

PUCRS

ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
MESTRADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

LUIZA ALBAN

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NANOTUBOS DE
TITANATOS MODIFICADOS COM QUERCETINA EM CÂNCER DE BEXIGA**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL
DE NANOTUBOS DE TITANATOS MODIFICADOS COM
QUERCETINA EM CÂNCER DE BEXIGA**

Luisa Alban

Engenheira Química

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA
E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

Agosto, 2018



DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NANOTUBOS DE TITANATOS MODIFICADOS COM QUERCETINA EM CÂNCER DE BEXIGA

Luisa Alban

Engenheira Química

ORIENTADOR: PROF(a). DR(a). Rosane Ligabue

Dissertação realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre/Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Agosto, 2018**

Ficha Catalográfica

A326d Alban, Luisa

Desenvolvimento e avaliação da atividade antitumoral de nanotubos de titanatos modificados com quercetina em câncer de bexiga / Luisa Alban . – 2018.

92.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Angélica Ligabue.

1. Nanotubos de titanatos. 2. Quercetina. 3. Atividade antitumoral. 4. Câncer de bexiga. I. Ligabue, Rosane Angélica. II. Título.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE NANOTUBOS DE TITANATOS
MODIFICADOS COM QUERCETINA EM CÂNCER DE BEXIGA**

CANDIDATA: LUISA ALBAN

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE - ORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA

DRA. ANGÉLICA REGINA CAPPELLARI - INSTITUTO DE TOXICOLOGIA E FARMACOLOGIA - PUCRS

DRA. MÁRA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA - PUCRS

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 32 - Sala 505 - CEP: 90619-900
Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625
E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br
www.pucrs.br/politecnica

*Quando alimentamos mais a
nossa coragem do que os nossos
medos, passamos a derrubar
muros e a construir pontes.*

(Lígia Guerra)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os envolvidos na construção do mesmo.

AGRADECIMENTOS

À orientadora Professora Rosane Ligabue pela atenção e dedicação constante mesmo frente a inúmeras funções.

À minha mãe por me encorajar e apoiar em todos os momentos da vida.

Ao colega Wesley Monteiro pela idealização do projeto e incentivo em todas as etapas do mesmo.

Ao colega Fernando Diz pelo apoio em todas as etapas do projeto, especialmente com os ensaios biológicos, pelas conversas e conselhos.

À colega e amiga Gabriela Messias pelas valiosas contribuições e suporte ao longo do desenvolvimento do mestrado e na vida.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À toda a equipe do Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM).

Ao Laboratório de Farmacologia Aplicada (LAFAP) da Escola de Ciências (PUCRS).

Ao setor de radiologia do Hospital São Lucas.

A todos que auxiliaram e contribuíram de alguma forma para a construção deste trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	7
AGRADECIMENTOS	8
SUMÁRIO	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE QUADROS	14
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	15
LISTA DE UNIDADES	16
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos Específicos	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1. Materiais Nanoestruturados	22
3.1.1. Nanotubos de titanatos	22
3.1.2. Nanotubos de titanatos no tratamento de cânceres	27
3.2. Flavonoides	28
3.2.1. Quercetina	29
3.2.1.1. Nanoestruturas carregadas com quercetina	32
3.2.1.2. Complexação de quercetina e metais.....	39
3.3. Câncer de Bexiga	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1. Síntese de nanoestruturas	48
4.1.1. Síntese de nanotubos de titanatos	48
4.1.2. Preparação de nanotubos com Zinco	49
4.1.3. Incorporação da Quercetina nos nanotubos de titanatos	50
4.2. Técnicas de Caracterização	50
4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)..	50

4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV- FEG)	51
4.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	51
4.2.4. Difração de Raios X (DRX)	51
4.2.5. Análise Termogravimétrica (TGA).....	52
4.3. Ensaio de liberação controlada	52
4.4. Avaliação das Propriedades Biológicas	53
4.4.1. Cultura e Manutenção das Células	53
4.4.2. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)	54
4.4.3. Avaliação da Citotoxicidade combinada com Irradiação.....	55
4.4.3.1. Contagem Celular	56
4.4.3.2. Ensaio Clonogênico	56
4.4.4. Análise Estatística.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
5.1. Caracterização de nanoestruturas de TNT e TNTQc.....	58
5.1.1. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)..	58
5.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV- FEG)	60
5.1.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	62
5.1.4. Difração de Raios X (DRX)	63
5.1.5. Análise Termogravimétrica (TGA).....	64
5.2. Ensaio de liberação controlada	66
5.3. Avaliação das Propriedades Biológicas	67
5.3.1. Ensaio de Viabilidade celular (MTT)	67
5.3.2. Avaliação da Citotoxicidade combinada com Irradiação.....	72
5.3.2.1. Contagem celular.....	72
5.3.2.2. Ensaio Clonogênico	74
6. CONCLUSÕES	78
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Formação de TNT a) superfície de $H_2Ti_3O_7$ em contato com íons OH^- e Na^+ b) íons H^+ carregados por OH^- , formando H_2O c) perda de H^+ formando TNTs. Adaptado de Zhang et al. (2003).....24
- Figura 3.2. Imagens para nanotubos de titanatos obtida por Sipos et al. (2017) por a) MET b) MEV.....25
- Figura 3.3. Imagens de MET obtida por Sallem et al. (2017) para a) TNTs b) TNTs funcionalizados com APTES e Glu e revestidos com quitosana c) TNTs revestidos com quitosana.....26
- Figura 3.4. Resultados obtidos por Mirjolet et al. (2013) para a viabilidade celular das linhagens SBN-19 (a) e U87MG (b) após 72h a uma concentração crescente de TNTs, e o efeito da irradiação em células SBN-19 (c) e U87MG (d) 24 h pós-irradiação após 10 dias.27
- Figura 3.5. Estrutura básica de um flavonoide.....28
- Figura 3.6. Estrutura da Quercetina.....29
- Figura 3.7. Estrutura do Irinotecano.....30
- Figura 3.8. Resultado de MTT obtido por Ma et al. (2006) mostrando o efeito inibitório da quercetina na proliferação de células cancerígenas EJ, T24 e J82 após 24h e 48h.....31
- Figura 3.9. Resultado de MTT obtido por Rockenbach et al. (2013) mostrando o efeito inibitório da quercetina na proliferação de células T24 após 24, 48 e 72h.31
- Figura 3.10. Resultados de FTIR obtidos por Sapino et al. (2005) para Qc, NH_2 -MSN e Qc/ NH_2 -MSN.....33
- Figura 3.11. Resultados obtidos por Sapino et al. (2005) para a) TGA b) Ensaio de difusão.....34
- Figura 3.12. Espectros da Quercetina (Qc), nanopartículas de sílica mesoporosas (MSN), nanopartículas de sílica mesoporosas com quercetina (QMSN) obtidos por Sarkar et al. (2016).....35
- Figura 3.13. Perfis de liberação de quercetina a partir de nanopartículas de sílica mesoporosas funcionalizadas com ácido fólico em diferentes pHs obtidos por Sarkar et al. (2016).....36

Figura 3.14. Estrutura da Icarina.....	37
Figura 3.15. Perfis de liberação de quercetina a partir de nanotubos de TiO ₂ recobertos por diferentes teores de quitosana obtidos por Mohan et al. (2016).....	38
Figura 3.16. Desprotonação de hidroxilas 3' ou 4' por complexação da quercetina. Adaptado de Bukhari et al. (2009).....	40
Figura 3.17. Estruturas químicas propostas por Kalinowska et al. (2016) para a complexação Zn-Qc.	40
Figura 3.18. Estruturas químicas propostas por (a) Vimalraj et al. (2018) para a complexação Cu-Qc e por (b) Jun et al. (2007) e para a complexação Zn-Qc.	41
Figura 3.19. Resultado de FTIR obtido por Trendafilova et al. (2017).	42
Figura 3.20. Resultados obtidos por Trendafilova et al. (2017) para a sílica SBA-15 carregada com quercetina, e com diferentes teores de zinco e quercetina a) TGA b) liberação <i>in vitro</i>	43
Figura 3.21. Curvas de TG apresentadas por Popova et al. (2016) para sílicas SBA-16 e MCM-41, com e sem zinco.....	45
Figura 3.22. Taxas brutas de incidência de câncer de bexiga por 100 mil habitantes estimada para o ano de 2018 na população brasileira. Adaptado de INCA, (2017).	46
Figura 4.1. Síntese de nanotubos de titanatos sódicos.	49
Figura 4.2. Preparação de nanotubos com zinco.....	49
Figura 4.3. Preparação de NaTNTQc e ZnTNTQc.....	50
Figura 4.4. Metodologia de ensaio de liberação de quercetina de nanoestruturas. ...	53
Figura 4.5. Princípio do ensaio de MTT.	54
Figura 4.6. Avaliação do efeito da combinação dos TNTs com a irradiação.	55
Figura 5.1. Espectros FTIR para NaTNT, Qc e NaTNTQc.....	58
Figura 5.2. Espectros de FTIR para NaTNT, ZnTNT e ZnTNTQc.....	59

- Figura 5.3. Imagens obtidas por MEV para a) NaTNT b) ZnTNT c) NaTNTQc d) ZnTNTQc a uma magnificação de 100k.....61
- Figura 5.4. Espectros de EDS obtido para a) NaTNT e b) ZnTNT.....61
- Figura 5.5. Micrografias obtidas por MET para a) NaTNT b) ZnTNT c) NaTNTQc d) ZnTNTQc a magnificação de 440k (a, b e d) e 180k (c).62
- Figura 5.6. Difratogramas obtidos para NaTNT, ZnTNT, NaTNTQc e ZnTNTQc em duas perspectivas (a) sobrepostos (b) individuais.63
- Figura 5.7. Curvas de a) TG e b) DTG NaTNT, ZnTNT, NaTNTQc e ZnTNTQc c) DTG Qc.65
- Figura 5.8. Perfis de liberação de quercetina a partir de nanoestruturas NaTNTQc e ZnTNTQc.66
- Figura 5.9. Resultados da viabilidade celular da quercetina na linhagem Vero por 24h (a) e 48h (b) e na linhagem ceular T24 por 24h (c) e 48h (d). *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05.....67
- Figura 5.10. Resultados da viabilidade celular de NaTNT na linhagem Vero por 24h (a) e 48h (b) e da linhagem T24 por 24h (c) e 48h (d) e de NaTNTQc na linhagem Vero por 24h (e) e 48h (f) e da linhagem T24 por 24h (g) e 48h (h). *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05.69
- Figura 5.11. Resultados da viabilidade celular de ZnTNT na linhagem Vero por 24h (a) e 48h (b) e da linhagem T24 por 24h (c) e 48h (d) e de ZnTNTQc na linhagem Vero por 24h (e) e 48h (f) e da linhagem T24 por 24h (g) e 48h (h). *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05.70
- Figura 5.12. Número de céulas (a) e análise estatística (b, c) da linhagem T24 exposta ou não a irradiação após 24h de tratamento com quercetina e nanoestruturas. *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05.....73
- Figura 5.13. Número de céulas (a) e análise estatística (b, c) da linhagem T24 exposta ou não a irradiação após 48h de tratamento com quercetina e nanoestruturas. *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05.....74
- Figura 5.14. Efeito da exposição a energia ionizante e as nanoestruturas na formação de colônias após 10 dias. *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05.75
- Figura 5.15. Efeito da exposição a energia ionizante para condição de tratamento na formação de colônias após 10 dias. *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05.76

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1. Tratamento, concentrações e linhagem celular utilizadas nos ensaios por MTT.....	55
----------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

APTES	(3-aminopropil) trietoxissilano
BGC	Antibioticoterapia intravesical adjuvante
CNMIB	Carcinoma não-músculo invasivo de bexiga
CNT	Nanotubo de carbono
CMIB	Carcinoma músculo invasivo de bexiga
DRX	Difração de Raios-X
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersa (do inglês, <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>)
FA	Ácido fólico
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
Glu	Glutaraldeído
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MSN	Nanopartículas de sílica mesoporosa
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
PLGA	Poli(ácido-co-glicólico)
PGON	Polímero penetrante de células uroteliais
Qc	Quercetina
SFB	Soro fetal bovino
TNT	Nanotubos de Titanatos (do inglês, <i>Titanate Nanotubes</i>)
TGA	Análise Termogravimétrica (do inglês, <i>Thermogravimetric Analysis</i>)
UATR	Refletância Atenuada Total Universal (do inglês, <i>Universal Attenuated Total Reflectance</i>)
UV	Ultravioleta
θ	Ângulo Teta
λ	Comprimento de onda

LISTA DE UNIDADES

cm^{-1}	Número de onda
$^{\circ}\text{C}$	Temperatura
cm^3 , mL	Volume
g, mg	Massa
m^2	Área superficial
min	Tempo
nm	Comprimento
rpm	Frequência de rotação
gy	Irradiação

RESUMO

ALBAN, LUISA. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antitumoral de nanotubos de titanatos modificados com quercetina em câncer de bexiga.**

Porto Alegre. 2018. Dissertação/Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O interesse por nanoestruturas como nanotubos de titanatos (TNTs) tem crescido notavelmente nos últimos anos devido a sua biocompatibilidade e viabilidade econômica, o que os tornam promissores para a aplicação na área biomédica. A quercetina (Qc) tem sido relatada como tendo grande potencial como agente quimiopreventivo amplamente utilizada no estudo do tratamento de doenças como câncer de bexiga. Neste sentido, este trabalho pretendeu estudar a incorporação de quercetina em TNTs de sódio (NaTNT) e de zinco (ZnTNT), bem como, realizar a caracterização das nanoestruturas formadas. Além disso, pretendeu-se conduzir testes de liberação de Qc e atividades biológicas e antitumorais em células da linhagem T24. As nanoestruturas de TNTs foram sintetizadas e caracterizadas por técnicas de FTIR, MEV-FEG, EDS, MET DRX e TGA. Os resultados mostraram que as nanoestruturas apresentam estrutura tubular, e a troca de íons Na^+ por Zn^{2+} , bem como a incorporação de quercetina na estrutura não alteram esta morfologia. Além disso, a interação estabelecida entre o Zn e Qc aumenta a estabilidade térmica das nanoestruturas. O ensaio de liberação mostrou que a entrega máxima de Qc ocorre após 24h e a presença de Zn controla a liberação do flavonoide para o meio. Os ensaios biológicos mostraram que as nanoestruturas NaTNTQc e ZnTNTQc diminuem a viabilidade celular de T24 após 48h em altas concentrações. Ainda, NaTNT, NaTNTQc e ZnTNT reduzem o número de células da linhagem T24 quando combinadas com irradiação após 48h mostrando que a combinação entre as nanoestruturas e energia ionizante se apresenta como um objeto de estudo atrativo no tratamento de câncer de bexiga.

Palavras-Chaves: Nanotubos de titanatos, quercetina, atividade antitumoral, câncer de bexiga.

ABSTRACT

ALBAN, LUISA. **Development and evaluation of antitumor activity of titanate-modified nanotubes with quercetin in bladder cancer.** Porto Alegre. 2018. Master/PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The interest in nanostructures such as titanate nanotubes (TNTs) has grown notably in recent years due to their biocompatibility and economic viability, which makes them promising for application in the biomedical field. Quercetin (Qc) has been reported to have great potential as a chemopreventive agent widely used in the study of the treatment of diseases such as bladder cancer. Therefore, this work aimed to study the incorporation of quercetin in sodium TNTs (NaTNT) and zinc (ZnTNT), as well as characterize the nanostructures formed. In addition, it was intended to conduct Qc release tests and biological and antitumor activities in T24 lineage cells. The nanostructures of TNTs were synthesized and characterized by FTIR, MEV-FEG, EDS, MET DRX and TGA techniques. The results showed that the nanostructures have a tubular structure and the exchange of Na^+ ions by Zn^{2+} , as well as the incorporation of quercetin in the structure do not alter this morphology. In addition, the interaction established between Zn and Qc increases the thermal stability of nanostructures. The release test showed that the maximum delivery of Qc occurs after 24h and the presence of Zn controls the release of the flavonoid. Biological assays have shown that the NaTNTQc and ZnTNTQc nanostructures decrease the cellular viability of T24 after 48h in high concentrations. Furthermore, NaTNT, NaTNTQc and ZnTNT reduce the number of T24 lineage cells when combined with irradiation after 48h showing that the combination of nanostructures and ionizing energy is an attractive object of study in the treatment of bladder cancer.

Key-words: titanate nanotubes, quercetin, antitumor activity, bladder cancer.

1. INTRODUÇÃO

O interesse por materiais nanoestruturados diferenciados tem crescido notavelmente nos últimos anos devido ao grande potencial de aplicação das mesmas em áreas como proteção ambiental, eficiência energética e medicina. A utilização destes materiais para o desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos, sistemas catalíticos, sensores e dispositivos de liberação de fármacos, indica o grande impacto destes materiais nas diversas áreas da ciência (FARIQ; KHAN; YASMIN, 2017; HAIDER et al., 2017; HUANG et al., 2017; HUSKIĆ; ŽAGAR, 2017; SALLEM et al., 2017; ZHU et al., 2015).

Dentro deste contexto, as nanoestruturas de dióxido de titânio (TiO_2) têm propriedades interessantes como: biocompatibilidade, viabilidade econômica e estabilidade química e, destacam-se pela capacidade de modificação morfológica da sua superfície (SREE LATHA et al., 2017). Estas propriedades atribuem às nanoestruturas formadas a partir de TiO_2 a capacidade de interagirem com biomoléculas, o que possibilita a aplicação na área biomédica, principalmente como dispositivos para o tratamento de infecções e cânceres (OLIVEIRA et al., 2017).

Nanotubos de titanatos (TNT) são nanoestruturas formadas a partir de nanopartículas de TiO_2 que foram sintetizados pela primeira vez por Kasuga et al. (1998) pelo método hidrotérmico. TNTs possuem aplicação bastante versátil incluindo alimentos, biomedicina, cosméticos, tintas, fotocatalise, entre outros (SIPOS et al., 2017). As características dos nanotubos de titanatos, como biocompatibilidade e não toxicidade os tornam materiais promissores para aplicações na área biomédica como em sistemas de administração de moléculas bioativas (SALLEM et al., 2017) e potencializadores de radioterapias (MIRJOLET et al., 2014).

Por outro lado, a quercetina, um flavonoide natural amplamente disponível na natureza, tem sido relatada como tendo grande potencial como agente quimiopreventivo contra uma ampla variedade de cânceres (LEI et al., 2018). No entanto, a baixa hidrossolubilidade e a baixa biodisponibilidade limitam seu uso na área biomédica (SARKAR et al., 2016). Assim, abordagens alternativas são adotadas, como a incorporação do flavonoide em diferentes sistemas de distribuição (AZZI et al., 2018).

Dispositivos de suporte para a quercetina têm sido amplamente estudados e materiais como sílicas (RAIE et al., 2018), nanolipídios (HUANG et al., 2017) e nanoestruturas de TiO_2 (MOHAN; ANANDAN; RAJENDRAN, 2016) tem sido utilizados para este fim. Nanotubos de titanatos, devido a sua estrutura, são apropriados para o carregamento de compostos farmacêuticos ativos e, portanto, se apresentam como fortes candidatos ao suporte de biomoléculas como a quercetina (SIPOS et al., 2017).

Ainda, estudos sugerem que a quercetina associada a metais como cobre (BUKHARI et al., 2009; VIMALRAJ et al., 2018), cobalto (BIRJEES BUKHARI et al., 2008), ferro (JABEEN et al., 2017), magnésio (GHOSH et al., 2017) e zinco (POPOVA et al., 2016; TRENDAFILOVA et al., 2017) podem formar complexos que, quando carregados em transportadores adequados, podem estabilizar e melhorar a eficiência do sistema de entrega da biomolécula (POPOVA et al., 2016).

Associado a isto e frente a necessidade de aprimorar a eficácia diminuindo os efeitos colaterais de radioterapias, o desenvolvimento de novas técnicas para aprimorar os resultados de tratamentos convencionais de câncer vem rebendo destaque na área biomédica, e a aplicação de nanoestruturas vem sendo cada vez mais debatida e explorada no âmbito científico (MIRJOLET et al., 2013; PAVON; OKAMOTO, 2007).

Dentro deste contexto, este trabalho pretende estudar os nanotubos de titanatos como suporte para a incorporação de quercetina. Além disso, pretende-se avaliar a liberação de quercetina a partir das matrizes elaboradas e sua viabilidade celular frente a células Vero e T24 e a citotoxicidade combinada com irradiação.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de nanoestruturas de titanatos como suporte do flavonoide quercetina, bem como, a avaliação da sua atividade antitumoral em câncer de bexiga.

