f) magnetophoresis; (b, d, f) DAPI signal suppressed, remaining only fluorescein signal .....	173
Figure 42 - ADA quantification in 0.785cm <sup>2</sup> skin discs .....	175
Figure 43 - ADA quantification in 1mm biopsies: a) in the presence and absence of a magnetic field (n = 5); b) only in the presence of a magnetic field (n = 13)	176

## ABBREVIATIONS

ADA	Adapalene
CA	Citric Acid
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DLS	Dynamic Light Scattering
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DOX	Doxorubicin
DS	Degree of Substitution
FDA	Food and Drug Administration
GBM	Glioblastoma Multiform
H <sub>c</sub>	Coercive Field
HES	Hydroxyethyl starch
IC <sub>50</sub>	Inhibitory Concentration 50%
LC <sub>50</sub>	Lethal Concentration 50%
MRI	Magnetic Resonance Imaging
M <sub>s</sub>	Saturation of Magnetization
MSNs	Mesoporous Silica Nanoparticles
MW	Molecular Weight
Onco-A	Oncocalyxone A
PBS	Phosphate Buffered Saline Solution
PSU	Pilosebaceous Unit
RNA	Ribonucleic Acid
SC	Stratum Corneum
SPIONs	Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles
TEM	Transmission Electronic Microscopy
TPGS	D- $\alpha$ -Tocopherol Polyethylene Glycol Succinate 1000
VSM	Vibrant Sample Magnetometry

## SUMMARY

<b>CHAPTER I - MAGNETIC NANOCOMPOSITES FOR THERAPEUTIC STRATEGIES INNOVATION: AN APPROACH TO RECENT ADVANCES.....</b>	<b>111</b>
1 PRESENTATION .....	112
2 INTRODUCTION.....	113
3 THEORETICAL FRAMEWORK .....	115
3.1 Drug delivery strategies.....	115
3.2 Hydroxyethyl starch polymeric nanocapsules.....	116
3.3 Superparamagnetic Nanoparticles.....	118
3.4 Magnetic Hyperthermia.....	121
3.5 Magnetophoresis .....	123
3.6 Oncocalyxone A (Onco-A) .....	126
4 OBJECTIVES .....	128
4.1 General goal .....	128
4.2 Specific goals .....	128
<b>CHAPTER II - SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A MAGNETIC NANOCOMPOSITE BASED ON HYDROXYETHYL STARCH FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS IN THE MAGNETIC TARGETING AND PROLONGED RELEASE OF ONCOCALYXONE A.....</b>	<b>129</b>
1 INTRODUCTION.....	130
2 METHODOLOGY.....	131
2.1 Materials.....	131
2.2 Synthesis of magnetite nanoparticles with surface modified by citrate ions (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @citrate).....	131
2.3 Synthesis of magnetic nanocapsules based on hydroxyethyl starch (HES) loaded with oncocalyxone A .....	132
2.4 Oncocalyxone A release studies.....	134
2.5 Onco-A encapsulation efficiency .....	134

2.6	Citotoxicidade <i>in vitro</i> (determinação de IC50).....	135
2.7	( <i>In vivo</i> ) acute toxicity and locomotor activity .....	135
2.8	Characterization procedures .....	136
2.8.1	<i>X-Ray diffraction</i> .....	136
2.8.2	<i>Nuclear magnetic resonance (NMR)</i> .....	136
2.8.3	<i>Gel Permeation Chromatography (GPC)</i> .....	137
2.8.4	<i>Infrared vibrational spectroscopy (FTIR)</i> .....	137
2.8.5	<i>Transmission electron microscopy (TEM)</i> .....	137
2.8.6	<i>Vibrating sample magnetometry (VSM)</i> .....	138
2.8.7	<i>Dynamic Light Scattering (DLS)</i> .....	138
2.8.8	<i>Thermogravimetric Analysis (TGA)</i> .....	138
3	RESULTS AND DISCUSSION .....	139
3.1	Obtaining SPIONs (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @citrate).....	139
3.2	Obtaining the starch-based magnetic nanocomposite .....	143
3.3	Release studies .....	150
3.4	Biological essays .....	153
<b>CHAPTER III - MAGNETOPHORESIS AS A STRATEGY FOR MAGNETIC TARGETING OF DRUGS IN TOPICAL APPLICATIONS</b> .....		156
1	PRESENTATION .....	157
2	INTRODUCTION.....	158
2.1	Transdermal drug penetration .....	158
2.2	TPGS Polymeric micelles loaded with adapalene.....	161
3	METHODOLOGY .....	162
3.1	Material .....	162
3.2	Synthesis.....	162
3.2.1	<i>Fluorescein-loaded polymeric nanocapsules</i> .....	162
3.2.2	<i>ADA-loaded polymeric micelles</i> .....	162

3.3	Skin processing.....	163
3.4	Transdermal penetration experiments .....	163
3.5	1mm skin disks biopsy with and without the pilosebaceous unit (PSU) .....	165
3.6	Confocal laser scanning microscopy (CLSM) .....	165
3.7	Fluorescence spectroscopy .....	166
4	RESULTS AND DISCUSSION .....	167
4.1	HES polymeric nanocapsules loaded with fluorescein .....	167
4.2	TPGS polymeric micelles loaded with adapalene .....	174
5	CONCLUSION .....	178
	REFERENCES .....	179



**CHAPTER I**

**MAGNETIC NANOCOMPOSITES FOR THERAPEUTIC STRATEGIES  
INNOVATION: AN APPROACH TO RECENT ADVANCES**

## 1 PRESENTATION

The present work initially addresses the synthesis of an original magnetic nanocomposite for biotechnological applications, aiming to the innovation and expansion of therapeutic strategies. In the synthesis of this nanocomposite, hydroxyethyl starch was used as a polymeric matrix precursor. Magnetite superparamagnetic nanoparticles with surface functionalized by citrate ions ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$ ) were used in the form of magnetic ferrofluid to incorporate magnetic properties to this product. As hydrophilic bioactive, oncocalyxone A was used, which is a quinone extracted from the species *Auxemma Oncocalyx* (a plant popularly known as “Pau Branco”), a native tree from the Caatinga in the northeast region of Brazil.

Subsequently, through an international collaboration with the University of Geneva, the effect of applying a magnetic field on the targeting of nanocarriers is addressed, evaluating, in an unprecedented study, the intensification of drug skin penetration through follicular via (or not), a phenomenon called magnetophoresis, which represents an innovative spectrum of therapeutic possibilities when combined with the use of magnetic nanocarriers.

For didactic purposes, this work is divided into three chapters:

In the first, a contextualization of the use of nanotechnology applied to the biomedical sciences is carried out, approaching the theoretical fundament pertinent to the execution of this work and presenting its objectives. The second chapter is devoted to the methodological foundations of the experimental procedures, as well as, the discussion concerning the obtained results about the synthesis, characterization, and biological tests carried out for the original magnetic nanocomposite synthesized in this work. Finally, the third chapter discusses about penetration experiments and drug quantification in the skin, under the application of a magnetic field (negative magnetophoresis), in comparison with passive penetration (absence of magnetic field), and also considering the penetration directed to the hair follicle in comparison with PSU free biopsies.

It is expected, therefore, that the present work will contribute to the use of nanotechnological chemistry for benefit of therapeutic solutions for the biomedical sciences.

## 2 INTRODUCTION

The development of nanotechnology has driven the coming of therapeutic innovations against challenging diseases. Strategies involving the application of multifunctional nanoparticles have shown promising results for the fight against cancer, enabling the anchoring of antibodies, nucleic acids, vitamins and carbohydrates on the surface of nanocarriers (GREWAL et al., 2021).

A variety of nanoparticle-based medicines, such as liposomal doxorubicin (Doxil®) and albumin nanocomposites (Abraxane®), have already been adopted for clinical use, while hundreds more candidates continue to be evaluated by the Food and Drug Administration (FDA) (GAO et al., 2021). As an example, graphene and its oxides have been investigated in the fight against cancer as carriers of various types of drugs, antibodies, proteins, DNA and RNA (JAIN et al., 2021). The use of gold nanoparticles has enabled the development of several nanoplatforms for the delivery of clinically relevant radioisotopes for cancer therapy and diagnosis (SILVA; CAMPELLO; PAULO, 2021). Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) have acted as drug delivery platforms, improving stability and efficiency in the release of bioactives and, consequently, in the administered dose (MOODLEY; SINGH, 2021).

In this sense, theranostic formulations explore the simultaneous performance of diagnostic and therapeutic procedures (WANG et al., 2019), performing anticancer treatments with high efficiency. A single nanoplatform can serve as contrast agent in magnetic resonance imaging (MRI) and, simultaneously, deliver chemotherapeutic agents to the target tissue. Thus, theranostic nanocomposites gain prominence due to their performance, since their small dimensions allow them to penetrate biological barriers and achieve high therapeutic efficiency (HADADIAN et al., 2021; JI et al., 2021).

Iron oxide nanoparticles, especially magnetite nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), have been already used for delivery of platinum drugs, in a therapeutic strategy in which platinum complex nanocarriers not only reduce side effects, by temporarily inactivating drugs during transport in the blood, but also enhance tumor uptake by targeted drug delivery (DUSZYŃSKA et al., 2020; JIA et al., 2021).

Specifically, in the field of magnetic nanocomposites, magnetite nanoparticles have been consolidating themselves as promising candidates for the incorporation of magnetic properties in therapeutic formulations, since these nanoparticles are already safely used in several formulations approved by the FDA for clinical use in humans with

different kidney function levels, such as Feraheme® (NDC 59338-775-10), Ferumoxytol® (NDC 0781-3154-01) and INFeD® (NDC 0023-6082-10) (AJALLI et al., 2022; COLBERT et al., 2022; ESLAMI et al., 2022).

Thus, once evidenced a global context of intense demand for nanotechnological materials that promote therapeutic benefits, the present work intends to contribute to the development of a new magnetic nanocomposite with potential for biomedical applications, promoting magnetic drug vectorization. In the synthesis of this new nanocomposite, hydroxyethyl starch was used as a precursor polymeric matrix to simultaneously encapsulate magnetite nanoparticles and a hydrophilic bioactive with anticancer properties, resulting in a magnetic nanocapsule of polymeric nature and core-shell morphology for drug delivery strategies. Additionally, the effect of a magnetic field on skin drug penetration by magnetic nanocarriers was also evaluated.

### 3 THEORETICAL FRAMEWORK

#### 3.1 Drug delivery strategies

Studies related to applications of nanomedicine in chemotherapies suggest that, normally, only about 0.7% of intravenously administered doses specifically reach the tumor, suggesting that the low efficiency of drug delivery to the target tissue is an important obstacle to the nanomedicine performance (JIANG et al., 2017). Thus, a large part of the medication applied to a patient is dispersed through different regions of the body, allowing the appearance of multiple side effects. To overcome or minimize these obstacles, several strategies have been constantly developed with nanotechnological advances in the production of polysaccharide-based biomaterials (MENG et al., 2022).

A wide variety of platforms such as docetaxel-loaded chitosan microspheres (KANOJIA et al., 2020; WANG; XU; ZHOU, 2014), solid lipid nanoparticles loaded with quinones (DE ALMEIDA et al., 2017; DE MOURA et al., 2020), micelles and dendrimers loaded with cyanines and anthocyanins (LI et al., 2021), liposomes (SHUKLA; GUPTA, 2020), as well as polymeric nanocapsules (DA SILVA et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2020) have been developed to optimize the drug delivery efficient, enabling higher performance of the drug in the target tissue.

Liposomes (vesicles consisting of a lipophilic bilayer and a hydrophilic core) offer application as a delivery vehicle for both hydrophilic and lipophilic agents, increasing the delivery efficiency and safety of chemotherapeutic agents compared to their free (non-liposomal) formulations. In recent clinical cases, doxorubicin (DOX) has been the most explored chemotherapeutic agent for evaluating different liposomal applications, demonstrating excellent results in the most advanced cancer stages, in which a surgical removal is no longer a viable option (CHENG et al., 2022; MAKWANA et al., 2021; SOLEIMANI et al., 2022).

Nanoemulsions have demonstrated high efficiency in oxidative protection and delivery of drugs, such as Chlorambucil and TOCOSOL™, enhancing their bioavailability and improving results against breast and ovarian carcinomas (SINGH et al., 2017). Since many drugs extracted from nature have a lipophilic identity, nanoemulsion drug delivery systems represent a promising tool to improve the bioavailability of these compounds (KUMAR et al., 2019).

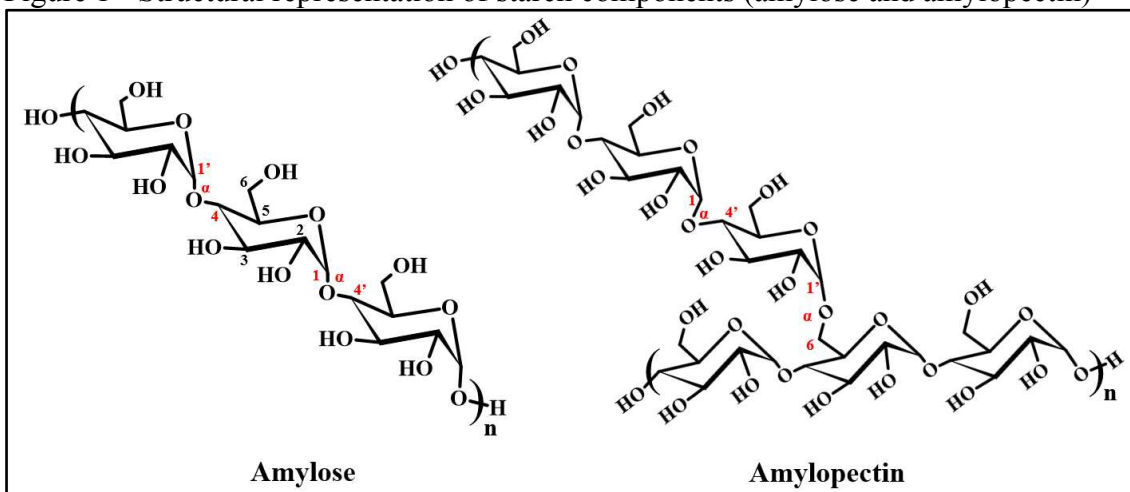
Specific magnetic nanocarriers for protein delivery, developed based on magnetic nanoparticles coordinated with graphene oxide and chitosan, have reduced oxidative instability and degradation in protein delivery, contributing to the fight against a wide variety of diseases such as cancer, metabolic disorders and autoimmune diseases (REBEKAH et al., 2021).

Thus, it is evident, from the above, the growing search for strategies aimed to improving the delivery of bioactives to a target tissue, contributing to the achievement of better therapeutic results. In this sense, new concepts of multifunctional nanocomposites based on organic structures with core-shell morphology have been considered very promising for the development of new carrier platforms, seeking high surface area, high drug loading capacity and low toxicity (KRASKOUSKI et al., 2022; ZHAO et al., 2021).

### **3.2 Hydroxyethyl starch polymeric nanocapsules**

Starch consists of a mixture of linear amylose [ $\alpha(1,4)$ -D-glucopyranose] and amylopectin [ $\alpha(1,4)$ -D-glucopyranose branched with  $\alpha(1,6)$ -D-glucopyranose] (KHAN; AHMAD, 2013), as illustrated in Figure 1. The proportion between these two polysaccharides varies according to the botanical origin of the starch. Typically, 20 to 35% amylose is found in starch. “Waxy” starches can contain less than 15% amylose and starches with a high amylose content can exceed 40% of this component (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Several studies suggest the development of starch-based systems for administering antineoplastic drugs (TORLOPOV et al., 2020; XU et al., 2018; ZHAO et al., 2017).

Figure 1 - Structural representation of starch components (amylose and amylopectin)



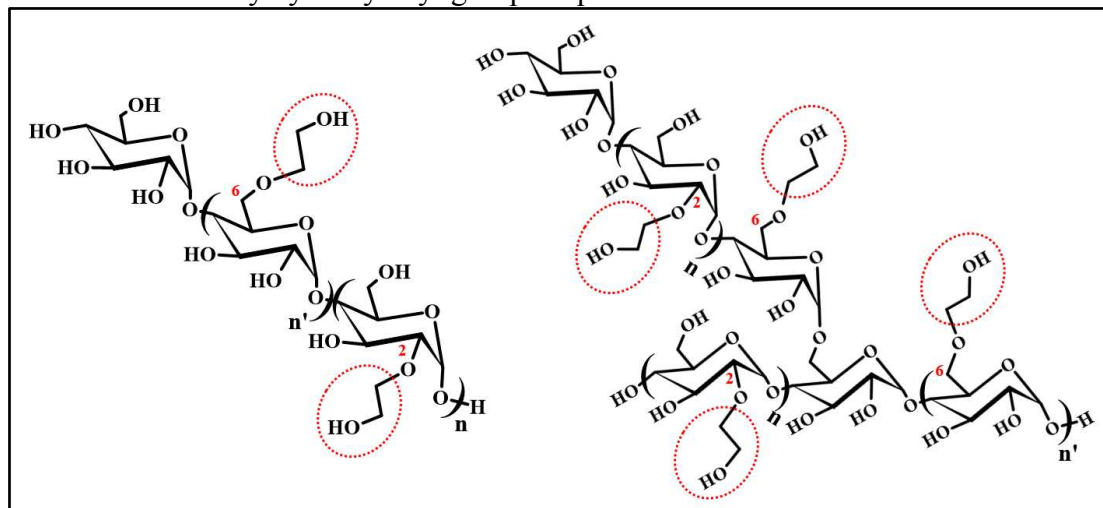
Source: developed by the author.

The starch potential for biomedical applications is mainly due to its biocompatibility and biodegradability. However, especially about prolonged drug release, starch may not be an appropriate option, as it is rapidly biodegraded and may release bioactives very quickly. Strategically, this limitation is overcome by modifying its structure to achieve better properties in its use for prolonged release (KANG et al., 2015; YU et al., 2021a). Hydroxyethyl starch (HES), for example, is more water soluble than starch, exhibits greater hydrolysis stability and longer half-life when *in vivo* (PALEOS; SIDERATOU; TSIOURVAS, 2017).

HES is a starch-derived polymer in which hydroxyl groups at positions C2 or C6 are partially functionalized by hydroxyethyl groups, as shown in Figure 2 (KANG et al., 2015; PEREIRA et al., 2020; VON ROTEN et al., 2006). It is commonly used safely in drugs for the treatment of hypovolemic shock and cerebral ischemia (BAIER et al., 2012). HES improves microcirculation within the body due to the regulation of blood viscosity. Its retention time in blood plasma, liver, lungs and spleen is significantly higher compared to starch. Its renal elimination time can also be prolonged by increasing the degree of molar substitution of the hydroxyethyl group in its chain (BAIER et al., 2012). HES can be excreted in the urine after being enzymatically hydrolyzed in the blood by  $\alpha$ -amylase to a molecular weight (MW) less than the renal clearance limit (~70 kDa) (WANG et al., 2021). Each different type of HES is characterized by its MW, degree of substitution (DS) and the ratio of substitutions between the C2 and C6 carbons (HITOSUGI et al., 2007; KANG et al., 2015). Substitutions at the C3 position may be rarely observed (TORLOPOV et al., 2020). Such characteristics have a direct impact on

several polymer properties, such as water solubility, solution stability, and most importantly, *in vivo* half-life (BESHEER et al., 2007).

Figure 2 - Structural representation of hydroxyethyl starch (amylose and amylopectin chains substituted by hydroxyethyl groups at positions C2 and C6



Source: developed by the author.

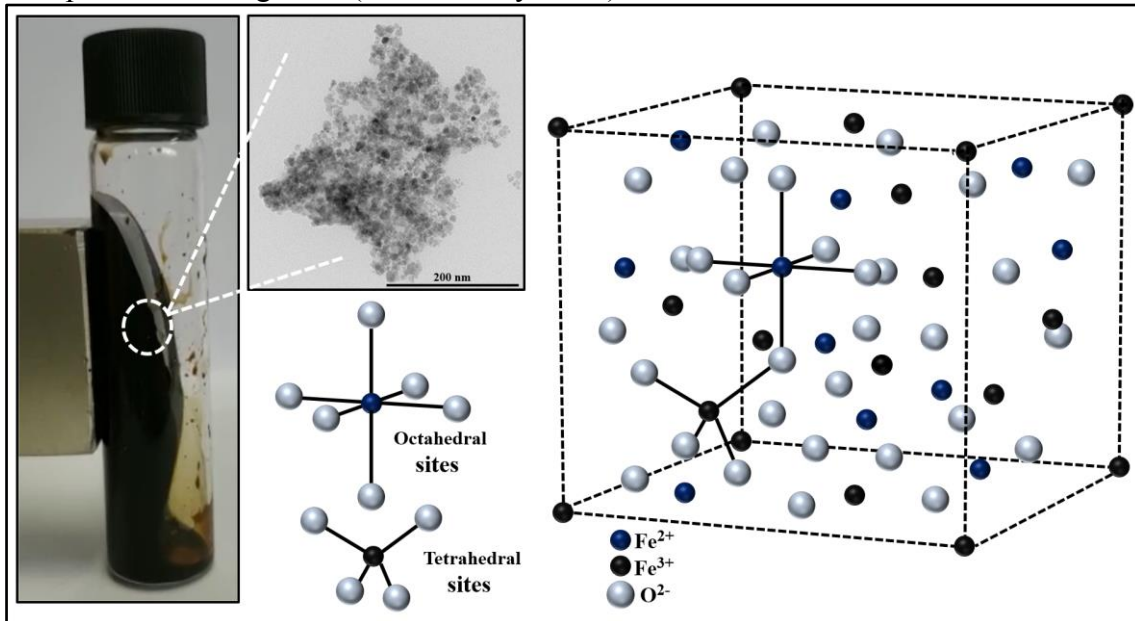
Biological applications of hydroxyethyl starch in drug delivery include micelle formation and vesicles loaded with doxorubicin (DOX) (YU et al., 2021a; ZHAO et al., 2017). HES-based nanocapsules and hydrogels have also been evaluated in drug and protein delivery systems (PALEOS; SIDERATOU; TSIOURVAS, 2017). HES-based polymeric nanocapsules were formed from multiple nanoemulsions (Oil/Water/Oil), with the potential to carry hydrophilic and/or lipophilic bioactives (PEREIRA et al., 2020).

### 3.3 Superparamagnetic Nanoparticles

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) are crystalline particles on nanometric scale, usually iron oxides, such as magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) or maghemite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) (LI et al., 2020), which can have their surfaces modified to acquire aqueous stability, as illustrated below in Figure 3. Magnetite nanoparticles are one of the most used options for therapeutic purposes, presenting tetrahedral ( $\text{Fe}^{3+}$ ) and octahedral ( $\text{Fe}^{3+}$  or  $\text{Fe}^{2+}$ ) coordination sites in its crystalline structure. Surface functionalization is commonly performed with organic acids or biocompatible hydrophilic polymers, such as polyethylene glycol (RAMAZANOV; KARIMOVA; SHIRINOVA, 2021).



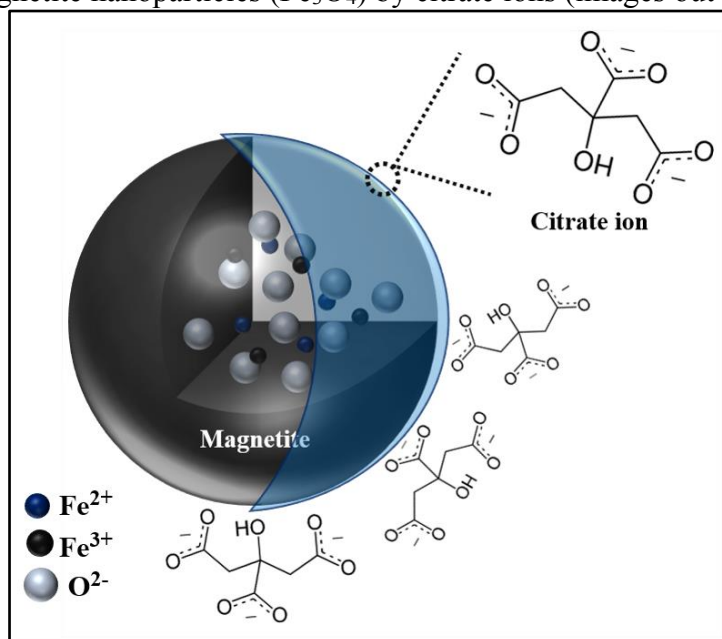
Figure 3 - Representation of aqueous ferrofluid composed by superparamagnetic nanoparticles of magnetite (visualized by TEM)



Source: developed by the author.

Citric acid (CA) is a widely used ligand to modify the surface of iron oxide nanoparticles, where the COOH or C–OH groups of the CA make the complex water-soluble and stable for biological applications. The CA molecule has two terminal COOH groups, a central COOH group and a C–OH group, which can all of them be active in the coating of iron oxides through Fe–OH coordinations, as illustrated below in Figure 4 (ZHANG et al., 2019a).

Figure 4 - Representation of the interactions involved in the surface functionalization of the magnetite nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) by citrate ions (images out of scale)



Source: developed by the author.

Due to their morphology, size (usually around 20 nm) and surface characteristics, SPIONs can also be conjugated with antitumor drugs and antibodies, acting at the cellular level and injecting particles in a targeted way into the target tissue, which significantly expands their medicinal applications (DULIŃSKA-LITEWKA et al., 2019).

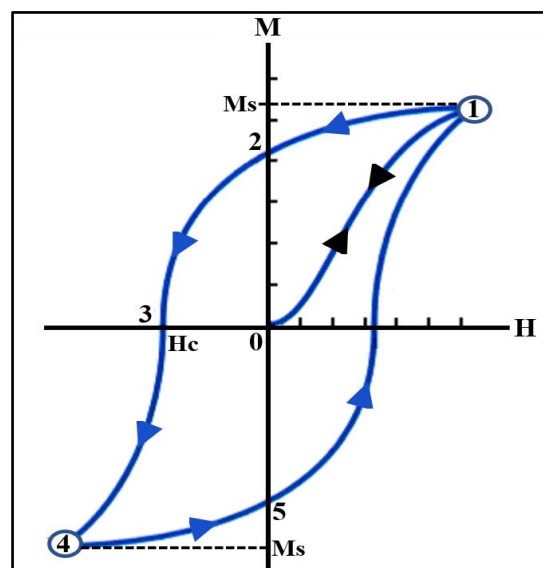
In bone cancer cases, for example, the most modern therapies still encounter great adversities in the adequate administration of anticancer drugs to the bone, because the unique characteristics of this tissue repress the penetration efficiency of therapeutic agents. The development of nanomaterials, including SPIONs, liposomes and polymers, addresses intelligent and multifunctional platforms that are capable of delivering therapeutic agents to target cancer cells, generating *in vivo* images for bone diagnosis (PANG et al., 2021).

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive, besides to being the most malignant variant in the spectrum of brain tumors. *In vivo* essays with polymeric nanoparticles loaded with SPIONs and doxorubicin (DOX) demonstrated an increase in drug retention in the tumor, with a significant decrease in its growth rate (LUQUE-MICHEL; LEMAIRE; BLANCO-PRIETO, 2021).

Superparamagnetism is a property commonly observed in single-domain particles, characterized by the absence of hysteresis. Hysteresis are magnetization curves

that represent the magnetic behavior of materials from various domains, as can be seen in the Figure 5, below, by the blue arrows (1→2→3→4→5→1). The formation of a hysteresis is observed after the saturation of magnetization ( $M_s$ ) is reached and the magnetic field intensity ( $H$ ) starts to decrease (1→2). Since all the magnetic domains of the particle do not return to their original orientations, there is remaining magnetization, even when the magnetic field is no longer applied (2). The remaining magnetization can be removed (2→3) by applying a magnetic field in the opposite direction to the initial original field, which is defined as coercive field ( $H_c$ ). On the other hand, superparamagnetic nanoparticles, unlike ferromagnetic materials, have only a single domain (monodomain), not exhibiting a hysteresis loop (0→1→0), i.e. not remaining magnetized when the magnetic field is removed (SANDLER; FELLOWS; THOMPSON MEFFORD, 2019).

Figure 5 - Comparison between ferromagnetic (with hysteresis – blue arrows) and superparamagnetic (black arrows) behavior



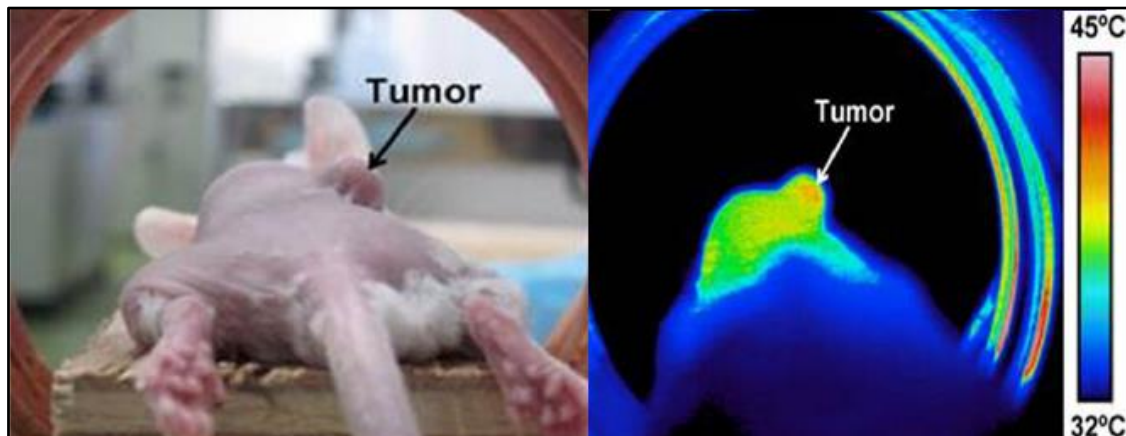
Source: developed by the author.

### 3.4 Magnetic Hyperthermia

Therapies based on magnetic hyperthermia use the heat generated by SPIONs, under the action of a magnetic field with alternating direction at high frequency, to increase the temperature in specific areas of the tumor. As healthy cells are more resistant against heating, tumor cells can be selectively induced to apoptosis in localized regions (between 42 and 46 °C), without damaging adjacent healthy tissues, as illustrated in

Figure 6 (CASTELLANOS-RUBIO et al., 2020; PADYA et al., 2021; ZHANG et al., 2019c).

Figure 6 - Magnetic hyperthermia as an anticancer therapeutic strategy



Source: from (DHAR; SIRISHA MAGANTI, 2017).

Thus, magnetic hyperthermia represents an effective anticancer therapeutic line, with minimal side effects, projecting itself as an alternative to chemo and radiotherapy. Magnetite nanoparticles are considered one of the best choices for biomedical applications, due to their high magnetic response and their good biocompatibility and biodegradability. Magnetite-based formulations have already been approved for use in humans by the Food and Drug Administration (FDA) (PADYA et al., 2021). In this context, magnetic nanocomposites in hydrogel form have shown great potential for simultaneous action in chemotherapy and magnetic hyperthermia of solid tumors, exhibiting biocompatibility, prolonged release profile and high saturation magnetization for magnetic vectorization of bioactives(SOLEIMANI et al., 2021).

The relaxation theory (ILG, 2019) is the most appropriate to explain the heating mechanism of single-domain nanoparticles under the action of an external magnetic field. When a magnetic field is applied, the magnetic moments of the nanoparticles change direction, aligning themselves in the direction of the field. When the magnetic field is later removed or has its direction changed, the magnetic moments return to their original positions or follow the change, thus promoting local heating through the Néel and Brownian relaxation mechanisms (ZUVIN et al., 2019). Based on this model, heat is generated by energy losses from Néel and Brownian relaxation processes. Néel relaxation comprises the reversal of the magnetic dipole, while Brownian relaxation results from the physical rotation of the nanoparticles themselves. Thus, the first is characterized by the time taken to return to magnetic equilibrium after the field disturbance leaves, while the

Brownian relaxation is characterized by the viscosity of the physical rotation of the nanoparticles (LAURENT et al., 2011; YU et al., 2021b).

To get an idea about the advances concerned to the application of this technology in medicinal therapies, the first clinical trial involving magnetic hyperthermia was carried out in patients with prostate carcinoma by the acclaimed Charité Hospital (Berlin, Germany) together with the company MagForce® in 2006, in which the maximum intraprostatic temperature, under a field strength of 4 to 5 kA.m<sup>-1</sup>, was 48.5 °C. In 2013, MagForce® received approval from the European Medicines Agency (EMA) and also from the German Federal Institute for Pharmaceuticals and Medical Devices (BfArM) to start using the NanoTherm® formulation (magnetic ferrofluid formulation based on SPIONs) for the treatment of glioblastoma. More recently, in 2018, MagForce® received FDA approval to initiate a clinical trial with NanoTherm® for prostate cancer in the United States (ETEMADI; PLIEGER, 2020).

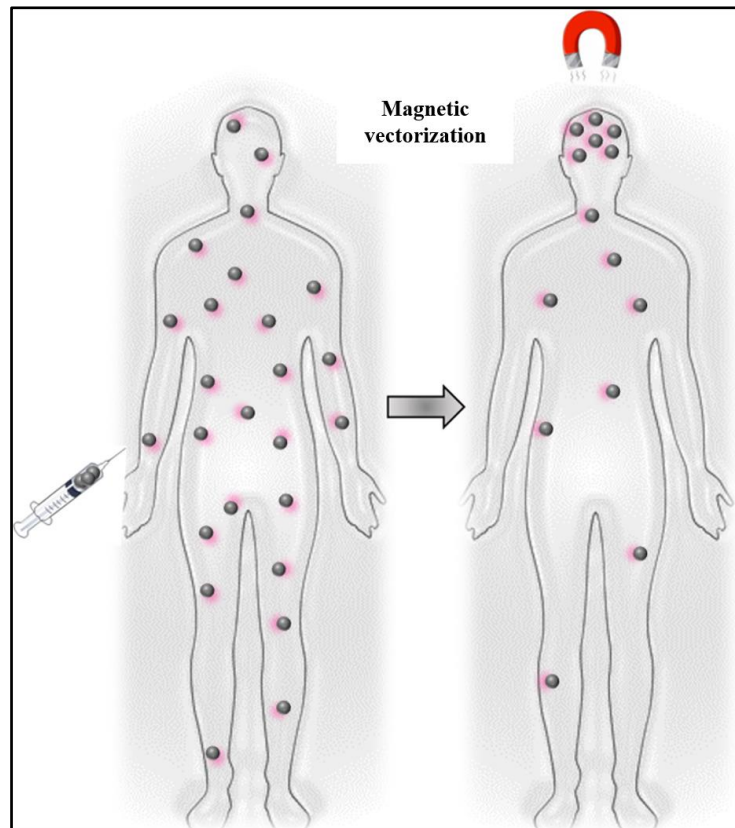
Currently, magnetic hyperthermia has been used in the treatment of numerous cases of cancer, such as prostate, uterus, lung and neck (FARZIN et al., 2020).

### **3.5 Magnetophoresis**

Magnetophoresis refers to the movement of particles in a fluid medium, in a specific direction, originated by the action of a magnetic field. The magnetic susceptibility of the particles, as well as, the surrounding medium, are important parameters that affect magnetophoresis, in which one of the great advantages is the lack of direct physical contact between the particles and the source that generates the magnetic field. Thus, magnets can generate magnetic fields capable to penetrate through a variety of materials, including organic tissues, to promote an indirect manipulation of particles (SU et al., 2021).

Magnetic drug targeting is a promising technology for improving cancer therapies by targeting and accumulating SPIONs loaded with drugs to a target tissue by the application of a magnetic field capable of to generate an attractive force. Thus, as illustrated in Figure 7, the magnetic field, potentially, represents a strategy to exert an attractive force on SPIONs, concentrating them at the target location where drugs could be released. (LINDEMANN et al., 2021).

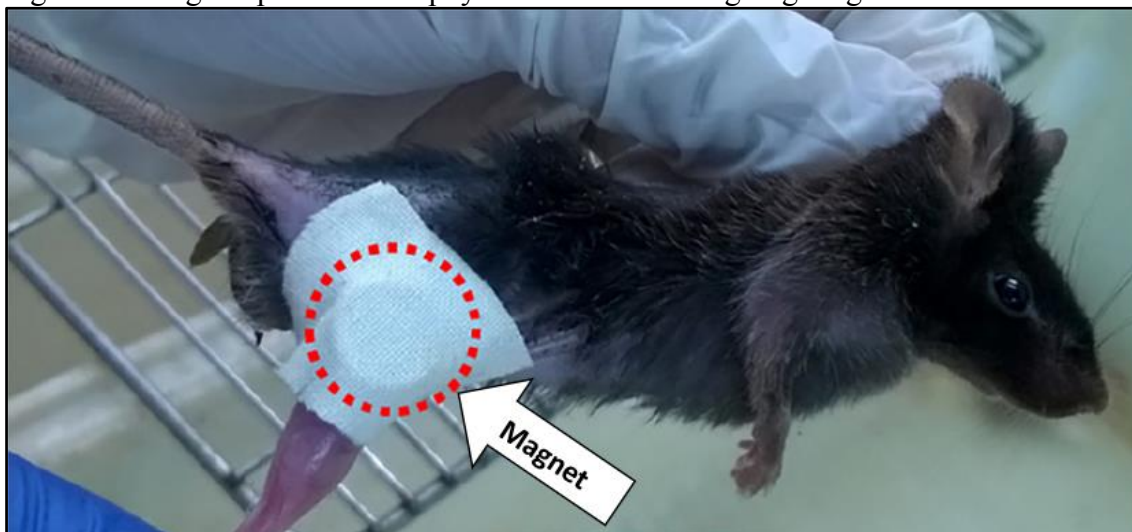
Figure 7 – Representation: magnetic targeting of drug carriers through the application of a magnetic field



Source: developed by the author.

However, it is important to emphasize that the delivery of drugs to a target tissue often involves the transposition of biological barriers, where the degree of impediment against the flow of drug movement, as well as, the approaches to overcome it, depend on the tissue, the drug, and many other factors involved in the complex metabolic environments. In this context, magnetophoresis has been evaluated as a potential option for the magnetic vectorization of drugs in order to increase the power of transposition of these molecules against biological barriers (YANG et al., 2017). In this sense, *in vivo* studies have shown higher concentrations of DOX in mice tumors that had the loading of this drug induced by the application of a magnetic field (Figure 8), leading to growth interruption and more pronounced tumor reduction, compared to the control group that had passive loading (NIGAM; BAHADUR, 2018).

Figure 8 – Magnetophoresis as a physical method of drug targeting

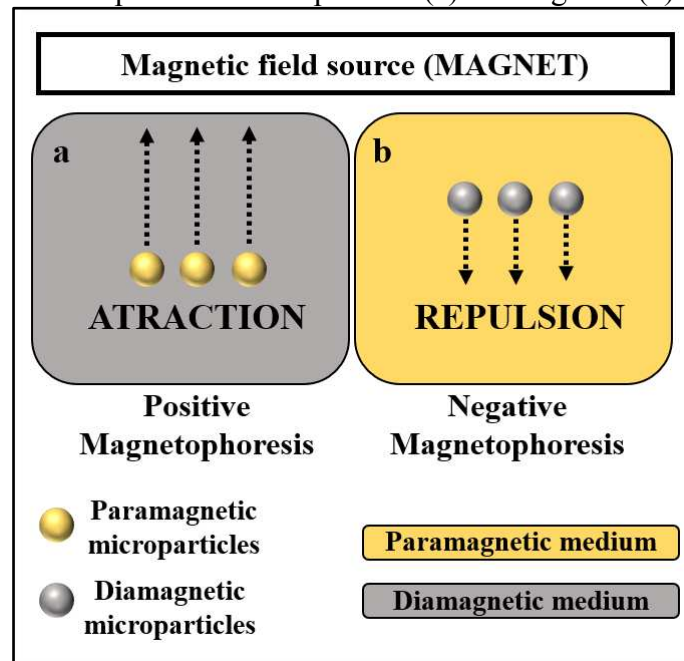


Source: from (NIGAM; BAHADUR, 2018).

In magnetophoresis, the mobility of microparticles, in relation to the surrounding medium, can occur by two ways, in two opposite directions. The first one is positive magnetophoresis, which promotes a movement of attraction of the microparticles by the magnetic field generating source (previously illustrated by Figures 7 and 8). Positive magnetophoresis involves magnetic microparticles (paramagnetic or SPIONs) suspended in a surrounding diamagnetic fluid (ie, a non-magnetic fluid) (Figure 9a). The second possibility is the so-called negative magnetophoresis, which, on the contrary, generates a repulsive movement of the microparticles, involving diamagnetic microparticles suspended in a surrounding paramagnetic medium (Figure 9b) (ALNAIMAT et al., 2018).

Thus, in the case of systemic applications, in which the nanocarrier is already dispersed in the bloodstream, for example, positive magnetophoresis would represent a possibility of attracting the nanocarriers to the site of interest, by applying an external magnetic field (illustrated earlier in Figure 8). Differently, considering topical applications cases, in which the nanocarrier is found on the surface of the skin, for example, negative magnetophoresis would represent a possibility of to push the nanocarriers in the skin penetration flux.

Figure 9 – Schematic representation of positive (a) and negative (b) magnetophoresis



Source: developed by the author.

Once force is a vectorial amount, the physical meaning of its sign (positive or negative) is related to the direction of application of that force. Thus, the force produced by magnetophoresis can be positive or negative depending on the relationship between the susceptibility of the particle and the surrounding medium, according to Equation 1, where the force of magnetophoresis will be positive when  $X_p$  is greater than  $X_f$ , in which case the particle will be attracted to the maxima of the magnetic field. Otherwise, if  $X_p$  is less than  $X_f$ , there is a situation of negative magnetophoresis (ALNAIMAT et al., 2018).

$$F_m = \frac{V_p (X_p - X_f)}{\mu_0} (B \cdot \nabla) B \quad (\text{Eq. 01})$$

Where  $F_m$  is the magnetic force,  $V_p$  is the volume of the particle,  $X_p$  and  $X_f$  are the magnetic susceptibilities of the particle and the surrounding fluid, respectively,  $B$  and  $\nabla B$  are the magnetic flux density and its gradient and  $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7}$  Tesla.meter/Ampere.

### 3.6 Oncocalyxone A (Onco-A)

The use of plants in traditional medicine dates back to antiquity and, even today, constitutes an important source of new drugs and metabolites for pharmacological and biotechnological applications (MENEZES et al., 2020). In this sense, the Nobel Prize in Medicine and Physiology in 2015 was awarded to William C. Campbell and Satoshi

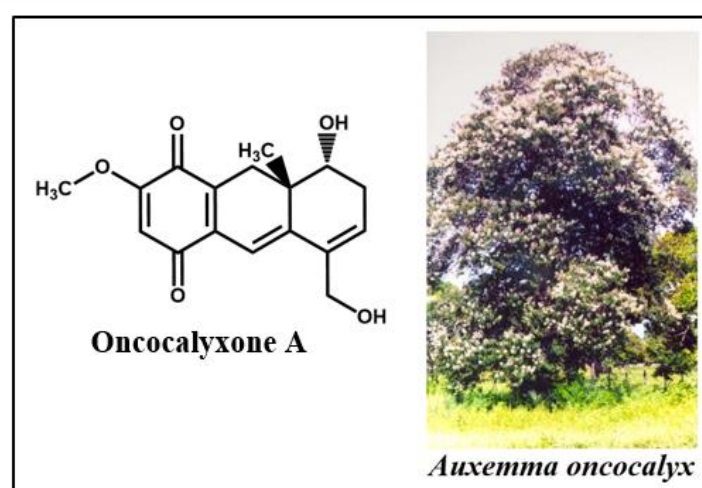


Omura, for the discovery of natural microbial products (Ivermectin) that radically reduced the incidence of onchocerciasis (river blindness) and lymphatic filariasis (elephantiasis) and also to Youyou Tu, for the discovery of the natural plant product artemisinin, a drug that significantly reduced mortality rates in patients with malaria (SHEN, 2015).

*Auxemma Oncocalyx* is a species of arboreal plant, belonging to the Boraginaceae family, endemic to the Caatinga, in the northeastern of Brazil, where it is commonly known as "white stick". The shell of its stem is astringent and popularly used in the treatment of wounds (FERREIRA et al., 2004).

Onco-A is a quinone obtained from *Auxemma Oncocalyx* (Figure 10), had been selected as the hydrophilic bioactive for the development of this work due to its various pharmacological properties, such as antiplatelet, leishmanicidal, antimicrobial, analgesic, anti-inflammatory, hypoglycemic and antioxidant (TAVARES et al., 2019; XAVIER-JÚNIOR et al., 2019). Furthermore, onco-A exhibits anticancer activity against several human tumor cell lines (sarcoma 180, leukemia HL-60, leukemia L1210, lung SW1573 and skin CCD922) (PESSOA et al., 2000; XAVIER-JÚNIOR et al., 2019). Thus, the present work intends to emphasize applicability for this natural bioactive from the Brazilian northeastern flora, since it presents such pharmacological activities.

Figure 10 - Molecular structure for the quinone oncocalyxone A, extracted from the species *Auxemma Oncocalyx*



Source: from (CARVALHO, 2008).

## 4 OBJECTIVES

### 4.1 General goal

To synthesize and to characterize a new magnetic nanocomposite based on hydroxyethyl starch and magnetite, by inverse miniemulsion technique, for applications in sustained release of oncocalyxone A, as well as, for applications in magnetic targeting by magnetophoresis.

### 4.2 Specific goals

To synthesize magnetite nanoparticles by chemical coprecipitation with modification of its surface by citrate ions ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$ ) to acquire hydrophilic stability in the form of magnetic aqueous ferrofluid;

To characterize the hydroxyethyl starch used as a polymeric matrix in terms of chain size and degree of substitution;

To examine the particle size, distribution profile, colloidal stability and morphology of nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$ ) and magnetic nanocomposites, as well as, the magnetic profile of their respective hysteresis;

To follow the occurrence of the chemical reaction of interfacial polymerization and formation of the starch-based polymeric nanocapsules;

To evaluate the encapsulation efficiency of oncocalyxone A, as well as, its release profile of from the magnetic nanocomposite;

To perform *in vitro* cytotoxicity tests for the synthesized nanocomposites against different cancer cell lines;

To evaluate the *in vivo* toxicity (biocompatibility) of the synthesized nanocomposites loaded with oncocalyxone A;

To verify the effect of applying a magnetic field in directing compounds to penetrate the stratum corneum of the skin, when carried by magnetic formulations;

To follow the effect of applying a magnetic field on the penetration profile of fluorescein into the skin, considering its biodistribution for skin units with the presence and absence of pilosebaceous units;


To evaluate the effect of negative magnetophoresis on the skin penetration of adapalene, considering its biodistribution for skin units with the presence and absence of pilosebaceous units.

## CHAPTER II

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A MAGNETIC  
NANOCOMPOSITE BASED ON HYDROXYETHYL STARCH FOR  
BIOLOGICAL APPLICATIONS IN THE MAGNETIC TARGETING AND  
PROLONGED RELEASE OF ONCOCALYXONE A**

Carbohydrate Polymers 264 (2021) 118017

---




ELSEVIER


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

**Carbohydrate Polymers**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/carbpol](http://www.elsevier.com/locate/carbpol)



---



**Starch-based magnetic nanocomposite for targeted delivery of hydrophilic bioactives as anticancer strategy**

Alexandre C.C. Sousa<sup>a,b</sup>, Adolfo I.B. Romo<sup>c</sup>, Raimundo R. Almeida<sup>a</sup>, Aiêrta C.C. Silva<sup>a</sup>, Lillian M.U. Fechine<sup>a</sup>, Débora H.A. Brito<sup>a</sup>, Rafael M. Freire<sup>d,e</sup>, Daniel P. Pinheiro<sup>f</sup>, Larissa M. R. Silva<sup>g</sup>, Otlía D.L. Pessoa<sup>c</sup>, Juliano C. Denardin<sup>d</sup>, Claudia Pessoa<sup>f</sup>, Nágila M.P.S. Ricardo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Polymers and Materials Innovation, Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza – CE, Zip Code 60440-900, Brazil

<sup>b</sup> Federal Institute of Education, Science and Technology of Ceará, Quixadá – CE, Zip Code 63902-580, Brazil

<sup>c</sup> Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza – CE, Zip Code 60440-900, Brazil

<sup>d</sup> University of Santiago of Chile (USACH), Physics Department and CEDDENA, Santiago, Zip Code 9170-124, Chile

<sup>e</sup> Institute of Applied Chemical Sciences, Universidad Autónoma de Chile, Zip Code 8910-060, Chile

<sup>f</sup> Laboratory of Experimental Oncology, Center for Research and Drug Development, Federal University of Ceará, Fortaleza – CE, Zip Code 60430-275, Brazil

<sup>g</sup> Department of Food Engineering, Federal University of Ceará, Fortaleza – CE, Zip Code 60356-000, Brazil

## 1 INTRODUCTION

Recent nanotechnological advances have encouraged the development of magnetic nanocomposites with extremely promising and innovative biomedical applications, such as the carrying and tracking of interfering RNA in vaccines against breast cancer (WU et al., 2021).

In addition, as discussed in the previous chapter, increasing efforts have been seeking the feasibility of magnetic nanocomposites that promote synergism, acting simultaneously in chemotherapy, photodynamic therapy and photothermal therapy (CHENG et al., 2021), improving therapeutic results.

Thus, in an evident global context of growing demand for new nanotechnological materials, the focus of this work is on the development of a magnetic nanocapsule based on hydroxyethyl starch with potential for magnetic targeting of hydrophilic compounds, generating prospects for higher concentration of drugs in a target tissue, through magnetic vectorization and, simultaneously, enabling therapeutic action by prolonged release and magnetic hyperthermia. Oncocalyxone A was the hydrophilic bioactive selected for the development of this work.

## 2 METHODOLOGY

### 2.1 Materials

Hydroxyethyl starch (HES) [ $\geq 99\%$ , molecular weight (MW) = 260 kDa, degree of substitution (DS) = 0.15], iron (II) chloride tetrahydrate ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99.0\%$ ), chloride iron (III) hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99.0\%$ ), sodium citrate dihydrate [ $\text{HO}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99.0\%$ ], tolylene-2,4-diisocyanate (TDI,  $\geq 95.0\%$ ), sodium dodecyl sulfate (SDS, 99%), phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), sodium nitrate ( $\text{NaNO}_3$ , 99%), potassium bromide (KBr, 99%), deuterium oxide (99.9%  $\text{D}_2\text{O}$ ) were purchased from Sigma-Aldrich® and used as received. Ammonium hydroxide ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , 30%) and cyclohexane (99%) were purchased from Synth® and used as received. Polyglycerol polyricinoleate (PGPR Grindsted®) was donated by DuPont Danisco®. Distilled and ultrapure water (Milli-Q Advantage A-10 system, Millipore®) was used in this work. The bioactive oncocalyxone A was extracted and isolated as a dark red powder from the ethanol extract of the stem of *A. Oncocalyx*, as previously described (FERREIRA et al., 2008), and kindly provided by Professor Dr. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, who is coordinator of the Laboratory of Phytochemical Analysis of Medicinal Plants II (LAFIPLAM II) at Federal University of Ceará.

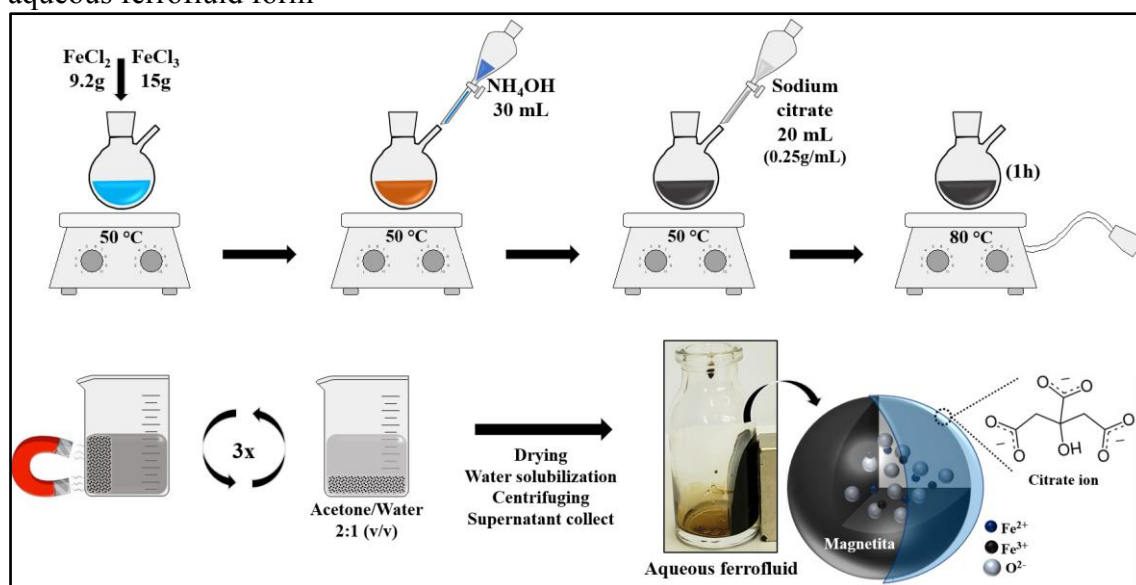
### 2.2 Synthesis of magnetite nanoparticles with surface modified by citrate ions ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$ )

Magnetite nanoparticles functionalized with citrate ions ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$ ) were obtained by the chemical coprecipitation method, adapted from previously adopted methodologies (DE ALMEIDA et al., 2017; DUSZYŃSKA et al., 2020), as shown in Figure 11.

Thus, under constant stirring, 9.2 g of iron (II) chloride tetrahydrate and 15 g of iron (III) chloride hexahydrate were dissolved in 250 ml of deionized water at a temperature of 50 °C for 10 min. Subsequently, 30 mL of  $\text{NH}_4\text{OH}$  (12 mol/L) were added, forming a dark precipitate ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Then, 20 mL of aqueous solution containing 5 g of sodium citrate were added. This mixture was heated at 80 °C for 1 h. With the aid of a magnet, a magnetic separation of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$  was carried out, followed by removal of the supernatant and redispersion of the solid in acetone/water solution (2:1 v/v). This procedure was repeated three times to eliminate excess sodium citrate and ammonia.

Finally, the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$  nanoparticles were subjected to drying in a desiccator and subsequently redispersed in the smallest possible volume of deionized water. This final solution was centrifuged to remove any precipitated nanoparticles, and the supernatant was stored in the form of ferrofluid (Figure 11) at room temperature. Magnetite nanoparticles were analyzed for their colloidal stability, morphology, size distribution, crystalline structure and magnetic properties.

Figure 11 - Scheme for the synthesis steps of magnetic nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$ ) in aqueous ferrofluid form



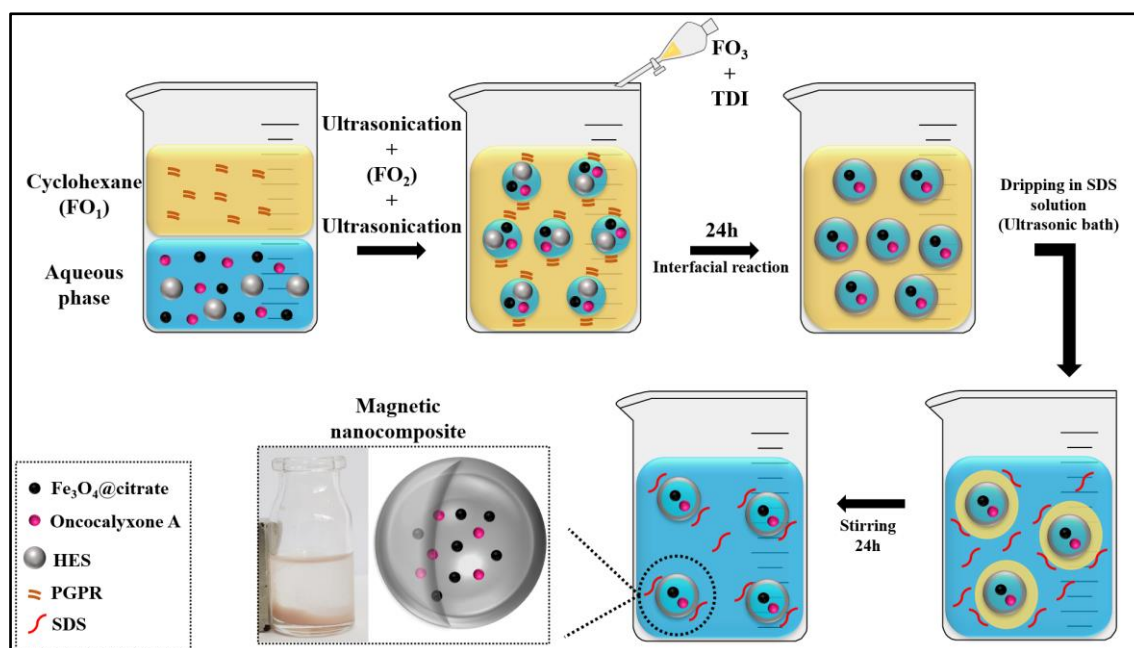
Source: developed by the author.