2.1. Objetivos Específicos

- Sintetizar nanotubos de titanatos sódicos (NaTNT) e modificados com zinco (ZnTNT);
- Preparar nanoestruturas híbridas com nanotubos de titanatos incorporados com quercetina e (NaTNTQc e ZnTNTQc);
- Caracterizar a morfologia e propriedades físico-químicas das nanoestruturas preparadas;
- Avaliar o comportamento de liberação de quercetina das nanoestruturas NaTNTQc e ZnTNTQc;
- Avaliar a viabilidade celular das nanoestruturas preparadas frente a células Vero e T24;
- Avaliar a citotoxicidade das nanoestruturas combinados com irradiação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Materiais Nanoestruturados

Materiais nanoestruturados são formados por materiais de diferentes naturezas, estruturados em escala nanométrica, o que proporciona propriedades particulares aos mesmos quando comparados a estruturas em dimensões micrométricas (OU; LO, 2007). Estruturas em escala nano se aplicam a diversos tipos de materiais como nanosílicas (SARKAR et al., 2016), lipídios nanoestruturados (HUANG et al., 2017), nanopartículas poliméricas (GÓMEZ-GAETE et al., 2007), nanoestruturas a base de carbono (ARRIGO et al., 2016) e de titânio (JUKAPLI; BAGHERI, 2016; ZHOU et al., 2017), entre outras.

As propriedades obtidas devido a nano escala possibilitam uma ampla gama de aplicações como na área ambiental (HAIDER et al., 2017), energética (RHO et al., 2018) e da saúde (KULKARNI et al., 2015) recebendo destaque na área médica no estudo do tratamento de cânceres como o de mama (SREE LATHA et al., 2017), glioblastoma (MIRJOLET et al., 2014) e câncer de bexiga (RIEGER et al., 2015).

3.1.1. Nanotubos de titanatos

Nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) são nanoestruturas biocompatíveis, economicamente viáveis e quimicamente estáveis. Além disso, recebem destaque, pois possibilitam projetar nanoestruturas através da modificação e/ou funcionalização das mesmas resultando no desenvolvimento de outros materiais nanoestruturados, como os nanotubos de titanatos (SREE LATHA et al., 2017).

Nanotubos de titanatos (TNTs) são nanoestruturas tubulares, ocas e de paredes múltiplas que vem atraído notável atenção devido a sua baixa

citotoxicidade, alta estabilidade química, alta biocompatibilidade, alta resistência à corrosão, além de baixo custo de produção (SALLEM et al., 2017; SREE LATHA et al., 2017).

Estas propriedades atribuem aos nanotubos de titanatos a aplicação em diversos campos incluindo fotocatalise (SANDOVAL; HERNÁNDEZ-VENTURA; KLIMOVA, 2017), sensores foto eletroquímicos (DAI et al., 2016), troca iônica (DU; SUN; LECKIE, 2011), nanofluidos (CHEN et al., 2008), remediação ambiental (XU et al., 2017), energia (FERNÁNDEZ-WERNER et al., 2017), e aplicação na área biomédica (PAN et al., 2015).

Kasuga et al., (1998) foram os primeiros a sintetizar nanotubos de titanatos pelo método hidrotérmico. Atualmente, este método adaptado é mais utilizado para a obtenção destas nanoestruturas devido à simplicidade e ao baixo custo (ERJAVEC; KAPLAN; PINTAR, 2015). Este método consiste na reação entre nanopartículas de TiO_2 e uma solução concentrada de NaOH a altas temperaturas (130-140°C). O produto da reação, depois de lavado com água destilada, são nanotubos com elevado teor de sódio ($Na_2Ti_3O_7$) ou então com soluções ácidas (0,1mol/L) de HCl ou HNO_3 , formam nanotubos protonados ($H_2Ti_3O_7$). Ambos os nanotubos formados são de titanatos, porém com os cátions Na^+ e H^+ , respectivamente dos nanotubos sódico e protonado, ocupando posições diferentes na estrutura.

É interessante destacar que as características dos nanotubos formados, como área superficial específica, fases cristalinas e morfologia, dependem das condições de síntese e dos tratamentos após a mesma (OU; LO, 2007). Assim, ao final da lavagem obtêm-se um sólido branco formado por nanotubos com diâmetro médio entre 8 nm e 10 nm (SIPOS et al., 2017), com fórmula estrutural $Na_{2-x}H_xTi_3O_7$ ($0 < x < 2$), sendo x dependente do processo de lavagem.

Um mecanismo para a formação da estrutura tubular dos nanotubos foi proposto por Zhang et al. (2003), no qual a reação do TiO_2 com NaOH produz uma fase desordenada que recristaliza em camadas formando folhas de titanatos. Os íons H^+ da superfície da camada reagem com hidroxilas OH^- do meio básico

formando água. Quando a perda de hidrogênio da superfície excede o valor crítico, a energia de deformação se torna tão grande que a camada superficial se desloca da camada inferior, liberando folhas que, conseqüentemente, se enrolam formando os nanotubos.

Esta configuração possui energia mais baixa do que a forma plana, uma vez que as ligações pendentes da borda, as quais geram tensões superficiais, são eliminadas. Um esquema deste processo de formação é mostrado na Figura 3.1.

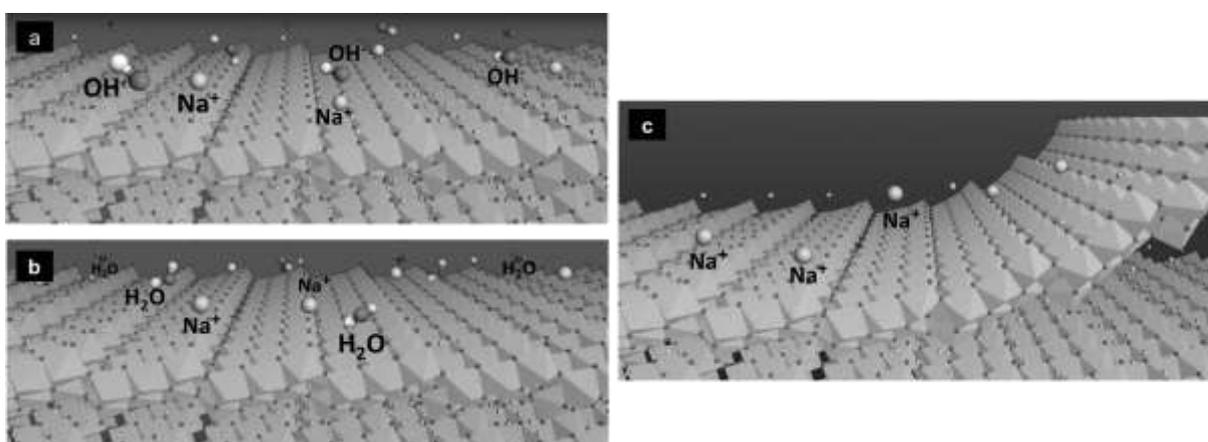


Figura 3.1. Formação de TNT a) superfície de $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ em contato com íons OH^- e Na^+ b) íons H^+ carregados por OH^- , formando H_2O c) perda de H^+ formando TNTs. Adaptado de Zhang et al. (2003).

Atualmente, vários estudos envolvendo nanotubos de titanatos reportam suas aplicações na área biomédica (SALLEM et al., 2017). Isto se deve ao fato de que, além de apresentarem propriedades excelentes para a aplicação neste segmento, como biocompatibilidade (SRUTHI et al., 2018), pode ser usado como um vetor de moléculas e biomoléculas (SALLEM et al., 2017; SIPOS et al., 2017) e no tratamento de doenças complexas como cânceres (MIRJOLET et al., 2014; SREE LATHA et al., 2017).

Sruthi et al. (2018) conduziram trabalhos em relação à biocompatibilidade dos nanotubos de titanatos. Os autores sintetizaram TNTs e procederam com a funcionalização dos mesmos com (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES) e suas interações e biocompatibilidade foram estudadas *in vitro* utilizando células BV-2 microgliais murinas. As análises do ciclo celular e avaliação morfológica indicaram

que as nanoestruturas TNTs-APTES não promoveram proliferação microglial em células BV-2. Além disso, os TNTs-APTES exibiram boa biocompatibilidade, conforme revelado pela integridade da membrana plasmática, integridade da membrana lisossômica, morfologia e ensaio de viabilidade celular (MTT). Assim, o autor destaca que os nanotubos de titanato são agentes promissores para aplicações biomédicas.

Sipos et al. (2017) utilizaram nanotubos de titanatos produzidos por método hidrotérmico como dispositivos para o carregamento de fármacos como diclofenaco de sódio, atenolol e hidroclorotiazida. Além disso, estudaram a interação entre as nanoestruturas e as moléculas incorporadas. Os resultados obtidos pelo grupo demonstraram que os nanotubos de titanatos são capazes de suportar biomoléculas e manter sua bioatividade após o carregamento, os quais interagem principalmente por ligações eletrostáticas como pontes de hidrogênio.

Uma imagem de MET dos nanotubos de titanatos obtidos pelo grupo é mostrada na Figura 3.2a, revelando estrutura tubular, diâmetro médio de 7,01 nm e comprimento, que é altamente influenciado pelos parâmetros da síntese hidrotérmica, de 164,25 nm. Além disso, os autores obtiveram uma imagem de MEV (Figura 3.2b), a qual mostra que os TNTs têm uma tendência a se agregarem, fenômeno que, segundo o grupo, é comum nos nanomateriais.

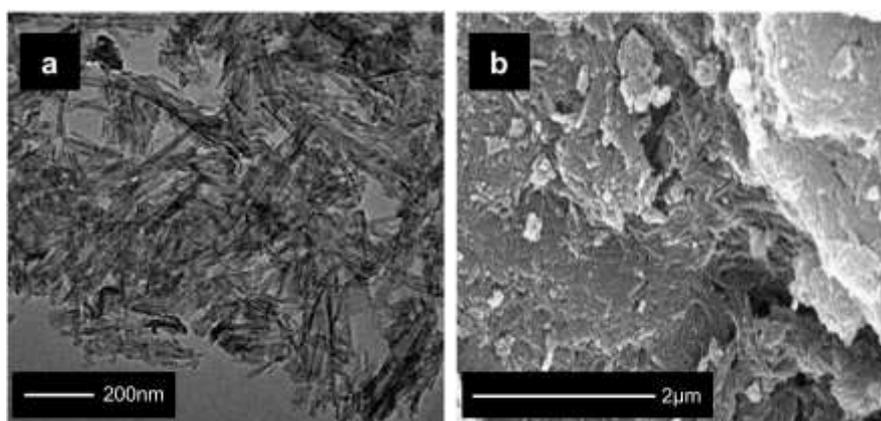


Figura 3.2. Imagens para nanotubos de titanatos obtida por Sipos et al. (2017) por a) MET b) MEV.

Trabalhos como o conduzido por Sallem et al. (2017) também verificaram a utilização de nanotubos de titanatos hidrotermicamente produzidos para o carregamento de biomoléculas. Além disso, estudaram o efeito do revestimento dos TNTs com quitosana. O grupo mostrou que o revestimento dos TNTs com quitosana pode ser conduzido por diferentes abordagens, por ligações covalentes utilizando-se moléculas intermediárias, ou por interações eletrostáticas entre a quitosana e os nanotubos. As moléculas intermediárias utilizadas pelo grupo para a funcionalização dos nanotubos foram aminopropiltriétoxissilano (APTES) e glutaraldeído (Glu). Segundo os autores, ambos os métodos produzem dispositivos não tóxicos apropriados para o carregamento e entrega de moléculas aplicadas a área biomédica.

O grupo realizou imagens de MET para os nanotubos de titanatos puros (Figura 3.3a), nanotubos de titanatos funcionalizados com APTES e Glu revestidos com quitosana (Figura 3.3b) e nanotubos de titanatos revestidos com quitosana sem funcionalização (Figura 3.3c).

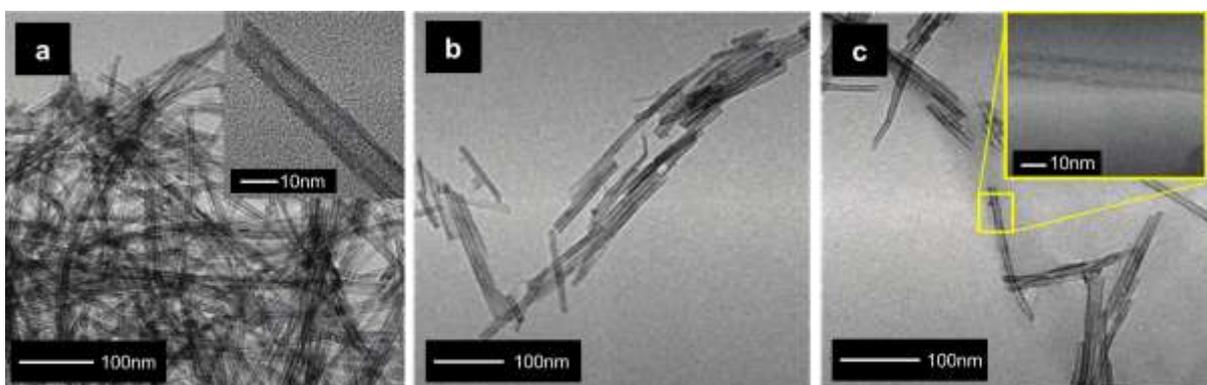


Figura 3.3. Imagens de MET obtida por Sallem et al. (2017) para a) TNTs b) TNTs funcionalizados com APTES e Glu e revestidos com quitosana c) TNTs revestidos com quitosana.

As imagens revelaram que os nanotubos apresentam diâmetros médios de 10nm, e que houve a conservação da nanoestrutura dos TNTs mesmo após a interação com quitosana realizado pelas duas abordagens estudadas.

3.1.2. Nanotubos de titanatos no tratamento de cânceres

Mirjolet et al. (2013) verificaram a utilização de nanotubos de titanatos como potencializadores de ionização em radioterapias para tratamento de glioblastoma. Os autores sintetizaram nanotubos de titanatos pelo método hidrotérmico e testaram os mesmos como dispositivos de aumento do efeito ionizante em radioterapias. Duas linhagens celulares de glioblastoma foram testadas (SNB-19 and U87MG). A citotoxicidade foi analisada por MTT (Figura 3.4a e Figura 3.4b) e a radiosensibilização pela análise de fração celular sobrevivente (Figura 3.4c e Figura 3.4d).

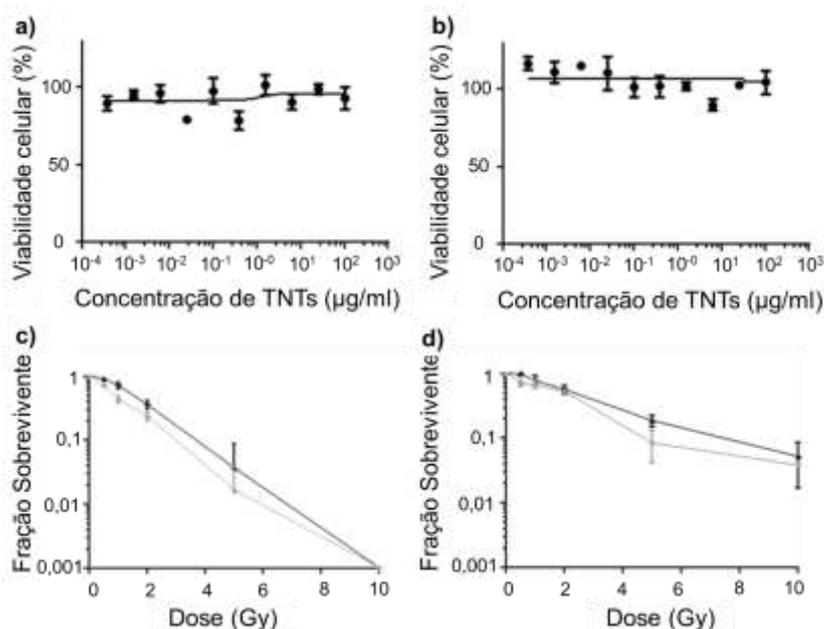


Figura 3.4. Resultados obtidos por Mirjolet et al. (2013) para a viabilidade celular das linhagens SBN-19 (a) e U87MG (b) após 72h a uma concentração crescente de TNTs, e o efeito da irradiação em células SBN-19 (c) e U87MG (d) 24 h pós-irradiação após 10 dias.

Os resultados de MTT mostraram que os nanotubos produzidos por método hidrotérmico são atóxicos e inibidores de proliferação de células cancerosas quando combinados com irradiação, o que fica evidenciado pela redução do número de colônias das linhagens celulares incubadas com TNTs que foram expostas a energia ionizante, indicando que os mesmos possuem potencial aplicação no tratamento de cânceres.

Latha et al. (2017) também estudaram a atividade anticancerígena de nanotubos de titanatos, através de testes *in vitro* e *in vivo*. O grupo observou que os nanotubos de titanatos inibiram significativamente a proliferação e formação de colônias de células de câncer de mama, se mostrando como uma alternativa viável ao tratamento contra este câncer.

Mirjolet et al., (2017) sintetizaram nanotubos de titanatos carregados com Docetaxel (DTX) a fim de aumentar a eficácia em radioterapias no tratamento de câncer de próstata. Os TNTs-DTX foram utilizados como dispositivos de carregamento e liberação de DTX a fim de manter a droga dentro das células cancerígenas, aumentando as concentrações intracelulares da mesma nas células tumorais. Análises *in vitro* e *in vivo* mostraram que o crescimento do tumor foi significativamente retardado pelas nanoestruturas TNTs-DRX associado com radioterapia em comparação com o DTX livre nas mesmas condições. Esses resultados sugerem que nanotubos de titanatos são capazes de melhorar a eficácia de radioterapias pelo controle local de fármacos no tratamento de cânceres.

3.2. Flavonoides

Flavonoides são metabolitos polifenólicos secundários que ocorrem comumente em fungos e plantas (RAFFA et al., 2017). Eles possuem várias atividades biológicas/farmacológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antialérgicas e antivirais (SOUNDARYA et al., 2017). Os flavonoides possuem uma estrutura básica (Figura 3.5) polifenólica, na qual ocorre a substituição dos anéis de benzeno (A e B) para a formação de flavonóis, flavonas, catequinas, flavanonas, entre outros (BIRJEES BUKHARI et al., 2008).

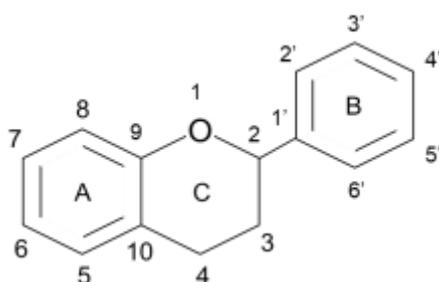


Figura 3.5. Estrutura básica de um flavonoide.

Mais de 4000 flavonoides diferentes que ocorrem naturalmente foram relatados na literatura, sendo estes uma fonte útil de moléculas bioativas (BIRJEES BUKHARI et al., 2008; RAFFA et al., 2017). Entre os diversos flavonoides encontrados, a quercetina tem recebido destaque devido a suas propriedades biológicas, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antivirais e antibacterianos (LEE et al., 2016).

3.2.1. Quercetina

Quercetina (3,4',5',5,7-pentahidroxiflavona, $C_{15}H_{10}O_7$) é um flavonoide natural abundante e facilmente extraído de frutas e legumes (LESJAK et al., 2018; LIU et al., 2017). A quercetina é amplamente reconhecida por apresentar atividade antioxidante (LEE et al., 2016) e outras propriedades interessantes como biocompatibilidade (ALUANI et al., 2017), atividade anti-inflamatória (LESJAK et al., 2018), antivirais (LEE et al., 2016) e atividade anticancerígena (LIU et al., 2017; SARKAR et al., 2016). A estrutura da quercetina é formada por três anéis aromáticos (A, B e C), cinco grupos hidroxilas e um grupo carbonila (Figura 3.6).

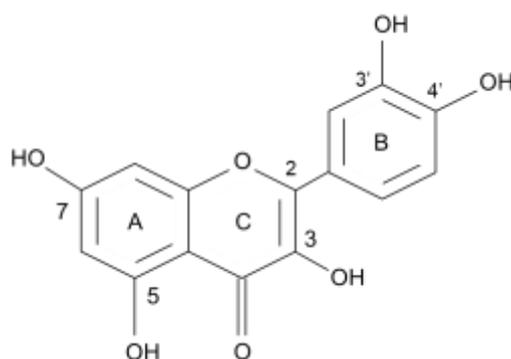


Figura 3.6. Estrutura da Quercetina.

Diversos trabalhos tem evidenciado o potencial terapêutico da quercetina na prevenção e tratamento de diferentes doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, bem como o câncer (LESJAK et al., 2018). A quercetina tem se mostrado como um agente quimiopreventivo potente contra uma ampla variedade de cânceres, como câncer de pulmão, mama, próstata e cólon

(LEI et al., 2018). Os mecanismos que podem estar associados aos efeitos antitumorais da quercetina incluem a indução da quebra do ciclo celular e promoção da apoptose celular pelo flavonoide (LIU et al., 2017; RAFFA et al., 2017).

Liu et al. (2017) estudaram o efeito da quercetina na proliferação e migração de células de glioblastoma humano, no qual o flavonoide inibiu a reprodução das células cancerosas após um tratamento de 24 horas. O estudo mostrou que o flavonoide é capaz de induzir a fragmentação do DNA bem como a apoptose celular.