### 2.3 Synthesis of magnetic nanocapsules based on hydroxyethyl starch (HES) loaded with oncoalyxone A

HES nanocapsules were synthesized through inverse miniemulsion system (water in oil), with adaptations made from previous methodologies (KANG et al., 2015), as shown in Figure 12. Thus, the organic phase (FO) was prepared by dissolving 50 mg of PGPR (hydrophobic surfactant) in 14.5 g of cyclohexane. The organic phase was homogenized by ultrasonic bath for 5 min and separated into three different portions (FO1 = 7.5 g; FO2 = 5.0 g and FO3 = 2 g). The aqueous phase was prepared by dissolving, in 4 mL of deionized water, 100 mg of HES, 2 mg of oncoalyxone A and 30  $\mu\text{L}$  (2.7 mg) of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$ . The aqueous phase was dripped into FO1 at 500 rpm, followed by emulsification in probe ultrasound at 70% amplitude for 3 min in pulse mode (Branson

Sonifier W-450-Digital with ½” tip). In the emulsion resulted from this process, FO2 was added and the ultrasound procedure was repeated. Then, 50 mg of TDI (crosslinking agent) was added to FO3, and dripped into the final emulsion. This system was then maintained under mechanical agitation at 500 rpm for 24 hours at room temperature. After this period (occurred the interfacial polyaddition reaction), the dispersion of nanocapsules was washed in cyclohexane, centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and discarded the supernatant in order to remove excess of PGPR and TDI. This procedure was repeated 3 times and the final precipitate of nanocapsules was redispersed in 20 mL of cyclohexane. Posteriorly, in a sonication bath (Bandelin Sonorex, type RK 52H), 1 mL of the dispersion of nanocapsules in cyclohexane was dropped into 5 mL of aqueous solution of hydrophilic surfactant SDS (0.1% m/m) under stirring at 500 rpm. This agitation was maintained for 24 hours at room temperature to allow the cyclohexane to evaporate, resulting in an aqueous formulation of the magnetic nanocomposite.

Figure 12 - Scheme for the synthesis steps of the magnetic nanocomposite based on HES and magnetite, loaded with oncocalyxone A



Source: developed by the author.

The magnetic nanocapsules were analyzed concerning their colloidal stability, morphology, size distribution, chemical composition, onco-A release profile, magnetic properties, cytotoxic activity (*in vitro*) and acute toxicity (*in vivo*).

## 2.4 Oncocalyxone A release studies

The onco-A release profile of the nanocapsules was evaluated using vertical Franz diffusion cells, adapted from previous protocols (MARTO *et al.*, 2018). Dialysis membrane (permeation area: 1.75 cm<sup>2</sup>) with defined molecular mass cutoff (12 kDa) was fixed between the recipient and donor compartment. 2 mL of sample was added to the donor compartment. The receptor compartment was prepared with 14 mL of buffered solution (phosphate buffer, pH = 7.4). The release assay was performed, independently, for the nanocapsules and for free onco-A, in the same buffered solution. Samples were taken from the receiving compartment and analyzed by UV-Vis spectroscopy. Release studies were carried out in two independent experiments performed in triplicate. Absorbance was interpolated into a previously constructed calibration curve, respecting the same analysis conditions (Absorbance = 0.02775 [onco-A] - 0.00134; with R<sup>2</sup> = 0.9992). Electronic UV-vis spectra were obtained using a Hewlett-Packard model 8453 Diode-Array spectrophotometer.

## 2.5 Onco-A encapsulation efficiency

The evaluation of the efficiency of encapsulation of bioactives was carried out based on previously published methodologies (DA SILVA *et al.*, 2020; DOS SANTOS *et al.*, 2020). The final nanocapsule formulation was centrifuged at 9000 rpm for 10 min using a 3 kDa pore size ultracentrifugation filter to separate the magnetic nanocapsules from free onco-A in solution. Then, in independent tests performed in triplicate, the non-magnetic aqueous filtrate was analyzed by UV-Vis spectroscopy. Thus, the encapsulation efficiency of onco-A was determined through the difference between the initial total amount of bioactive in the synthesis by the free amount observed after the filtration process in the non-magnetic fraction, as represented by Eq.1:

$$EE(\%) = [(M(\text{total}) - M(\text{free oncoA})]/M(\text{total})] \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Where  $M_{(\text{total})}$  represents the total concentration of onco-A added to the nanocapsule formulation and  $M_{(\text{free onco})}$  represents the onco-A non-encapsulated fraction obtained in the filtered and non-magnetic fraction.



## 2.6 Citotoxicidade *in vitro* (determinação de IC<sub>50</sub>)

The nanocomposite cytotoxic activity was evaluated (*in vitro*) by determining the inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) in 72h against four human tumor cell lines: glioblastoma (SNB-19), colon carcinoma (HCT-116), prostateand (PC3), leukemia (HL-60), provided by the National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA).

All the tumor cell lines were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum, 2 mM of L-glutamine, 100 U.mL<sup>-1</sup> of penicillin and 100 µg.mL<sup>-1</sup> of streptomycin, at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. For MTT assays, cells were plated in 96-well plates (0.1 x 10<sup>6</sup> cells/well for PC3 and SNB-19 strains; 0.3 x 10<sup>6</sup> cells/well for HL-60; and 0.7 x 10<sup>5</sup> cells/well for HCT-116). Oncocalyxone A (free and nanoencapsulated bioactive) was tested in increasing concentrations (highest concentration of 50 µg.mL<sup>-1</sup> for free bioactive or 12 µg.mL<sup>-1</sup> for all systems). The final concentration of dimethylsulfoxide (DMSO) in the culture medium was always maintained below 0.1% v/v.

The cell viability was determined by the MTT assay, in which the yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) is reduced to a blue formazan product by metabolically active cells (MOSMANN, 1983). After incubation (72 h at 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>), the plates were centrifuged and the supernatant was replaced with fresh medium (100 µL) containing 0.5 mgmL<sup>-1</sup> MTT. Three hours later, the plates were centrifuged and the MTT formazan product was dissolved in DMSO (100 µL) and the absorbance was measured using a multiplate reader (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California, EUA) at 525 nm. The absorbances obtained were used to calculate the IC<sub>50</sub> values (concentration capable of inhibiting 50 % of cell growth) of each sample by non-linear regression using GraphPad Prism<sup>®</sup> 8.0 program. All treatments were performed in triplicate in at least four independent experiments.

## 2.7 (*In vivo*) acute toxicity and locomotor activity

All the *in vivo* experimental procedures with zebrafish (*Danio rerio*) were approved by the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Ceará (CEUA n° 5639090320).

Zebrafish (*Danio rerio*), aged from 60 to 90 days of both sexes (short-fin phenotype), with sizes ranging from 3.5 to 1.5 cm and weights from 0.3 to 0.5 g were purchased from “Agroquímica Comércio de Produtos Veterinários LTDA” (a supplier in Fortaleza, Ceará, Brazil). The fishes were acclimatized for 24 h at 25 °C in pH = 7.0 glass aquariums containing dechlorinated water (ProtecPlus<sup>®</sup>) and air pumps with submerged filters, and with circadian cycle of 14:10 h (light/dark). The fishes received *ad libitum* feed 24 h before the experiments. After the experiments, the animals were sacrificed by immersion in ice water (4 °C) for 10 min until loss of opercular movements (SILVA et al., 2020). The acute toxicity study (96 h) was carried out according to the methodologies proposed by (HUANG et al., 2014). The open field test (AHMAD; RICHARDSON, 2013), was performed to evaluate the motor coordination of the animals. After 1 h of the oral treatments, the animals were moved to Petri dishes marked with four quadrants, containing the same water as the aquarium. The locomotor activity was analyzed by counting the number of line crossings (LC) for 5 min, using the LC value of the Naive group as the baseline (100%). The biological results are expressed as the mean  $\pm$  standard error for each group tested. After confirming the normal distribution and homogeneity of the data, the differences between the groups were subjected to analysis of variance (one-way ANOVA), followed by the Tukey test. All analyses were performed using GraphPad Prism v. 8.0. The level of statistical significance was set at 5% ( $P < 0.05$ ).

## 2.8 Characterization procedures

### 2.8.1 X-Ray diffraction

X-Ray diffraction was performed to evaluate the crystalline phases of synthesized magnetite nanoparticles (SPIONs). X-ray patterns of the synthesized nanoparticles were collected using a Bruker D2 Phaser diffractometer, controlled by a Diffract. Measurement software was operated at 30 kV and 10 mA in Bragg-Brentano reflection geometry with  $\text{CoK}\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.7880 \text{ \AA}$ ), using a  $2\theta$  range  $10^\circ$ - $90^\circ$  and a scanning rate of  $2^\circ\text{min}^{-1}$ .

### 2.8.2 Nuclear magnetic resonance (NMR)

The degree of substitution (DS) from HES (Eq.2) was investigated by  $^{13}\text{C}$ -NMR (CHEN et al., 2020; CUENCA; FERRERO; ALBANI, 2020). For the  $^{13}\text{C}$ -NMR experiment, 30 mg of HES was dissolved in 600  $\mu\text{L}$  of  $\text{D}_2\text{O}$  and recorded by a 500 MHz

Avance DPX (Bruker) with a total of 16,000 transients. The final spectrum was processed using the TopSpin 3.6.2 software.

$$DS = X_2 + X_6; X_n = \frac{A(X_{ns})}{A(X_{ns} + X_{nus})} \quad \text{Eq.2}$$

Where  $n$  is the carbon number;  $us$  is the number of the substituted carbon,  $nus$  is the number of the unsubstituted carbon and  $A$  represents the area of each peak.

### 2.8.3 Gel Permeation Chromatography (GPC)

The molecular weight of hydroxyethyl starch (HES) was evaluated by Gel Permeation Chromatography (GPC). The samples were prepared in deionized water, solubilized for 24 hours at a concentration of 0.2% (w/w) and filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore® membrane. The sample injected volume was 20  $\mu\text{L}$ , eluted at 40 °C by a mobile phase of  $\text{NaNO}_3$  0.1M at a flow rate of 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  in an Ultrahydrogel column (7.8 x 300 mm - PolySep-GFC-P Linear) in a SHIMADZU LC-10AD equipment with RID-10A refractive index detector. The average molecular weight (MW) was obtained from the equation  $\log(\text{MW}) = -0,96V_e + 13,49$ ;  $r^2 = 0,9987$ .

### 2.8.4 Infrared vibrational spectroscopy (FTIR)

FTIR spectra were obtained through a Shimadzu IRTracer-100 spectrophotometer, with a sweep range of 400 to 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Samples were dispersed on potassium bromide (KBr) pellets and spectra were captured at room temperature by averaging 64 scans.

### 2.8.5 Transmission electron microscopy (TEM)

All the TEM measurements were performed using a Hitachi HT7700 TEM system in the Microscopy Laboratory of Centro para el Desarrollo de la Nanociencia y la Nanotecnología (CEDENNA), in the Universidad de Santiago de Chile, operating at an accelerating voltage of 120 keV. The samples were deposited on a carbon-coated copper grid sample holder (Formvar Carbon grids of 200 copper grids (F/C mesh 200 Cu)). The histogram for particle size distribution was developed by measuring 200 particles randomly chosen by the ImageJ software.

### **2.8.6 Vibrating sample magnetometry (VSM)**

The magnetic curves were obtained at Magnetism Laboratory of University of Santiago, using a homemade vibrating sample magnetometer at 300 K. The equipment was calibrated using a standard reference material (Yttrium Iron Garnet Sphere) from the National Institute of Standards and Technology (NIST). After calibration, when all the samples are centered in the correct saddle point position, the repeatability was similar to commercial VSMS (better than 2 %), the sensibility is  $1\text{E}^{-5}$  emu, oscillation frequency was 37 Hz and amplitude was 2 mm for such equipment. For all measurements, the magnetic moment obtained for each applied field was normalized by the sample mass.

### **2.8.7 Dynamic Light Scattering (DLS)**

Hydrodynamic particle size distribution, Polydispersity Index (PDI) and Zeta Potential measurements were performed using a Zetasizer Nano ZS, model ZEN 3600, Malvern Instruments, UK, equipped with Dynamic Light Scattering (DLS) technology. DLS measurements were performed at 25°C and at a fixed angle of 90°. All samples were dispersed in SDS solution at  $1\text{mg.mL}^{-1}$  in deionized water.

### **2.8.8 Thermogravimetric Analysis (TGA)**

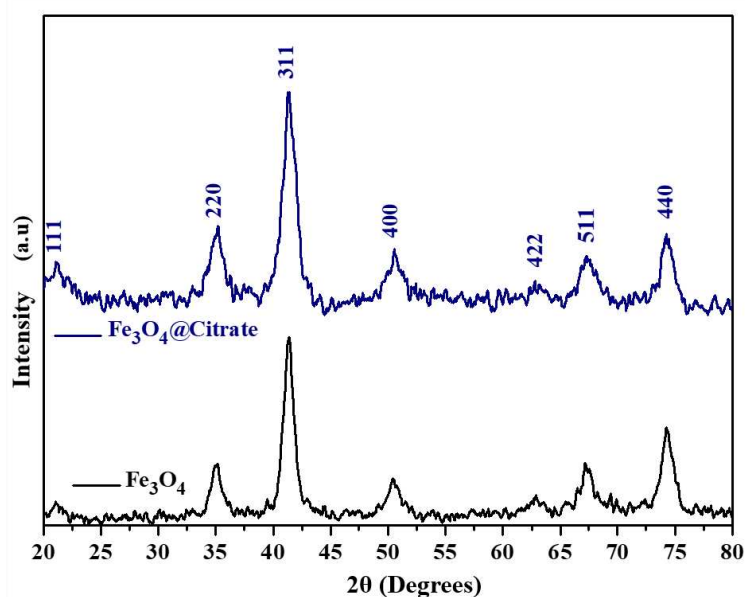
Thermogravimetric analysis (TGA) were conducted by a thermogravimetric/differential thermal analysis equipment model DTG – 60H Shimadzu®, in synthetic air flow ( $40\text{ mL.min}^{-1}$ ) at a constant heating rate of  $10\text{ °C.min}^{-1}$ , up to at a maximum temperature of 800 °C, using an alumina crucible as a sample holder.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Obtaining SPIONs ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrate)

X-ray diffraction evaluations were carried out (Figure 13) in order to obtain a confirmation about the structural identity of the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrate nanoparticles, synthesized by the coprecipitation method. Magnetite nanoparticles were synthesized with and without surface modified by citrate ions, proceeding with the analysis of both for comparison purposes. XRD signals with sharp peaks were displayed, indicating a high crystallinity for the obtained magnetite samples. The peaks were compared with commercial standards, being observed in (111), (220), (311), (400), (422), (511) and (440), which can be attributed to the crystal planes of a cubic structure inverse spinel type (ICSD number 065339) (HRDINA et al., 2010; LI et al., 2017; PAREDES-GARCÍA et al., 2013). It was also observed, as discussed in Figure 13, that the functionalization of citrate ions on the surface of magnetite nanoparticles did not promote changes in the crystalline nature of the compound, indicating the preservation of its original magnetic properties (LATHA et al., 2021; MOSIVAND, 2021). In addition, it is possible to verify that no additional peaks were observed, revealing the absence of secondary phases related to the presence of impurities or relatively common oxidation processes in iron oxide nanoparticles, thus indicating good efficiency of the coprecipitation method used for the synthesis of SPIONs.

Figura 13 - X-ray diffraction patterns for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (in black) and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @citrate (in blue) nanoparticles synthesized by the coprecipitation method



Source: developed by the author.

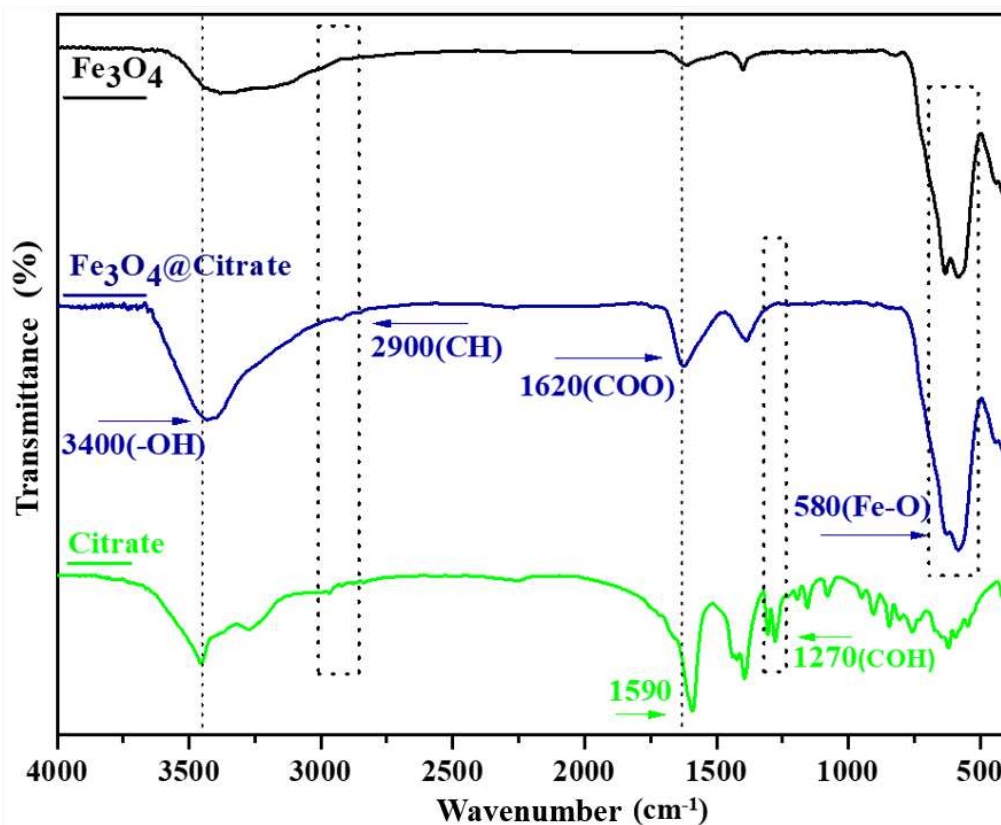
Citrate ion is a widely used ligand to modify the surface of iron oxide nanoparticles, since the COOH and OH groups of citrate make the complex more hydrophilic and stable when Fe-OH bonds are formed in the functionalization of the nanoparticle coating (DUSZYŃSKA et al., 2020).

The FTIR assays (Figure 14) revealed a small band at  $1270\text{ cm}^{-1}$ , associated with the C–OH vibrations of the uncoordinated citrate ion (Figure 14, green line), which disappeared when citrate was coordinated in the iron oxide nanoparticles (Figure 14, blue line) (ZHANG et al., 2019b). As expected for magnetite, stretching vibrations of Fe–O tetrahedral sites were identified at  $580\text{ cm}^{-1}$  (HRDINA et al., 2010; SLAVOV et al., 2010). The citrate OH groups that covered the magnetite nanoparticles (Figure 14, blue line) could be observed around  $3400\text{ cm}^{-1}$  (BARRETO et al., 2013; ZHAO et al., 2019).

Furthermore, citrate ions show an intense band at  $1590\text{ cm}^{-1}$  (Figure 14, green line) that can be attributed to the asymmetric stretching of COO groups, however, when citrate is functionalized on the surface of magnetite nanoparticles, this asymmetric stretching of COO is represented around  $1620\text{ cm}^{-1}$  (Figure 14, blue line), which explains the increase in the relative intensity of this band for  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$  when compared to uncoated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Figure 14, black line) (DUSZYŃSKA et al., 2020).

Finally, for the final coated nanoparticles, the CH stretching vibrations from citrate are seen around  $2900\text{ cm}^{-1}$  (Figure 14, blue line) which, together with the results obtained by X-ray diffraction, suggest that citrate ions successfully functionalized the surface of the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles without structurally affecting these nanoparticles (HUI et al., 2008).

Figure 14 - FTIR spectroscopic measurements for: a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (black line),  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$  (blue line), and sodium citrate (green line)

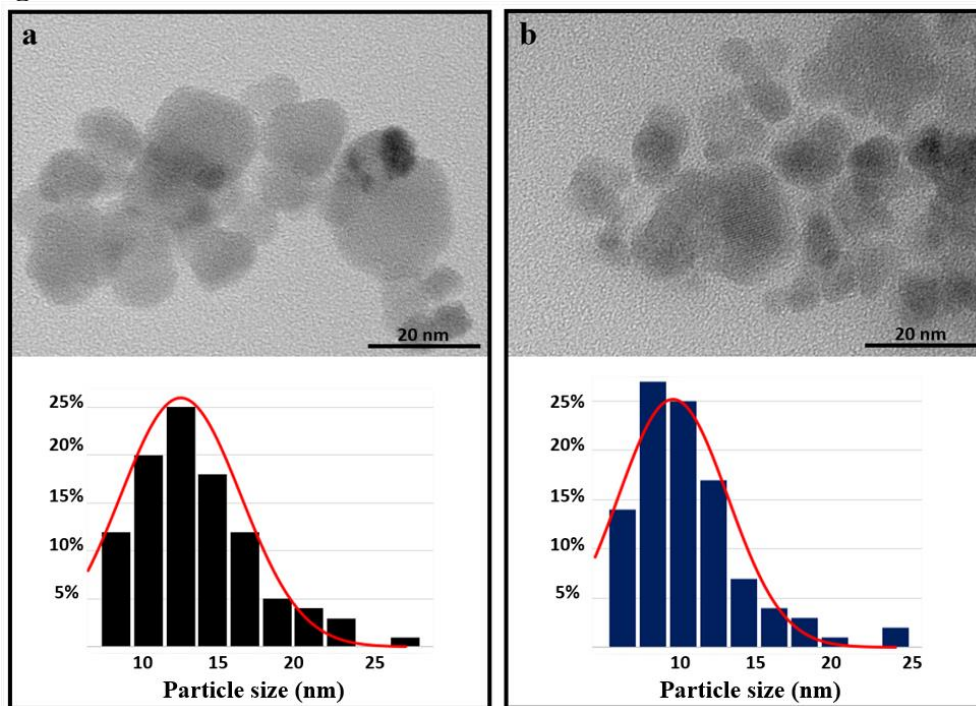


Source: developed by the author.

The evaluation about morphology and particle size distribution was performed through Transmission Electron Microscopy (TEM). The uncoated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles showed an average size of 12 nm, however, with surface modification by coating with citrate ions ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$ ), the average diameter in the nanoparticle size distribution decreased to about 10 nm, as addressed in Figures 15a and 15b, respectively. This decrease suggests that the citrate groups prevent small aggregations of the nanomaterial. In both cases, it was possible to observe a spherical morphological profile and a polydisperse particle size distribution, as also reported by previous studies (BARRETO et al., 2013).

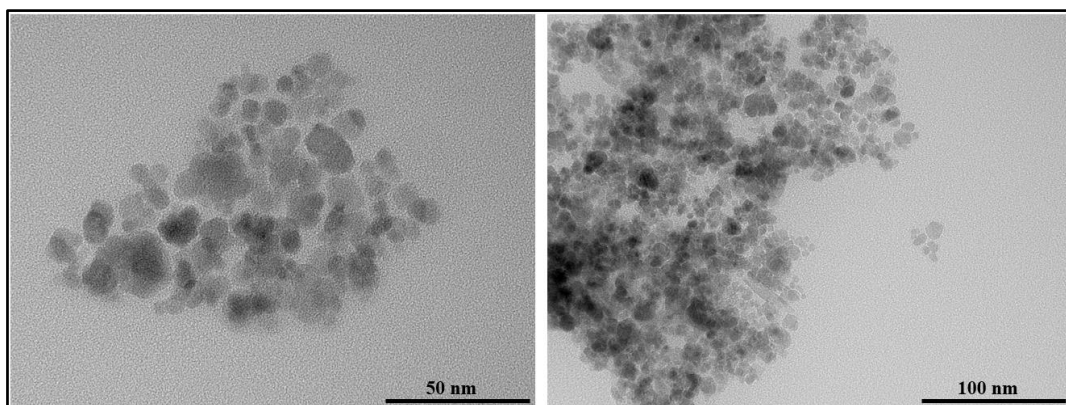
It should also be noted that each particle size distribution histogram was generated by measuring at least 200 randomly chosen particles in different images obtained from the same sample, as shown in Figure 16, using the ImageJ software.

Figure 15 - TEM images (with particle size distribution histograms) for: a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$



Source: developed by the author.

Figure 16 – TEM images for SPIONs coated with citrate ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$ )



Source: developed by the author.

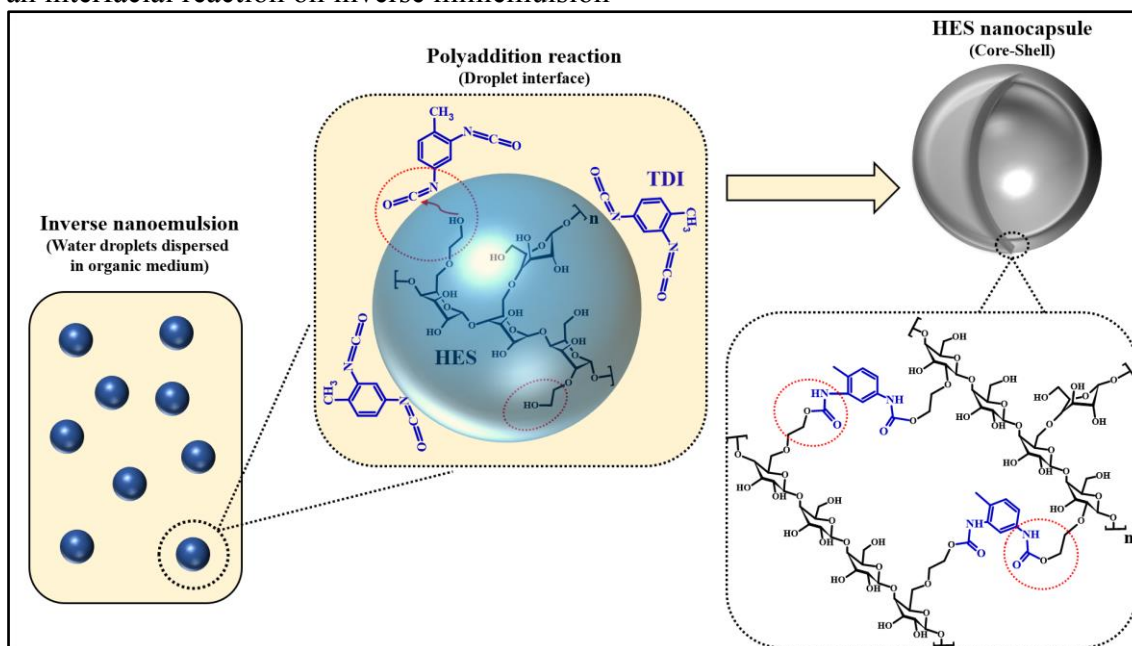


### 3.2 Obtaining the starch-based magnetic nanocomposite

Regarding to the synthesis of the polymeric nanocapsules based on hydroxyethyl starch, it should be noted that, aiming a greater stability in aqueous media, only magnetite nanoparticles functionalized with citrate ions ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$ ) were used in order to incorporate a magnetic character into the nanocomposite.

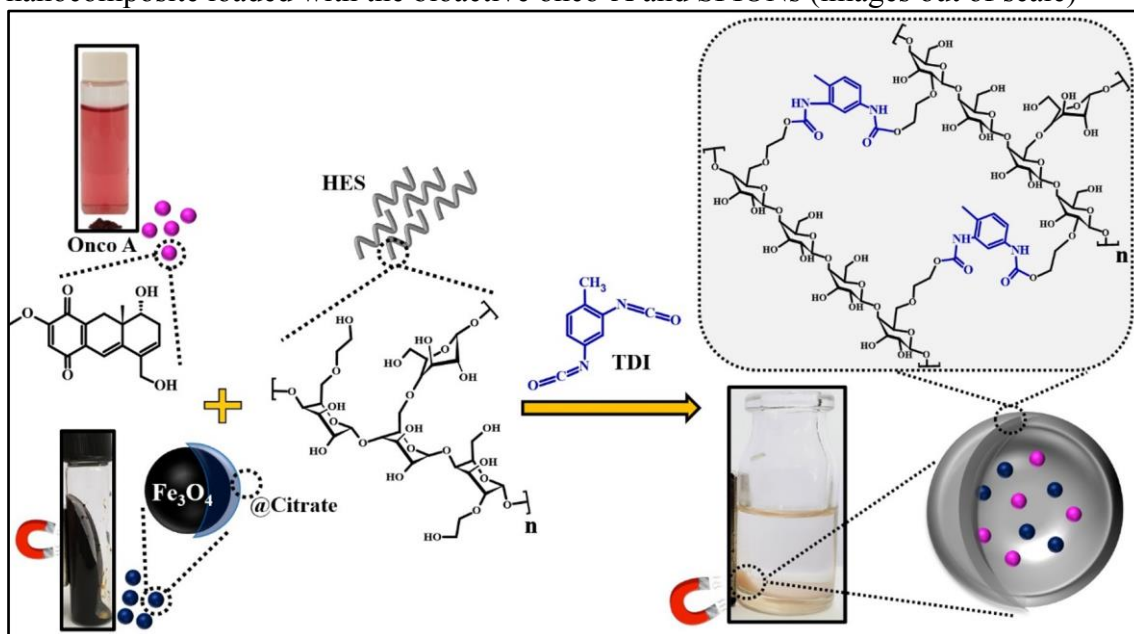
The technique called by synthesis through inverse miniemulsion (water droplets dispersed in organic medium) enables the formation of polymeric nanocapsules with a core-shell structure through a polyaddition reaction at the interface of the droplets (FICHTER et al., 2013; TAHERI et al., 2014; WANG et al., 2021). In this interfacial reaction, the sterically more available OH groups from hydroxyethyl starch (solubilized in the aqueous core of the droplets) react with NCO groups from the cross-linking agent (TDI) previously solubilized in the organic medium in which the drops are dispersed (external face of the droplets). Thus, as illustrated in Figure 17, the miniemulsion droplets act as nanoreactors for the chemical reaction for the polymeric nanocapsules formation, and this way, the synthesis of the magnetic nanocomposite allowed the simultaneous encapsulation of the magnetite nanoparticles and the bioactive onco-A, as represented in Figure 18.

Figure 17 - Representation of the HES polymeric nanocapsule formation process through an interfacial reaction on inverse miniemulsion



Source: developed by the author.

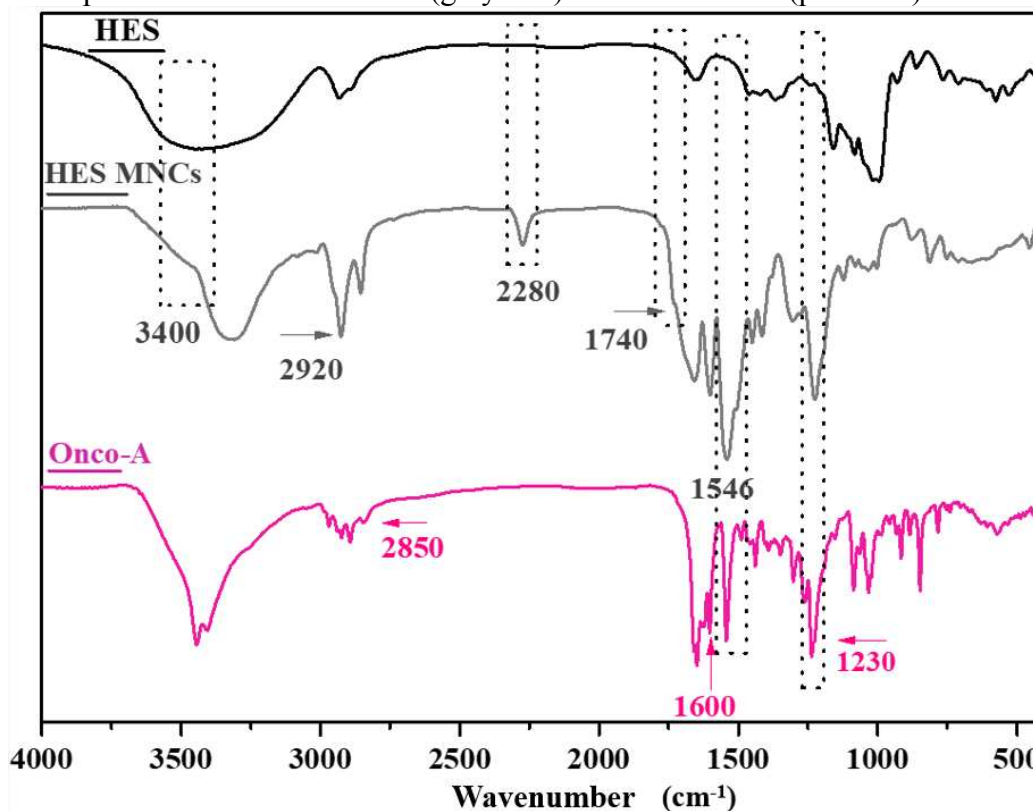
Figure 18 – Illustrative representation of the formation process for the magnetic nanocomposite loaded with the bioactive onco-A and SPIONs (images out of scale)



Source: developed by the author.

This nanocapsule formation process was evaluated by FTIR (Figure 19). The polymeric shell of the nanocapsule was generated by the chemical reaction between the cross-linking agent (TDI) and a portion of the OH groups from the HES. This led to the consumption of part of the OH groups from the HES, which can be observed by the decrease in the relative intensity of the band around  $3400\text{ cm}^{-1}$  (Figure 19, gray line), which is related to the vibrational mode of asymmetric stretching of OH groups (TORLOPOV et al., 2020). Furthermore, the appearance of bands at  $1740\text{ cm}^{-1}$  (C=O stretching of carbonyl groups) and  $1546\text{ cm}^{-1}$  (NH deformation) suggest the formation of urethane bonds, the main constituent group of nanocapsules shell (DOS SANTOS et al., 2020; STEINMACHER et al., 2017; ZHANG et al., 2017), not being observed in HES molecules before the reaction (Figure 19, black line). The intense band at  $2920\text{ cm}^{-1}$  is characteristic of CH ( $\text{sp}^3$ ) stretching (TAHERI et al., 2014; ZHANG et al., 2017). The band at  $2280\text{ cm}^{-1}$  is attributed to the NCO groups from TDI (STEINMACHER et al., 2017; TAHERI et al., 2014), which may suggest some excess of cross-linking agent. Various bands present in free onco-A (Figure 19, pink line), such as CH stretching bands around  $2850\text{ cm}^{-1}$ , C=C and C=O stretching vibrations at  $1600$  and  $1230\text{ cm}^{-1}$ , respectively (HADJ-HAMOU et al., 2014), were also observed in the final magnetic nanocomposite (Figure 19, gray line), suggesting the presence of onco-A in the synthesized magnetic nanocomposite.

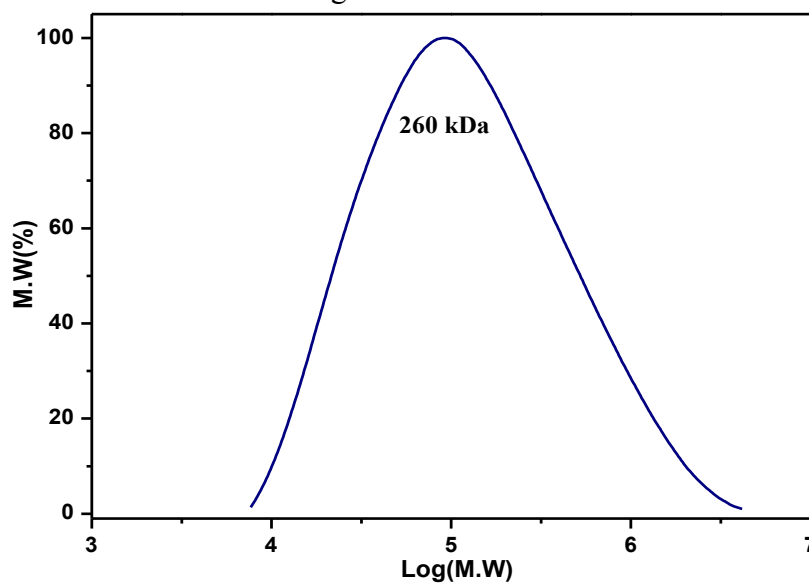
Figure 19 - FTIR spectroscopic measurements for: free HES (black line), HES magnetic nanocomposite loaded with onco-A (grey line) and free onco-A (pink line)



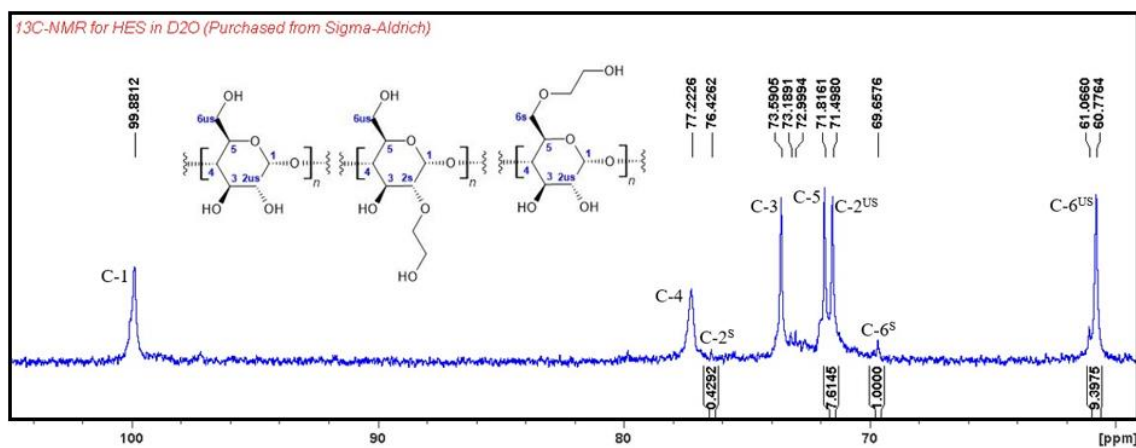
Source: developed by the author.

The molecular weight from HES that was used in the synthesis of nanocapsules was evaluated by GPC, resulting in an average value of 260 kDa (Figure 20) (KILICARISLAN OZKAN; OZGUNAY; AKAT, 2019), while the degree of substitution was determined by  $^{13}\text{C}$ -NMR, resulting in an average of 3 OH groups substituted by hydroxyethyl groups per 20 glucose units (DS = 0.15), according to Figure 21 with the application of Eq.2 (CHEN et al., 2020; CUENCA; FERRERO; ALBANI, 2020). Therefore, based on such results, it was concluded that the structural characteristics of the HES used as polymeric matrix in this work are similar to the same characteristics of HES formulations that are already widely used for medicinal purposes, such as PENTASPAN® (Pentastarch) which is indicated for expansion of plasma volume in hemorrhage cases or another traumas (GOI et al., 2015; RIOUX et al., 2009).

Figure 20 - Gel Permeation Chromatogram for HES



Source: developed by the author.

Figure 21 -  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum for HES in  $\text{D}_2\text{O}$ 

Carbon	$\delta$	$\delta$ reference*
C-1	99.98	99.90
C-2 <sup>S</sup>	76.42	69.75
C-2 <sup>US</sup>	71.49	72.03
C-3	73.49	73.01
C-4	77.22	78.82
C-5	71.81	71.38
C-6 <sup>US</sup>	60.77	60.48
C-6 <sup>S</sup>	69.65	62.70

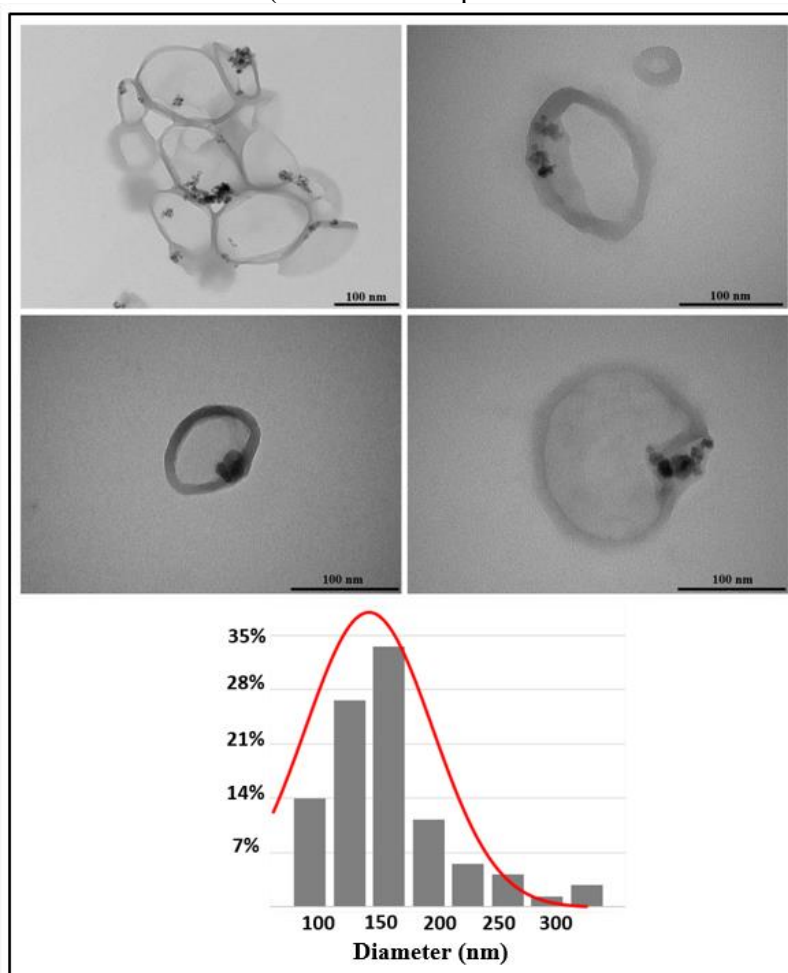
\* CUENCA, FERRERO, ALBANI, 2020.

Source: developed by the author.

For the magnetic nanocapsules, a well-defined core-shell morphology was obtained in which the SPIONs ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ citrate) could be observed inside the core as darker spots, and the nanocapsule as a spherical carrier structure. These structures were observed in different TEM images, showing a mean diameter of 143 nm (Figure 22).

The observed core-shell morphology matches with the nature of the nanocapsule formation process (inverse miniemulsion). In this process, as the polymerization reaction occurs at the interface of nanometric droplets, obtained by ultrasound (KANG et al., 2015; SINGH et al., 2017), the crosslinking agent (TDI) reacts with the hydroxyl groups of the HES, generating the polymeric shell of the nanocapsule in the same shape of the droplets, as previously detailed in Figure 17 (DOS SANTOS et al., 2020; KANG et al., 2015).

Figure 22 - TEM images (with histogram of particle size distribution) of nanocomposites loaded with onco-A and SPIONs (red line corresponds to the Gaussian distribution)

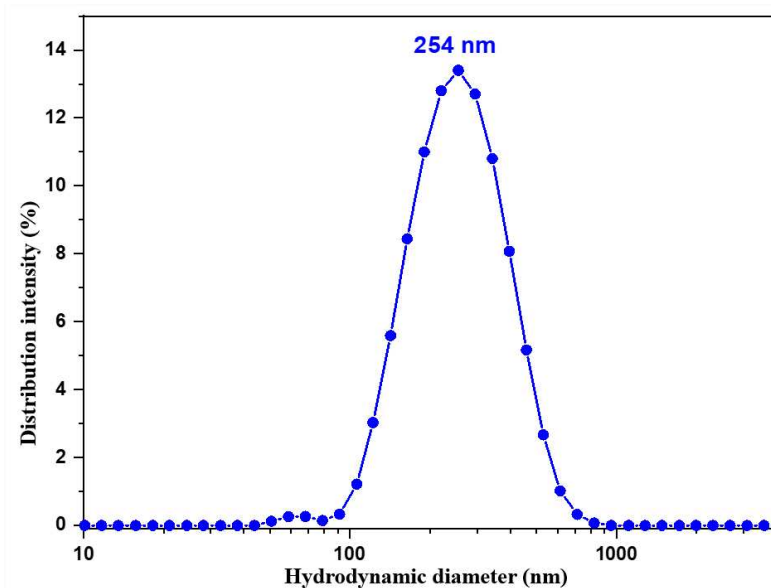


Source: developed by the author.

The nanocapsules were also evaluated in solution by dynamic light scattering (DLS) (Figure 23), showing a mean hydrodynamic diameter of 264 nm. This average

diameter is related to Brownian fluctuations in solution and the hydrodynamic radius (SOARES et al., 2020), therefore, a value higher than that observed by TEM is expected, once for TEM the nanocapsules were measured under complete drying conditions (CHAMORRO RENGIFO et al., 2019; ZHANG et al., 2019c). In solution, the polydispersity index (PDI) and the zeta potential resulted in 0.307 and -37 mV, respectively, suggesting a polydisperse sample with a high surface electric charge, which contributes to minimize the aggregation process of particles in suspension.

Figure 23 - Hydrodynamic diameter distribution by DLS for magnetic nanocomposites loaded with onco-A

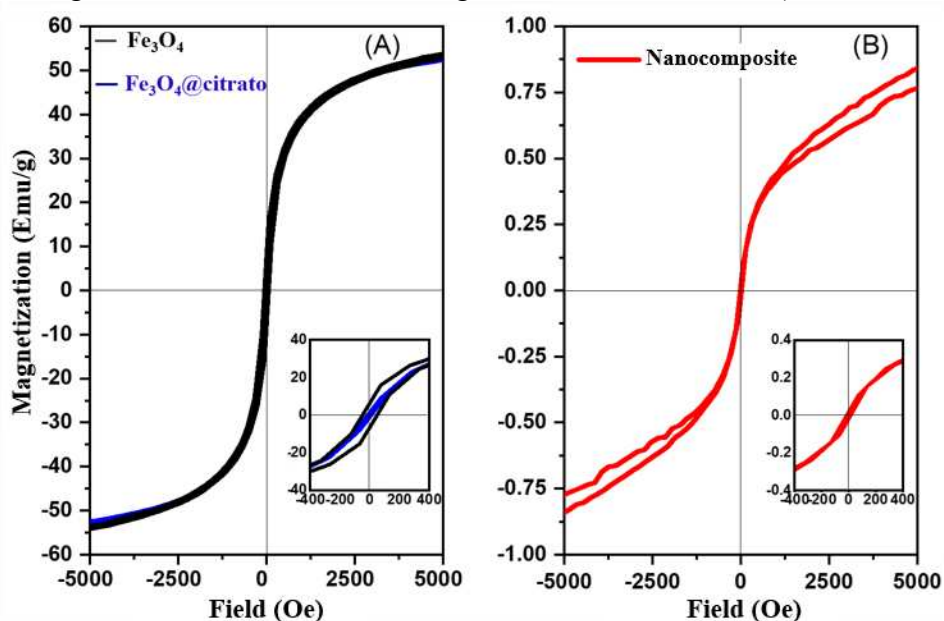


Source: developed by the author.

The magnetic properties observed in nanoparticles are highly influenced by their particle sizes and domain structures. A single domain allows these nanoparticles to exhibit a so-called superparamagnetic behavior (with no remaining magnetization after the action of a magnetic field leaves) (MOGHADAM ZIABARI et al., 2020), as observed in hysteresis loops obtained by VSM measurements at room temperature (Figure 24). The organic surface coated on the magnetite nanoparticles added to them a mass of citrate groups, however, it is possible to assume that this mass is relatively small, since it did not lead to a significant change in the hysteresis of the magnetic nanoparticles (Figure 24a). The saturation magnetization values obtained were 58.98 and 56.21 emu/g for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @citrate, respectively, which corresponds with the range of values (30 to 80 emu/g) reported for synthetic magnetite powders (NOVAL; CARRIAZO, 2019).

In the case of magnetic nanocapsules, a much lower magnetization value was evidenced (Figure 24b) when compared to magnetite samples. This is expected due to the incorporation of non-magnetic organic materials forming the nanocapsule, which reduces the percentage of magnetic mass in the sample, while increasing the total mass (called mass dilution effect). However, despite the lower saturation magnetization obtained for the nanocomposite samples, the nanocapsules still maintained their magnetic character, responding to a magnetic vectorization by the application of an external magnetic field (Figure 25).

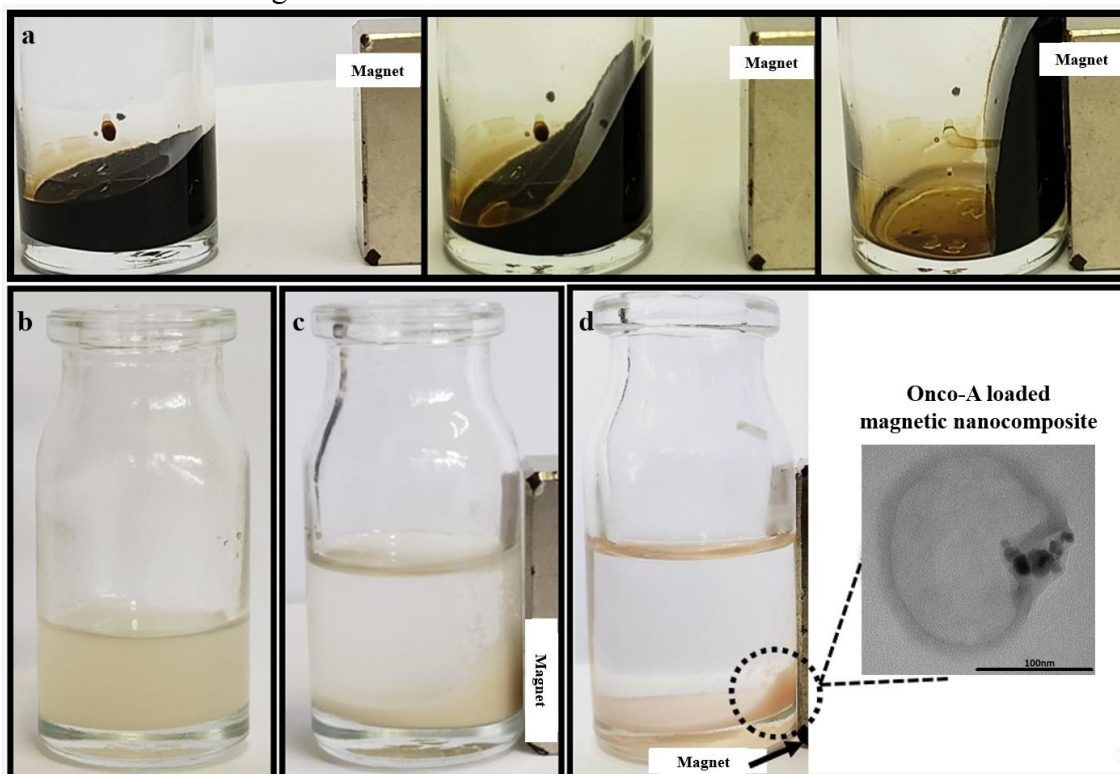
Figure 24 - Magnetic hysteresis at 300 K for: a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (black line) and  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$  (blue line); b) Magnetic nanocomposite loaded with onco-A (red line); (Inserted in the panels: enlarged view for the small field region from -400 to 400 Oe)



Source: developed by the author.

Figure 25 - Macroscopic view of a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{citrate}$  nanoparticles under an external magnetic field; b) magnetic nanocapsules without onco-A; c) magnetic nanocapsules

without onco-A under an external magnetic field; d) magnetic nanocapsules with onco-A under an external magnetic field



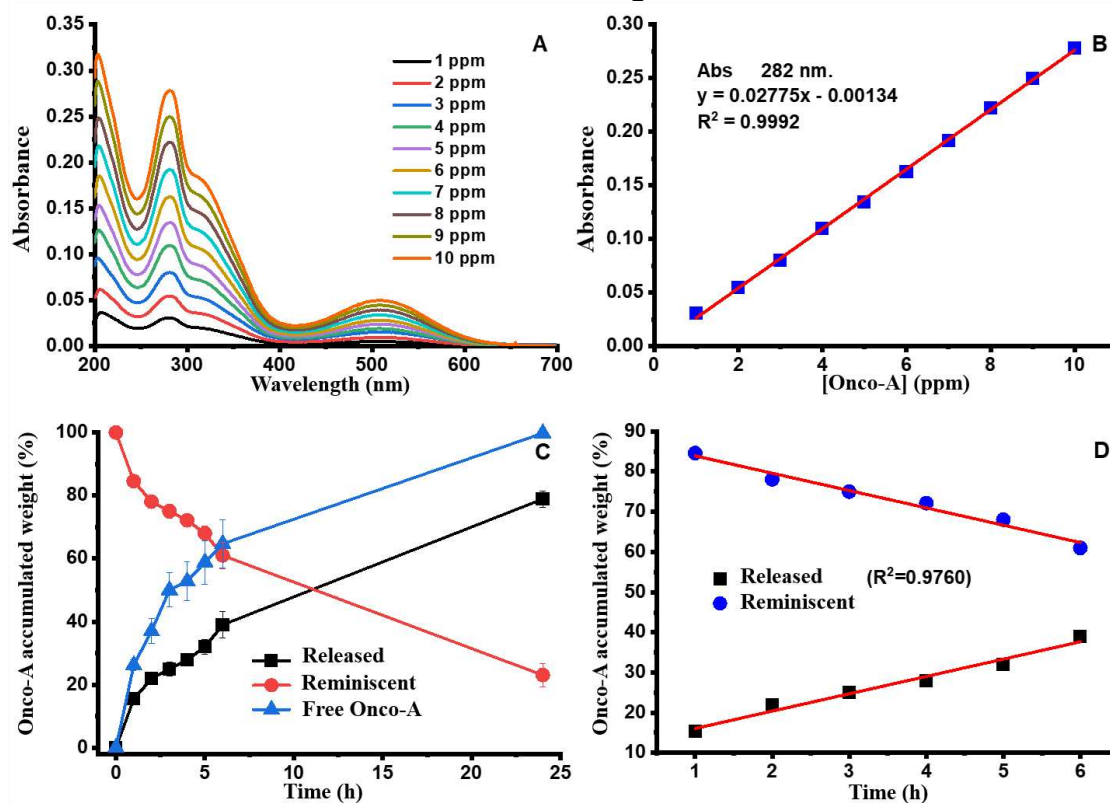
Source: developed by the author.

### 3.3 Release studies

To evaluate the release pattern from the nanocomposite, measurements of absorbance of the electronic spectrum of onco-A were carried out at different known concentrations through absorption scans in the UV-Vis wavelength (Figure 26a). Thus, a calibration curve (Figure 26b) was constructed for quantification of onco-A in solution. According to Eq.1, the encapsulation efficiency of onco-A was  $EE = 92.43\%$ . Therefore, this high EE (%) suggests that the proposed synthetic mechanism of inverse miniemulsion was effective for the co-encapsulation of onco-A and magnetic nanoparticles in a single drug delivery nanoplatform.



Figure 26 – a) Absorption scans for oncocalyxone A at different concentrations in PBS  $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH = 7.4) at 310 K; b) calibration curve for onco-A at 282nm; c) onco-A release profile from nanocapsules, remaining onco-A (not released) and onco-A (free bioactive) in PBS  $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH = 7.4) at 310 K; d) enlarged view for the release profile between 1 and 6 hours for released and remaining onco-A



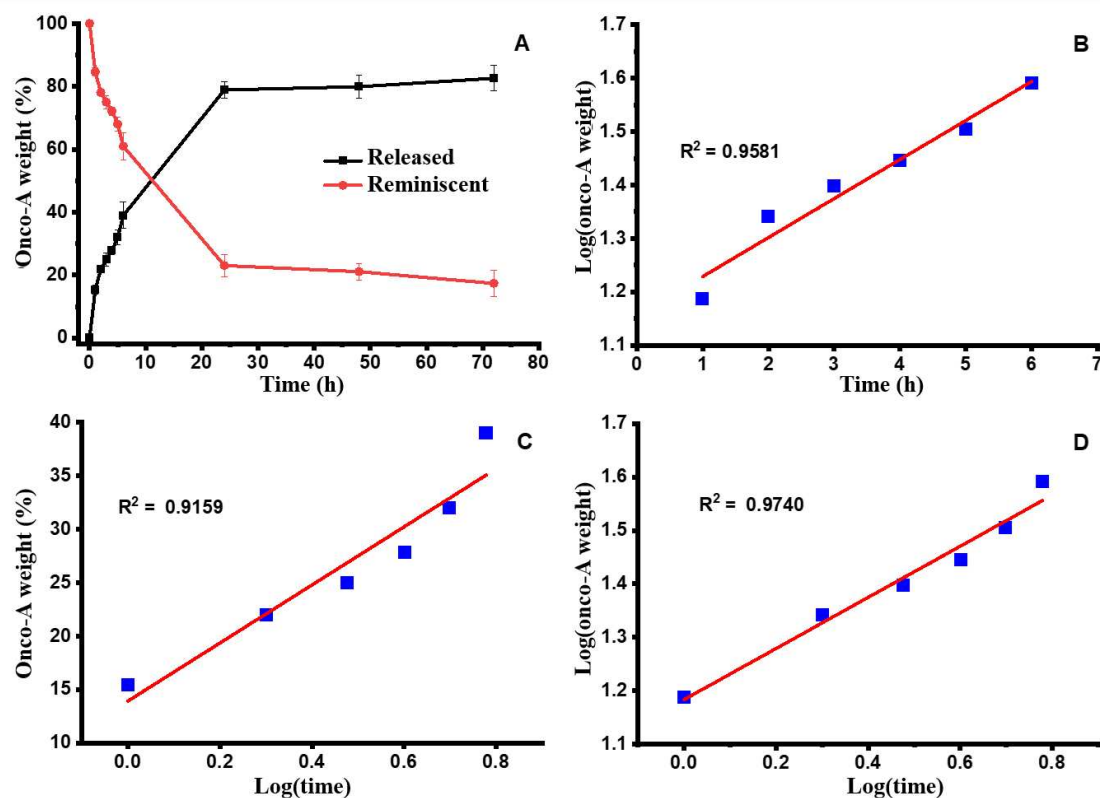
Source: developed by the author.