Ainda, estudos indicam que a quercetina pode apresentar efeitos sinérgicos quando combinada com agentes quimioterapêuticos (BRITO et al., 2015). Lei et al. (2018) investigaram o efeito terapêutico da quercetina como potencializadora do fármaco Irinotecano, em células de câncer gástrico. Irinotecano é um componente derivado do alcaloide camptotecina, extraído de vegetais, com baixa toxicidade e atividade biológica (Figura 3.7). Estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram que a combinação de quercetina e uma baixa dose de Irinotecano apresenta efeitos de inibição de crescimento de células tumorais e melhoria da apoptose celular comparáveis a altas doses de Irinotecano.

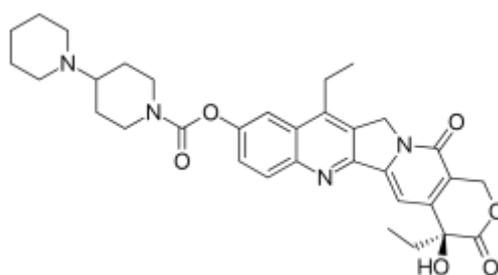


Figura 3.7. Estrutura do Irinotecano.

Ma et al., (2006) investigaram a influência da quercetina na inibição do crescimento e formação de colônias de três células de câncer de bexiga (EJ, J82 e T24). As células foram tratadas com concentrações crescentes de quercetina (12,5, 25, 50, 75 e 100 μM) por 24h e 48h e a sobrevivência celular foi medida pelo ensaio de MTT (Figura 3.8).

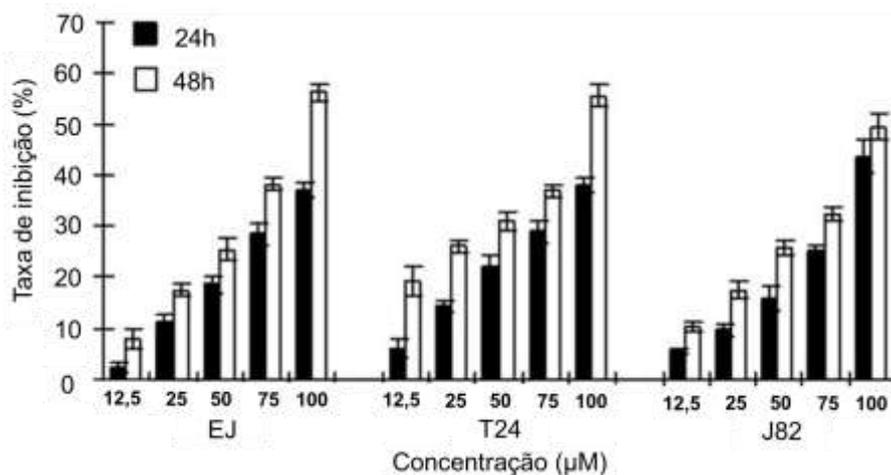


Figura 3.8. Resultado de MTT obtido por Ma et al. (2006) mostrando o efeito inibitório da quercetina na proliferação de células cancerígenas EJ, T24 e J82 após 24h e 48h.

A Figura 3.8 mostra que a quercetina inibe a proliferação de células EJ, T24 e J82 de maneira dependente do tempo e da dose, sendo esta redução mais significativa em maiores concentrações do flavonoide.

Rockenbach et al. (2013) também mostraram o efeito da quercetina na proliferação de células da linhagem T24. As células foram tratadas com concentrações crescentes de quercetina (10, 20, 30 e 40 μM) por 24, 48 e 72h e a sobrevivência celular foi medida por MTT (Figura 3.9).

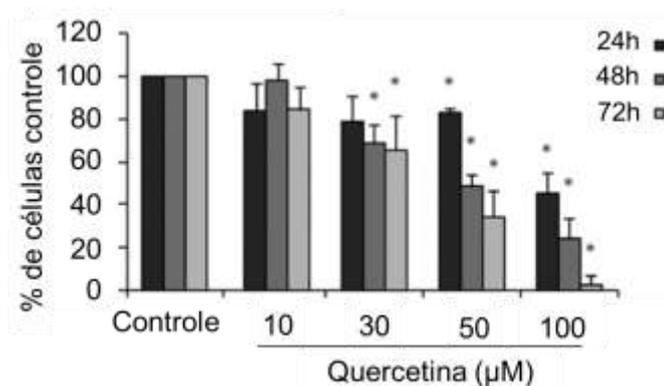


Figura 3.9. Resultado de MTT obtido por Rockenbach et al. (2013) mostrando o efeito inibitório da quercetina na proliferação de células T24 após 24, 48 e 72h.

A Figura 3.9 mostra que com 30 μM de quercetina, o efeito inibitório na proliferação de células T24 é observado em 48 e 72 horas de tratamento. Porém,

quando as células são tratadas com concentrações maiores (50 e 100 μM), o efeito inibitório é observado em todos os tempos de tratamento. Assim, o estudo conduzido pelos autores mostrou que a quercetina possui efeito antiproliferativo em células T24, destacando o uso potencial da quercetina no tratamento do câncer de bexiga.

Apesar das boas propriedades biológicas, o uso da quercetina na área biomédica é, muitas vezes, dificultado devido sua baixa solubilidade em água, alta instabilidade em meio neutro e alcalino (POPOVA et al., 2016) e baixa biodisponibilidade (SARKAR et al., 2016). Assim, a fim de diminuir estas dificuldades e aumentar a eficácia do flavonoide, abordagens alternativas são adotadas, como a incorporação da quercetina em diferentes sistemas de distribuição, incluindo lipossomas (AZZI et al., 2018), lipídios nanoestruturados (HUANG et al., 2017; SUN et al., 2014), nanopartículas (POPOVA et al., 2016; SARKAR et al., 2016) e complexos de íons metálicos (TRENDAFILOVA et al., 2017).

3.2.1.1. *Nanoestruturas carregadas com quercetina*

Estudos recentes vêm sendo conduzidos em relação à interação de biomoléculas como quercetina e nanoestruturas (LEE et al., 2016; MOHAN; ANANDAN; RAJENDRAN, 2016; SAPINO et al., 2015; SARKAR et al., 2016). Nanomateriais híbridos que combinam componentes inorgânicos, orgânicos ou bioativos em um único material são amplamente aplicáveis à área biológica (OLIVEIRA et al., 2017) principalmente como dispositivos de liberação de fármacos para o organismo (MOHAN; ANANDAN; RAJENDRAN, 2016; PAN et al., 2015; SARKAR et al., 2016; ZHOU et al., 2017).

Sapino et al. (2015) estudaram o carregamento de quercetina em nanopartículas de sílica mesoporosas (MSN) funcionalizadas com aminopropil na razão de 1:1 ($\text{NH}_2\text{-MSN}_{1/1}$), além da liberação do flavonoide a partir das estruturas carregadas com o mesmo ($\text{Qc/NH}_2\text{-MSN}_{1/1}$). A caracterização das nanoestruturas por FTIR é apresentada na Figura 3.10.

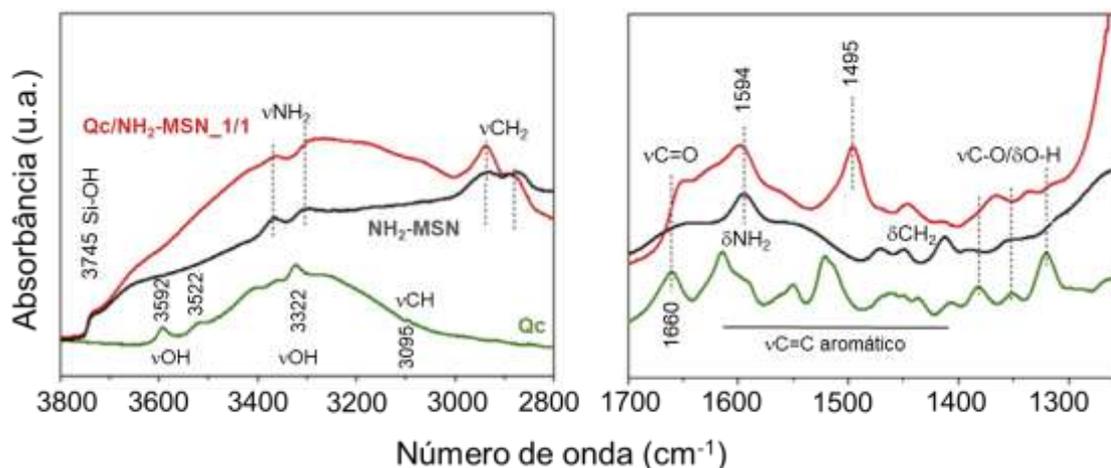


Figura 3.10. Resultados de FTIR obtidos por Sapino et al. (2005) para Qc, NH₂-MSN e Qc/NH₂-MSN.

Os resultados encontrados pelo autor mostram que a quercetina apresenta sinais correspondentes aos grupos OH da estrutura em 3592, 3522 e 3322 cm⁻¹. Bandas na faixa de 3095 cm⁻¹ correspondem a ligações CH e na faixa de 1660 cm⁻¹ correspondem a ligações C=O. As bandas encontradas na faixa de 1600 cm⁻¹ e 1400 cm⁻¹ são correspondentes às ligações C=C de anéis aromáticos presentes na estrutura do flavonoide, e de 1400 a 1300 cm⁻¹ as vibrações envolvidas são derivadas da combinação vC-O/δO-H.

Os principais modos de vibração dos grupos da superfície de sílica são correspondentes aos grupos silanóis (3745 cm⁻¹) e aminopropilas (entre 3400 cm⁻¹ e 3200⁻¹). Segundo o autor, as mudanças na posição dos modos de vibração da quercetina (vC=O, vC=O aromático, combinação vC-O/δO-H) indicam interações de ligação de hidrogênio entre os grupos da superfície de sílica e a carbonila de quercetina, mostrando que o flavonoide foi incorporado à sílica mesoporosa na estrutura Qc/NH₂-MSN.

A análise de TGA foi empregada para estimar a quantidade de grupos funcionais (aminopropil) e a carga final de quercetina nos complexos. O resultado da análise é mostrado na Figura 3.11a. Sapino et al. (2015) também conduziram testes de difusão da quercetina livre e quercetina incorporada na sílica funcionalizada através de uma membrana de celulose, em dois diferentes meios (Meio 1 e Meio 2) com mesmo pH (pH 5), porém com polaridades diferentes. O Meio 1 trata-se de

uma solução etanol/tampão (20/80 v/v, pH 5.0) e o Meio 2 é uma emulsão óleo/água preparada pelo autor a partir de compostos lipídicos e glicerol (pH 5.0). A fase de recepção foi uma solução etanol/tampão (20/80 v/v, pH 5.0). Em tempos fixos, alíquotas foram recolhidas e substituídas por um mesmo volume de solução fresca, e as alíquotas retiradas foram avaliadas em HPLC. Os resultados do teste de difusão são mostrados na Figura 3.11b.

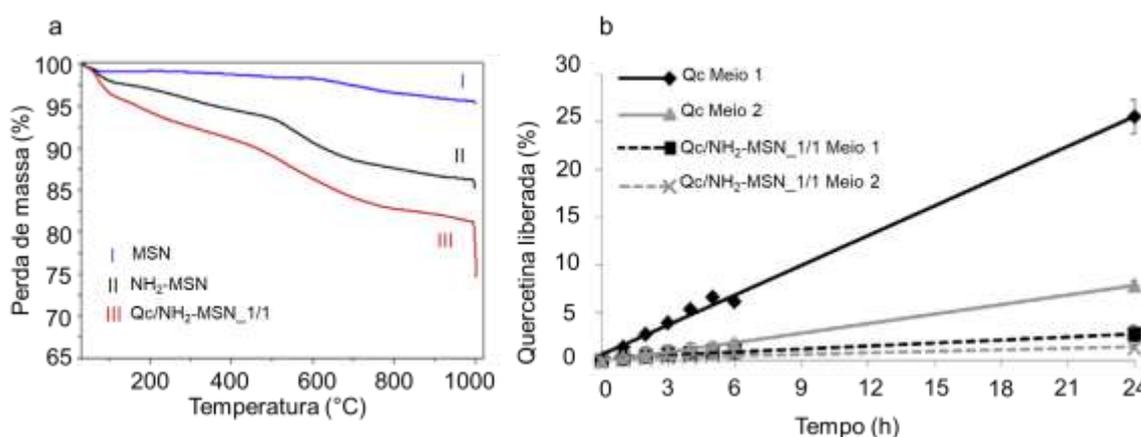


Figura 3.11. Resultados obtidos por Sapino et al. (2005) para a) TGA b) Ensaio de difusão.

Através dos termogramas do complexo Qc/NH₂-MSN e das amostras NH₂-MSN, por comparação entre as perdas de massa dos três tipos de materiais, o autor estimou a porcentagem em massa dos grupos funcionais incorporados (10,2%) e a inclusão em massa das moléculas de quercetina (9,2%).

Os resultados de difusão de quercetina mostraram que, independente do meio liberado, a taxa de difusão da quercetina pura é muito superior a mesma quando incorporada à matriz de sílica, confirmando que ocorre certa interação entre a quercetina e a sílica. Além disso, tanto a quercetina livre quanto complexada com NH₂-MSN difundiu-se mais lentamente no meio 2, indicando que a polaridade do sistema pode influenciar sua liberação. Assim, pode-se dizer que a difusão da quercetina é influenciada tanto pelo sistema de dispersão quanto pela matriz na qual está carregada.

Testes biológicos como análise de citotoxicidade, mostraram que as nanopartículas de sílica mesoporosas carregadas com Qc são dispositivos

promissores para o fornecimento de flavonoides como agentes quimiopreventivos em órgãos e células devido à boa biocompatibilidade e aumento da atividade antiproliferativa.

Sarkar et al. (2016) também estudaram a liberação de quercetina carregada em nanopartículas de sílica mesoporosas (MSN), funcionalizadas com ácido fólico (FA) para aplicação como uma droga terapêutica eficaz contra células de câncer de mama. A fim de verificar a funcionalização com ácido fólico e incorporação de quercetina nas nanopartículas de sílica, o grupo utilizou a técnica de FTIR, e obteve os espectros como mostrado na Figura 3.12.

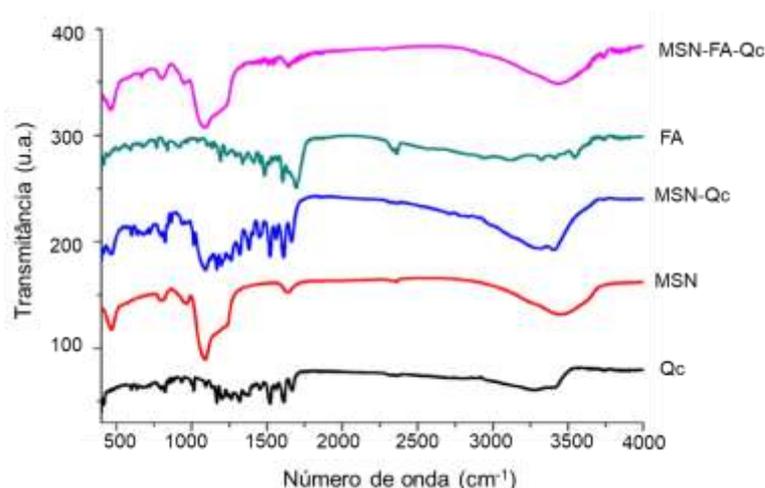


Figura 3.12. Espectros da Quercetina (Qc), nanopartículas de sílica mesoporosas (MSN), nanopartículas de sílica mesoporosas com quercetina (QMSN) obtidos por Sarkar et al. (2016).

Os espectros de FTIR encontrados pelos autores mostram que a banda característica do ácido fólico em 1695 cm^{-1} , se encontra deslocada no espectro de MSN-FA-Qc devido à ligação da sílica com o mesmo, confirmando a funcionalização. Ainda, as bandas características da quercetina de 1400 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} , referente a ligações C=C dos anéis aromáticos, e a banda característica na faixa de 3017 e 3224 cm^{-1} referente à ligação O-H dos grupos hidroxilas, também são visíveis no espectro de MSN-Qc, confirmando o carregamento do flavoinoide na matriz. Além disso, o grupo realizou o estudo de liberação *in vitro* da quercetina a partir das nanopartículas de sílica mesoporosas funcionalizadas com ácido fólico em três diferentes pHs. Os perfis de liberação obtidos são mostrados na Figura 3.13.

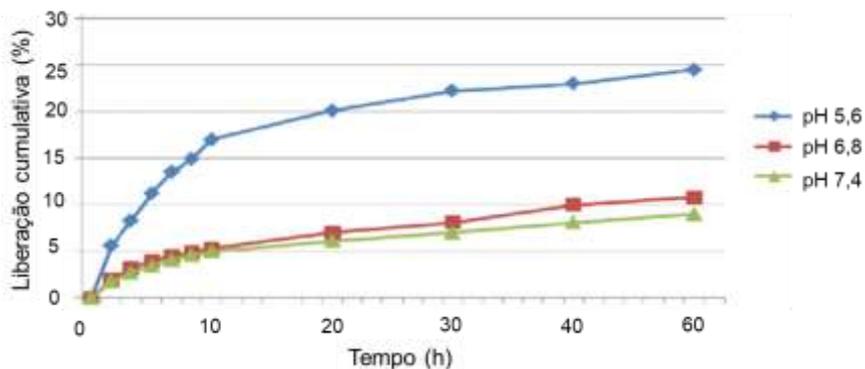


Figura 3.13. Perfis de liberação de quercetina a partir de nanopartículas de sílica mesoporosas funcionalizadas com ácido fólico em diferentes pHs obtidos por Sarkar et al. (2016).

As curvas de cinética de liberação da quercetina encontradas por Sarkar et al. (2016) indicam que as nanopartículas de sílica mesoporosas garantem uma entrega direcionada de quercetina com maior biodisponibilidade para o meio. Além disso, o comportamento de liberação de droga é dependente do pH do meio no qual a mesma está sendo liberada, sendo que esta ocorre de forma mais lenta em soluções mais básicas do que em soluções mais ácidas.

Ainda, os resultados dos testes biológicos mostraram que as nanoestruturas MSN-FA-Qc facilitam uma maior captação celular permitindo maior biodisponibilidade do flavonoide para as células cancerígenas. Além disso, as nanoestruturas MSN-FA-Q provocam parada do ciclo celular e apoptose das mesmas confirmando a eficácia do sistema contra células de câncer de mama (SARKAR et al., 2016).

Trabalhos como o conduzido por Lee et al. (2016) investigaram os efeitos do carregamento da molécula de quercetina em nanopartículas de sílica e o efeito antioxidante e anti-inflamatório das mesmas. As nanopartículas mostraram viabilidade celular comparável aos controles, além da redução significativa de células tumorais. Adicionalmente, as atividades antioxidantes e antiinflamatórias da quercetina foram mantidas mesmo após o carregamento da molécula, mostrando que dispositivos como a nanosílica podem ser usados para a incorporação de componentes naturais biologicamente ativos (LEE et al., 2016).

Materiais nanoestruturados como nanopartículas a base de titânio vem sendo amplamente utilizados para a administração de fármacos, pois são facilmente carregados com moléculas bioativas (OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, possuem vasta aplicação na área biomédica devido a propriedades como biocompatibilidade, estabilidade, possibilidade de modificação da superfície e viabilidade econômica (SREE LATHA et al., 2017).

Zhang et al. (2016) produziram nanotubos de dióxido de titânio a partir do método de oxidação anódica eletroquímica, que consiste em um processo capaz de formar uma camada de óxido sobre a superfície de um metal, permitindo o crescimento de nanotubos de TiO_2 altamente organizados.

Moléculas do flavonoide icarina, com estrutura química como mostrada na Figura 3.14, foram carregados no nanotubos de TiO_2 por adsorção física e a estrutura foi revestida com camadas de quitosana, a fim de controlar a liberação do flavonoide. Testes biológicos e ensaios de liberação *in vitro* foram conduzidos visando-se avaliar a eficiência das nanoestruturas nos tratamentos propostos.

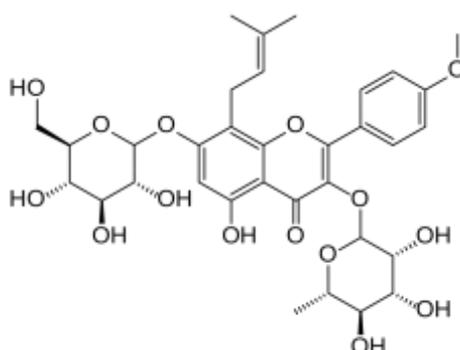


Figura 3.14. Estrutura da Icarina.

Testes biológicos demonstraram que as nanoestruturas produzidas exibiram excelentes propriedades, promovendo a proliferação osteoblástica e regulando positivamente a expressão de genes relacionados ao osso. Os testes *in vitro* revelaram que a molécula de icarina foi liberada com sucesso a partir de matrizes de TiO_2 nanoestruturados. Ainda, a adição de um revestimento multicamadas produzido pela adição de quitosana pode prolongar o tempo de liberação do flavonoide no meio estudado.

Mohan et al. (2016) conduziram estudos semelhantes aos de Zhang et al. (2016) no qual quercetina, incorporada em nanotubos de TiO_2 produzidos por oxidação eletroquímica e revestidos com diferentes teores de quitosana, foi liberada de forma controlada, a fim de investigar sua aplicação no tratamento de infecções pós-operatórias e osseointegração de implantes.