The onco-A release profile from the nanocomposites was evaluated for 72 hours in PBS medium, using a Franz vertical diffusion cell equipped with a dialysis membrane. Then, the release behavior of the nanocapsules was compared with the behavior of free onco-A (Figure 26c, black and blue lines). Thus, it was found that during the initial 6 hours of the experiment, about 65% of free onco-A was released from the donor compartment to the receptor compartment (Figure 26c, blue line). In the same period, only 40% of the drug was released from the nanocapsules (black line). Additionally, it was concluded that after 24 hours, the release of onco-A from the nanocapsules is minimal, since a stabilization plateau is reached around 80% of the drug released (Figure 27). The polymeric shell of the nanocapsule plays a significant role in the release profile, protecting the incorporated bioactive and prolonging the release process. In this context, very similar behavior has already been reported in other systems of polymeric wall nanocapsules, where approximately 70% of the drug was released from the nanocarriers

within 30 hours after the beginning of the release tests (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

The data collected in all release experiments were adjusted to different kinetic models, obtaining representative values both for a kinetic behavior consistent with the Higuchi model (Figure 26d), as well as the Korsmeyer-Peppas model (Figure 27d), with  $R^2$  equal to 0.9760 and 0.9740, respectively. However, Higuchi's model would find more adequate application for the study of the release profile of solid drugs incorporated into solid matrices (release from a flat surface or spherical tablets of homogeneous matrix), in which the release rate decreases with time (HIGUCHI T., 1963). On the other hand, for HES-based nanocapsules delivery systems (PEREIRA et al., 2020), the release behavior is affected by conformational changes, swelling/disintegration or solubilization of the nanocarriers polymeric chains by hydrolytic cleavage or by the introduction of ionizable groups, which expands the volume, generating greater porosity to drug release (PEREIRA et al., 2020; PRAMANIK et al., 2018), following, this way, Korsmeyer-Peppas as the most suitable kinetic model.

Figure 27 – a) Release profile (black line) and reminiscent (red line) up to 72 h of experiment in PBS 0.1 molL<sup>-1</sup> (pH = 7.4) at 310 K; b) log(onco-A weight) vs time; c) onco-A weight vs log(time); d) log(onco-A weight) vs log(time)



Source: developed by the author.

### 3.4 Biological essays

To evaluate the anticancer potential of the magnetic nanocomposite formulation with oncoalyxone A, *in vitro* cytotoxicity tests were carried out by the MTT reduction method. Thus, the IC<sub>50</sub> values for free and encapsulated oncoalyxone A were determined using the MTT assay against four human tumor cell lines (Table 1). Data are represented in IC<sub>50</sub> values ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and correspond to the mean  $\pm$  Standard Deviation of at least four independent experiments performed in triplicate.

According to the results in Table 1, free onco-A exhibited cytotoxicity for all the tumor cell lines tested, showing greater efficacy against leukemic cell line, i.e., lower IC<sub>50</sub> values for HL-60 cells. It was also observed that the cytotoxic activity was higher for magnetic nanocomposites loaded with onco-A, compared to the free bioactive. Furthermore, the anticancer action was even greater for nanocapsules loaded with onco-A without Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@citrate (system C). Consequently, system C exhibited the highest antitumor activity for all testes, which may suggest that SPIONs incorporated into the nanocapsule seem to decrease the cytotoxicity of nanocomposites (comparing systems B and C). However, although this finding cannot be ruled out, the influence of SPIONs on IC<sub>50</sub> values is not worrying, since system B still has low IC<sub>50</sub> values (in the order of  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and, consequently, a great potential for anticancer applications. Therefore, the main objective performed by SPIONs in the synthesized nanocomposite is to respond to an external magnetic field, generating perspectives of magnetic targeting of encapsulated drugs.

Furthermore, a blank control sample (system D) consisting of the magnetic nanocomposite formulation without onco-A was also evaluated. System D also exhibited cytotoxicity, but with less potency than onco-A-loaded nanocapsules (system C), for all tumor cell lines tested. Thus, the cytotoxicity observed in the D system (without onco-A) can probably be explained by the remaining SDS concentration (0.1% w/w) in the nanocomposite formulation, which may act as a detergent, breaking the cell membrane and leading to cell death (AVILA-CALDERÓN et al., 2020). Although polyurethane (the nanocapsule wall composition) is a biocompatible crosslinker, any residual TDI from the synthesis process also could be contributing to the cytotoxicity of the blank system, (BARMAN et al., 2020).

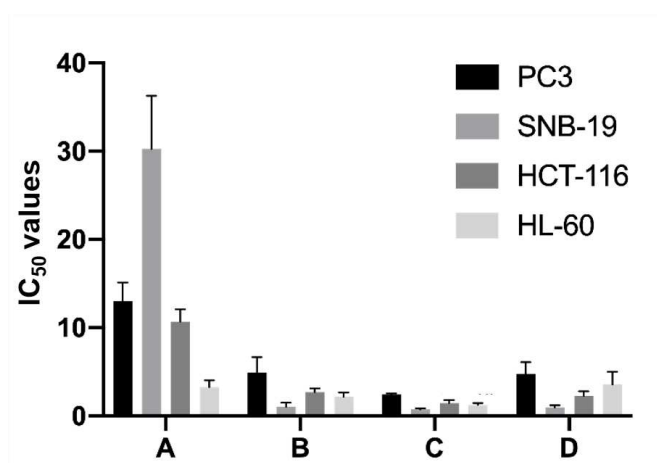
When the acute toxicity of the final formulation was assessed by an *in vivo* toxicity assay (zebrafish model), no deaths were observed for the tested groups (Table 1), even at a much higher concentration ( $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) than those tested for the *in vitro* experiments, emphasizing the biocompatibility and potential of the formulation for future *in vivo* anticancer applications. The data in Table 1 are represented in a comparative way in Figure 28.

Table 1 - Antiproliferative activity of free and encapsulated onco-A against four human tumor cell lines evaluated by MTT assay at 72h. Acute toxicity study (96h) of HES-based magnetic nanocomposite loaded with onco-A in *zebrafish* model

		MTT ( $\text{IC}_{50} \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) – 72 h				Zebrafish mortality ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) – 96 h				
Systems		PC3	SNB-19	HCT-116	HL-60	Control	25	50	75	LC <sub>50</sub>
A	Free onco-A	$12.99 \pm 2.13$	$30.26 \pm 6.03$	$10.68 \pm 1.42$	$3.26 \pm 0.75$					
B	Onco-A loaded magnetic nanocomposite	$4.87 \pm 1.77$	$1.01 \pm 0.48$	$2.68 \pm 0.44$	$2.17 \pm 0.49$	0	0	0	0	>75
C	Onco-A loaded nanocapsules (no SPIONs)	$2.50 \pm 0.431$	$0.71 \pm 0.14$	$1.45 \pm 0.34$	$1.24 \pm 0.21$					
D	Magnetic nanocomposite (no onco-A)	$4.76 \pm 1.33$	$0.95 \pm 0.23$	$2.25 \pm 0.55$	$3.56 \pm 1.44$					

Source: developed by the author.

Figure 28 - Antiproliferative activity of free and encapsulated onco-A against four human tumor cell lines evaluated by the MTT assay (72h)



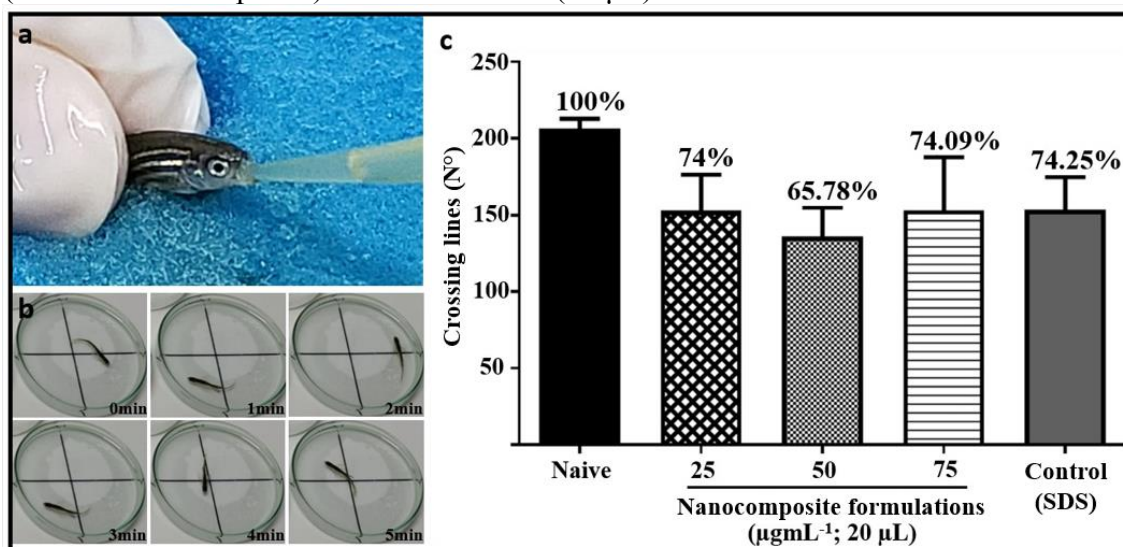
Source: developed by the author.

The *in vivo* toxicity of the aqueous nanocomposite formulation was evaluated for the first time using the zebrafish model. Fish ( $n = 8/\text{group}$ ) were randomly selected and treated orally (Figure 29a) with  $20 \mu\text{L}$  of the nanocomposite formulations (25, 50 or

75  $\mu\text{g}$  onco-A/mL) or 20  $\mu\text{L}$  of the control sample consisting of a SDS-only solution (0.1% w/w formulation vehicle, no nanocomposite). A group of animals without any treatment was included (Naive). After 96 h, the number of dead fish in each group was recorded and the lethal concentration capable of killing 50% of the animals (LC50) was determined. For all tested groups, no deaths were observed (Table 1), suggesting a potential biocompatibility of the developed formulation for future *in vivo* applications.

Locomotor activity is an important indicator for the behavioral analysis of drugs that affect the central nervous system, assessing whether the tested sample can cause locomotor impairment (Lira et al., 2020). The effects of nanocomposites on the locomotor activity of adult zebrafish were evaluated (Figure 29b). The results suggest that, for the control group (absence of nanocomposites), the SDS solution caused a moderate impact on the central nervous system of the animals, promoting a calming action. However, for the nanocomposite formulations, this impact was maintained, with no increase in the calming action being observed by the presence of the nanocomposites at the tested concentrations (25, 50 and 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figure 29c), suggesting that the impact observed on the locomotor activity is due to the surfactant agent, but not directly related to the nanocomposites. Thus, decreasing the concentration of remaining SDS in the final formulation of nanocomposites is desirable in order to minimize the impacts of the formulation on locomotor activity.

Figure 29 - a) Oral treatment representation performed on zebrafish; b) Open field test representation (locomotor activity); c) Effect of the formulations on the locomotor activity of adult zebrafish. Naive: untreated animals. Control: 1mg/mL SDS solution (without nanocomposite) in distilled water (20  $\mu\text{L}$ )



Source: developed by the author.

**CHAPTER III**

**MAGNETOPHORESIS AS A STRATEGY FOR MAGNETIC TARGETING  
OF DRUGS IN TOPICAL APPLICATIONS**

## **1 PRESENTATION**

The results obtained and discussed in the previous chapters, together with the concepts related to the magnetic direction of drugs, encouraged the elaboration of an independent research project, submitted to the Federal Department of Economic Affairs, Education and Research of the Swiss government. This project was then selected and awarded by the “Swiss Government Excellence Scholarships” program, resulting in a research stage in partnership with the Molecular Therapeutics Delivery Group, from the University of Geneva, Switzerland, which is a group with renowned expertise of excellence in the development of new drug delivery strategies in different biological barriers, such as the skin, eye, intestine, and buccal mucosa.

Thus, Chapter III of this work is dedicated to addressing the aspects involved in this research stage, combining the applicability of magnetic nanocarriers with strategies to enhance the bioavailability of drugs in biological barriers, specifically, the stratum corneum.

In an unprecedented way, the present study evaluated the targeted penetration of drugs to the hair follicle, under the influence of the negative magnetophoresis phenomenon.

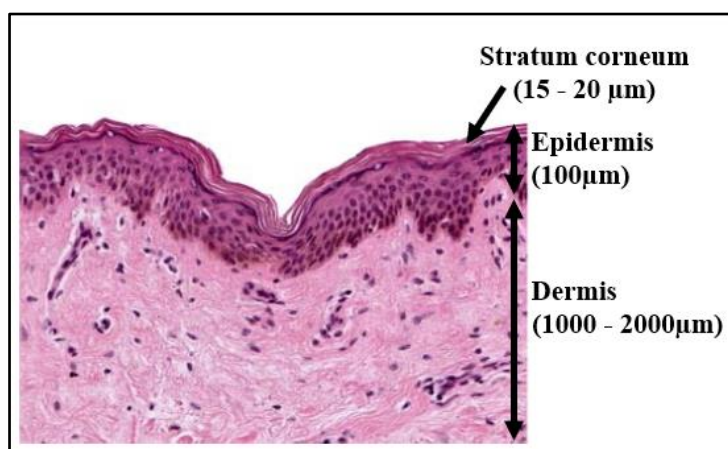
## 2 INTRODUCTION

### 2.1 Transdermal drug penetration

The skin is the largest organ in the body and has as its main functions the regulation of body temperature, reduction of water loss and protecting the body through transport control mechanisms, preventing the entry of exogenous matter (including pathogenic microorganisms), and regulating the output of endogenous molecules. The epidermis provides this protective function through its outermost layer, the stratum corneum (SC), where proteinaceous corneocytes are incorporated into a multilamellar lipid matrix (brick & mortar model), represented by the Figure 30 (SINGHAL et al., 2019).

Skin diseases represent a global public health problem that often generates physiological, psychological, and social impacts. Some of the most common skin conditions include acne, alopecia, atopic dermatitis, facial pigmentation, psoriasis and different types of skin cancer (QU et al., 2022).

Figure 30 – Histological section of human skin



Source: adapted from (SINGHAL et al., 2019).

Topical therapies, in general, have high levels of therapeutic adherence by patients, often being the most recommended and effective modality, compared to oral administration of medications. However, when it comes to transdermal drug delivery, SC constitutes a powerful diffusion barrier in which its molecular architecture and composition ensure that only extremely potent drugs can penetrate the skin at pharmacologically relevant doses (GRATIERI et al., 2013). Combined with this impediment imposed by the stratum corneum, several molecular properties, such as



molecular weight, aqueous solubility, and octanol/water partition coefficient (logP) influence the availability of a molecule for transdermal application. For this reason, the market of transdermal therapeutic patches comprised, until recently, products based on only 18 drugs (PASTORE et al., 2015).

Nanocarrier systems for transdermal drug delivery offer multiple advantages to the encapsulated drug, such as increased solubility, greater physicochemical stability, increased biodistribution, greater skin permeation, targeted accumulation and controlled drug delivery. Thus, nanomaterials can effectively increase the permeation of active molecules through the SC, improving their penetration in the deeper layers of the skin (ZOABI; TOUITOU; MARGULIS, 2021). The most widely explored topical nanocarriers for drug delivery include liposomes, solid lipid nanoparticles, nanoemulsions, microemulsions, nanogels, dendrimers, and micelles (QU et al., 2022).

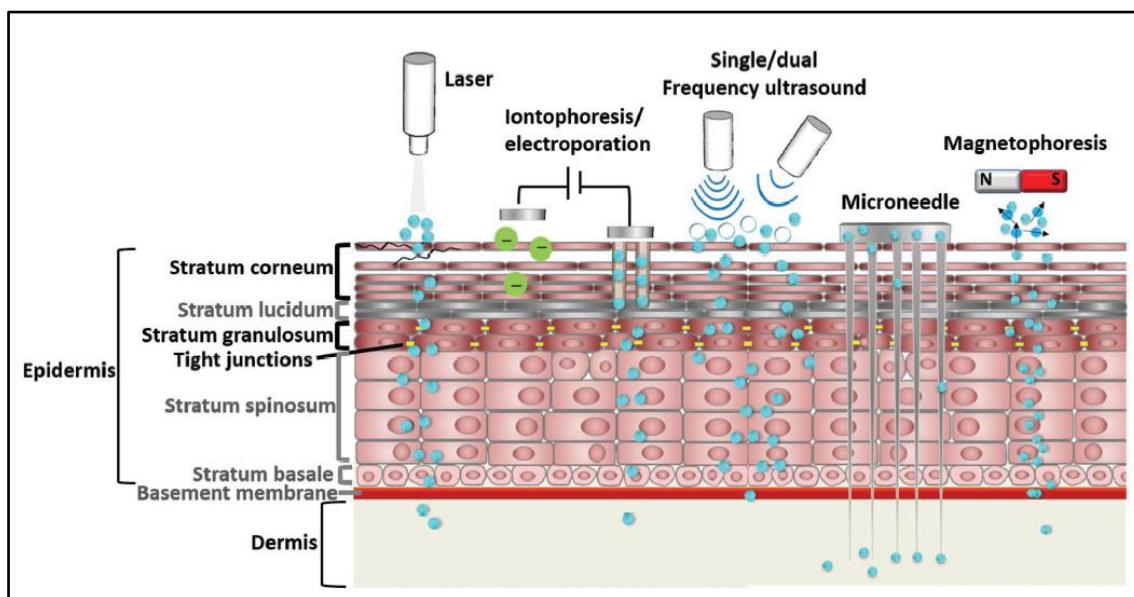
Recently, polymeric micelles have gained prominence as nanocarriers for topical applications on the skin (BANGIA et al., 2019; LAPTEVA et al., 2019; QUARTIER et al., 2021). Especially, nanocarriers based on polymeric micelles can be applied in targeted delivery to the hair follicle to improve the results of topical treatments of some skin diseases with follicular origin, such as alopecia and acne (DAHMANA et al., 2021; KANDEKAR et al., 2018; LAPTEVA et al., 2015). In this sense, the hair follicle, hair shaft, and sebaceous gland, collectively, form the pilosebaceous unit (PSU) (WEINER, 1998).

Besides to the contributions from the use of nanocarrier systems, active methods, such as iontophoresis and electroporation, have shown significantly better results for penetration of high molecular weight drugs into the skin, or also for molecules with markedly polar structures (NIKOLIĆ et al., 2022). In this context, different active penetration methods, such as laser ablation, ultrasound, iontophoresis, microneedles, and magnetophoresis (Figure 31) have been investigated to provide a variety of topical therapies for enhanced drug penetration of the stratum corneum (YANG et al., 2017).

Magnetophoresis (especially addressed in the topic 3.5 of the Chapter I) is a completely non-invasive method, since it consists of applying a magnetic field that, unlike other techniques, does not cause any damage to the tissue. The effect of the magnetic field on the transdermal diffusion flux of the drug can be increased with corresponding increase in field strength. Thus, increased skin penetration of lidocaine was demonstrated at

different magnetic field intensities (30, 150 and 300 mT) (AKHTAR et al., 2020; MURTHY; SAMMETA; BOWERS, 2010).

Figure 31 – Active methods of transdermal drug penetration



Source: from (YANG et al., 2017).

The magnetic field constitutes, therefore, a possibility of external action that has been explored in drug delivery applications, offering deep tissue penetration with a clinically confirmed safety profile. Compared to other forms of physical stimuli, magnetophoresis stands out by the fact that biological tissue is magnetically inert and therefore, unlike laser, ultrasound or electric current, magnetic fields normally do not act directly on biological barriers. Thus, magnetic forces are not attenuated by tissue, which is desired to prevent excessive energy deposition and, consequently, physical damage to healthy tissue (FARZIN et al., 2020; SUN et al., 2020).

Magnetic nanocarriers can strongly act as vehicles for enhanced drug accumulation and controlled drug release. *In vitro* transdermal studies demonstrate that magnetic composites can penetrate deep into the skin through the action of an external magnetic field. (RAO et al., 2015).

Based on the above context, the present work intends, for the first time, to evaluate the effect of applying a magnetic field on transdermal penetration directed, or not, to the hair follicle (specifically, under conditions of negative magnetophoresis in comparison with passive penetration). The nanocapsules discussed in the Chapter II, as well as, another formulation based on polymeric micelles, will be the object of this investigation.

## 2.2 TPGS Polymeric micelles loaded with adapalene

D- $\alpha$ -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) is a vitamin E derivative conjugated with polyethylene glycol already approved by the Food and Drug Administration (FDA) as a pharmaceutical ingredient, having been used as an excipient in several marketable products. It has also been approved by the European Medicines Agency for the treatment of congenital or hereditary chronic cholestasis (Vedrop®). Recently, encouraging results confirmed that TPGS polymeric micelles provided the development of aqueous formulations for targeted epidermal delivery of sirolimus (immunosuppressive drug) in facial angiofibromas (QUARTIER et al., 2021).

Adapalene (ADA) is a 3rd generation retinoid, derived from naphthoic acid, used in the topical treatment of mild to moderate acne (*acne vulgaris*) (MILLIKAN, 2000). However, ADA is exceptionally lipophilic ( $\log P = 8.1$ ) and practically insoluble in water ( $<4 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), encouraging the development of formulations for solubilization and delivery strategies for its topical use. In this context, nanocarriers based on TPGS polymeric micelles allowed the targeted delivery of ADA to the hair follicle, generating better perspectives for follicular disease therapies (KANDEKAR et al., 2018).

ADA shows strong native fluorescence at 389 nm (emission) when excited at 312 nm. Fluorimetric methods have shown high sensitivity for ADA quantification, even in small concentrations in the range of  $\text{ng.mL}^{-1}$ , which represents an alternative to sophisticated and high cost methods, such as high performance liquid chromatography (HPLC) (TOLBA; EL-GAMAL, 2016).

Thus, considering formulations of polymeric micelles based on TPGS loaded with ADA, already developed and investigated by the partner research group (KANDEKAR et al., 2018), the present study evaluated, in an unprecedented way, the effect of the negative magnetophoresis phenomenon on the magnetic targeting of adapalene to the hair follicle, using fluorimetric quantification methods.

### 3 METHODOLOGY

#### 3.1 Material

Fluorescein was obtained from Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland). ADA was purchased from Hangzhou Dayangchem Co. Ltd, (Hangzhou, PR China). TPGS, sodium potassium chloride, sodium potassium phosphate, and Tween 80 were purchased from Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland). Eukitt® was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Sodium dodecyl sulfate (SDS) and 4,6-diamino-2-phenyl-indole (DAPI) were purchased from Applichem Axon lab AG (Baden-Dättwil, Switzerland). Dulbecco's solution (phosphate buffered saline without calcium chloride and magnesium chloride; DPBS) was obtained from Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland). HPLC grade acetone was purchased from Fisher Scientific (Reinach, Switzerland). Ultrapure water (Millipore Milli-Q Gard 1 Purification Pack resistivity > 18 MΩ cm; Zug, Switzerland) was used to prepare all the solutions.

#### 3.2 Synthesis

##### 3.2.1 *Fluorescein-loaded polymeric nanocapsules*

Hydroxyethyl starch (HES) nanocapsules were synthesized through the inverse miniemulsion technique (water in oil), as described in the topic 2.3 of chapter II. Adaptations were made to study the feasibility of this nanocarrier in transdermal penetration applications by negative magnetophoresis. Thus, the fluorescein compound was encapsulated instead of oncocalyxone A. Furthermore, the SPIONs were not co-encapsulated in the polymeric structure, being added free in the final solution of the nanocapsules, generating, this way, a formulation of diamagnetic nanocapsules surrounded by a paramagnetic medium (0.45 mg SPIONs/mL<sub>formulation</sub>), which is ideal for applications in negative magnetophoresis, as addressed in the chapter I, topic 3.5, Figure 9b.

##### 3.2.2 *ADA-loaded polymeric micelles*

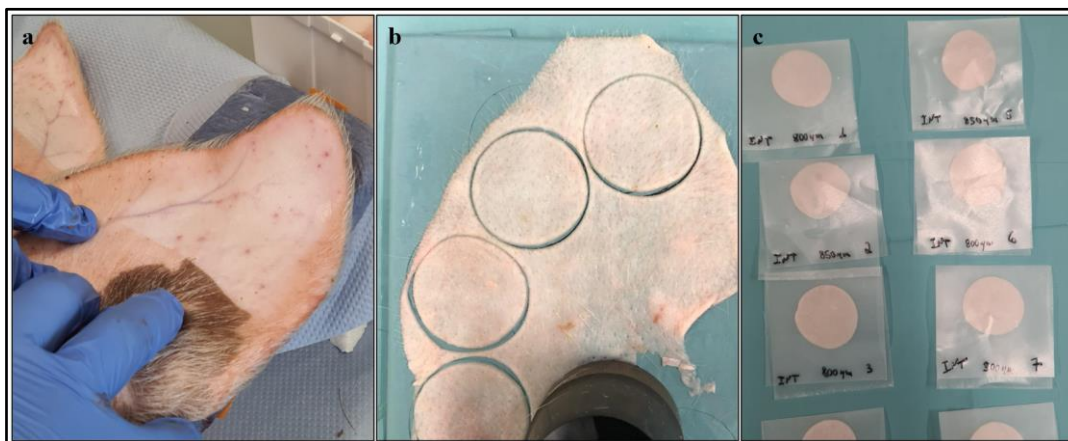
Briefly, adapalene and TPGS were dissolved in 4 mL of acetone, as previously proposed by (KANDEKAR et al., 2018). The mixture was added dropwise to 4 mL of ultrapure water under sonication (Branson Digital Sonifier® S-450D; Carouge, Switzerland). Subsequently, the acetone was slowly evaporated at 40 °C by rotary

evaporation (Büchi RE 121 Rotavapor®; Flawil, Switzerland). After resting for 12 hours for equilibration, the micellar solution was centrifuged at 10,000 rpm for 15 min (Eppendorf Centrifuge 5804; Hamburg, Germany) to remove possible amounts of precipitated drug, carefully collecting the supernatant. In the final supernatant, SPIONs were solubilized at a concentration of 0.45 mg/mL of the formulation, generating, this way, a formulation of diamagnetic micelles surrounded by a paramagnetic medium.

### 3.3 Skin processing

Porcine ear skin was processed and used for *in vitro* studies in Franz diffusion cells. The supply took place from a local abattoir (CARRE; Rolle, CH) always on the same day of the animal's slaughter. As briefly illustrated below, by Figure 32, skin samples were processed with a Zimmer® electric dermatome (Münsingen, Switzerland), coupled to pressurized air tubing, collecting skin samples with a thickness close to 800 µm (32a). Excess hair was carefully removed from the surface of the skin with the aid of an electric razor and circular discs (220 mm of diameter) were then selected (32b) for storage in Parafilm® at -20 °C for a period not higher than 3 months (32c).

Figure 32 – Steps concerned to the porcine skin processing

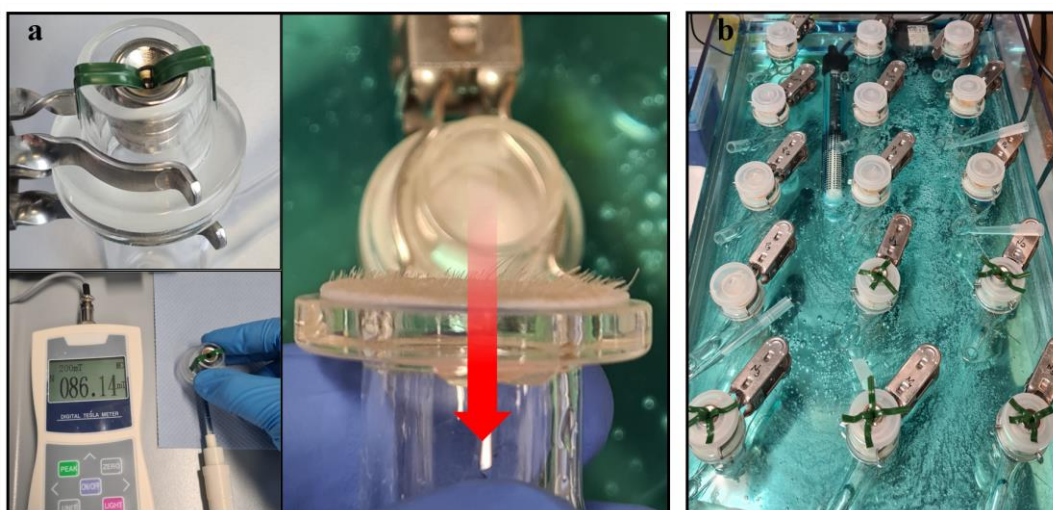


Source: provided by the author.

### 3.4 Transdermal penetration experiments

The transdermal penetration profile was evaluated using vertical Franz diffusion cells, adapted from previous protocols (LAPTEVA et al., 2020). Porcine ear skin discs were fixed between the recipient and donor compartments (permeation area: 2.0 cm<sup>2</sup>) with the stratum corneum side facing to the donor compartment. Aliquots of 0.4 mL of

the samples were added to the donor compartment. The donor compartment was also adapted to attach magnets, when necessary, promoting a magnetic field of, approximately, 85mT on the surface of the skin (Figure 33a). The receiving compartment was prepared with 10 mL of buffered solution (phosphate buffer, pH = 7.3), under constant magnetic stirring and thermostatic bath at  $33\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ . For tests involving ADA, Tween 80 (1%) was also used in the receptor compartment. Tests were performed in quintuplicate, always by an independent way for passive penetration experiments (absence of magnetic field) and penetration with application of external magnetic field (negative magnetophoresis) (Figure 33b). Penetration experiments were performed during 24h or 8h, after which the Franz cells were disassembled and the skin discs were carefully washed with running water and cotton moistened with PBS pH 7.3 buffer solution to remove any reminiscent formulation from the surface of the stratum corneum. Figure 33 – Franz diffusion cells adaptation for transdermal penetration assays



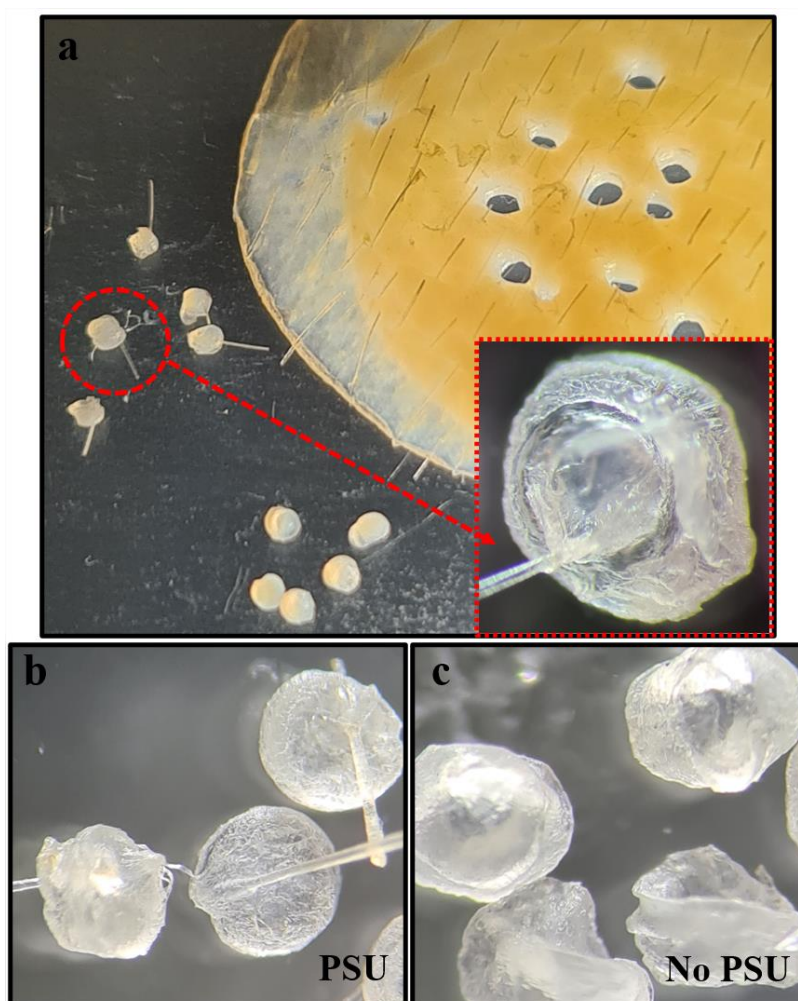
Source: developed by the author.

For extraction of the drug penetrated in the skin, the skin disks were then sectioned into small pieces and placed for 12 hours in a Falcon or Eppendorf tube, under vortex agitation, with 7.5 mL of PBS buffer (fluorescein extraction) or 4.0 mL of ethanol (ADA extraction). Extractions concerned to PSU were always performed with 1 mL of the respective solvent. The solutions then passed through a Millipore 0.22  $\mu\text{m}$  filter to remove possible suspended particles from the skin and the quantification was performed by fluorescence spectroscopy.

### 3.5 1mm skin disks biopsy with and without the pilosebaceous unit (PSU)

Skin samples were carefully manipulated, according to procedures previously developed by the partner group (LAPTEVA et al., 2020). So, the end portion of the PSU, the hair root and its angle of implantation in the skin could be considered for the puncture procedure of 1mm biopsies containing, or not, the PSU (as represented by the Figure 34a). The collection was then checked for completeness and also for the presence or absence of PSU using a Leica S6D stereomicroscope (Leica; Heerbrugg, Switzerland) (34b and 34c).

Figure 34 – 1mm skin biopsies with and without the pilosebaceous unit (PSU)



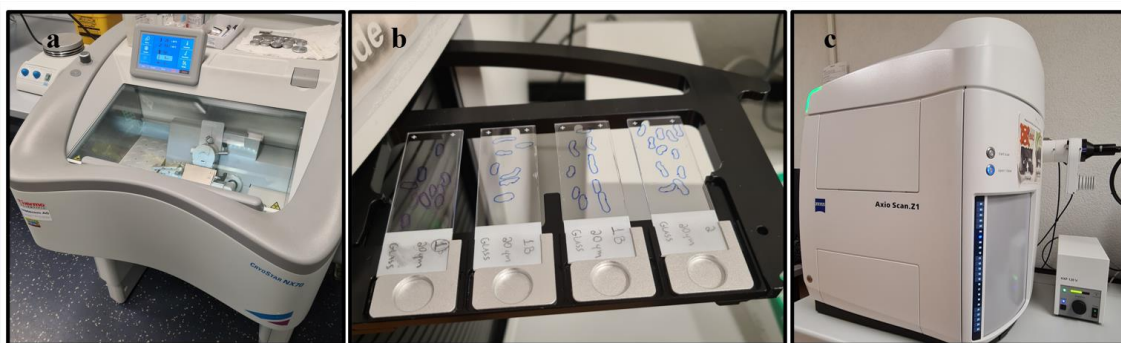
Source: developed by the author.

### 3.6 Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

After 24h of the transdermal penetration experiment, samples were sectioned at a thickness of 20  $\mu\text{m}$  using a Criotome (Thermo Scientific CryoStar<sup>TM</sup> NX70; Reinach,

Switzerland) (Figure 35a). The 20  $\mu\text{m}$  cross sections of skin were fixed on Superfrost™ Plus microscope slides with 4% formaldehyde for 15 minutes, washed in PBS and permeabilized in methanol for 5 min. After removing methanol by washing in PBS, cell nuclei were stained with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of DAPI for 5 min. The slides were then finished with Eukitt® mounting medium and a cover glass slip (35b). Image acquisition was performed at the Bioimaging Core Facility, Faculty of Medicine, University of Geneva. Skin sections were examined with an Axio Scan.Z1 microscope (Zeiss, Germany) (35c), where each image was obtained by averaging ten repeated scans. Image processing was performed using ZEN 3.2 Imaging Software Blue edition. Excitation and emission wavelengths for DAPI were 353 and 465 nm, respectively.

Figure 35 – Obtaining CLSM images



Source: developed by the author.

### 3.7 Fluorescence spectroscopy

Fluorescence spectra, as well as, fluorescence intensity measurements were obtained from a high-performance microplate reader BMG CLARIOstar® Plus (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany). The samples were placed in 96-well black polystyrene microplates (OptiPlate-96), always in volumes of 200  $\mu\text{L}$  in each analysis. Different calibration curves, covering concentration ranges of interest, were always built simultaneously with the sample analyses, guaranteeing similar temperature conditions and technical parameters of lamps and optical sensors. SMART Control and MARS data analysis software were used for data processing. Fluorescein and adapalene were excited at 480 and 320 nm, respectively, and their emissions were measured at 530 and 370 nm, respectively.



## 4 RESULTS AND DISCUSSION

### 4.1 HES polymeric nanocapsules loaded with fluorescein

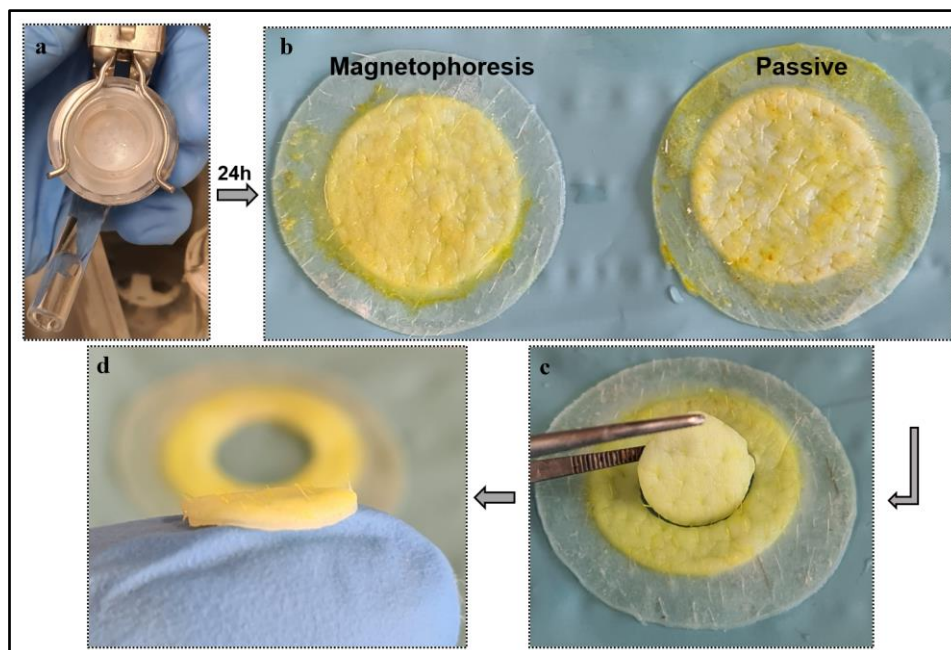
In order to evaluate the possibility of magnetic targeting by the HES nanocapsules (addressed in the Chapter II), the performance of these nanocarriers was investigated, concerning the delivery of hydrophilic compound in transdermal penetration experiments (under the presence or the absence of a magnetic field). Fluorescein is a compound widely used as a fluorescent probe for several molecules, having been selected as a model hydrophilic compound in the present study, due to its luminescent properties, such as, high intensity emission peaks and high molar absorption coefficient, which leads to an easy detection, quantification and image generation (YAN et al., 2017). Absorption and emission spectra for fluorescein in PBS buffer solution showed 480 nm and 530 nm, respectively, as wavelength regions of maximum intensity.

The fluorescein transdermal penetration experiments were performed during 24 hours in Franz diffusion cells with a permeation area of 2 cm<sup>2</sup>, with an initial application of 400 µL of magnetic formulation of HES polymeric nanocapsules loaded with fluorescein at a concentration of 300 µg/mL, thus, a total fluorescein application to the skin at 60 µg/cm<sup>2</sup>.

After 24 hours of experiment, the Franz cells were disassembled and the skin discs were carefully washed to remove excess formulation from the surface. Due to the fluorescein characteristic coloration, it was possible to visually observe a more pronounced penetration in the skin discs kept under a magnetic field, in comparison with the discs kept in passive penetration conditions (absence of magnetic field), as illustrated by the Figure 36 (a, b).

Then, it was performed the quantification of fluorescein through a process of standardization of its extraction from the skin in discs of 0.785cm<sup>2</sup>, giving priority to the most central regions (Figure 36c and 36d), against the peripheral regions (the central ones are more aligned with the magnets affixed to the upper central part of the Franz cells donor compartment) for subsequent quantification by fluorescence spectroscopy.

Figure 36 – Fluorescein transdermal penetration carried by HES nanocapsules



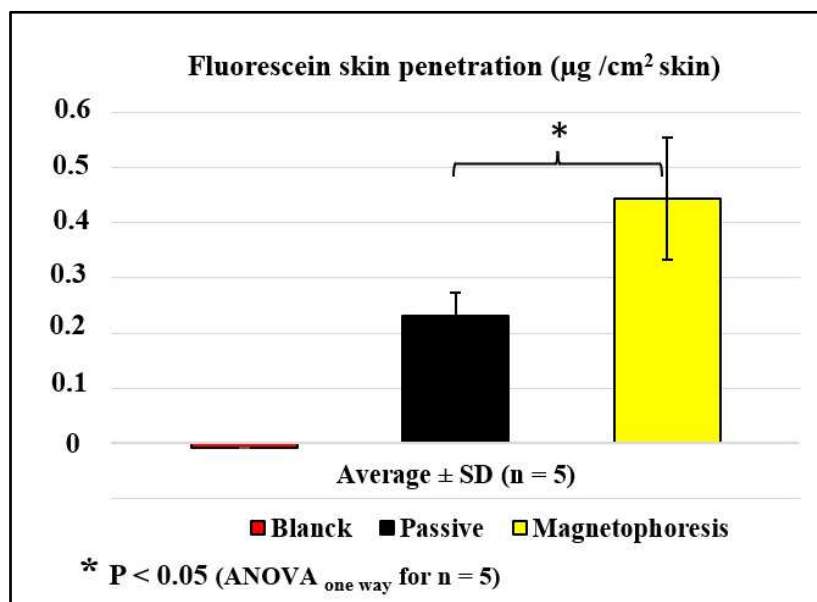
Source: developed by the author.

Standardization tests of fluorescein extraction were performed to ensure the efficiency of the adopted extraction methodology. Known concentrations of free fluorescein, solubilized in PBS buffer, were applied to skin samples at a concentration of  $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  and allowed to penetrate until complete drying of the surface and stabilization for 6h. DMSO and PBS buffer solvents were then tested in triplicate as candidates for extraction, observing an extraction efficiency of  $84.37\% (\pm 0.58)$  and  $72.33\% (\pm 1.76)$ , respectively (values expressed in %mean  $\pm$  SD). Although DMSO showed greater efficiency, PBS also demonstrated an acceptable efficiency in extracting fluorescein from the skin, so this second candidate was chosen due to its properties of lower volatility, odor and, mainly, lower risk of causing accidental intoxication.

The results concerning to the quantification of fluorescein skin penetration (Figure 37) demonstrated that it was possible to observe a penetration of  $0.44 \mu\text{g}/\text{cm}^2 (\pm 0.11 \text{ SD})$  to the negative magnetophoresis experiments. For the passive penetration experiments, a lower penetration of  $0.23 \mu\text{g}/\text{cm}^2 (\pm 0.04 \text{ SD})$  was observed. These results indicate a fluorescein penetration, on average, 91% more intense for  $0.785\text{cm}^2$  skin discs (Figure 36d) under the application of a magnetic field of 85 mT on the surface of the skin. The finding of these results is consistent with the theoretical reasoning that supports the choice of negative magnetophoresis as a supporting method for topical drug application (BANI; BHARDWAJ, 2021), due to its ability to repel nanoparticles (ALNAIMAT et al.,

2018; KUMAR et al., 2016). Therefore, the hypothesis evaluated in this study is whether this repulsion generated by magnetophoresis, when applied in favor of a transdermal penetration flux, could intensify the drug penetration for topical applications.

Figure 37 – Quantification of fluorescein in 0.785 cm<sup>2</sup> skin discs



Source: developed by the author.

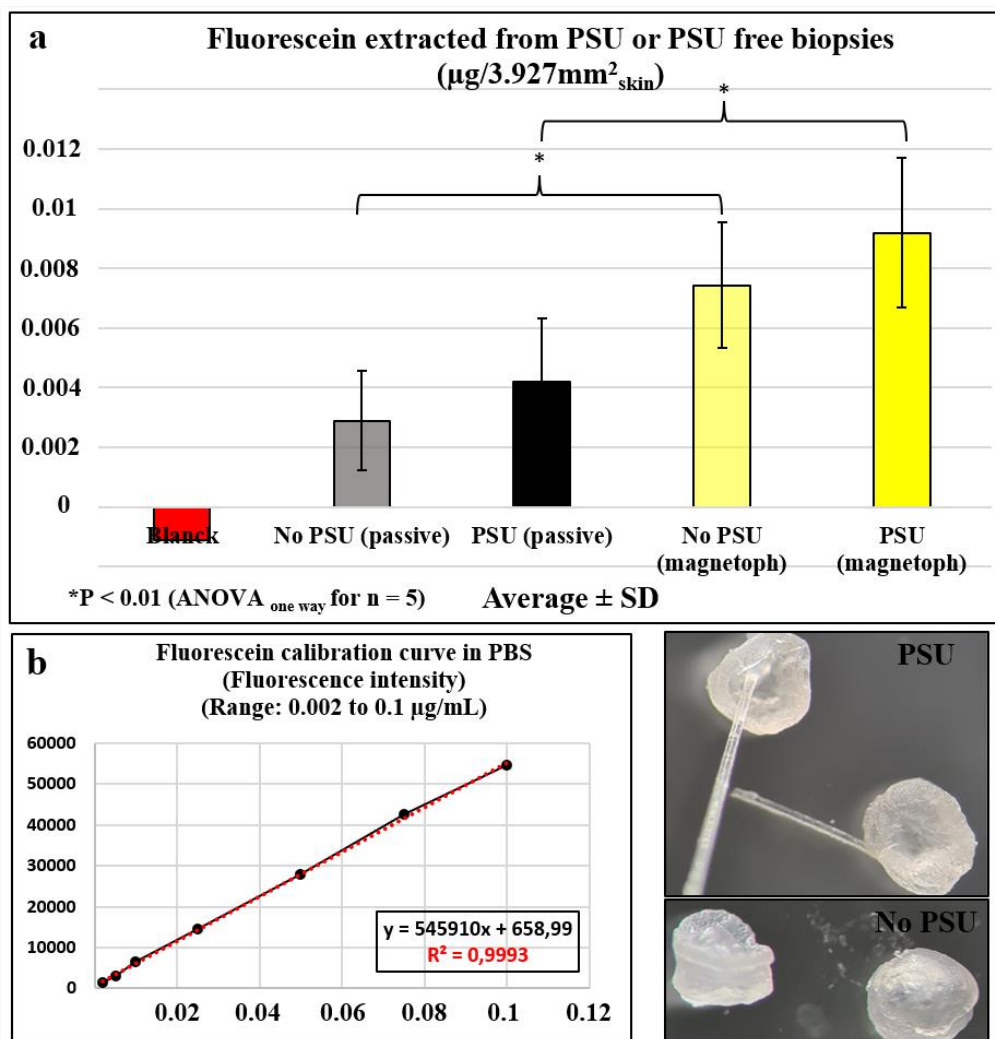
The standard deviation was observed more markedly in the systems involving magnetophoresis, which can be explained by the operational limitation of ensuring, for all experiments, the same distance between the skin surface and the magnet adapted to the donor compartment of the Franz cell. A micrometric difference could already interfere in the intensity of the magnetic field (LINDEMANN et al., 2021) in the surface of the skin and, consequently, generate a greater variation of results between the different experiments involving magnetophoresis, that is, a higher standard deviation.

Penetration experiments were also performed in white control groups, applying HES nanocapsule formulations without fluorescein during the 24h of penetration. In these cases, quantification by fluorescence spectroscopy did not observe, in the wavelengths of interest, emission signals of relevant intensity for the white control group samples (Figure 37, red bar), demonstrating that neither the skin, neither another constituent of the formulation, besides fluorescein, could be responsible for the emission signals observed and used to quantify fluorescein penetration.

Besides the fluorescein quantification in 0.785cm<sup>2</sup> skin discs, quantification in 1mm skin biopsies (with and without PSU, as previously illustrated by the Figure 34) was also investigated. In these cases, the values obtained in each spectroscopic reading reflect

the fluorescein extraction accumulated in 5 biopsies of 1mm (3.927mm<sup>2</sup> of skin) for each of the experiments performed, independently, in quintuplicate (Figure 38a). The concentrations were calculated from the calibration curve constructed simultaneously with the measurements with an R<sup>2</sup> of 0.999 for the measured concentration range (38b).

Figure 38 – Quantification of fluorescein in 1mm biopsies



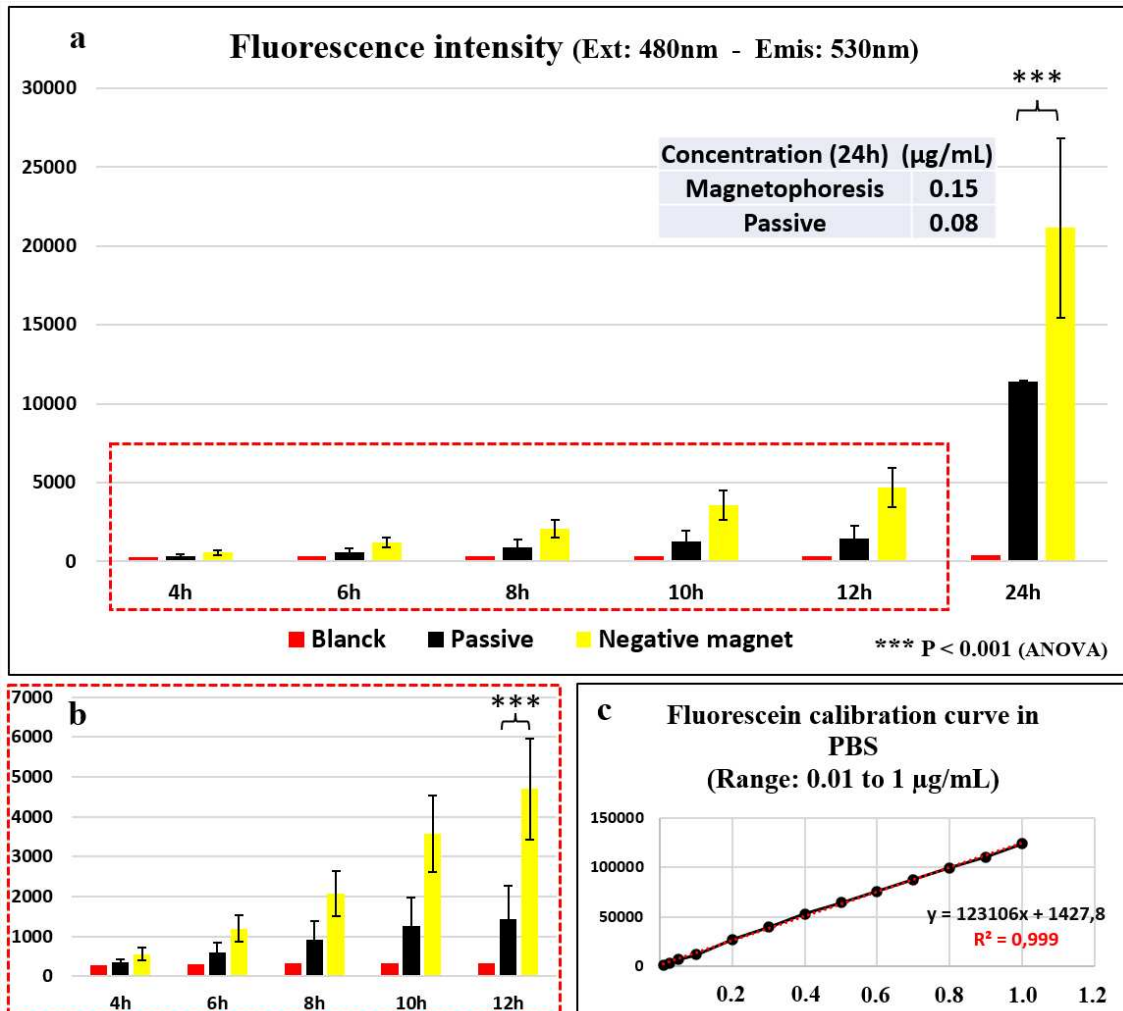
Source: developed by the author.

The quantification of fluorescein in 1mm biopsies also indicated, for all experiments, higher penetration when the experiment took place under negative magnetophoresis conditions. For biopsies containing PSU, the average observed was 0.0092  $\mu\text{g}$  of fluorescein ( $\pm 0.0025$  SD) for each 3.927 mm<sup>2</sup> of skin, in the presence of a magnetic field, while only 0.0042  $\mu\text{g}$  of fluorescein ( $\pm 0.0021$  SD) in cases of passive penetration, indicating that negative magnetophoresis provided an increase of 119% in the fluorescein penetration, on average, for these units containing PSU. For biopsies that did not contain PSU, 0.0074  $\mu\text{g}$  ( $\pm 0.0021$  SD) and 0.0028  $\mu\text{g}$  ( $\pm 0.0017$  SD) were

observed, respectively, for negative magnetophoresis and passive penetration, revealing that in these cases the magnetic field promoted a 164% increase in the penetration, on average. Thus, contrary to what one might suppose, the results suggest that the observed increase in the fluorescein penetration, promoted by the action of the magnetic field, does not seem to have an exclusive relationship with targeted delivery through the hair follicle pathways, since the intensification of penetration was higher in biopsies without hair follicle. However, the results still allow us to observe that, both in the passive penetration experiments as in the penetration by magnetophoresis, the means of fluorescein detected in biopsies containing PSU were higher than that means detected in biopsies without PSU, suggesting that the nanocarriers, both for passive penetration as for magnetophoresis, experienced a more pronounced penetration through the hair follicle pathways, consistent with what has already been widely established in previous studies (DAHMANA et al., 2021; OTBERG et al., 2008; WEINER, 1998). In the present study, however, considering the standard deviation of the experiments in the same penetration regime (passive or magnetophoresis), the concentration difference between the biopsies with and without PSU did not present a statistically significant quality when submitted to the ANOVA test ( $P > 0.05$ ). A possible explanation would be due to the fact that the experiments were performed during 24 hours, which is time enough for that fluorescein accumulated in PSU could then to diffuse laterally in the skin to regions without PSU, thus masking this difference. Superior statistical quality was obtained in experiments involving the penetration of adapalene, discussed in the next topic.

The possibility of diffusion of fluorescein through the skin was verified by monitoring the fluorescein concentration in the receptor compartment of the Franz diffusion cells, indicating that fluorescein was capable of transposing the entire skin thickness between the donor and the receptor compartment, as shown in the Figure 39.

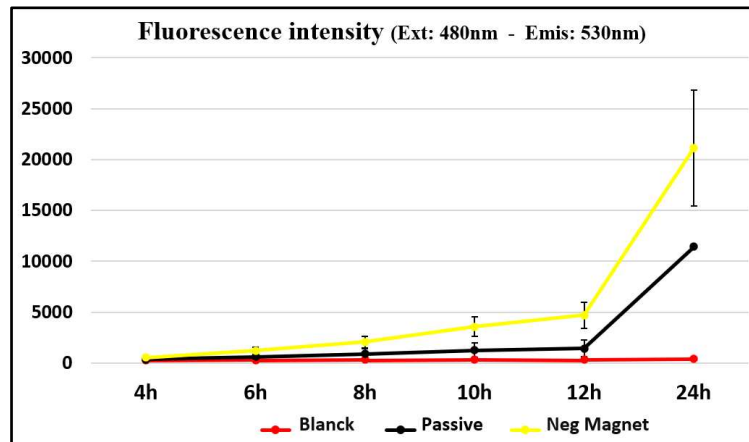
Figure 39 – a) Spectroscopic monitoring of fluorescein transposition into the receptor medium during 24 hours of transdermal penetration; b) expanded scale for the initial 12 hours; c) calibration curve concerned to the calculation of concentrations



Source: developed by the author.

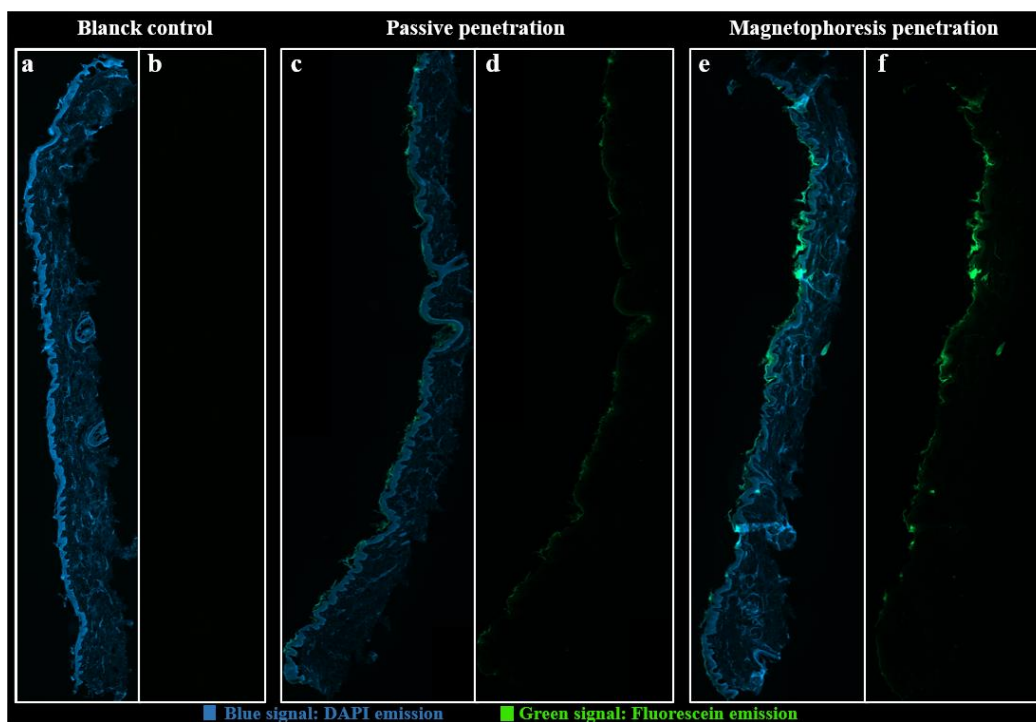
During the 24h of transdermal penetration, samples of PBS buffer solution were collected from the receptor compartment of the Franz cells, from time to time, for analysis by fluorescence spectroscopy (Figures 39 and 40). The results indicated that the magnetophoresis experiments showed an 87% more pronounced transposition of fluorescein to the receptor medium, when compared to the passive penetration experiments, with a concentration of 0.15 and 0.08  $\mu\text{g/mL}$  (after 24 hours), on average, in the presence and absence of the magnetic field, respectively (Figure 39a).