No trabalho de Mohan et al (2016), foram preparadas amostras de nanotubos de TiO_2 com quercetina revestidos com 3 diferentes teores de quitosana (0,5, 1 e 2%). Em seguida conduziu-se a liberação do fármaco a partir da imersão das amostras em 30 mL de solução salina tamponada com pH neutro. A quantidade de quercetina liberada foi medida usando a técnica de espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis). Os perfis de liberação do fármaco foram plotados com porcentagem de liberação vs. tempo para cada conjunto experimental, como mostrado na Figura 3.15.

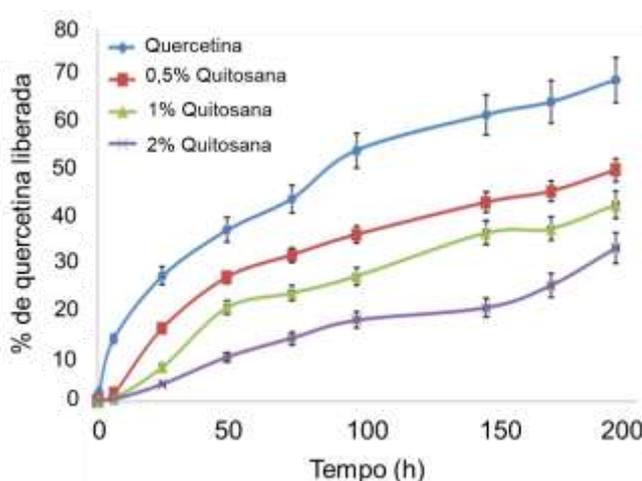


Figura 3.15. Perfis de liberação de quercetina a partir de nanotubos de TiO_2 recobertos por diferentes teores de quitosana obtidos por Mohan et al. (2016).

Os resultados obtidos por Mohan et al. (2016) para os ensaios de liberação revelam que quercetina pode ser liberada com sucesso de nanopartículas de TiO_2 . Além disso, a concentração local da droga pode ser controlada à medida que se ajusta a espessura da camada de quitosana que recobre os nanotubos contendo quercetina, o que favorece o ajuste da janela terapêutica ideal para o tratamento de infecções pós-operatórias, e melhor osseointegração de implantes de titânio.

Trabalhos conduzidos recentemente sugerem que esta interação entre nanotubos de TiO₂ e quercetina podem ocorrer por métodos físicos, como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, ou por métodos químicos, como por ligação covalente com a formação de ligações éter, amida e tioéter. A facilidade da quercetina de interagir com outras moléculas se deve principalmente às hidroxilas no flavonoide (RAIE et al., 2018).

3.2.1.2. *Complexação de quercetina e metais*

Em relação à interação da quercetina com metais, estudos já foram conduzidos entre o flavonoide e metais como cobre (BUKHARI et al., 2009; VIMALRAJ et al., 2018), cobalto (BIRJEES BUKHARI et al., 2008), ferro (JABEEN et al., 2017), magnésio (GHOSH et al., 2017) e zinco (POPOVA et al., 2016; TRENDAFILOVA et al., 2017).

Devido aos grupos hidroxilas e carbonila presentes na quercetina, esta possui facilidade na formação de complexos com metais (RAVICHANDRAN; RAJENDRAN; DEVAPIRIAM, 2014). Esta interação influencia as atividades biológicas da biomolécula (BUKHARI et al., 2009) e a estabilidade da mesma quando carregada a matrizes diversas (POPOVA et al., 2016; TRENDAFILOVA et al., 2017).

Autores como Bukhari et al. (2009) e Vimalraj et al. (2018) investigaram a influência da complexação de quercetina com cobre. Ambos os autores mostram que o complexo Cu-Qc apresenta maior atividade antioxidante em comparação com a quercetina pura. Esta influência se dá, pois, propriedades como atividade antioxidante, dependem do número e posições dos grupos OH na estrutura dos flavonoides, grupos que interagem com metais como cobre.

Bukhari et al. (2009) citou o mecanismo proposto por Bravo et al. (2001) para demonstrar a possível interação que ocorre entre o cobre e quercetina das nanoestruturas produzidas, onde íons metálicos removem os hidrogênios das hidroxilas presentes nas posições 3' ou 4' do anel fenólico B da quercetina em meio aquoso, como mostrado no esquema da Figura 3.16.

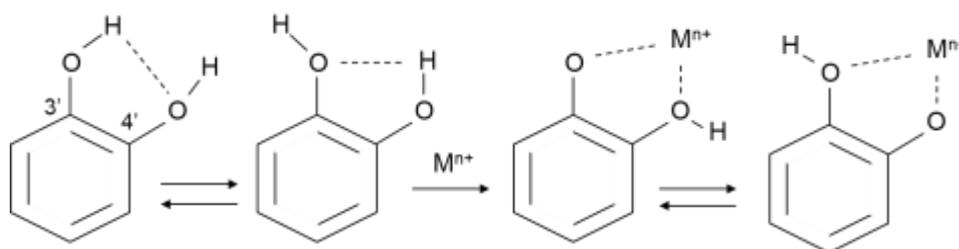


Figura 3.16. Desprotonação de hidroxilas 3' ou 4' por complexação da quercetina. Adaptado de Bukhari et al. (2009).

Kalinowska et al. (2016) investigaram a complexação de quercetina com o metal zinco. A partir de análises térmicas e elementares de complexos de Zn-Qc, os autores sugerem que a coordenação do metal envolveu principalmente os grupos 3',4'-hidroxila presentes no grupamento catecol da quercetina. As estruturas propostas são mostradas na Figura 3.17.

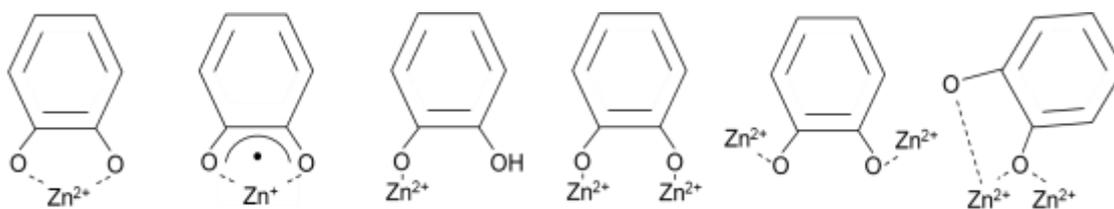


Figura 3.17. Estruturas químicas propostas por Kalinowska et al. (2016) para a complexação Zn-Qc.

A interação de metais com a quercetina também pode ocorrer entre o metal e a carbonila presente no flavonoide, como proposto por Vimalraj et al. (2018) para a interação entre cobre e quercetina e por Jun et al. (2007) para a interação entre zinco e quercetina, mostrado na Figura 3.18.

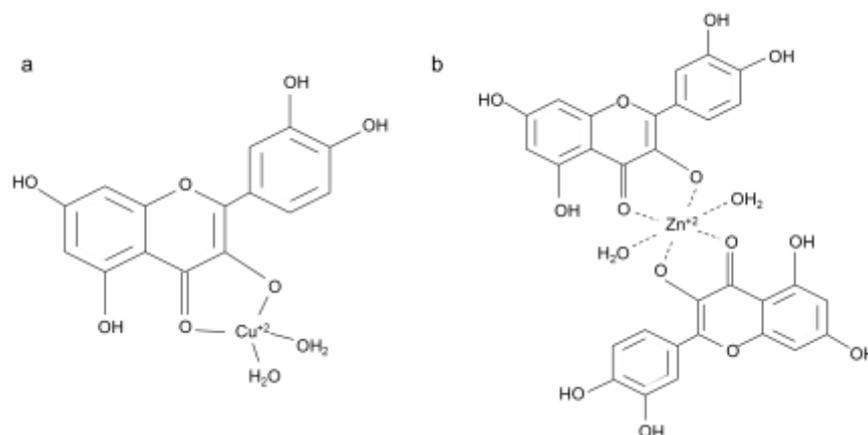


Figura 3.18. Estruturas químicas propostas por (a) Vimalraj et al. (2018) para a complexação Cu-Qc e por (b) Jun et al. (2007) e para a complexação Zn-Qc.

Vimalraj et al. (2018) elaboraram o complexo Cu-Qc pela mistura a temperatura ambiente de quercetina e sal de cobre em metanol. A estrutura química sugerida pelo grupo para o complexo formado envolve a interação do metal com a carbonila do anel C do flavonoide. Os autores Jun et al. (2007) também propuseram o envolvimento da carbonila do flavonoide no complexo Zn-Qc, no qual cada molécula de metal interage com duas moléculas de quercetina.

Trendafilova et al. (2017) estudaram o efeito da incorporação de diferentes teores de Zn (2 e 4% em peso) em sílica mesoporosa do tipo SBA-15 e o carregamento destas sílicas com quercetina anidra (Qc). Os materiais foram caracterizados por análise termogravimétrica (TGA) e espectroscopia no infravermelho (FTIR). Além disso, foi realizado um ensaio de liberação *in vitro* de quercetina em solução com pH 5,5.

Para a funcionalização da sílica com o metal, acetato de zinco, (20,14 mg e 40,28 mg para 2 ou 4% em peso de zinco, respectivamente) foi dissolvido em 1 mL de etanol (99,9%) e, a esta mistura adicionou-se a 300 mg de suporte mesoporoso SBA-15 à temperatura ambiente. Após, as amostras foram calcinadas em 500 °C por 3 h. A incorporação da quercetina na sílica ocorreu por meio da adição da sílica SBA-15 e quercetina na proporção de 1:1 em 1 mL de etanol e posterior agitação até a evaporação total do solvente. Em seguida, as nanoestruturas obtidas foram lavadas 3 vezes com 5 mL de água destilada e secas a 40 °C.

A análise de FTIR foi realizada a fim de se estudar a interação entre a molécula de quercetina, Zn e sílica mesoporosa, obtendo-se os espectros mostrados, na Figura 3.19.

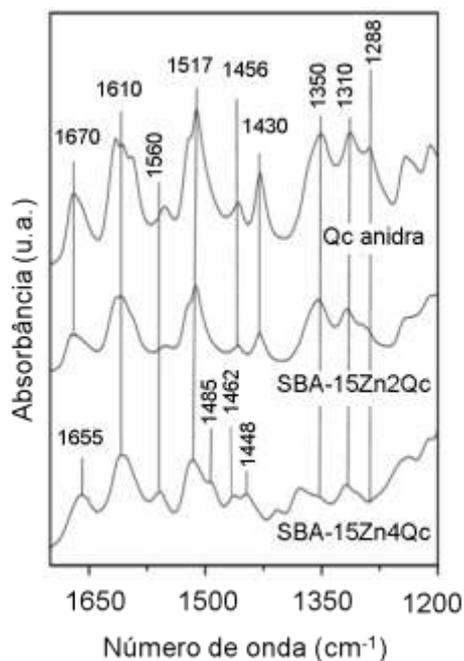


Figura 3.19. Resultado de FTIR obtido por Trendafilova et al. (2017).

Os resultados obtidos por FTIR indicam que a quercetina apresenta bandas características de vibrações de estiramento de carbonila aril-cetônica ($C=O$ a 1670 cm^{-1}) e de vibrações $C=C$ de anel aromático ($1610\text{-}1432\text{ cm}^{-1}$). A banda em 1350 cm^{-1} pertence à vibração de dobramento dos fenóis (provavelmente referentes aos átomos de carbono C3 e C4), a banda em torno de 1310 cm^{-1} pode ser atribuída a vibração de aromáticos e estiramentos $C-O$ aparecem em 1288 cm^{-1} .

Os resultados de FTIR para as amostra SBA-15 modificada com zinco e quercetina revelam que a adição de diferentes teores do metal impacta de formas diferentes os espectros das estruturas formadas. Para ambos os teores de metal, as intensidades das bandas em 1430 cm^{-1} relacionada à deformação $C-H$ do anel A aromático e 1288 cm^{-1} , relacionada a vibração de $C-O$ diminuem.

A estrutura com 4% de zinco apresenta mudanças ainda mais nítidas. Para esta estrutura é possível observar que a banda a 1456 cm^{-1} , relacionada a

vibrações C=C aromáticas, é dividida nas bandas 1462 e 1448 cm^{-1} . A principal mudança, no entanto, é o desaparecimento da banda larga e média intensidade pertencente à flexão dos OH de fenóis em 1350 cm^{-1} .

A partir das mudanças espectrais observadas, os autores sugerem que para a sílica SBA-15ZnQc modificada com Qc e 2% de metal, como o anel C é fixo, provavelmente a molécula de quercetina sofre alteração no anel B, havendo uma rotação do mesmo ao longo da ligação C-C. Sendo que a interação dominante entre Zn e quercetina ocorre através dos grupos OH do anel. Em contraste, para a sílica SBA-15ZnQc modificada com 4% do metal a formação do complexo Zn-Qc envolvem o grupo C=O ou os grupos OH do anéis C ou A, respectivamente.

Os resultados das análises termogravimétricas e do ensaio de liberação *in vitro* de quercetina são mostrados, respectivamente, nas Figura 3.20a e Figura 3.20b.

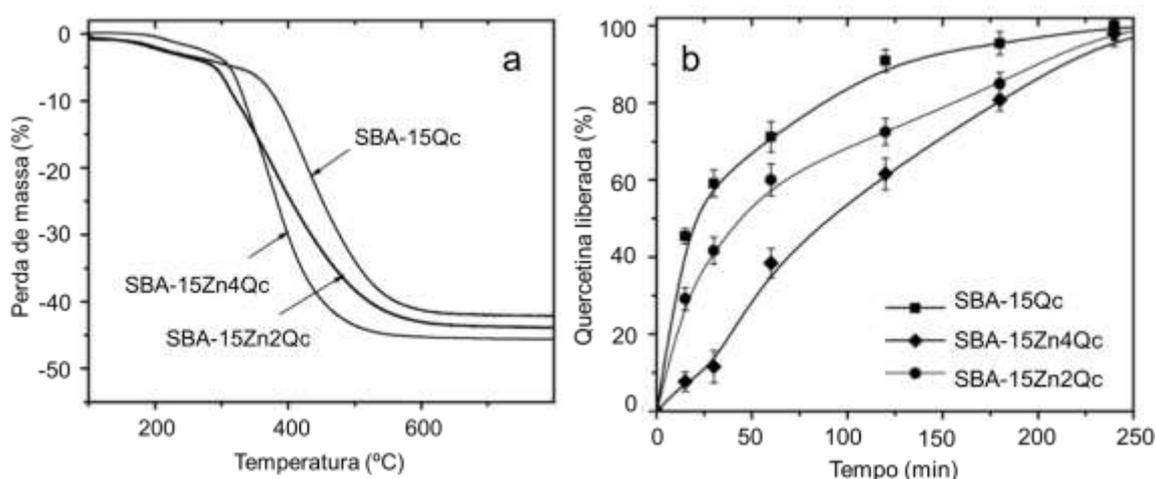


Figura 3.20. Resultados obtidos por Trendafilova et al. (2017) para a sílica SBA-15 carregada com quercetina, e com diferentes teores de zinco e quercetina a) TGA b) liberação *in vitro*.

Através dos resultados de TGA, o autor estimou o percentual de quercetina impregnada nas nanoestruturas de sílica modificadas com Zn, obtendo os seguintes valores: 41,6% para SBA-15Qc; 43,7% para SBA-15Zn2Qc e 45,5% for SBA-15Zn4Qc, indicando que a adição de zinco influencia ligeiramente o carregamento de quercetina. Além disso, pela análise de TGA, foi possível observar que a presença do metal aumentou a estabilidade térmica da estrutura estudada.

Os ensaios *in vitro* a pH = 5,5 mostraram uma liberação mais lenta de quercetina a partir de amostras de SBA-15Qc modificadas com Zn em comparação com a amostra sem o metal. A liberação do flavonoide acontece quase totalmente nos primeiros minutos, sendo quase 60% liberado nos primeiros 30 minutos. Em contraste, as amostras modificadas com Zn mostraram uma liberação mais lenta de quercetina, o que é mais proeminente para a amostra SBA-15Zn4Qc. No entanto, a liberação completa de quercetina foi observada dentro de 4 horas para todas as amostras. Estas diferenças nos perfis de liberação de amostras modificadas com Zn podem ser atribuídas à formação de complexos Zn-Qc, que são temporariamente imobilizados na estrutura de sílica.

Adicionalmente, testes biológicos mostraram que a quercetina carregada em veículos de sílica modificados com Zn tem potencial antineoplástico contra células cancerígenas HUT-29 (modelo de célula de linfoma cutâneo) superior em comparação com a ação do fármaco livre, ao mesmo passo que não afetou células HEK-293 (células epiteliais não-cancerígenas). Assim, as partículas de sílica SBA-15 modificadas com Zn são dispositivos promissores para a liberação da quercetina para o tratamento de cânceres.

Popova et al. (2016) também investigaram o comportamento de sílicas dopadas com quercetina (SBA-16/Qc e MCM-41/Qc) frente a incorporação de metal zinco através de análise de degradação térmica. As curvas de TG obtidas pelos autores para as zeólitas SBA-16 e MCM-41 são apresentadas na Figura 3.21.

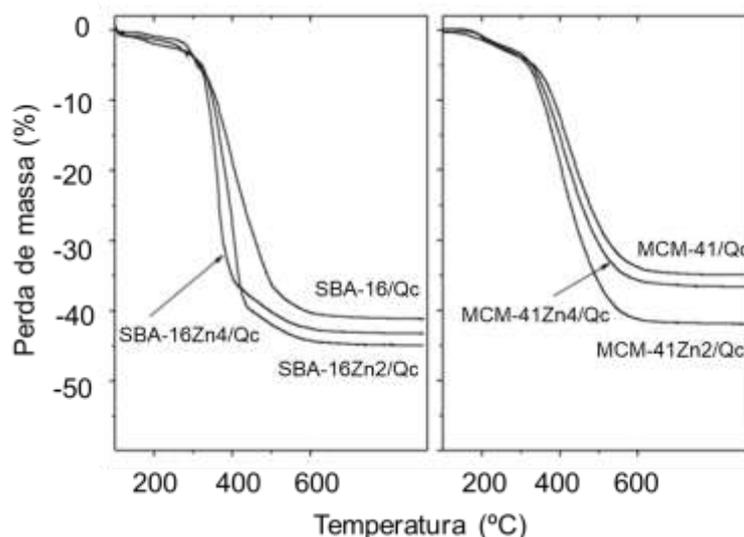


Figura 3.21. Curvas de TG apresentadas por Popova et al. (2016) para sílicas SBA-16 e MCM-41, com e sem zinco.

As curvas de degradação obtidas por Popova et al. (2016) evidenciam que ambas as sílicas dopadas com quercetina são mais estáveis do que as mesmas estruturas com o flavonoide e sem o metal. Popova et al. (2016) sugeriu que a interação entre quercetina e Zn forma um complexo que, carregado em um transportador apropriado, pode estabilizar e melhorar a eficiência do sistema de entrega da biomolécula a partir de matrizes como sílica.

Apesar do extenso número de trabalhos que reportam a utilização de nanotubos de TiO_2 na área biomédica, nenhum estudo encontrado até o momento relata o emprego de nanotubos de titanatos modificados com zinco e carregados com quercetina.

3.3. Câncer de Bexiga

O câncer de bexiga é a segunda malignidade mais comum do trato geniturinário (ROCKENBACH et al., 2013) e de acordo com as estatísticas da OMS é o quinto tumor maligno mais comum diagnosticado no Ocidente (ANTONI et al., 2017; COSTANTINI; MILLARD, 2011). O principal fator de risco associado a este câncer é o tabaco, porém outros fatores como idade, exposição ocupacional e hábitos podem ser responsáveis pela doença (ROCKENBACH et al., 2013).

No Brasil, o número de casos desta neoplasia vem aumentando nos últimos anos: subiu de 6.750 casos em 2014 para 9.670 casos em 2016 (INCA, 2016, 2014). Estimam-se 9.480 novos casos de câncer de bexiga para o Brasil em 2018, sendo 2.790 casos em mulheres e 6.990 casos em homens (INCA, 2017) (Figura 3.22).

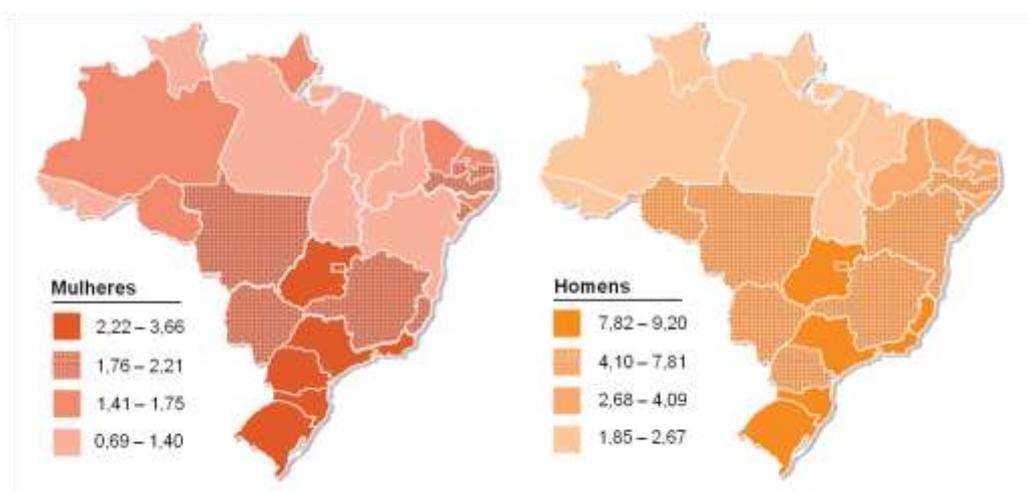


Figura 3.22. Taxas brutas de incidência de câncer de bexiga por 100 mil habitantes estimada para o ano de 2018 na população brasileira. Adaptado de INCA, (2017).

Quando diagnosticado precocemente, a maioria dos casos corresponde ao carcinoma não-músculo invasivo de bexiga (CNMIB) (que não invade a musculatura própria da bexiga), geralmente associado a bom prognóstico se tratado com ressecção transuretral e com antibioticoterapia intravesical adjuvante (BCG) (ROCKENBACH et al., 2013). No entanto, CNMIBs quando invadem a lâmina própria, passam a ser classificadas como carcinoma músculo-invasivo de bexiga (CMIB), correspondendo a 21-50% dos casos (VAN DE PUTTE et al., 2018). Neste estágio a doença é potencialmente letal quando não tratada (ANTONI et al., 2017; PARK et al., 2014; POMPEO et al., 2008)

O tratamento padrão utilizado para o carcinoma não-músculo invasivo de bexiga (CMIB), que é o tipo de câncer mais comum, é a cistectomia radical (ANTONI et al., 2017; PORTER et al., 2011), contudo esta abordagem é associada a altas taxas de morbidade e complicações pós-cirúrgicas (JACOBS, B.L., LEE, C.T., MONTIE, 2010). Diferentes abordagens terapêuticas têm surgido como opção de

tratamento alternativo para pacientes com CMIB, como por exemplo, a abordagem trimodal, cujo tratamento é uma combinação de cirurgia, quimioterapia e radioterapia (ANTONI et al., 2017; DIETRICH et al., 2018; JACOBS, B.L., LEE, C.T., MONTIE, 2010).

Deste modo, é importante o desenvolvimento de novas técnicas para aprimorar os resultados dos tratamentos convencionais e atualmente a aplicação de nanoestruturas vem se mostrando como alternativas interessantes neste âmbito (Pavon e Okamoto, 2007; Mirjolet et al., 2013).

Rieger et al., (2015) estudaram o uso de nanotubos de carbono (CNTs) como um dispositivo mucoadesivo para o transporte de fármaco combinado com quimioterápicos no tratamento de câncer de bexiga. Ensaios *in vivo* mostraram que os CNTs foram capazes de se aderirem ao urotélio da bexiga de ratos. Ensaios de viabilidade celular mostraram que os dispositivos apresentam efeito inibitório das células tumorais. Assim, os autores destacam a potencial utilização das nanoestruturas como um transportador de fármacos no combate ao câncer de bexiga.

Martin et al., (2014) exploraram a funcionalização superficial de nanopartículas de poli(ácido-co-glicólico), PLGA, com um polímero penetrante de células uroteliais (PGON) a fim de melhorar a solubilidade aquosa, captação celular urotelial, internalização, efeito citotóxico e duração da ação da droga carregada na nanopartícula (belinostat) no tratamento de câncer de bexiga. Estudos *ex vivo* e *in vivo* mostraram que a captação das nanopartículas modificadas foi dez vezes maior do que das nanopartículas não modificadas e inibe a progressão do câncer para suas formas metastática e agressiva. Assim, os autores mostraram que nanopartículas de PLGA combinados com PGON e Belionostat são uma alternativa viável para se atingir o mesmo índice terapêutico observado com o belinostat livre.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese de nanoestruturas

Neste trabalho, foram sintetizados nanotubos de titanatos sódicos (NaTNT), bem como nanotubos de titanatos com zinco (ZnTNT), os quais foram usados como suporte para a incorporação da biomolécula quercetina formando nanotubos de titanatos com quercetina (NaTNTQc) e nanotubos de titanatos com zinco e quercetina (ZnTNTQc). As nanoestruturas foram desenvolvidas no Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) da Escola de Ciências da PUCRS. A seguir são descritos os procedimentos de cada técnica.

4.1.1. Síntese de nanotubos de titanatos

O método de síntese dos nanotubos de titanatos (NaTNT), baseado no método hidrotérmico proposto por Kasuga et al. (1998), já foi anteriormente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, no qual as condições ótimas de síntese já foram estudadas (MONTEIRO, 2015). Para a síntese, 1,5 g de TiO_2 (5 mmol, JB Química, fase anatase, 99% pureza) foram suspensos em 120 mL de solução de NaOH 10 mol/L (Vetec), sob agitação magnética por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi transferida para um reator autoclave de inox de 120 cm^3 de volume interno revestido com copo de teflon e mantida a 135 °C por 72 h. O produto obtido da síntese foi um sólido branco, o qual foi lavado com água destilada até a obtenção de pH=7 na água de lavagem, e posteriormente seco em estufa por 12 h a uma temperatura de 80 °C e armazenado em dessecador, rendimento >95%. A Figura 4.1 ilustra um esquema das etapas desenvolvidas para a síntese dos nanotubos de titanatos sódicos (NaTNT).

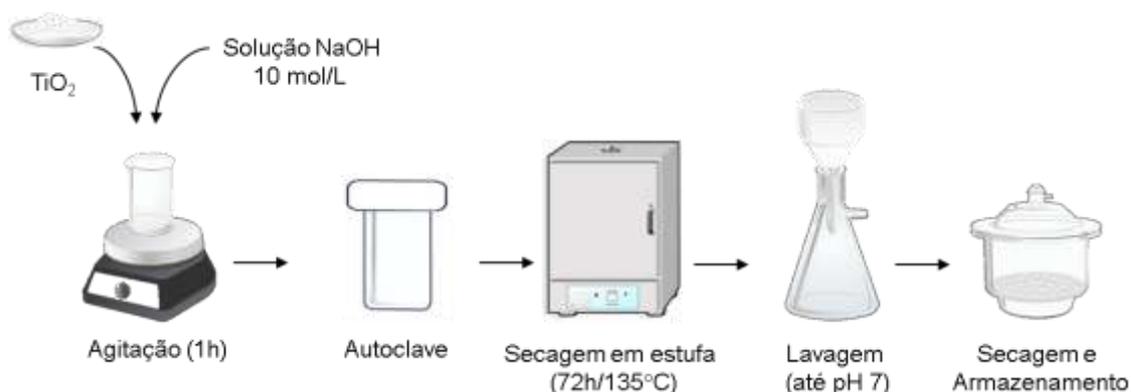


Figura 4.1. Síntese de nanotubos de titanatos sódicos.

4.1.2. Preparação de nanotubos com Zinco

A síntese de nanotubos de titanatos contendo zinco foi baseado no método descrito por Popova et al. (2016). Para a obtenção dos nanotubos de titanatos com zinco (ZnTNT), 0,5 g de NaTNT (1,65 mmol) foram adicionados a 100 mL de uma solução aquosa de cloreto de zinco 0,5 mol/L (50 mmol, Anidrol) e mantidos sob agitação magnética por 15 min a temperatura ambiente. Após, a suspensão foi filtrada a pressão reduzida sendo lavada com água destilada até a retirada total do cloreto (teste com nitrato de prata). O sólido branco obtido foi seco em estufa por 12 h a uma temperatura de 80°C e armazenado em dessecador. A Figura 4.2 ilustra um esquema das etapas desenvolvidas para a preparação dos nanotubos com íons metálicos de zinco (ZnTNT), rendimento >95%.

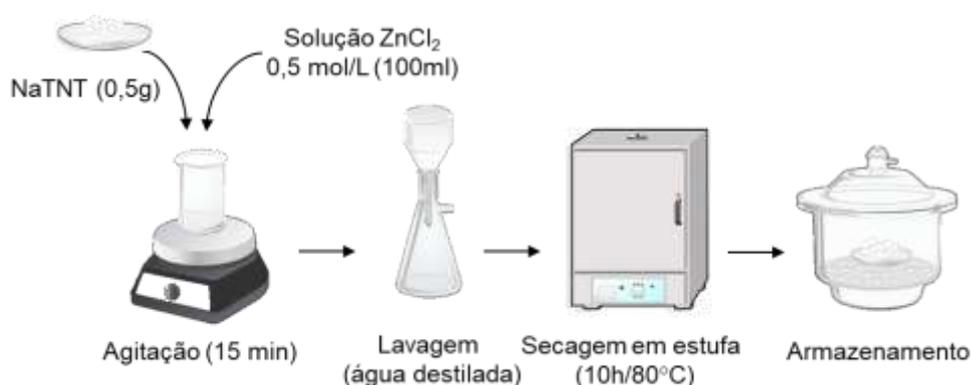


Figura 4.2. Preparação de nanotubos com zinco.

4.1.3. Incorporação da Quercetina nos nanotubos de titanatos

A metodologia utilizada para a incorporação da quercetina nos nanotubos de titanatos (NaTNT e ZnTNT) foi adaptada do método descrito na literatura segundo Popova et al (2016). Para o preparo de NaTNTQc, NaTNT (1,65 mmol) e quercetina (1,65 mmol, Sigma-Aldrich, 95% de pureza) foram adicionados na proporção de 1:1 em 50 mL de etanol, e mantidos sob agitação magnética por 60 min a temperatura ambiente, sob fluxo de nitrogênio. Em seguida, a suspensão foi centrifugada e o sólido alaranjado obtido foi lavado 3 vezes com 25 mL de água destilada. Após, o sólido foi seco em estufa por 10 h a uma temperatura de 40 °C e armazenado em dessecador. O preparo de ZnTNTQc foi realizado a partir do mesmo procedimento descrito acima, a não ser pela adição de ZnTNT no início do processo ao invés de NaTNT, e o sólido obtido apresentou coloração em tons de marrom. O rendimento obtido para NaTNTQc e ZnTNTQc foi de 50% e 47% respectivamente. A Figura 4.3 ilustra um esquema das etapas desenvolvidas para a incorporação da quercetina nos nanotubos (NaTNT e ZnTNT).

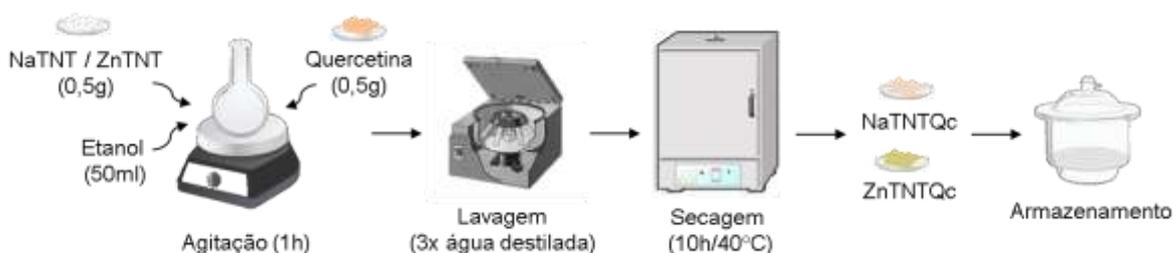


Figura 4.3. Preparação de NaTNTQc e ZnTNTQc.

4.2. Técnicas de Caracterização

4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia de infravermelho foi realizada a fim de investigar a presença de grupos funcionais na estrutura molecular das nanoestruturas de TNT, antes e após a incorporação de quercetina. Para esta análise utilizou-se a técnica espectroscopia vibracional com transformada de Fourier (FTIR) empregando um espectrômetro Perkin Elmer Instruments Spectrum One FTIR Spectrometer Hair

Sampling Accessory, localizado no Laboratório de Espectroscopia da Escola de Ciências da PUCRS, no intervalo de 1000 a 650 cm^{-1} com o auxílio do acessório UATR. As amostras foram analisadas em forma de pó.

4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV- FEG)

A análise da morfologia das nanoestruturas de TNT antes e após a incorporação de quercetina foi obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um microscópio FEI Inspect F50 no modo de elétrons secundários (SE) disponível no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM) da PUCRS. A tensão de aceleração foi de 20 kV e utilizou-se Au-Pd (ouro-paládio) para metalização das amostras. Além do modo SE, foi utilizado o modo EDS (*Energy Dispersive Spectroscopy*), a fim de identificar, de forma qualitativa, os metais contidos nos nanotubos e a realização de mapeamento para verificar a distribuição do mesmo na nanoestrutura.

4.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise de MET teve como objetivo a verificação da formação de paredes internas dos nanotubos bem como, possíveis diferenças ocasionadas pela troca iônica dos íons sódio por zinco e a incorporação da quercetina na estrutura. As imagens foram obtidas em um equipamento FEI, modelo Tecnai G2 T20, no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM) da PUCRS. As amostras foram suspensas em acetona e permaneceram em um ultrassom por 5 min, sendo colocadas em grids de cobre com filme de carbono (300 mesh).

4.2.4. Difração de Raios X (DRX)

Para a caracterização da estrutura cristalina das nanoestruturas elaboradas utilizou-se a técnica de DRX. Todos os materiais foram analisados sob a forma de pó em um difratômetro Shimadzu XRD 7000, radiação $\text{CuK}\alpha$ operando com voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA, varredura do 2θ de 5° a 70° , passo de $0,02^\circ$ e tempo de contagem de 2,0 s no Laboratório de Materiais e Nanoestruturas

(LMN-GEPSI) da PUCRS. O fenômeno de difração foi interpretado a partir da lei de Bragg.

4.2.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

A técnica de TGA foi utilizada a fim de avaliar a estabilidade térmica dos nanotubos de titanatos, da quercetina, bem como das estruturas TNTQc, ZnTNT e ZnTNTQc, além de estimar a quantidade de quercetina incorporada nas nanoestruturas de TNT. O equipamento utilizado foi um SDT modelo Q 600 (TA instruments) em atmosfera de N₂ com rampa de aquecimento de 10 °C/min a partir da temperatura ambiente até 1000 °C.

4.3. Ensaio de liberação controlada

O ensaio de liberação de quercetina a partir das nanoestruturas preparadas foi conduzido a fim de se verificar como o flavonoide interage com os nanomateriais e qual o percentual de entrega do mesmo para o meio a partir de cada nanoestrutura. A metodologia utilizada para o ensaio de liberação de quercetina a partir dos nanotubos de titanatos (NaTNT e ZnTNT) foi adaptada do método descrito na literatura segundo Trendafilova et al. (2017) e Sarkar et al. (2016). As nanoestruturas preparadas foram previamente pesadas (5 mg) e, em seguida, foram colocadas em contato com 50 mL uma solução de PBS (pH 5,5) e etanol na proporção de 90:10 v/v. O teste foi conduzido a 37 °C e 120 rpm e alíquotas de 3 mL foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados com reposição do meio após a coleta de cada alíquota. Este procedimento garante a dissolução infinita do meio, impedindo a saturação do mesmo, o que representa a dissolução do fármaco no organismo.

O procedimento foi realizado durante de 7 dias, com a coleta de alíquotas nas primeiras 12h de testes, e em seguida, uma coleta por dia. As soluções recolhidas foram analisadas em espectrofotômetro UV-vis (Perkin Elmer Lambda 35, comprimento de onda de 372 nm) disponível na Escola de Ciências da PUCRS. A concentração de quercetina liberada foi calculada de acordo com uma curva de

calibração preparada na mesma solução do meio de ensaio ($r= 0,9989$). Um esquema da metodologia é mostrado na Figura 4.4.

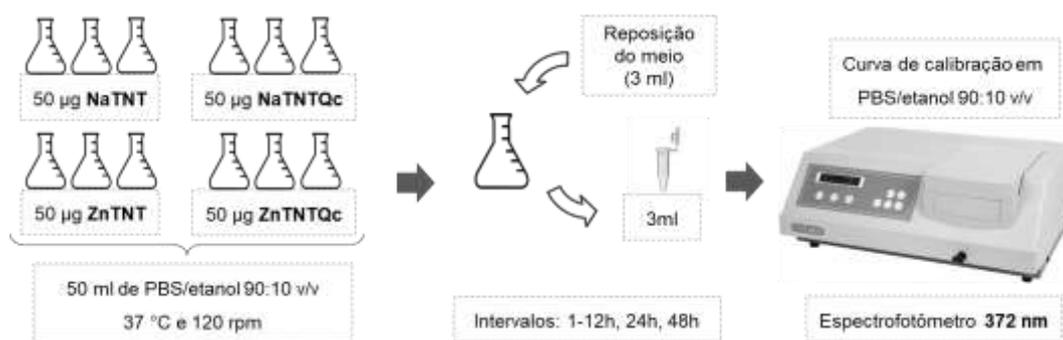


Figura 4.4. Metodologia de ensaio de liberação de quercetina de nanoestruturas.

4.4. Avaliação das Propriedades Biológicas

As nanoestruturas desenvolvidas neste trabalho foram analisadas quanto à viabilidade celular (MTT) e citotoxicidade combinada com irradiação. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia Aplicada (LAFAP) da Escola de Ciências (PUCRS), e no setor de radiologia do Hospital São Lucas. A seguir são descritos os procedimentos de cada ensaio, bem como o procedimento para cultura e manutenção celular, e análises estatísticas utilizadas no tratamento dos resultados.

4.4.1. Cultura e Manutenção das Células

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram de carcinoma de células transicionais de bexiga humana (T24) e células renais de macaco verde africano (Vero), ambas obtidas da ATCC. As células T24 foram cultivadas em meio RPMI e, a linhagem Vero foi cultivada em meio DMEM, ambos os meios contendo 0,5 U/mL dos antibióticos (penicilina/estreptomicina), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantida em temperatura de 37°C, com umidade relativa do ar de 95% e atmosfera de 5% CO₂. Para a realização dos experimentos as células foram tripsinizadas e plaqueadas conforme a necessidade.

4.4.2. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). O princípio deste método descrito por Mosmann (1983) consiste em medir a viabilidade celular pela atividade metabólica mitocondrial das células vivas, no qual é quantificada pela reação de redução do MTT (coloração amarela) em cristais de Formazan (coloração roxa). Desta forma, a redução do MTT é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (Figura 4.5).

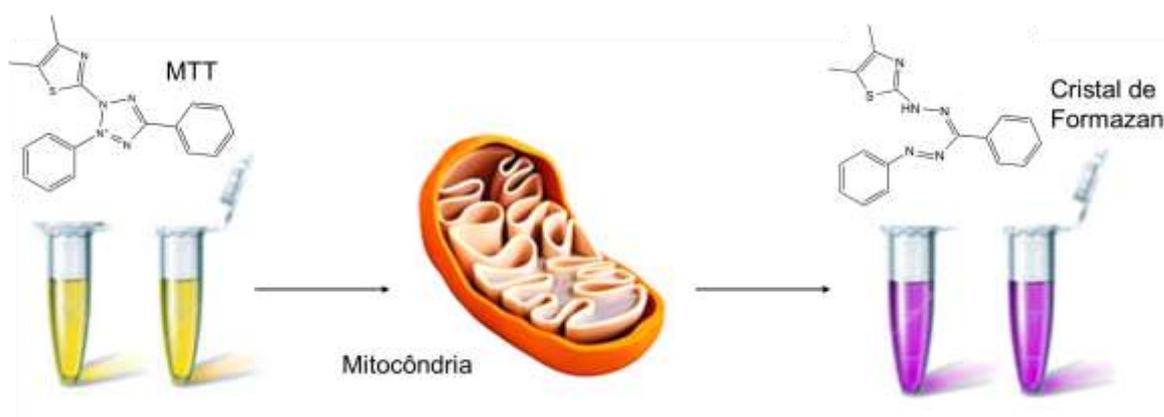


Figura 4.5. Princípio do ensaio de MTT.

Para avaliação da viabilidade celular, as linhagens T24 e Vero foram plaqueadas numa densidade de 5×10^3 células por poço em placas de 96 poços. Após a confluência, as células foram expostas a diferentes concentrações de Qc, NaTNT, NaTNT-Qc, ZnTNT e ZnTNT-Qc (Quadro 4.1) e incubadas por 24 e 48 horas. Os ensaios foram realizados em quatro experimentos independentes em triplicata para cada concentração, também foi utilizado um grupo sem tratamento como controle do experimento.

Quadro 4.1. Tratamento, concentrações e linhagem celular utilizadas nos ensaios por MTT.

Tratamento	Concentrações	Linhagem Celular
Controle	-	T24 e Vero
Qc	25; 50; 100 e 200 µg/mL	T24 e Vero
NaTNT		
NaTNTQc		
ZnTNT		
ZnTNTQc		

Após 24 e 48 horas de incubação, as células foram lavadas com PBS e a elas foram adicionados 100 µL de solução de MTT 0,5% por poço. Após 3 horas de incubação, o meio foi removido e a placa foi mantida em temperatura ambiente por 24 horas, para secagem. Na sequência, os cristais de Formazan foram eluídos em 100 µL de DMSO. A densidade óptica de coloração foi determinada por espectrofotômetro (SpectraMax Plus) a 570 nm (NICOLETTI et al., 2017). Os resultados foram determinados em percentual da absorbância dos tratados em relação ao grupo que não recebeu tratamento (controle).