Figure 40 – Spectroscopic monitoring of the transposition of fluorescein to the receptor medium during 24 hours of transdermal penetration



Source: developed by the author.

In accordance with the previous results, CLSM images indicated a higher intensity of emission, related to the detection of fluorescein, in skin sections submitted to negative magnetophoresis (41f), compared to the passive penetration (41d) for 24h penetration experiments (XZ-plane, considering the surface of the skin as an XY-plane). Figure 41– CLSM micrographs of skin sections (SC facing to the left) after 24h of transdermal penetration: (a, b) white control (without fluorescein); (c, d) passive penetration; (e, f) magnetophoresis; (b, d, f) DAPI signal suppressed (fluorescent stain), remaining only fluorescein signal.



Source: developed by the author.

Thus, all experiments carried out for fluorescein penetration demonstrated an enhancement of transdermal penetration when under negative magnetophoresis conditions, compared to passive penetration. Additionally, the results also suggest that this intensification may not be exclusively related to the follicular pathways. In fact, penetration pathways for highly hydrophilic substances are still under discussion, so that some authors suggest intercellular and/or follicular penetration as preferred pathways, while other authors hypothesize transcellular transport of hydrophilic substances (PATZELT; LADEMANN, 2020).

#### **4.2 TPGS polymeric micelles loaded with adapalene**

In order to evaluate the potential of negative magnetophoresis for applications related to transdermal drug penetration directed to the hair follicle, this study followed the penetration capacity of the hydrophobic compound adapalene (ADA) carried by TPGS polymeric micelles, under the presence and absence of magnetic field. Thus, it was observed in a comparative way, the impact promoted by the application of a magnetic field in the crossing of the stratum corneum.

The ADA transdermal penetration experiments were performed for 8 hours in Franz cells with a permeation area of 2 cm<sup>2</sup>, with an initial application of 200 µL of magnetic formulation of TPGS micelles loaded with ADA at a concentration of 250 µg/mL (a total of ADA applied to the skin at 25 µg/cm<sup>2</sup>). After 8 hours of experiment, the Franz cells were disassembled and the skin discs were carefully washed to remove excess of formulation in contact with the stratum corneum. Tests carried out in triplicate demonstrated that it was possible to extract ADA from skin disks with ethanol by vortexing for 12h in a yield of 75.81% ± 2.02 (mean ± SD).

Next, ADA quantification was performed by fluorescence spectroscopy. Absorption and emission spectra for ADA solution in ethanol showed, respectively, 320 nm and 370 nm as wavelength regions of maximum intensity.

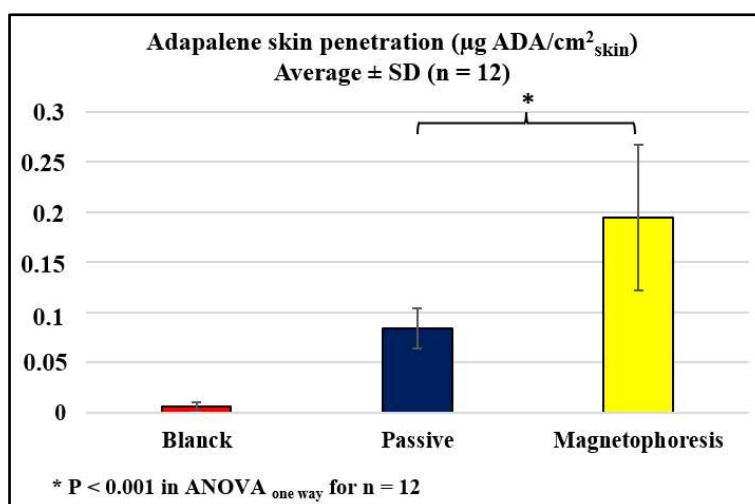
In previous experiments, involving fluorescein, we obtained the challenging finding that standard deviation (SD) values were higher in experiments involving the fixation of magnets in the Franz cell donor compartment. Thus, since the objective of the present study was to evaluate the practical possibility of negative magnetophoresis intensifying the topical penetration of a drug already commercially approved for clinical



use, a greater number of repetitions were performed in the experiment to obtain results with higher quality of statistical validation.

Thus, the results schematized by Figure 42 summarize the experimentation of 27 independent tests (12 for passive penetration, 12 for penetration with application of magnetic field and 03 for blank control), revealing that negative magnetophoresis was able to promote a penetration of adapalene, on average, 130% higher for 0.785 cm<sup>2</sup> skin discs, when applied a magnetic field of, approximately, 85 mT on the surface of the skin ( $P < 0.001$  in ANOVA test). On average, penetration of 0.19  $\mu\text{gADA}/\text{cm}^2$  ( $\pm 0.07$  SD) was observed in the presence of the magnetic field and 0.08  $\mu\text{gADA}/\text{cm}^2$  ( $\pm 0.02$  SD) under passive penetration conditions.

Figure 42 – ADA quantification in 0.785cm<sup>2</sup> skin discs



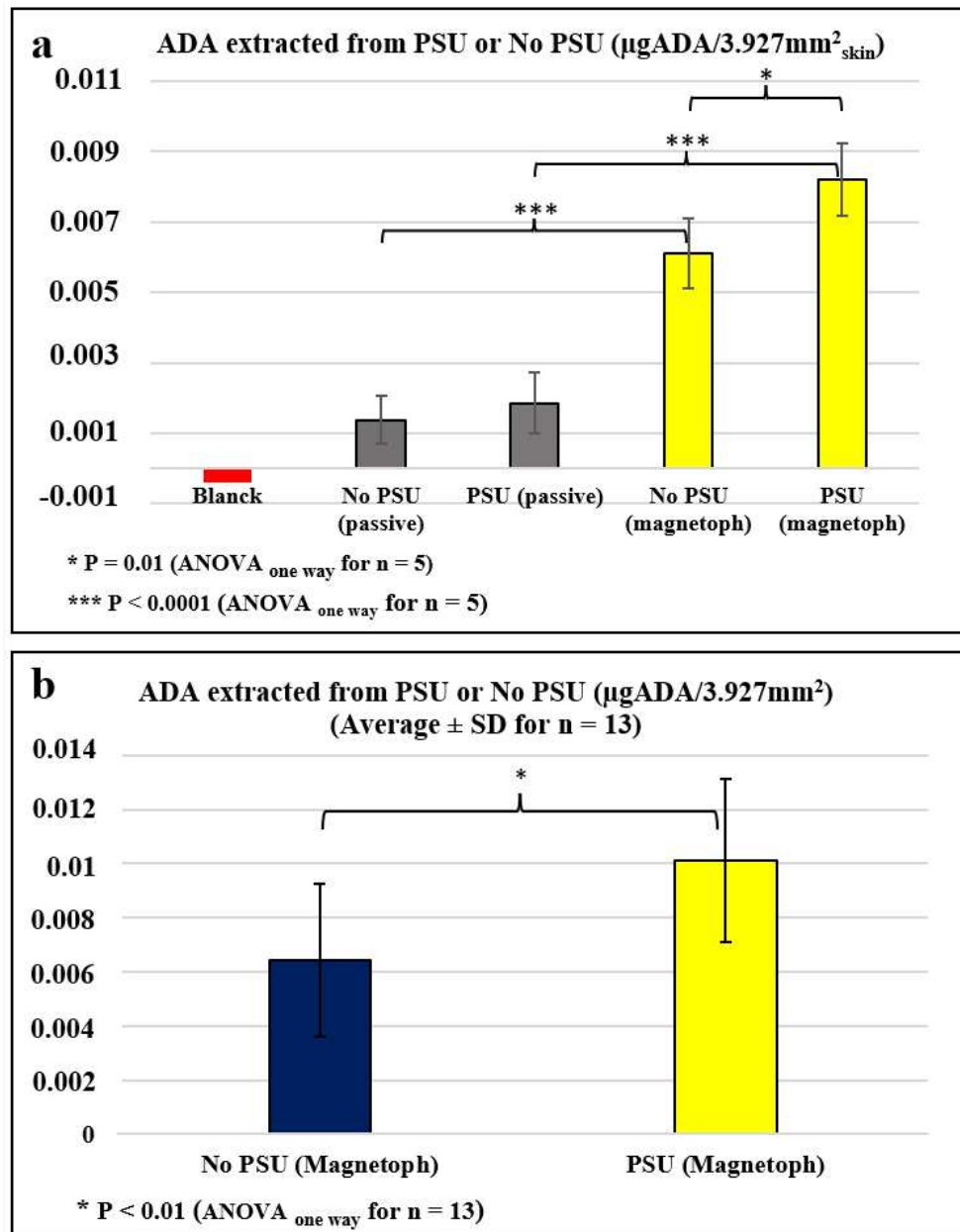
Source: developed by the author.

Penetration experiments were also performed for white control groups, applying TPGS micelle formulations without adapalene during 8h experiments. In these cases, quantification by fluorescence spectroscopy did not observe, in the spectroscopic range of interest, relevant emission signals for the white control group samples (Figure 42, red bar), suggesting that, besides to ADA, neither the skin neither another formulation constituent, could significantly impact the emission signals used in the quantifications.

In addition to ADA quantification from 0.785cm<sup>2</sup> skin discs, quantifications from 1mm skin disc biopsies (with and without PSU) were also performed. Thus, the values obtained in each spectroscopic reading reflect the accumulated ADA extraction from 5 biopsies of 1mm (3.927mm<sup>2</sup>) for each of the experiments performed, independently, in quintuplicate (Figure 43a).

ADA quantification from 1mm biopsies demonstrated, for all experiments, a higher penetration when the experiment was carried out under negative magnetophoresis conditions.

Figure 43 – ADA quantification from 1mm biopsies: a) in the presence and absence of a magnetic field (n = 5); b) only in the presence of a magnetic field (n = 13)



Source: developed by the author.

For biopsies containing PSU, the average ADA penetration observed was  $0.0082 \mu\text{g}$  ( $\pm 0.001$  SD) for  $3.927\text{mm}^2$  of skin, in the presence of a magnetic field, while for the passive penetration, was observed only  $0.0018 \mu\text{g}/3.927\text{mm}^2$  ( $\pm 0.0008$  SD), indicating that, for the units containing PSU, negative magnetophoresis provided an increase of

340%, on average, in the ADA penetration during 8h. For biopsies that did not contain PSU, averages of  $0.0061 \mu\text{g}_{\text{ADA}}/3.927\text{mm}^2$  ( $\pm 0.0009$  SD) and  $0.0014 \mu\text{g}_{\text{ADA}}/3.927\text{mm}^2$  ( $\pm 0.0007$  SD) were observed for negative magnetophoresis and passive penetration, respectively, revealing that in these cases of absence of PSU, the magnetic field, surprisingly, provided the same increase of 340%, on average, in the penetration of adapalene.

Thus, the results once again suggest that the observed increase in the penetration capacity does not appear to be exclusively related to targeted drug delivery via hair follicle pathways, once a 340% increased penetration was observed both in the presence as in the absence of PSU. Nevertheless, the ability of nanocarriers based on polymeric micelles to preferentially reach hair follicles has already been demonstrated in previous studies (DAHMANA et al., 2021; LAPTEVA et al., 2014, 2015). In this sense, the present study performed additional investigations, involving 13 independent experiments, demonstrating that, in the presence of a magnetic field, penetration pathways related to the hair follicle continue to be confirmed as the preferential route of penetration for polymeric micelles, since it was detected, in biopsies containing PSU, a 57% higher concentration of ADA, on average ( $0.0101 \mu\text{g}/3.927\text{mm}^2$  and  $0.0064 \mu\text{g}/3.927\text{mm}^2$ , respectively, for biopsies with and without PSU), as seen in the Figure 43b.

Therefore, evaluating the results compiled by Figures 42 and 43, it is possible to demonstrate that negative magnetophoresis exerted an enhancing effect on the transdermal penetration of adapalene loaded by TPGS polymeric micelles, on average, 130% higher (up to 340%) when compared to the passive penetration. Additionally, it is also possible to suggest that this penetration-enhancing effect occurred in a generalized way on the surface of the skin, that is, not showing an exclusive relationship with follicular penetration pathways, although, these follicular pathways have been shown to be a pronounced penetration route.

## 5 CONCLUSION

The present work demonstrated that a new magnetic nanocomposite based on hydroxyethyl starch was successfully synthesized through an inverse miniemulsion synthesis method. The nature of this nanocomposite consists of polymeric nanocapsules with a well-defined core-shell morphology, with an average diameter of 143 nm, ranging from 100 to 340 nm, which allowed the co-encapsulation of the hydrophilic bioactive oncolyxone A with SPIONs in the core of this nanostructure, visualized by Transmission Electron Microscopy. Exhibiting a prolonged drug release profile, the nanocomposite demonstrated *in vitro* cytotoxicity against four human tumor cell lines, while it did not promote the occurrence of deaths in the *in vivo* acute toxicity tests (zebrafish model), generating perspectives for the magnetic vectorization of hydrophilic anticancer drugs. Thus, the nanocomposite synthesized in this work represents an intelligent perspective for the transport of drugs/bioactives, since it can transport hydrophilic compounds by magnetic vectorization. Additionally, magnetic nanocarriers were tested concerning the capacity of drug directing against the stratum corneum barrier. It was possible to demonstrate that negative magnetophoresis exerted an enhancing effect (up to 340%) on the transdermal penetration of hydrophilic and hydrophobic compounds, when compared to the passive penetration. It was also possible to suggest that this penetration-enhancing effect occurred in a generalized way on the surface of the skin, not showing an exclusive relationship with follicular penetration pathways, although, these follicular pathways showed to be a pronounced penetration route. This way, the present work not only synthesized a new magnetic nanocomposite, but also evaluated possible applications concerning magnetic drug delivery through interactions with magnetic fields.

## REFERENCES

AHMAD, Farooq; RICHARDSON, Michael K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: Impact of environmental complexity. **Behavioural Processes**, [*S. l.*], v. 92, p. 88–98, 2013. DOI: 10.1016/j.beproc.2012.10.014.

AJALLI, Narges; POURMADADI, Mehrab; YAZDIAN, Fatemeh; RASHEDI, Hamid; NAVAEI-NIGJEH, Mona; DÍEZ-PASCUAL, Ana. Chitosan/Gamma-Alumina/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@5-FU Nanostructures as Promising Nanocarriers: Physicochemical Characterization and Toxicity Activity. **Molecules**, [*S. l.*], v. 5369, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27175369>.

AKHTAR, Naseem; SINGH, Varsha; YUSUF, Mohammad; KHAN, Riaz A. Non-invasive drug delivery technology: Development and current status of transdermal drug delivery devices, techniques and biomedical applications. **Biomedizinische Technik**, [*S. l.*], v. 65, n. 3, p. 243–272, 2020. DOI: 10.1515/bmt-2019-0019.

ALNAIMAT, Fadi; DAGHER, Sawsan; MATHEW, Bobby; HILAL-ALNQBI, Ali; KHASHAN, Saud. Microfluidics Based Magnetophoresis: A Review. **Chemical Record**, [*S. l.*], v. 18, n. 11, p. 1596–1612, 2018. DOI: 10.1002/tcr.201800018.

AVILA-CALDERÓN, Eric Daniel et al. Outer Membrane Vesicles From *Brucella melitensis* Modulate Immune Response and Induce Cytoskeleton Rearrangement in Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Frontiers in Microbiology**, [*S. l.*], v. 11, n. October, p. 1–18, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556795.

BAIER, Grit; BAUMANN, Daniela; SIEBERT, Jörg Max; MUSYANOVYCH, Anna; MAILÄNDER, Volker; LANDFESTER, Katharina. Suppressing unspecific cell uptake for targeted delivery using hydroxyethyl starch nanocapsules. **Biomacromolecules**, [*S. l.*], v. 13, n. 9, p. 2704–2715, 2012. DOI: 10.1021/bm300653v.

BANGIA, Riya; SHARMA, Gajanand; DOGRA, Sunil; KATARE, Om Prakash. Nanotechnological interventions in dermatophytosis: from oral to topical, a fresh perspective. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [*S. l.*], v. 16, n. 4, p. 377–396, 2019. DOI: 10.1080/17425247.2019.1593962.

BANI, Kamal Singh; BHARDWAJ, Khushboo. Topical Drug Delivery Therapeutics, Drug Absorption and Penetration Enhancement Techniques. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, [*S. l.*], v. 11, n. 4, p. 105–110, 2021. DOI: 10.22270/jddt.v11i4.4864.

BARMAN, Ranajit; MONDAL, Tathagata; SARKAR, Jayita; SIKDER, Amrita; GHOSH, Suhrit. Self-Assembled Polyurethane Capsules with Selective Antimicrobial Activity against Gram-Negative *E. coli*. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, [*S. l.*], v. 6, n. 1, p. 654–663, 2020. DOI: 10.1021/acsbmaterials.9b00932.

BARRETO, Antônio C. H. et al. Magnetic nanosystem for cancer therapy using oncocalyxone A, an antitumour secondary metabolite isolated from a Brazilian plant. **International Journal of Molecular Sciences**, [*S. l.*], v. 14, n. 9, p. 18269–18283, 2013. DOI: 10.3390/ijms140918269.

BESHEER, Ahmed; HAUSE, Gerd; KRESSLER, Jörg; MÄDER, Karsten.

Hydrophobically modified hydroxyethyl starch: Synthesis, characterization, and aqueous self-assembly into nano-sized polymeric micelles and vesicles. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 359–367, 2007. DOI: 10.1021/bm0609487.

CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. Pau-Branco-do-Sertão (Auxemma oncocalyx). **Circular Técnica - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, [S. l.], n. 153, p. 6, 2008.

CASTELLANOS-RUBIO, Idoia et al. Highly Reproducible Hyperthermia Response in Water, Agar, and Cellular Environment by Discretely PEGylated Magnetite Nanoparticles. **ACS applied materials & interfaces**, [S. l.], v. 12, n. 25, p. 27917–27929, 2020. DOI: 10.1021/acsami.0c03222.

CHAMORRO RENGIFO, Andrés Felipe; STEFANES, Natalia; TOIGO, Jessica; MENDES, Cassiana; SANTOS-SILVA, Maria C.; NUNES, Ricardo J.; PARIZE, Alexandre Luis; MINATTI, Edson. A new and efficient carboxymethyl-hexanoyl chitosan/dodecyl sulfate nanocarrier for a pyrazoline with antileukemic activity. **Materials Science and Engineering C**, [S. l.], v. 105, n. July, p. 110051, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2019.110051.

CHEN, Lei; XIONG, Zhouyi; XIONG, Hanguo; DIN, Zia ud. Investigating the structure and self-assembly behavior of starch-g-VAc in starch-based adhesive by combining NMR analysis and multi-scale simulation. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 246, n. June, p. 116655, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116655.

CHENG, Han Long; GUO, Hai Ling; XIE, An Jian; SHEN, Yu Hua; ZHU, Man Zhou. 4-in-1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>@PPy-DOX nanocomposites: Magnetic targeting guided trimode combinatorial chemotherapy/PDT/PTT for cancer. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 215, n. November 2020, p. 111329, 2021. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111329.

CHENG, Sinan et al. A novel navigated doxorubicin delivery formulation to breast cancer therapy. **Materials Today Advances**, [S. l.], v. 14, p. 100235, 2022. DOI: 10.1016/j.mtadv.2022.100235.

COLBERT, Caroline M.; MING, Zhengyang; POGOSYAN, Arutyun; FINN, J. Paul; NGUYEN, Kim Lien. Comparison of Three Ultrasmall, Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for MRI at 3.0 T. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, [S. l.], p. 1–11, 2022. DOI: 10.1002/jmri.28457.

CUENCA, Pamela; FERRERO, Sergio; ALBANI, Oscar. Preparation and characterization of cassava starch acetate with high substitution degree. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 100, n. August 2019, p. 105430, 2020. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.105430.

DA SILVA, Aiêrta C. C.; ALMEIDA, Rafael R.; SOUSA, Alexandre C. C.; MARTÍNEZ, Fabián N. A.; DENARDIN, Juliano C.; MORAIS, Selene M.; RICARDO, Nágila M. P. S. International Journal of Biological Macromolecules Xyloglucan-based hybrid nanocomposite with potential for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], n. xxxx, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.128.

DAHMANA, Naoual; MUGNIER, Thibault; GABRIEL, Doris; FAVEZ, Tatiana; KOWALCZUK, Laura; BEHAR-COHEN, Francine; GURNY, Robert; KALIA, Yogeshvar N. Polymeric micelle mediated follicular delivery of spironolactone: Targeting the mineralocorticoid receptor to prevent glucocorticoid-induced activation and delayed cutaneous wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 604, p. 120773, 2021. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120773.

DE ALMEIDA, Raimundo R. et al. Preliminary evaluation of novel triglyceride-based nanocomposites for biomedical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 28, n. 8, p. 1547–1556, 2017. DOI: 10.21577/0103-5053.20170007.

DE MOURA, Carolina L.; GALLO, Juan; GARCÍA-HEVIA, Lorena; PESSOA, Otilia D. L.; RICARDO, Nágila M. P. S.; BAÑOBRE-LÓPEZ, Manuel. Magnetic Hybrid Wax Nanocomposites as Externally Controlled Theranostic Vehicles: High MRI Enhancement and Synergistic Magnetically Assisted Thermo/Chemo Therapy. **Chemistry - A European Journal**, [S. l.], v. 26, n. 20, p. 4531–4538, 2020. DOI: 10.1002/chem.201904709.

DHAR, Purbarun; SIRISHA MAGANTI, Lakshmi. Predicting thermal history a-priori for magnetic nanoparticle hyperthermia of internal carcinoma. **Journal of Applied Physics**, [S. l.], v. 122, n. 5, p. 054902, 2017. DOI: 10.1063/1.4997471.

DOS SANTOS, Sarah B. F. et al. Antibacterial activity of fluoxetine-loaded starch nanocapsules. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 164, p. 2813–2817, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.184.

DULIŃSKA-LITEWKA, Joanna; ŁAZARCZYK, Agnieszka; HAŁUBIEC, Przemysław; SZAFRAŃSKI, Oskar; KARNAS, Karolina; KAREWICZ, Anna. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles-current and prospective medical applications. **Materials**, [S. l.], v. 12, n. 4, 2019. DOI: 10.3390/ma12040617.

DUSZYŃSKA, Angelika; DANIELEWICZ, Agnieszka; KADŁUBOWSKI, Sławomir; KOZANECKI, Marcin; MANIUKIEWICZ, Waldemar; SOWIŃSKI, Przemysław; SZADKOWSKA – NICZE, Magdalena. Influence of electron-beam irradiation on surface properties of magnetic iron oxide nanoparticles stabilized with citrate. **Radiation Physics and Chemistry**, [S. l.], v. 169, n. March, p. 107796, 2020. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2018.03.009.

ESLAMI, Parisa et al. Smart Magnetic Nanocarriers for Multi-Stimuli On-Demand Drug Delivery. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 1–21, 2022. DOI: 10.3390/nano12030303.

ETEMADI, Hossein; PLIEGER, Paul G. Magnetic fluid hyperthermia based on magnetic nanoparticles: Physical characteristics, historical perspective, clinical trials, technological challenges, and recent advances. **Advanced Therapeutics**, [S. l.], v. 3, n. 11, 2020. DOI: 10.1002/adtp.202000061.

FARZIN, Ali; ETESAMI, Seyed Alireza; QUINT, Jacob; MEMIC, Adnan; TAMAYOL, Ali. Magnetic Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. **Advanced Healthcare Materials**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 1–29, 2020. DOI: 10.1002/adhm.201901058.

FERREIRA, M. A. D.; DO NASCIMENTO, N. R. F.; DE SOUSA, C. M.; PESSOA, O.

D. L.; DE LEMOS, T. L. G.; VENTURA, J. S.; SCHATTNER, M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Oncocalyxone A inhibits human platelet aggregation by increasing cGMP and by binding to GP Ib $\alpha$  glycoprotein. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 154, n. 6, p. 1216–1224, 2008. DOI: 10.1038/bjp.2008.199.

FERREIRA, M. A. D.; NUNES, Osmar D. R. H.; FONTENELE, Juvenia B.; PESSOA, Otilia D. L.; LEMOS, Telma L. G.; VIANA, Glauce S. B. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from Auxemma oncocalyx. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 315–322, 2004. DOI: 10.1078/0944711041495227.

FICHTER, Michael; BAIER, Grit; DEDTERS, Marvin; PRETSCH, Leah; PIETRZAK-NGUYEN, Anette; LANDFESTER, Katharina; GEHRING, Stephan. Nanocapsules generated out of a polymeric dexamethasone shell suppress the inflammatory response of liver macrophages. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 1223–1234, 2013. DOI: 10.1016/j.nano.2013.05.005.

GAO, Xin; LI, Lin; CAI, Xiaopan; HUANG, Quan; XIAO, Jianru; CHENG, Yiyun. Targeting nanoparticles for diagnosis and therapy of bone tumors: Opportunities and challenges. **Biomaterials**, [S. l.], v. 265, n. September 2020, p. 120404, 2021. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120404.

GOI, Universidade Federal D. E.; VETERIN, Escola D. E.; DE, Zootecnia Programa; CI, E. M.; ANIMAL, Ncia; ANDR, Thiago; ORIENTADOR, Carreo Costa; CARLOS, Juan; MORENO, Duque. Ressuscitação volêmica com diferentes soluções em modelo murino de choque hemorrágico. [S. l.], 2015.

GRATIERI, Taís; ALBERTI, Ingo; LAPTEVA, Maria; KALIA, Yogeshvar N. Next generation intra- and transdermal therapeutic systems: Using non- and minimally-invasive technologies to increase drug delivery into and across the skin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 50, n. 5, p. 609–622, 2013. DOI: 10.1016/j.ejps.2013.03.019.

GREWAL, Ikmeet Kaur; SINGH, Sukhbir; ARORA, Sandeep; SHARMA, Neelam. Polymeric nanoparticles for breast cancer therapy: A comprehensive review. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 11151–11171, 2021. DOI: 10.33263/BRIAC114.1115111171.

HADADIAN, Yaser; ULIANA, Joao H.; CARNEIRO, Antonio A. O.; PAVAN, Theo Z. A Novel Theranostic Platform: Integration of Magnetomotive and Thermal Ultrasound Imaging with Magnetic Hyperthermia. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 68–77, 2021. DOI: 10.1109/TBME.2020.2990873.

HADJ-HAMOU, Assia Siham; MATASSI, Sabiha; ABDERRAHMANE, Habi; YAHIAOUI, Farida. Effect of cloisite 30B on the thermal and tensile behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate)/poly(vinyl chloride) nanoblends. **Polymer Bulletin**, [S. l.], v. 71, n. 6, p. 1483–1503, 2014. DOI: 10.1007/s00289-014-1137-y.

HIGUCHI T. Mechanism of Sustained- Action Medication. **Journal of pharmaceutical sciences**, [S. l.], v. 52, p. 1145–1149, 1963.



HITOSUGI, Takashi; SAITO, Toshiyuki; SUZUKI, Sono; KUBOTA, Ieko; SHODA, Emi; SHIMIZU, Toru; OI, Yoshiyuki. Hydroxyethyl starch: The effect of molecular weight and degree of substitution on intravascular retention in vivo. **Anesthesia and Analgesia**, [S. l.], v. 105, n. 3, p. 724–728, 2007. DOI: 10.1213/01.ane.0000275198.84094.ad.

HRDINA, Amy; LAI, Edward; LI, Chunsheng; SADI, Baki; KRAMER, Gary. A comparative study of magnetic transferability of superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [S. l.], v. 322, n. 17, p. 2622–2627, 2010. DOI: 10.1016/j.jmmm.2010.03.031.

HUANG, Shi Ying et al. A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 8, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0104414.

HUI, Chao; SHEN, Chengmin; YANG, Tianzhong; BAO, Lihong; TIAN, Jifa; DING, Hao; LI, Chen; GAO, H. J. Large-scale Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles soluble in water synthesized by a facile method. **Journal of Physical Chemistry C**, [S. l.], v. 112, n. 30, p. 11336–11339, 2008. DOI: 10.1021/jp801632p.

ILG, Patrick. Diffusion-jump model for the combined Brownian and Néel relaxation dynamics of ferrofluids in the presence of external fields and flow. **Physical Review E**, [S. l.], v. 100, n. 2, p. 22608, 2019. DOI: 10.1103/PhysRevE.100.022608.

JAIN, Vijay Prakash; CHAUDHARY, Shivani; SHARMA, Deepa; DABAS, Neeru; LALJI, Ram Sunil Kumar; SINGH, Brajendra Kumar; JAISWAR, Gautam. Advanced functionalized nanographene oxide as a biomedical agent for drug delivery and anti-cancerous therapy: A review. **European Polymer Journal**, [S. l.], v. 142, n. November 2020, p. 110124, 2021. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.110124.

JI, Chendong; CHENG, Wenyu; HU, Yiseng; LIU, Yunfang; LIU, Fengyong; YIN, Meizhen. A nano vector with photothermally enhanced drug release and retention to overcome cancer multidrug resistance. **Nano Today**, [S. l.], v. 36, p. 101020, 2021. DOI: 10.1016/j.nantod.2020.101020.

JIA, Chunyan; DEACON, Glen B.; ZHANG, Yingjie; GAO, Chuanzhu. Platinum(IV) antitumor complexes and their nano-drug delivery. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 429, p. 213640, 2021. DOI: 10.1016/j.ccr.2020.213640.

JIANG, Wen; VON ROEMELING, Christina A.; CHEN, Yuanxin; QIE, Yaqing; LIU, Xiujie; CHEN, Jianzhu; KIM, Betty Y. S. Designing nanomedicine for immunoncology. **Nature Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 1–11, 2017. DOI: 10.1038/s41551-017-0029.

KANDEKAR, Somnath G.; DEL RÍO-SANCHO, Sergio; LAPTEVA, Maria; KALIA, Yogeshvar N. Selective delivery of adapalene to the human hair follicle under finite dose conditions using polymeric micelle nanocarriers. **Nanoscale**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 1099–1110, 2018. DOI: 10.1039/c7nr07706h.

KANG, Biao et al. Tailoring the stealth properties of biocompatible polysaccharide nanocontainers. **Biomaterials**, [S. l.], v. 49, p. 125–134, 2015. DOI:

10.1016/j.biomaterials.2015.01.042.

KANOJIA, Neha; SINGH, Sukhbir; SINGH, Jitender; SHARMA, Neelam; GREWAL, Ajmer Singh; RANI, Lata; THAPA, Komal; ARORA, Sandeep. Recent advancements and applications of inhalable microparticles based drug delivery systems in respiratory disorders. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [*S. l.*], v. 11, n. 3, p. 10099–10118, 2020. DOI: 10.33263/BRIAC113.1009910118.

KHAN, Ferdous; AHMAD, Sheikh Rafi. Polysaccharides and Their Derivatives for Versatile Tissue Engineering Application. **Macromolecular Bioscience**, [*S. l.*], v. 13, n. 4, p. 395–421, 2013. DOI: 10.1002/mabi.201200409.

KILICARISLAN OZKAN, Cigdem; OZGUNAY, Hasan; AKAT, Hakan. Possible use of corn starch as tanning agent in leather industry: Controlled (gradual) degradation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*S. l.*], v. 122, p. 610–618, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.217.

KRASKOUSKI, Aliaksandr; HILEUSKAYA, Kseniya; LADUTSKA, Alena; KABANAVA, Volha; LIUBIMAU, Aliaksandr; NOVIK, Galina; NHI, Tran Thi Y.; AGABEKOV, Vladimir. Multifunctional biocompatible films based on pectin-Ag nanocomposites and PVA: Design, characterization and antimicrobial potential. **Journal of Applied Polymer Science**, [*S. l.*], n. March, p. 2–6, 2022. DOI: 10.1002/app.53023.

KUMAR, Manish; BISHNOI, Ram Singh; SHUKLA, Ajay Kumar; JAIN, Chandra Prakash. Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review. **Preventive Nutrition and Food Science**, [*S. l.*], v. 24, n. 3, p. 225–234, 2019. DOI: 10.3746/pnf.2019.24.3.225.

KUMAR, Sunny; ALI FARIDI, Md Rashid; DASMAHAPATRA, Ashok Kumar; BANDYOPADHYAY, Dipankar. Magnetic field induced push-pull motility of liquibots. **RSC Advances**, [*S. l.*], v. 6, n. 108, p. 107049–107056, 2016. DOI: 10.1039/c6ra20948c.

LAPTEVA, Maria; MIGNOT, Margaux; MONDON, Karine; MÖLLER, Michael; GURNY, Robert. Self-assembled mPEG-hexPLA polymeric nanocarriers for the targeted cutaneous delivery of imiquimod. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [*S. l.*], v. 142, n. September 2018, p. 553–562, 2019. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.01.008.

LAPTEVA, Maria; MÖLLER, Michael; GURNY, Robert; KALIA, Yogeshvar N. Self-assembled polymeric nanocarriers for the targeted delivery of retinoic acid to the hair follicle. **Nanoscale**, [*S. l.*], v. 7, n. 44, p. 18651–18662, 2015. DOI: 10.1039/c5nr04770f.

LAPTEVA, Maria; MONDON, Karine; MÖLLER, Michael; GURNY, Robert; KALIA, Yogeshvar N. Polymeric micelle nanocarriers for the cutaneous delivery of tacrolimus: A targeted approach for the treatment of psoriasis. **Molecular Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 11, n. 9, p. 2989–3001, 2014. DOI: 10.1021/mp400639e.

LAPTEVA, Maria; SALLAM, Marwa A.; GOYON, Alexandre; GUILLARME, Davy; VEUTHEY, Jean Luc; KALIA, Yogeshvar N. Non-invasive targeted iontophoretic delivery of cetuximab to skin. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [*S. l.*], v. 17, n. 4, p. 589–602, 2020. DOI: 10.1080/17425247.2020.1731470.

LATHA, S.; SELVAMANI, P.; SUGANYA, G.; THIMIRI GOVINDA RAJ, Deepak B.; PAL, T. K. Preparation and In-vitro Evaluation of Pantoprazole Sodium Magnetic Microspheres by Emulsion Solvent Evaporation Method. **BioNanoScience**, [S. l.], p. 4–8, 2021. DOI: 10.1007/s12668-021-00837-2.

LAURENT, Sophie; DUTZ, Silvio; HÄFELI, Urs O.; MAHMOUDI, Morteza. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 166, n. 1–2, p. 8–23, 2011. DOI: 10.1016/j.cis.2011.04.003.

LI, Qing; KARTIKOWATI, Christina W.; HORIE, Shinji; OGI, Takashi; IWAKI, Toru; OKUYAMA, Kikuo. Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–4, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-09897-5.

LI, Xiuying et al. Magnetic targeting enhances the cutaneous wound healing effects of human mesenchymal stem cell-derived iron oxide exosomes. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1186/s12951-020-00670-x.

LI, Yang; ZHOU, Yiming; YUE, Xiuli; DAI, Zhifei. Cyanine conjugates in cancer theranostics. **Bioactive Materials**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 794–809, 2021. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2020.09.009.

LINDEMANN, Max C.; LUTTKE, Till; NOTTRODT, Nadine; SCHMITZ-RODE, Thomas; SLABU, Ioana. FEM based simulation of magnetic drug targeting in a multibranch vessel model. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, [S. l.], v. 210, p. 106354, 2021. DOI: 10.1016/j.cmpb.2021.106354.

LUQUE-MICHEL, Edurne; LEMAIRE, Laurent; BLANCO-PRIETO, Maria J. SPION and doxorubicin-loaded polymeric nanocarriers for glioblastoma theranostics. **Drug Delivery and Translational Research**, [S. l.], n. 0123456789, 2021. DOI: 10.1007/s13346-020-00880-8.

MAKWANA, Vivek; KARANJIA, Jasmine; HASELHORST, Thomas; ANOOPKUMAR-DUKIE, Shailendra; RUDRAWAR, Santosh. Liposomal doxorubicin as targeted delivery platform: Current trends in surface functionalization. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 593, n. November 2020, p. 120117, 2021. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120117.

MARTO, J. et al. Starch nanocapsules containing a novel neutrophil elastase inhibitor with improved pharmaceutical performance. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 127, n. November 2017, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.01.011.

MENEZES, Regina et al. Bioprospection of natural sources of polyphenols with therapeutic potential for redox-related diseases. **Antioxidants**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 1–24, 2020. DOI: 10.3390/antiox9090789.

MENG, Qingye; ZHONG, Shuangling; XU, Lifeng; WANG, Jingfei; ZHANG, Zhenqian; GAO, Yan; CUI, Xuejun. Review on design strategies and considerations of

polysaccharide-based smart drug delivery systems for cancer therapy. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 279, n. December 2021, p. 119013, 2022. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.119013.

MILLIKAN, L. E. Adapalene: An update on newer comparative studies between the various retinoids. **International Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 39, n. 10, p. 784–788, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-4362.2000.00050.x.

MOGHADAM ZIABARI, Seyed Ashkan; BABAMORADI, Mohsen; HAJIZADEH, Zoleikha; MALEKI, Ali. The effect of magnetic field on the magnetic and hyperthermia properties of bentonite/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite. **Physica B: Condensed Matter**, [S. l.], v. 588, p. 456–464, 2020. DOI: 10.1016/j.physb.2020.412167.

MOODLEY, Thashini; SINGH, Moganavelli. Polymeric mesoporous silica nanoparticles for combination drug delivery in vitro. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 11905–11919, 2021. DOI: 10.33263/BRIAC114.1190511919.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 2010. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.10.018.

MOSIVAND, Saba. Effect of mineral additives on magnetite nanoparticles prepared in an electrolytic cell. **Advanced Powder Technology**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 432–444, 2021. DOI: 10.1016/j.appt.2020.12.020.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MURTHY, S. Narasimha; SAMMETA, Srinivasa M.; BOWERS, C. Magnetophoresis for enhancing transdermal drug delivery: Mechanistic studies and patch design. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 148, n. 2, p. 197–203, 2010. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.08.015.

NIGAM, Saumya; BAHADUR, D. Doxorubicin-loaded dendritic-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> supramolecular nanoparticles for magnetic drug targeting and tumor regression in spheroid murine melanoma model. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 759–768, 2018. DOI: 10.1016/j.nano.2018.01.005.

NIKOLIĆ, Ines; SIMIĆ, Mitar; PANTELIĆ, Ivana; STOJANOVIĆ, Goran; STANKOVIĆ, Jelena Antić; MARKOVIĆ, Bojan; SAVIĆ, Snežana. Chemical vs. Physical Methods to Improve Dermal Drug Delivery: A Case Study with Nanoemulsions and Iontophoresis. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 14, n. 6, 2022. DOI: 10.3390/pharmaceutics14061144.

NOVAL, Virginia E.; CARRIAZO, Jose G. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> Core-shell Powders Synthesized from Industrially Processed Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Microparticles. [S. l.], v. 22, n. 3, 2019.

OTBERG, Nina; PATZELT, Alexa; RASULEV, Utkur; HAGEMEISTER, Timo; LINSCHIED, Michael; SINKGRAVEN, Ronald; STERRY, Wolfram; LADEMANN,

Jürgen. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 488–492, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2007.03065.x.

PADYA, Bharath Singh; PANDEY, Abhijeet; PISAY, Muralidhar; KOTESHWARA, K. B.; CHANDRASHEKHAR HARIHARAPURA, Raghu; BHAT, Kuruveri Udaya; BISWAS, Swati; MUTALIK, Srinivas. Stimuli-responsive and cellular targeted nanoplatforms for multimodal therapy of skin cancer. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 890, n. September 2020, p. 173633, 2021. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173633.

PALEOS, Constantinos M.; SIDERATOU, Zili; TSIOURVAS, Dimitris. Drug Delivery Systems Based on Hydroxyethyl Starch. **Bioconjugate Chemistry**, [S. l.], v. 28, n. 6, p. 1611–1624, 2017. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00186.

PANG, Yichuan et al. Inhibition of furin by bone targeting superparamagnetic iron oxide nanoparticles alleviated breast cancer bone metastasis. **Bioactive Materials**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 712–720, 2021. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2020.09.006.

PAREDES-GARCÍA, Verónica; TOLEDO, Néstor; DENARDIN, Juliano; VENEGAS-YAZIGI, Diego; CRUZ, Carlos; SPODINE, Evgenia; LUO, Zhiping. One pot Solvothermal synthesis of organic acid coated magnetic iron oxide Nanoparticles. **Journal of the Chilean Chemical Society**, [S. l.], v. 58, n. 4, p. 2011–2015, 2013. DOI: 10.4067/S0717-97072013000400023.

PASTORE, Michael N.; KALIA, Yogeshvar N.; HORSTMANN, Michael; ROBERTS, Michael S. Transdermal patches: History, development and pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 172, n. 9, p. 2179–2209, 2015. DOI: 10.1111/bph.13059.

PATZELT, Alexa; LADEMANN, Juergen. Recent advances in follicular drug delivery of nanoparticles. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 49–60, 2020. DOI: 10.1080/17425247.2020.1700226.

PEREIRA, Stéfano A. et al. Hydroxyethyl starch nanocapsules by multiple nanoemulsions for carrying and controlled release of lapachol. **Materials Letters**, [S. l.], v. 274, p. 1–3, 2020. DOI: 10.1016/j.matlet.2020.127983.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; LEMOS, T. L. G.; WETMORE, L. A.; MORAES, M. O.; LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. **Phytotherapy Research**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 187–191, 2000. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1573(200005)14:3<187::AID-PTR572>3.0.CO;2-I.

PRAMANIK, Sumit Kumar; SENECA, Senne; PETERS, Martijn; D'OLIESLAEGER, Lien; REEKMANS, Gunter; VANDERZANDE, Dirk; ADRIAENSENS, Peter; ETHIRAJAN, Anitha. Morphology-dependent pH-responsive release of hydrophilic payloads using biodegradable nanocarriers. **RSC Advances**, [S. l.], v. 8, n. 64, p. 36869–36878, 2018. DOI: 10.1039/C8RA07066K.

QU, Fei; GENG, Rui; LIU, Yijing; ZHU, Jintao. Advanced nanocarrier- and microneedle-based transdermal drug delivery strategies for skin diseases treatment. **Theranostics**, [S.

*l.*, v. 12, n. 8, p. 3372–3406, 2022. DOI: 10.7150/thno.69999. Disponível em: 10.7150/thno.69999.

QUARTIER, Julie; LAPTEVA, Maria; BOULAGUIEM, Younes; GUERRIER, Stéphane; KALIA, Yogeshvar N. Polymeric micelle formulations for the cutaneous delivery of sirolimus: A new approach for the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis complex. **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 604, 2021. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120736.

RAMAZANOV, Mahammadali; KARIMOVA, Aynura; SHIRINOVA, Habiba. Magnetism for drug delivery, mri and hyperthermia applications: A review. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [*S. l.*], v. 11, n. 2, p. 8654–8668, 2021. DOI: 10.33263/BRIAC112.86548668.

RAO, Yue Feng et al. Epirubicin-loaded superparamagnetic iron-oxide nanoparticles for transdermal delivery: Cancer therapy by circumventing the skin barrier. **Small**, [*S. l.*], v. 11, n. 2, p. 239–247, 2015. DOI: 10.1002/smll.201400775.

REBEKAH, A.; SIVASELVAM, S.; VISWANATHAN, C.; PRABHU, D.; GAUTAM, Ravi; PONPANDIAN, N. Magnetic nanoparticle-decorated graphene oxide-chitosan composite as an efficient nanocarrier for protein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [*S. l.*], v. 610, n. November 2020, p. 125913, 2021. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2020.125913.

RIOUX, Jean Philippe; LESSARD, Myriam; DE BORTOLI, Bruno; ROY, Patrick; ALBERT, Martin; VERDANT, Colin; MADORE, François; TROYANOV, Stéphan. Pentastarch 10% (250 kDa/0.45) is an independent risk factor of acute kidney injury following cardiac surgery. **Critical Care Medicine**, [*S. l.*], v. 37, n. 4, p. 1293–1298, 2009. DOI: 10.1097/CCM.0b013e31819cc1a0.

SANDLER, Sarah E.; FELLOWS, Benjamin; THOMPSON MEFFORD, O. Best Practices for Characterization of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. **Analytical Chemistry**, [*S. l.*], v. 91, n. 22, p. 14159–14169, 2019. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b03518.

SHEN, Ben. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, [*S. l.*], v. 163, n. 6, p. 1297–1300, 2015. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.031.

SHUKLA, Snehal K.; GUPTA, Vivek. Utilizing nanotechnology to recuperate sorafenib for lung cancer treatment: Challenges and future perspective. **Therapeutic Delivery**, [*S. l.*], v. 11, n. 4, p. 213–215, 2020. DOI: 10.4155/tde-2019-0098.

SILVA, Larissa Morais Ribeiro Da et al. Graviola Fruit Bar Added Acerola By-Product Extract Protects Against Inflammation and Nociception in Adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Medicinal Food**, [*S. l.*], v. 23, n. 2, p. 173–180, 2020. DOI: 10.1089/jmf.2019.0078.

SILVA, Francisco; CAMPELLO, Maria Paula Cabral; PAULO, António. Radiolabeled gold nanoparticles for imaging and therapy of cancer. **Materials**, [*S. l.*], v. 14, n. 1, p. 1–32, 2021. DOI: 10.3390/ma14010004.

SINGH, Yuvraj; MEHER, Jaya Gopal; RAVAL, Kavita; KHAN, Farooq Ali; CHAURASIA, Mohini; JAIN, Nitin K.; CHOURASIA, Manish K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 252, p. 28–49, 2017. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.03.008.

SINGHAL, Mayank; JIMENEZ, César E. S.; LAPTEVA, Maria; KALIA, Yogeshvar N. Transdermal medical devices: Formulation aspects. **Innovative Dosage Forms: Design and Development at Early Stage**, [S. l.], p. 245–279, 2019. DOI: 10.1002/9783527812172.ch8.

SLAVOV, L.; ABRASHEV, M. V.; MERODIISKA, T.; GELEV, Ch; VANDENBERGHE, R. E.; MARKOVA-DENEVA, I.; NEDKOV, I. Raman spectroscopy investigation of magnetite nanoparticles in ferrofluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [S. l.], v. 322, n. 14, p. 1904–1911, 2010. DOI: 10.1016/j.jmmm.2010.01.005.

SOARES, Daniel Cristian Ferreira; ARRIBADA, Raquel Gregorio; DE BARROS, Andre Luis Branco; TEBALDI, Marli Luiza. Polymeric nanoblends compatibilization: a strategic design to enhance the effectiveness of nanocarriers for biomedical applications. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, [S. l.], v. 69, n. 9, p. 567–579, 2020. DOI: 10.1080/00914037.2019.1581779.

SOLEIMANI, Anvar; MIRZAVI, Farshad; NIKOOFAL-SAHLABADI, Sara; NIKPOOR, Amin Reza; TAGHIZADEH, Bitia; BARATI, Mehdi; SOUKHTANLOO, Mohammad; JAAFARI, Mahmoud Reza. CD73 downregulation by EGFR-targeted liposomal CD73 siRNA potentiates antitumor effect of liposomal doxorubicin in 4T1 tumor-bearing mice. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–17, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-14392-7.

SOLEIMANI, Khadijeh; ARKAN, Elham; DERAKHSHANKHAH, Hossein; HAGHSHENAS, Babak; JAHANBAN-ESFAHLAN, Rana; JAYMAND, Mehdi. A novel bio-reducible and pH-responsive magnetic nanohydrogel based on  $\beta$ -cyclodextrin for chemo/hyperthermia therapy of cancer. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 252, n. September 2020, p. 117229, 2021. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117229.

STEINMACHER, Fernanda R.; BAIER, Grit; MUSYANOVYCH, Anna; LANDFESTER, Katharina; ARAÚJO, Pedro H. H.; SAYER, Claudia. Design of cross-linked starch nanocapsules for enzyme-triggered release of hydrophilic compounds. **Processes**, [S. l.], v. 5, n. 2, 2017. DOI: 10.3390/pr5020025.

SU, Peng; REN, Chunhui; FU, Yusheng; GUO, Jinhong; GUO, Jiuchuan; YUAN, Qi. Magnetophoresis in microfluidic lab: Recent advance. [S. l.], v. 332, 2021. DOI: 10.1016/j.sna.2021.113180.

SUN, Tao; DASGUPTA, Anshuman; ZHAO, Zongmin; NURUNNABI, Md; MITRAGOTRI, Samir. Physical triggering strategies for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 158, p. 36–62, 2020. DOI: 10.1016/j.addr.2020.06.010.

TAHERI, Shima; BAIER, Grit; MAJEWSKI, Peter; BARTON, Mary; FÖRCH, Renate; LANDFESTER, Katharina; VASILEV, Krasimir. Synthesis and antibacterial properties of a hybrid of silver-potato starch nanocapsules by miniemulsion/polyaddition

polymerization. **Journal of Materials Chemistry B**, [*S. l.*], v. 2, n. 13, p. 1838–1845, 2014. DOI: 10.1039/c3tb21690j.

TAVARES, Cybelle Alves; XAVIER-JÚNIOR, Francisco Humberto; PESSOA, Otilia Deusdênia Loiola; XIMENES, Rafael Matos; SANTOS-MAGALHÃES, Nereide Stela. Validation of an HPLC–UV Method for Quantifying Oncocalyxone A in Different Media and Nanocapsules. **Chromatographia**, [*S. l.*], v. 82, n. 5, p. 809–818, 2019. DOI: 10.1007/s10337-019-03716-x.

TESTER, Richard F.; KARKALAS, John; QI, Xin. Starch - Composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, [*S. l.*], v. 39, n. 2, p. 151–165, 2004. DOI: 10.1016/j.jcs.2003.12.001.

TOLBA, M. M.; EL-GAMAL, R. M. Determination of adapalene in gel formulation by conventional and derivative synchronous fluorimetric approaches. Application to stability studies and in vitro diffusion test. **Chemistry Central Journal**, [*S. l.*], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2016. DOI: 10.1186/S13065-016-0181-0.

TORLOPOV, Mikhail A.; DROZD, Natalia N.; TARABUKIN, Dmitriy V.; UDORATINA, Elena V. Synthesis and hemocompatibility of amino (di-)butyldeoxy modified hydroxyethyl starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*S. l.*], v. 145, p. 936–943, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.184.

VON ROTEN, I.; MADJDPOUR, C.; FRASCAROLO, P.; BURMEISTER, M. A.; FISCH, A.; SCHRAMM, S.; BOMBELI, T.; SPAHN, Donat R. Molar substitution and C2/C6 ratio of hydroxyethyl starch: Influence on blood coagulation. **British Journal of Anaesthesia**, [*S. l.*], v. 96, n. 4, p. 455–463, 2006. DOI: 10.1093/bja/ael019.

WANG, Hao; XU, Yongdong; ZHOU, Xiao. Docetaxel-loaded chitosan microspheres as a lung targeted drug delivery system: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Molecular Sciences**, [*S. l.*], v. 15, n. 3, p. 3519–3532, 2014. DOI: 10.3390/ijms15033519.

WANG, Huimin; HU, Hang; YANG, Hai; LI, Zifu. Hydroxyethyl starch based smart nanomedicine. **RSC Advances**, [*S. l.*], v. 11, n. 6, p. 3226–3240, 2021. DOI: 10.1039/d0ra09663f.

WANG, Yinghui; SONG, Shuyan; ZHANG, Songtao; ZHANG, Hongjie. Stimuli-responsive nanotheranostics based on lanthanide-doped upconversion nanoparticles for cancer imaging and therapy: current advances and future challenges. **Nano Today**, [*S. l.*], v. 25, p. 38–67, 2019. DOI: 10.1016/j.nantod.2019.02.007.

WEINER, Norman. Targeted follicular delivery of macromolecules via liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 162, n. 1–2, p. 29–38, 1998. DOI: 10.1016/s0378-5173(97)00409-2.

WU, Changqiang; ZHU, Wencheng; JIN, Rongrong; AI, Hua; XU, Ye. The MRI-Visible Nanocomposite Facilitates the Delivery and Tracking of siRNA Loaded DC Vaccine in the Breast Cancer Model. **Frontiers in Oncology**, [*S. l.*], v. 10, n. February, p. 1–12, 2021. DOI: 10.3389/fonc.2020.621642.



XAVIER-JÚNIOR, F. H.; TAVARES, C. T.; RABELLO, M. M.; HERNANDES, M. Z.; BEZERRA, B. P.; AYALA, A. P.; PESSOA, O. D. L.; XIMENES, R. M.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Elucidation of the mechanism of complexation between onococalyxone A and cyclodextrins by isothermal titration calorimetry and molecular modeling. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 274, p. 165–172, 2019. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.10.129.

XU, Lifeng; ZHONG, Shuangling; SHI, Chao; SUN, Yuexin; ZHAO, Shengnan; GAO, Yan; CUI, Xuejun. Sonochemical fabrication of reduction-responsive magnetic starch-based microcapsules. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 49, n. March, p. 169–174, 2018. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2018.07.047.

YAN, Fanyong; FAN, Keqing; BAI, Zhangjun; ZHANG, Ruiqi; ZU, Fanlin; XU, Jinxia; LI, Xiang. Fluorescein applications as fluorescent probes for the detection of analytes. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 97, p. 15–35, 2017. DOI: 10.1016/j.trac.2017.08.013.

YANG, Rong; WEI, Tuo; GOLDBERG, Hannah; WANG, Weiping; CULLION, Kathleen; KOHANE, Daniel S. Getting Drugs Across Biological Barriers. **Advanced Materials**, [S. l.], v. 29, n. 37, 2017. DOI: 10.1002/adma.201606596.

YU, Mengting; JI, Na; WANG, Yanfei; DAI, Lei; XIONG, Liu; SUN, Qingjie. Starch-based nanoparticles: Stimuli responsiveness, toxicity, and interactions with food components. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1075–1100, 2021. a. DOI: 10.1111/1541-4337.12677.

YU, Xiang; WANG, Lichen; LI, Kai; MI, Yan; LI, Zhengrui; WU, Di'an; SUN, Fan; HE, Shuli; ZENG, Hao. Tuning dipolar effects on magnetic hyperthermia of Zn<sub>0.3</sub>Fe<sub>2.7</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanoparticles by silica shell. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [S. l.], v. 521, n. September 2020, p. 1–7, 2021. b. DOI: 10.1016/j.jmmm.2020.167483.

ZHANG, Jieyu; XU, Hongping; HU, Ling; YANG, Yao; LI, Houbin; HUANG, Chi; LIU, Xinghai. Novel Waterborne UV-Curable Hyperbranched Polyurethane Acrylate/Silica with Good Printability and Rheological Properties Applicable to Flexographic Ink. **ACS Omega**, [S. l.], v. 2, n. 11, p. 7546–7558, 2017. DOI: 10.1021/acsomega.7b00939.

ZHANG, Xiaorui; CHEN, Lan; LIU, Renxiao; LI, Dexing; GE, Xiujie; GE, Guanglu. The Role of the OH Group in Citric Acid in the Coordination with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. **Langmuir**, [S. l.], 2019. a. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b00208.

ZHANG, Xiaorui; CHEN, Lan; LIU, Renxiao; LI, Dexing; GE, Xiujie; GE, Guanglu. The Role of the OH Group in Citric Acid in the Coordination with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. **Langmuir**, [S. l.], v. 7, p. 3–10, 2019. b. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b00208.

ZHANG, Xuejing; NIU, Shiwei; WILLIAMS, Gareth R.; WU, Jianrong; CHEN, Xia; ZHENG, Hong; ZHU, Li Min. Dual-responsive nanoparticles based on chitosan for enhanced breast cancer therapy. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 221, n. December 2018, p. 84–93, 2019. c. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.05.081.

ZHAO, Changhong; SONG, Xuebin; JIN, Weiguang; WU, Fan; ZHANG, Qicheng; ZHANG, Ming; ZHOU, Ninglin; SHEN, Jian. Image-guided cancer therapy using aptamer-functionalized cross-linked magnetic-responsive Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@carbon nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 1056, p. 108–116, 2019. DOI: 10.1016/j.aca.2018.12.045.

ZHAO, Kai et al. Fluorescence turn-off magnetic COF composite as a novel nanocarrier for drug loading and targeted delivery. **Microporous and Mesoporous Materials**, [S. l.], v. 311, n. October 2020, p. 110713, 2021. DOI: 10.1016/j.micromeso.2020.110713.

ZHAO, Kaidong; LI, Di; XU, Weiguo; DING, Jianxun; JIANG, Weiqian; LI, Mingqiang; WANG, Chunxi; CHEN, Xuesi. Targeted hydroxyethyl starch prodrug for inhibiting the growth and metastasis of prostate cancer. **Biomaterials**, [S. l.], v. 116, p. 82–94, 2017. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.11.030.

ZOABI, Amani; TOUITOU, Elka; MARGULIS, Katherine. Recent Advances in Nanomaterials for Dermal and Transdermal Applications. **Colloids and Interfaces**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 18, 2021. DOI: 10.3390/colloids5010018.

ZUVIN, Merve; KOÇAK, Muhammed; ÜNAL, Özlem; AKKOÇ, Yunus; KUTLU, Özlem; YAĞCI ACAR, Havva; GÖZÜAÇIK, Devrim; KOŞAR, Ali. Nanoparticle based induction heating at low magnitudes of magnetic field strengths for breast cancer therapy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [S. l.], v. 483, n. August 2018, p. 169–177, 2019. DOI: 10.1016/j.jmmm.2019.03.117.