4.4.3. Avaliação da Citotoxicidade combinada com Irradiação

Para determinar o efeito da combinação dos TNTs com irradiação em células tumorais de câncer de bexiga foram realizados dois ensaios combinados: contagem celular e ensaio clonogênico (Figura 4.6).



Figura 4.6. Avaliação do efeito da combinação dos TNTs com a irradiação.

4.4.3.1. *Contagem Celular*

A fim de determinar o efeito da combinação dos TNTs e irradiação no número total de células, as células T24 foram plaqueadas numa densidade de 7×10^3 células por poço em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas a 37 °C. Este ensaio foi dividido em dois grupos de oito experimentos independentes realizados em triplicata, onde as células foram incubadas sem tratamento (controle) e com 25 µg/mL de Qc, NaTNT, NaTNTQc, ZnTNT e ZnTNTQc. O grupo 1 experimental foi incubado por 24 horas e o grupo 2 por 48 horas antes de serem irradiadas com radiação gama na dose de 5 Gray (Gy), dose também estudada por Mirjolet et al. (2013) na irradiação combinada com TNTs em glioblastoma, utilizando fonte de Cobalto da *Theratron Phoenix* (Theratronics Ltda., Ontário, Canadá) a uma distância entre a fonte e o alvo de 54,5 cm. Após a irradiação, a linhagem celular T24 foi incubada por 24 horas.

Ao final deste período, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com CMF. Na sequência as células foram tripsinizadas e após neutralização da tripsina com o meio de cultivo, as células foram marcadas com tripan blue e imediatamente contadas no *Cell Counter - Life Technologies*. Esse ensaio permite a distinção individual das células vivas, que expulsam o corante de seu espaço interno, das não vivas, onde o corante penetra tornando-as azuis (NOMOTO et al., 2004). Os resultados foram expressos como percentual de células vivas em relação ao grupo controle não-irradiado.

4.4.3.2. *Ensaio Clonogênico*

A fim de avaliar a capacidade da célula se reproduzir após tratamento foi utilizado o ensaio clonogênico. Este ensaio consiste na sobrevivência celular *in vitro* baseada na habilidade que uma única célula possui de se multiplicar e formar colônias (FRANKEN et al., 2006). Para a realização deste ensaio foram plaqueadas 2×10^2 células por poço em placas de 12 poços e incubadas por 10 dias. As células foram mantidas em cultivo, onde o meio foi renovado a cada 2 dias, até o momento da fixação. Após a formação de colônias visíveis (10 dias), as células foram fixadas

em 500 μ L de formaldeído a 4% por 20 min e coradas em 500 μ L violeta genciana (0,1%) por 10 min.

4.4.4. Análise Estatística

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos como média \pm erro padrão da média e as análises estatísticas foram realizadas através do teste t de Student ou por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo post-hoc de Tukey. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados como indicativos de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização de nanoestruturas de TNT e TNTQc

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

A Figura 5.1 apresenta os espectros de infravermelho das nanoestruturas NaTNT, Qc e NaTNTQc e a Figura 5.2 apresenta os espectros de infravermelho das de NaTNT, ZnTNT e ZnTNTQc.

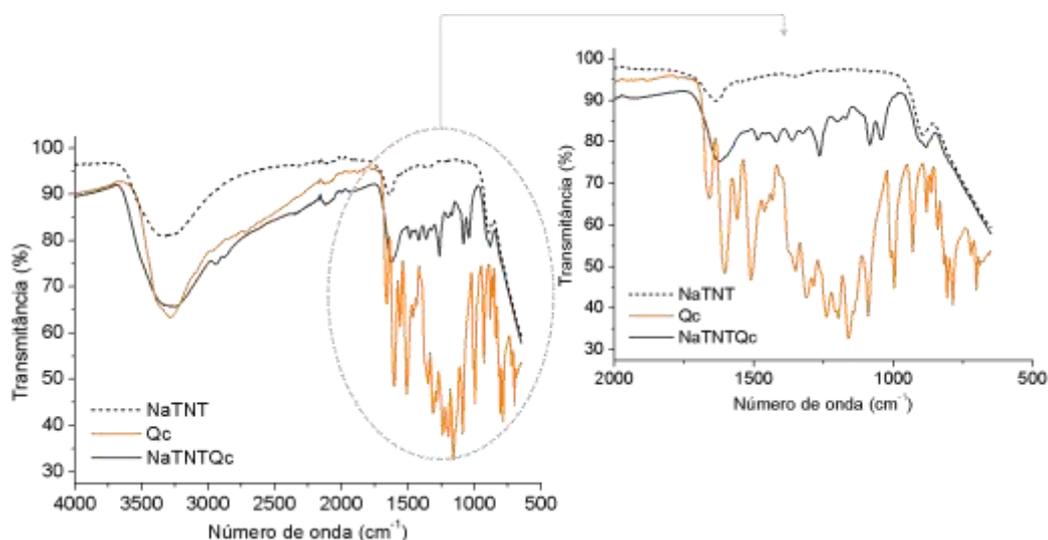


Figura 5.1. Espectros FTIR para NaTNT, Qc e NaTNTQc.

A análise dos espectros de infravermelho para os NaTNTs revela a presença de uma banda característica localizada entre 3500-3200 cm^{-1} , referente a vibração de estiramento dos grupos hidroxila superficiais provenientes da ligação Ti-OH, e uma banda localizada entre 1640-1630 cm^{-1} , referente a deformação da ligação O-H de Ti-OH. A banda localizada a 892 cm^{-1} é atribuída a vibração dos átomos de

oxigênio não ligados da estrutura Ti-O, podendo indicar a presença do sódio nos nanotubos (LINGHU et al., 2017).

O espectro de quercetina é similar aos obtidos por Trendafilova et al. (2017) e Sarkar et al. (2017), os quais apresentam uma banda característica localizada entre $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, referente a vibração dos grupos hidroxila e uma banda em 1660 cm^{-1} referente a vibrações de estiramento de carbonila aril-cetônica C=O. As bandas na faixa de $1600\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídas às vibrações de anel C=C aromáticas. A banda em 1350 cm^{-1} pertence à flexão dos OHs dos fenóis, a banda em torno de 1310 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração de aromáticos C-H enquanto o estiramento C-O aparece em 1288 cm^{-1} .

Os espectros mostram que a banda entre 3500 e 3000 cm^{-1} de NaTNT se encontra mais alargada em NaTNTQc. Além disso, é possível observar o aparecimento de uma banda fraca a 2941 cm^{-1} atribuída à presença de grupamentos C-H alifáticos. A presença de bandas entre 1750 e 1500 cm^{-1} pode ser atribuída a sobreposição das bandas em 1660 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} da quercetina incorporada nos nanotubos. A banda em 892 cm^{-1} de NaTNT, referente a presença de sódio na estrutura, é observada em NaTNTQc, sugerindo que a nanoestrutura manteve sua composição mesmo após a incorporação da quercetina. Além disso, é possível perceber o surgimento de bandas características deslocadas da quercetina nos espectros de NaTNTQc, bem como um ligeiro deslocamento da banda de NaTNT em 1640 cm^{-1} , sugerindo que o flavonoide foi incorporado a estrutura dos NaTNTs.

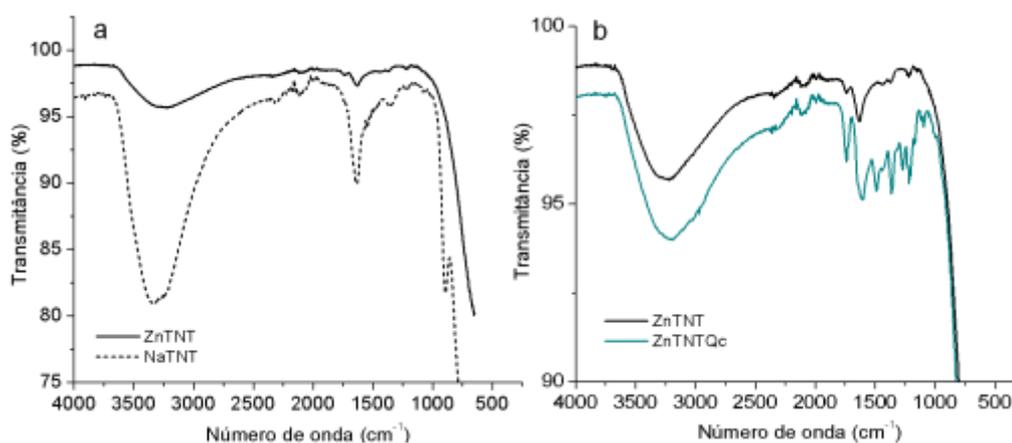


Figura 5.2. Espectros de FTIR para NaTNT, ZnTNT e ZnTNTQc.

A Figura 5.2a mostra os espectros das nanoestruturas modificadas com zinco, os quais apresentam bandas referentes a grupos hidroxila superficiais e vibração de água molecular como nos NaTNT. Porém as bandas entre 3500 e 3000 cm^{-1} se encontram mais alargadas em ZnTNT. Ainda, a banda localizada em 892 cm^{-1} , referente à presença de sódio, não é encontrada em ZnTNT, indicando que a troca iônica de sódio por zinco na estrutura dos mesmos foi efetiva.

A Figura 5.2b mostra os espectros para ZnTNT e ZnTNTQc. A partir destes espectros é possível perceber o surgimento de bandas características da quercetina nos espectros de ZnTNTQc. Ainda, é possível perceber o deslocamento e diminuição de intensidade da banda característica de NaTNT em 1640 cm^{-1} . A banda característica da quercetina em 1663 cm^{-1} referente à ligação C=O também tem sua intensidade diminuída em ZnTNTQc. As bandas na faixa de 1640 e 1440 cm^{-1} da nanoestrutura ZnTNTQc referem-se aos anéis aromáticos da quercetina.

A Figura 5.2b também mostra o aparecimento de uma banda em 1740 cm^{-1} referente à vibração C=O (SURENDRA et al., 2016). Esta banda de carbonila é atribuída ao deslocamento da banda referente ao mesmo grupamento encontrada em 1660 cm^{-1} nos espectros das outras nanoestruturas estudadas, o que sugere que a interação do zinco com a quercetina pode estar ocorrendo entre o metal e a carbonila presente no flavonoide.

Sapino et al. (2005) também observou modificações na posição dos modos de vibração da carbonila da quercetina após o carregamento da mesma em nanoestruturas de sílica, indicando que a mesma interage com a matriz. Já Trendafilova et al. (2017) verificaram que diferentes teores de metais carregados em matrizes de sílica e quercetina, impactam nos espectros das estruturas formadas, seja pelo desaparecimento, diminuição, ou deslocamento de bandas.

5.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV- FEG)

A fim de avaliar a morfologia dos nanotubos NaTNT e ZnTNT bem como possíveis modificações geradas pela incorporação da quercetina, foram realizadas análises por MEV-FEG. As micrografias obtidas para os nanotubos de titanatos de

sódio e zinco são mostradas na Figura 5.3a e Figura 5.3b, respectivamente, e as micrografias para as nanoestruturas NaTNT e ZnTNT com e sem quercetina incorporada são mostradas na Figura 5.3c e Figura 5.3d, respectivamente. A análise de EDS (Figura 5.4) para as nanoestruturas NaTNT e ZnTNT foi realizada a fim de verificar se a troca de sódio por zinco foi efetiva.

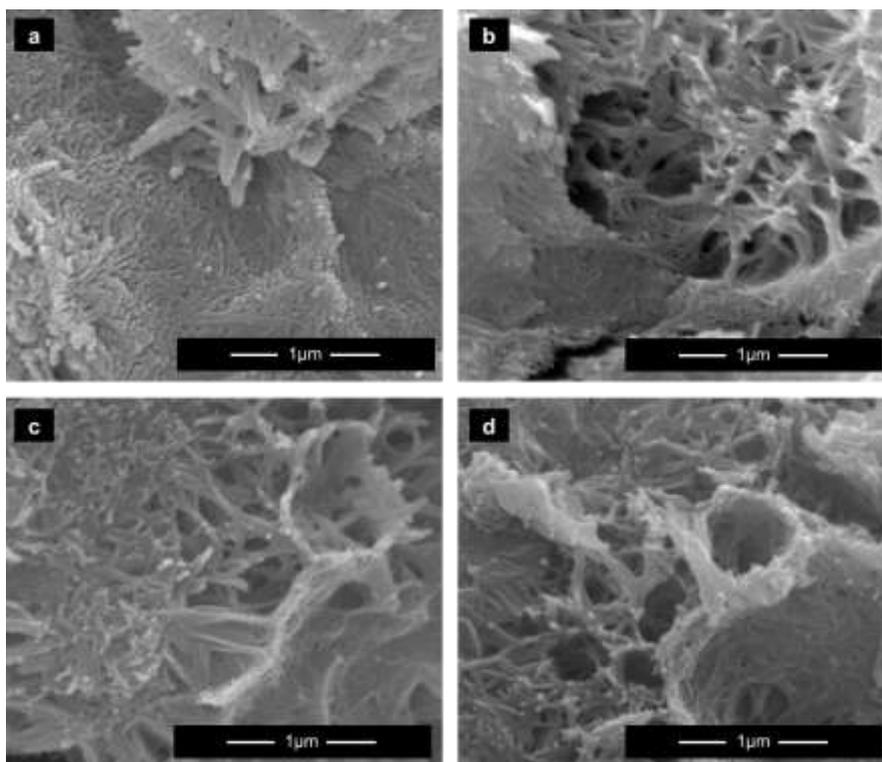


Figura 5.3. Imagens obtidas por MEV para a) NaTNT b) ZnTNT c) NaTNTQc d) ZnTNTQc a uma magnificação de 100k.

As imagens de MEV mostram que a estrutura tubular dos nanotubos de titanatos foi mantida após a troca iônica de sódio por zinco e carregamento com quercetina.

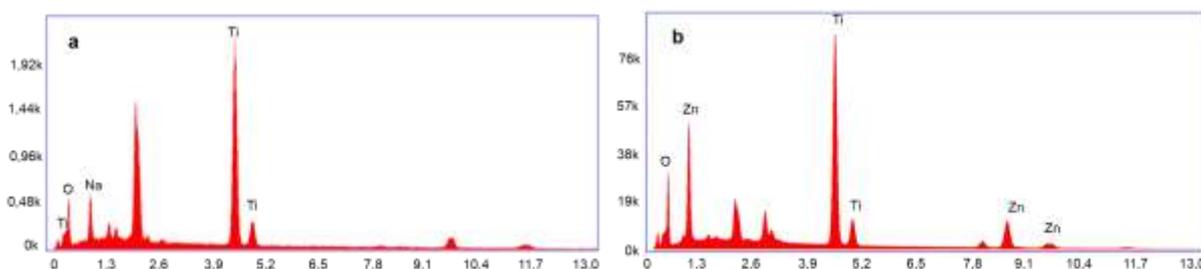


Figura 5.4. Espectros de EDS obtido para a) NaTNT e b) ZnTNT.

O espectro de EDS da Figura 5.4a mostra picos de titânio, oxigênio e sódio, encontrados na estrutura dos nanotubos de titanatos sódicos. Já a Figura 5.4b mostra os picos encontrados para as nanoestruturas após o tratamento com $ZnCl_2$, revelando a presença de titânio, oxigênio e zinco. Estes resultados indicam que houve uma troca efetiva do metal sódio presentes na superfície do NaTNT pelo metal zinco nas estruturas ZnTNT, o que corrobora com os resultados anteriores obtidos por FTIR. Os picos não identificados nos espectros são referentes à metalização com ouro.

5.1.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise de MET foi realizada a fim de avaliar a morfologia dos nanotubos NaTNT e ZnTNT, bem como nos nanotubos carregados com quercetina. A Figura 5.5 apresenta as imagens obtidas para os nanotubos NaTNT e ZnTNT antes e após a incorporação quercetina.

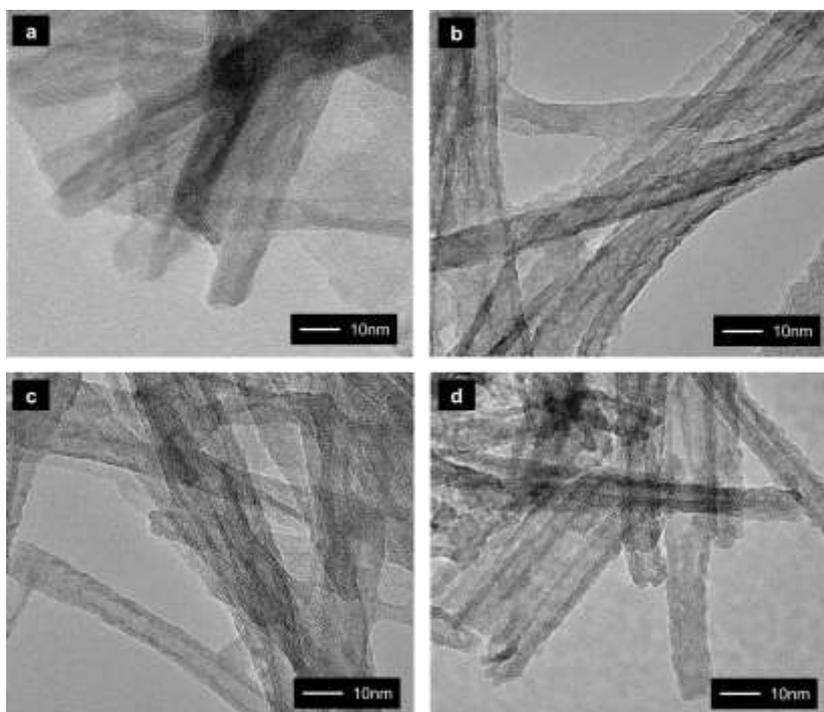


Figura 5.5. Micrografias obtidas por MET para a) NaTNT b) ZnTNT c) NaTNTQc d) ZnTNTQc a magnificação de 440k (a, b e d) e 180k (c).

As imagens obtidas por MET mostram que os nanotubos de titanatos apresentam morfologia tubular esperada devido ao método de preparação. Os nanotubos modificados com zinco (Figura 5.5b) apresentam uma superfície irregular, gerada pela presença do metal zinco. Este mesmo efeito já foi observado na incorporação de metais como Sn, Ce e Pd em nanotubos de titanatos (MARQUES et al., 2015; TSAI et al., 2013; YANG et al., 2015). Os autores mostraram que a incorporação de metais resulta na geração de pontos de maior densidade na superfície dos nanotubos, no formato partículas esféricas. O mesmo pode ser observado nos nanotubos ZnTNT incorporados com quercetina (Figura 5.5d).

No caso dos nanotubos NaTNT carregados com quercetina (Figura 5.5c), os mesmos apresentam estrutura semelhante aos nanotubos sem a biomolécula (Figura 5.5a), além de regiões de aglomerações de nanotubos.

5.1.4. Difração de Raios X (DRX)

A técnica de DRX foi utilizada a fim de investigar a estrutura cristalina dos das nanoestruturas preparadas. A Figura 5.6 apresenta os difratogramas para as nanoestruturas NaTNT, ZnTNT, NaTNTQc e ZnTNTQc.

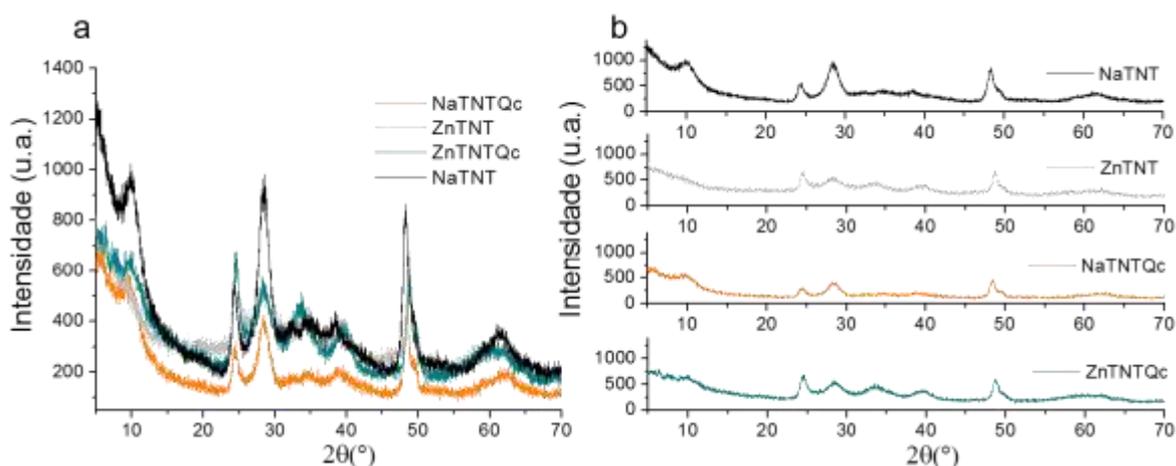


Figura 5.6. Difratogramas obtidos para NaTNT, ZnTNT, NaTNTQc e ZnTNTQc em duas perspectivas (a) sobrepostos (b) individuais.

A Figura 5.6a e Figura 5.6b mostram que as nanoestruturas NaTNT e NaTNTQc apresentam picos característicos em 10°, 24°, 28° e 48° correspondentes aos planos cristalinos de uma estrutura típica de $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ (DE CARVALHO et al., 2017). O pico em 10° é referente a distância interlamelar dos nanotubos (DE CARVALHO et al., 2017), a qual apresenta o valor de 0,875 nm para NaTNT e 0,927 para NaTNTQc indicando que houve um leve aumento da distância entre lamelas dos nanotubos pela adição de quercetina. Este aumento pode estar relacionado à interação que o flavonoide estabelece com os grupamentos encontrados nas camadas interlamelares do nanotubo, alterando o balanço original dos TNTs devido à substituição de íons Na^+ (NIU et al., 2013). A quercetina utilizada neste trabalho, a qual possui pico entre 25° e 30° (POPOVA et al., 2016), não é visível nas difatogramas, possivelmente por estar encoberto pelo pico 28° referente ao titanato.

As nanoestruturas com zinco apresentam, além dos picos discutidos anteriormente, picos de difração próximos a 34° e 36°, referentes a formação de óxido de zinco na nanoestrutura (WANG et al., 2009). Além disso, a baixa intensidade do pico em 28° comparado ao pico em 24° nas estruturas com zinco mostra que a troca iônica do cátio Na^+ foi bem sucedida (SANTOS et al., 2016). A distância interlamelar para as nanoestruturas com zinco foram de 0,885 nm para ZnTNT e 0,907 nm para ZnTNTQc. O aumento sofrido por ZnTNT em relação a NaTNT deve-se a incorporação de zinco na estrutura. Já aumento da distância interlamelar de ZnTNTQc em relação a ZnTNT deve-se a interação que a quercetina estabelece com os grupamentos encontrados nas camadas interlamelares do nanotubo.

5.1.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 5.7a apresenta os termogramas (TG) e a Figura 5.7b apresenta as derivadas das curvas termogravimétricas (DTG) para as nanoestruturas NaTNT, ZnTNT, NaTNTQc e ZnTNTQc.

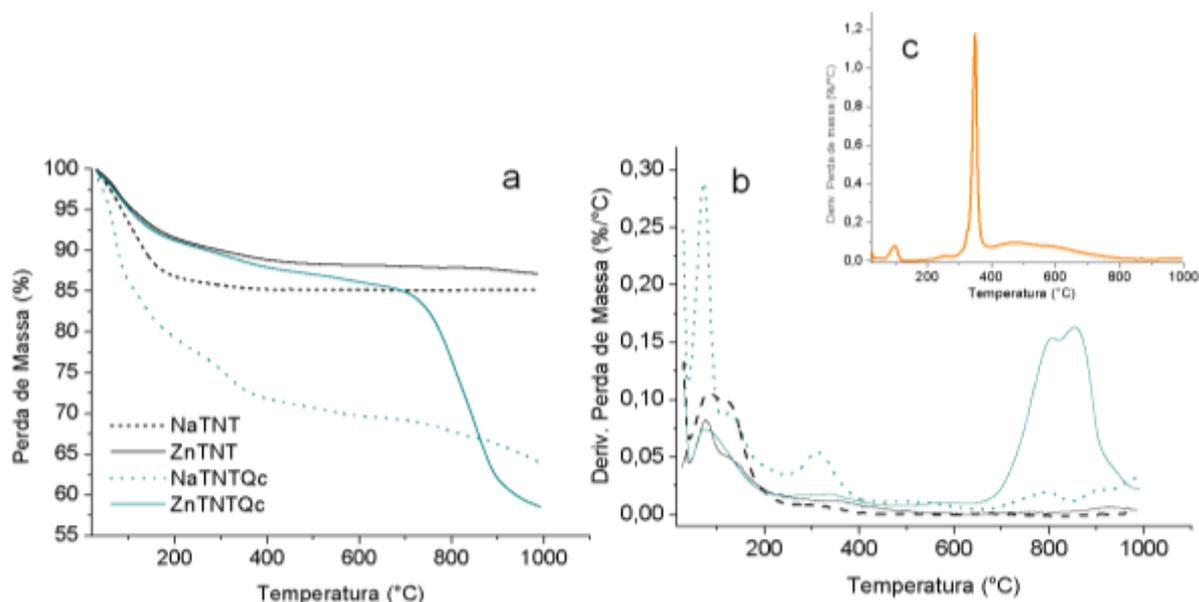


Figura 5.7. Curvas de a) TG e b) DTG NaTNT, ZnTNT, NaTNTQc e ZnTNTQc c) DTG Qc.

A Figura mostra que as curvas de degradação térmica das estruturas NaTNT e ZnTNT que ocorre em uma etapa, entre 25 e 100 °C, correspondente aos grupos OH e umidade presentes nas estruturas. A nanoestrutura NaTNTQc apresenta, além da primeira etapa de uma segunda etapa de degradação entre 200 e 400 °C, referente a degradação da quercetina incorporada (Figura 5.7c).

A nanoestrutura ZnTNT com quercetina (ZnTNTQc) apresenta, além da etapa já discutida para ZnTNT, uma segunda etapa de degradação entre 600 e 1000 °C. Este comportamento sugere uma interação entre o zinco e a quercetina, a qual aumenta a estabilidade térmica das nanoestruturas ZnTNTQc. Os percentuais de incorporação de quercetina obtidos foram em torno de 12,5 % para NaTNTQc e 27,75 % para ZnTNTQc, confirmando que a interação entre Qc e Zn aumenta a estabilidade do sistema.

Este resultado está de acordo com os resultados encontrados por Popova et al. (2016) e Trendafilova et al. (2017) as quais sugeriram que a interação entre quercetina e Zn forma um complexo capaz de estabilizar os sistemas os quais são encontrados.

5.2. Ensaio de liberação controlada

A Figura 5.8 apresenta os perfis de liberação de quercetina a partir das nanoestruturas NaTNTQc e ZnTNTQc.

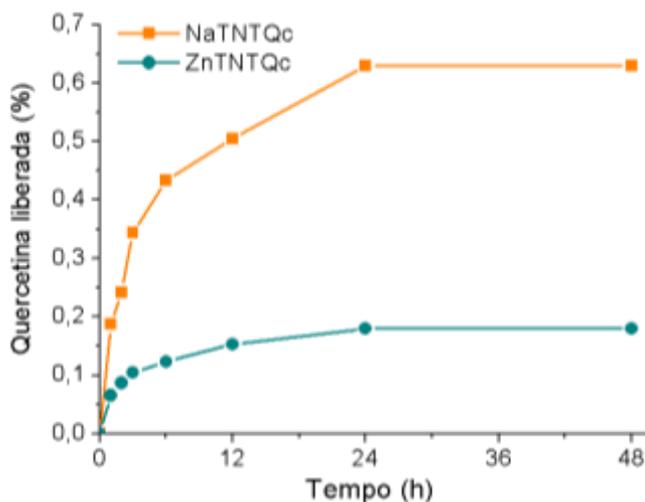


Figura 5.8. Perfis de liberação de quercetina a partir de nanoestruturas NaTNTQc e ZnTNTQc.

Os perfis de liberação mostram que as nanoestruturas NaTNTQc liberam em torno de 63% de quercetina após 24h de ensaio mantendo este comportamento por 48h. Já as nanoestruturas ZnTNTQc liberam apenas 18% de quercetina no mesmo período. Além disso, as nanoestruturas com zinco liberam o flavonoide de forma mais controlada, entregando menores massas do que as nanoestruturas sem o metal no mesmo período. Ainda, em ambas as estruturas, nota-se que a maior parte do flavonoide incorporado foi liberado após 6h de teste, mostrando um perfil mais linear após este período.

Estes resultados, associados aos resultados de caracterização, indicam que o zinco forma um complexo com a quercetina em ZnTNTQc, o que pode estar impedindo que a mesma seja totalmente liberada da nanoestrutura. Esta interação é menos notável em NaTNTQc, pois mais de 60% da quercetina inicial é liberada destas nanoestruturas.

Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Sarkar et al. (2016), que obteve perfis de liberação de quercetina a partir de nanopartículas de sílica em pH 5,6 com a maior parte de flavonoide liberado nas primeiras 10 horas de teste, seguido de uma liberação mais lenta do mesmo até 60 h. Trendafilova et al. (2017) obteve 100% de liberação de quercetina a partir de matriz de sílica SBA-15 após 4h de ensaio. A sílica SBA-15 modificada com zinco mostrou um maior controle de liberação do flavonoide, bem como os resultados encontrados neste trabalho, mostrando que o metal é capaz de delongar a liberação de quercetina a partir de matrizes como sílica ou nanopartículas de titanatos. Assim, as nanoestruturas elaboradas se mostram como dispositivos adequados para a liberação de flavonoides.

5.3. Avaliação das Propriedades Biológicas

5.3.1. Ensaio de Viabilidade celular (MTT)

Os resultados da viabilidade celular por MTT da quercetina nas linhagens Vero (células de rim de macaco verde) e T24 (câncer de bexiga humano) são mostrados na Figura 5.9.

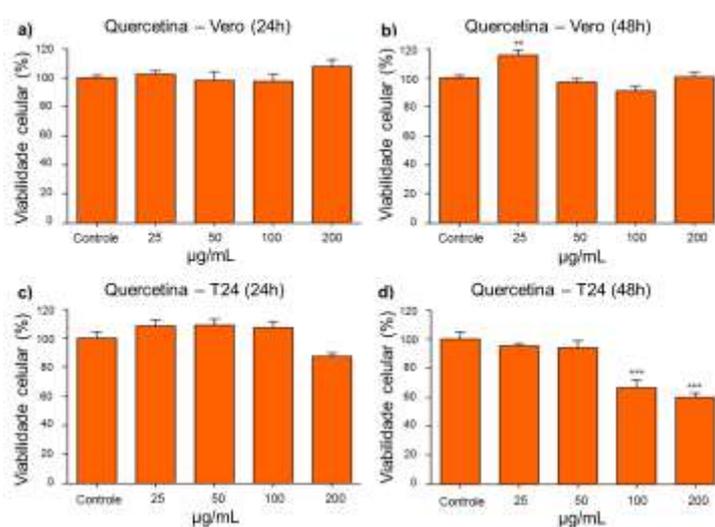


Figura 5.9. Resultados da viabilidade celular da quercetina na linhagem Vero por 24h (a) e 48h (b) e na linhagem celular T24 por 24h (c) e 48h (d). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Foi possível observar que a quercetina não promoveu nenhum efeito sobre a viabilidade celular das linhagens Vero e T24 nas concentrações testadas, após 24 horas. Por outro lado, a quercetina promoveu proliferação celular na concentração de 25 µg/mL, após 48 horas na linhagem Vero. Enquanto, na linhagem T24, a quercetina apresentou redução da viabilidade celular nas concentrações de 100 e 200 µg/mL, no mesmo tempo.

Este perfil antitumoral da quercetina é descrito por diversos autores (MA et al., 2006; ROCKENBACH et al., 2013) O mesmo perfil de inibição da viabilidade tumoral na linhagem T24 foi observada anteriormente por Ma et al., (2006) onde os mesmos ainda acrescentam que a quercetina inibe a formação de colônias, induz morte celular por apoptose e parada do ciclo celular em células de câncer de bexiga T24.

Os resultados da viabilidade celular por MTT das nanoestruturas NaTNT, NaTNTQc, ZnTNT e ZnTNTQc nas linhagens Vero e T24 são mostrados na Figura 5.10 e Figura 5.11, respectivamente. Como controle negativo de citotoxicidade foi utilizado apenas o meio de cultura.

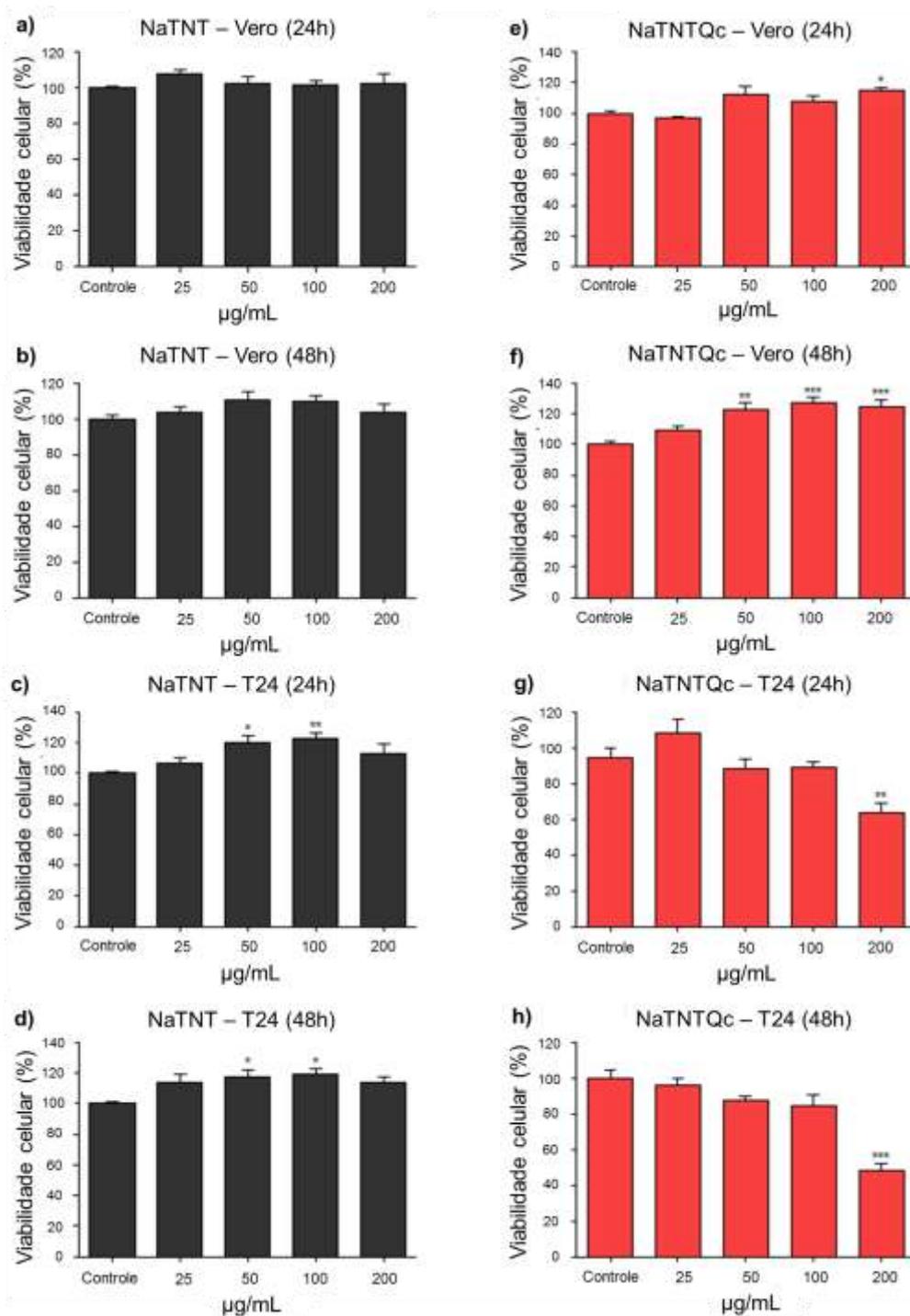


Figura 5.10. Resultados da viabilidade celular de NaTNT na linhagem Vero por 24h (a) e 48h (b) e da linhagem T24 por 24h (c) e 48h (d) e de NaTNTQc na linhagem Vero por 24h (e) e 48h (f) e da linhagem T24 por 24h (g) e 48h (h). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

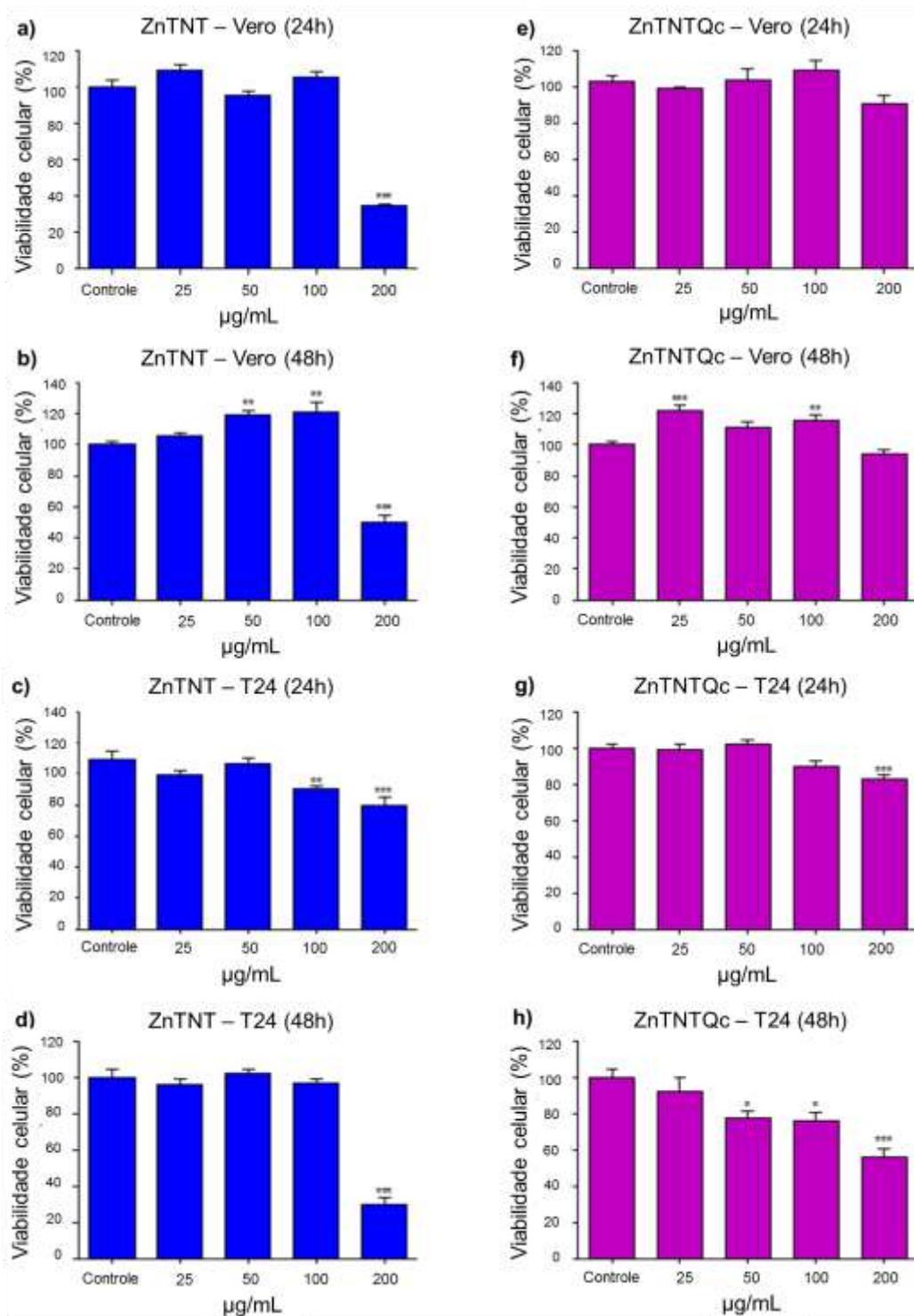


Figura 5.11. Resultados da viabilidade celular de ZnTNT na linhagem Vero por 24h (a) e 48h (b) e da linhagem T24 por 24h (c) e 48h (d) e de ZnTNTQc na linhagem Vero por 24h (e) e 48h (f) e da linhagem T24 por 24h (g) e 48h (h). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

A análise da Figura 5.10 mostra que o NaTNT não promoveu alteração da viabilidade celular da linhagem Vero até 48 horas. Enquanto na linhagem T24, o material promoveu proliferação celular nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, após 24 e 48 horas. Os NaTNT são descritos na literatura como biocompatíveis (MIRJOLET et al., 2013), e este perfil foi observado neste estudo tanto na Vero, quanto na T24. Em contraste ao perfil observado pelo NaTNT, os nanotubos quando funcionalizados com quercetina, exibem outro comportamento. O NaTNTQc promoveu um efeito dual: apresentando proliferação celular na linhagem Vero (na concentração de 200 µg/mL após 24 horas e, nas concentrações de 50 a 200 µg/mL após 48 horas) e redução da viabilidade celular na linhagem T24 na concentração de 200 µg/mL após 24 e 48 horas.

A análise da Figura 5.11 mostra que o tratamento ZnTNT apresentou redução da viabilidade celular de ambas as linhagens na concentração de 200 µg/mL até 48 horas. Além disso, o ZnTNT foi capaz de aumentar a viabilidade celular da Vero nas concentrações de 50 e 100 µg/mL após 48 horas. Já na linhagem T24, o material nanoestruturado também inibiu a viabilidade celular na concentração de 100 µg/mL, após 24 horas. Apesar das duas concentrações de redução da viabilidade tumoral após 24 horas de exposição ao ZnTNT, a redução da viabilidade da célula tumoral foi mais drástica em 48 horas. Por outro lado, quando ZnTNT é funcionalizado com quercetina apresenta aumento da proliferação celular nas concentrações de 25 e 100 µg/mL para as células Vero após 48 horas. Já quando testado na linhagem T24, o ZnTNTQc apresentou redução da viabilidade celular na concentração de 200 µg/mL, após 24 horas e, nas concentrações de 50 a 200 µg/mL, após 48 horas.

Utilizando um intervalo crescente de concentrações que variou de 25 a 200 µg/mL, não foi observada nenhuma resposta dose-efeito na concentração de 25 µg/mL nas linhagens Vero e T24 após 48 horas de exposição aos nanotubos (NaTNT, NaTNTQc, ZnTNT e ZnTNTQc). Para a continuação do trabalho, a dose não-citotóxica de 25 µg/mL foi escolhida para ser testada na linhagem T24 para a realização dos experimentos subsequentes.

A partir da Figura 5.10 e Figura 5.11 foi possível perceber que existe influência do tempo nos valores de citotoxicidade das nanoestruturas. Ainda, a partir dos resultados de liberação controlada, após 24h de contato com solução, toda a quercetina presente nas nanoestruturas é liberada para o meio. Assim, estes resultados sugerem que mesmo após a liberação total do flavonoide para o meio após 24h, a quercetina continua interagindo com as células até 48h de teste.

5.3.2. Avaliação da Citotoxicidade combinada com Irradiação

O efeito de radiosensibilização da combinação entre as nanoestruturas e a energia ionizante foi avaliado pela contagem celular (24 horas após a irradiação) e pelo ensaio clonogênico. Para cada condição de tratamento (controle e TNTs), uma placa não-irradiada correspondeu a 100% de sobrevivência para avaliar apenas o efeito de citotoxicidade da radiação ionizante. As células da linhagem T24 foram tratadas com uma concentração 25 µg/mL de NaTNT, NaTNTQc, ZnTNT e ZnTNTQc, e incubadas por 24 ou 48 horas.

5.3.2.1. Contagem celular

A Figura 5.12a e Figura 5.13a mostram o número de células após 24h e 48h de tratamento com quercetina e nanoestruturas, respectivamente, para grupos não-irradiados (0 Gy) e irradiados (5 Gy), bem como a análise estatística dos resultados (Figura 5.12b, Figura 5.12c, Figura 5.13b e Figura 5.13c).

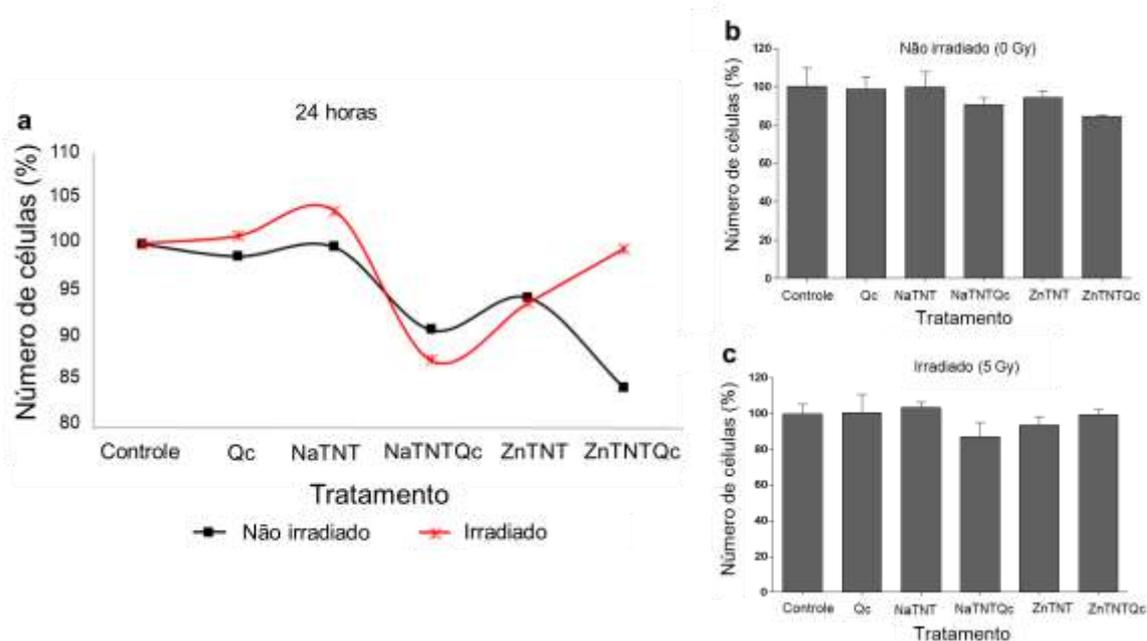


Figura 5.12. Número de células (a) e análise estatística (b, c) da linhagem T24 exposta ou não a irradiação após 24h de tratamento com quercetina e nanoestruturas. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

A análise da Figura 5.12a mostra que não houve uma variação significativa do número de células entre os grupos testados (não-irradiado e irradiado). Apesar dos resultados de perfil opostos no tratamento ZnTNTQc no grupo irradiado quando comparado ao grupo não-irradiado após 24h de incubação, esta diferença não é significativa estatisticamente. A Figura 5.12b e Figura 5.12c, exibem a avaliação estatística entre os grupos, onde ficou evidenciado a redução do número de células da linhagem T24 após 24 horas.

Por outro lado, através da análise da Figura 5.13a é possível observar uma diferença da variação do número de células entre o grupo não-irradiado e irradiado após 48h de incubação às nanoestruturas. O número de células apresentou variação significativa nos tratamentos com NaTNT, NaTNTQc e ZnTNT (Figura 5.13b e Figura 5.13c). Estes resultados estão de acordo com Mirjolet et al. (2013), onde os autores mostraram que nanotubos de titanatos foram capazes de diminuir o número de células de glioblastomas quando associados à radioterapia.

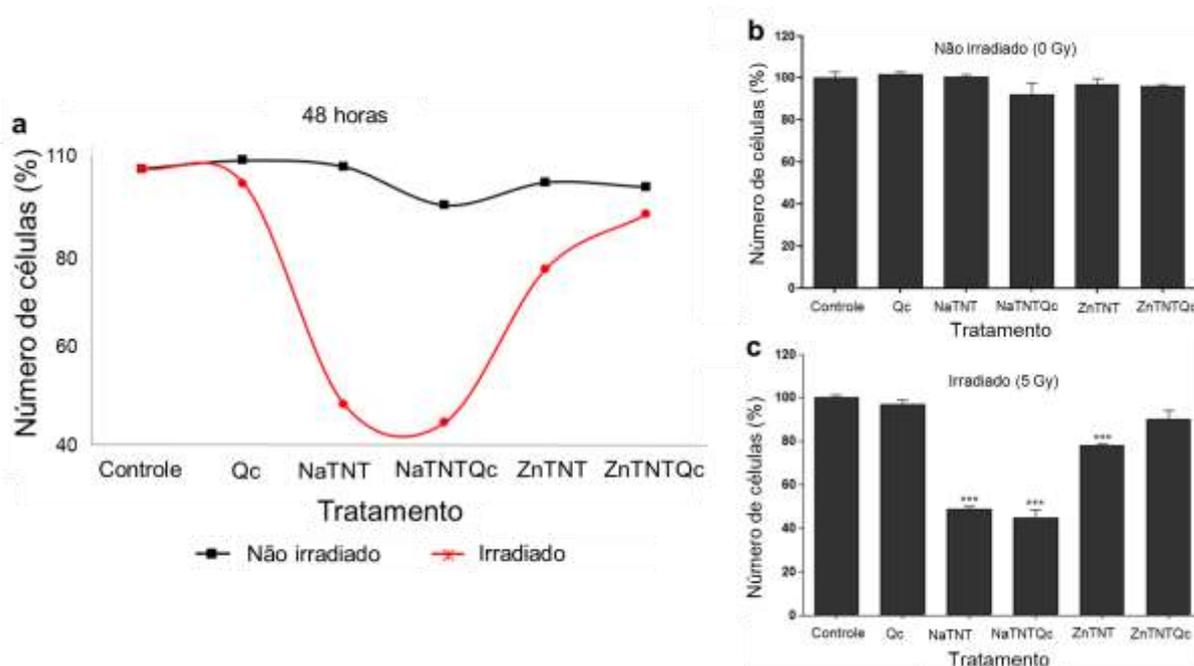


Figura 5.13. Número de células (a) e análise estatística (b, c) da linhagem T24 exposta ou não a irradiação após 48h de tratamento com quercetina e nanoestruturas. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

A diferença de respostas entre os grupos irradiados de 24 e 48 horas pode estar associado a taxa de internalização das nanoestruturas. Mirjolet et al., (2013) mostraram que os nanotubos de titanatos são internalizados por diferentes processos (endocitoses e processos de difusão) em glioblastoma em 24 horas, porém para a linhagem T24 ainda não há estudos relatados. Uma maior investigação se faz necessária a fim de se esclarecer este processo, contudo através dos resultados obtidos, é possível sugerir que a internalização das nanoestruturas ocorre mais tardiamente nesta linhagem.

5.3.2.2. Ensaio Clonogênico

A Figura 5.14 mostra o resultado da radiosensibilização da linhagem T24 pelo ensaio clonogênico.

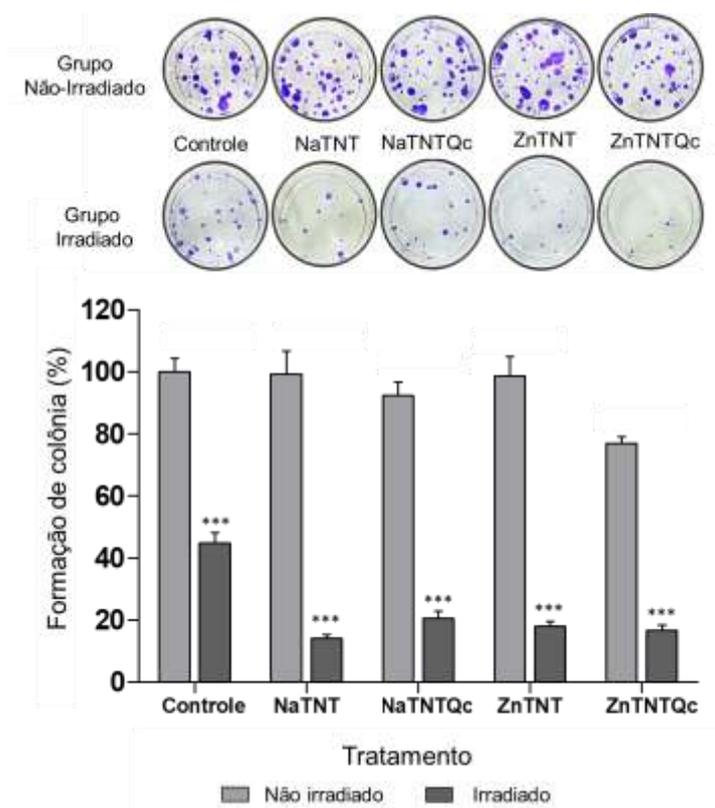


Figura 5.14. Efeito da exposição a energia ionizante e as nanoestruturas na formação de colônias após 10 dias. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Através da Figura 5.14 é possível perceber dois diferentes perfis de resposta entre os grupos avaliados. Observando as respostas obtidas no grupo não-irradiado nota-se que a concentração de trabalho selecionada via MTT (25 $\mu\text{g/mL}$) não alterou o comportamento da linhagem T24. Por outro lado, nestas condições, o grupo irradiado promoveu uma redução do número de colônias formadas quando comparado ao grupo não-irradiado para a linhagem tumoral T24.

Além disso, avaliou-se o efeito citotóxico apenas da radiação ionizante (controle versus controle), onde o controle do grupo não-irradiado (0 Gy) correspondeu a 100% de sobrevivência. Também se avaliou a citotoxicidade para cada condição de tratamento, quando comparado ao grupo irradiado através da inibição da formação de colônias.

Também é possível observar o efeito da radiosensibilização induzida pelas nanoestruturas tanto na curva de células vivas (Figura 5.13a) quanto na diminuição significativa do número de colônias formadas para as células T24 (Figura 5.14). Este

efeito de radiosensibilização pela redução da formação de colônias via NaTNT também foi observado em outro estudo realizado com glioblastoma (Mirjolet et al., 2013).

Ainda, quando os resultados entre cada condição de tratamento do grupo irradiado são comparados com o controle do mesmo grupo, é possível observar uma redução significativa do número de colônias formadas (Figura 5.15). Contudo, quando a comparação é estabelecida entre os grupos tratados, associados à irradiação, não é possível observar diferenças significativas.

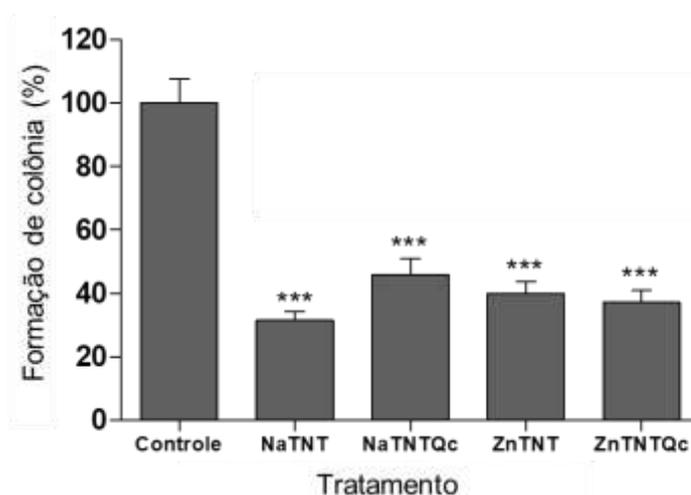


Figura 5.15. Efeito da exposição a energia ionizante para condição de tratamento na formação de colônias após 10 dias. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Apesar de não apresentar diferença significativa no que se refere ao percentual de colônias formadas entre os grupos tratados por NaTNT, NaTNTQc, ZnTNT e ZnTNTs, é precoce afirmar que esta diminuição ocorre da mesma maneira entre os tratamentos pois materiais submetidos a radiação absorvem a energia e em seguida re-irradiam fótons (fenômeno de fotoluminescência), elétrons secundários e elétrons Auger, radiações as quais produzem efeitos biológicos e químicos levando à morte das células (HAINFELD; SLATKIN; SMILOWITZ, 2004).

Mirjolet et al. (2013) relatam que nanotubos de titanatos são capazes de induzir a parada do ciclo celular de glioblastomas por meio da produção de ROS (especie reativa de oxigênio). Ainda, estudos recentes indicam que a internalização

de nanopartículas pode ativar a autofagia celular em resposta ao estresse provocado pela adaptação da célula a estrutura internalizada, ao mesmo tempo que a autofagia é uma resposta celular associada ao tratamento por radiação e este fenômeno pode estar ligado a radioresistência (CHAACHOUAY et al., 2011; MIRJOLET et al., 2013; ZABIRNYK; YEZHELYEV; SELEVERSTOV, 2007). Assim, o aumento do efeito da radiosensibilização celular observado pode ocorrer pela sinergia entre a internalização das nanoestruturas antes da irradiação.

Trabalhos como o conduzido por Dietrich et al. (2018), o qual utilizaram a enzima ecto-5'-nucleotidase/CD73 como um biomarcador na radioterapia da linhagem celular de câncer de bexiga humano T24, mostraram que a exposição da T24 a uma dose única de radiação (4 Gray) reduziu o número de células do câncer, principalmente pela parada do ciclo celular e a indução de apoptose. Porém, em longo prazo, a linhagem celular T24 retorna as taxas proliferativas semelhantes às das células controle.

Além disso, autores como Park et al. (2014) mostraram que o tratamento de câncer de bexiga através da irradiação como uma modalidade única, está relacionada a altos índices de reincidência ou persistência local com necessidade de cistectomia pós-radioterapia. Desta forma, os resultados obtidos são interessantes, principalmente se melhor estudados do ponto de vista de uma abordagem integrada, envolvendo outras modalidades de tratamento, e buscando aprimorar a eficácia e diminuindo os efeitos colaterais da radioterapia.

Neste sentido, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de ação, contudo as nanoestruturas avaliadas podem constituir uma ferramenta futura no tratamento do câncer de bexiga.

6. CONCLUSÕES

Referente à síntese e caracterização de nanotubos de titanatos sódicos (NaTNT), TNTs modificados com zinco (ZnTNT) e quercetina (NaTNTQc e ZnTNTQc)

- As nanoestruturas NaTNT foram sintetizadas com sucesso. A troca iônica de íons Na^+ por Zn^{2+} nas nanoestruturas ZnTNT foi efetiva, bem como a incorporação de quercetina em NaTNTQc e ZnTNTQc.
- As nanoestruturas de titanatos sintetizadas apresentam estrutura tubular e a mesma é mantida após a troca iônica e carregamento com quercetina.
- A distância interlamelar das nanoestruturas com quercetina aumentou em relação as nanoestruturas sem a mesma, indicando que o flavonoide interage com os TNTs. O mesmo aumento acontece em nanoestruturas com Zn em função da interação do ZnTNT com os grupamentos presentes no nanotubo.
- O percentual de incorporação de quercetina foi de 12,5 % para NaTNTQc e 27,75 % para ZnTNTQc, e a interação entre Qc e Zn aumenta a estabilidade do sistema.

Referente à avaliação do comportamento de liberação de quercetina das nanoestruturas NaTNTQc e ZnTNTQc

- Ambas nanoestruturas apresentam uma liberação máxima de quercetina em 24h. Ainda, as nanoestruturas com Zn liberam o flavonoide de forma mais controlada, entregando menores massas do que as nanoestruturas sem o metal no mesmo período, confirmando a existência de uma interação entre Zn e Qc.

Referente à avaliação da viabilidade celular das nanoestruturas frente a células Vero e T24

- As nanoestruturas NaTNT não promovem alteração da viabilidade celular da linhagem Vero até 48 horas. Na linhagem T24, promovem proliferação celular nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, mostrando que estas nanoestruturas são biocompatíveis.
- As nanoestruturas NaTNTQc promovem proliferação celular na linhagem Vero (200 µg/mL após 24 horas e 50 a 200 µg/mL após 48 horas) e redução da viabilidade celular na linhagem T24 apenas na maior concentração testada (200 µg/mL) após 24 e 48 horas, indicando que a nanoestrutura não é nociva a células Vero porém é nociva a células T24 em altas concentrações.
- O tratamento com ZnTNT reduz a viabilidade celular de ambas as linhagens em 200 µg/mL até 48 horas. Na linhagem T24, o composto inibe a viabilidade celular na concentração de 100 µg/mL e 200 µg/mL, após 24 horas.
- As nanoestruturas ZnTNTQc aumentam a proliferação celular nas concentrações de 25 e 100 µg/mL após 48 horas. Já na linhagem T24, o ZnTNTQc reduz a viabilidade celular na concentração de 200 µg/mL, após 24 horas e, nas concentrações de 50 a 200 µg/mL, após 48 horas. Assim, a nanoestrutura ZnTNT é nociva a células Vero e T24 a altas concentrações após 24h, enquanto ZnTNTQc só é nociva as mesmas células após 48h.

Referente à avaliação da citotoxicidade das nanoestruturas combinadas com irradiação

- Não houve variação significativa do número de células para nenhum tratamento testado após 24h. Porém, após 48h, o número de células reduz significativamente após os tratamentos com as nanoestruturas NaTNT, NaTNTQc e ZnTNT que sofreram irradiação.
- A radiosensibilização induzida pelas nanoestruturas diminui o número de colônias formadas na linhagem T24. Mais estudos devem ser conduzidos a

fim de se determinar o tipo de morte celular gerada por cada nanoestrutura avaliada, porém os resultados obtidos até o momento mostram que a combinação entre as nanoestruturas e energia ionizante se apresenta como um objeto de estudo atrativo na busca de tratamentos para câncer de bexiga.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos nesta Dissertação, pode-se sugerir a inserção das nanoestruturas em matrizes biocompatíveis, como por exemplo, matrizes de polímeros biodegradáveis ou polímeros naturais, a fim de aumentar o controle de liberação de flavonoide para o meio.

Sugere-se a realização de mais testes biológicos em relação à combinação das nanoestruturas e irradiação, como dose-efeito bem como o estudo do tipo de mecanismo relacionado a morte celular gerada por cada nanoestrutura avaliada.

Além disso, sugere-se a utilização de biomarcadores nos TNTs para a investigação do comportamento dos mesmos frente as células a fim de verificar se acontece a internalização das nanoestruturas pelas células.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALUANI, D. et al. Evaluation of Biocompatibility and Antioxidant Efficiency of Chitosan-Alginate Nanoparticles Loaded With Quercetin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 771–782, 2017.

ANTONI, S. et al. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. **European Urology**, v. 71, n. 1, p. 96–108, 2017.

ARRIGO, R. et al. Nano-hybrids based on quercetin and carbon nanotubes with excellent anti-oxidant activity. **Materials Letters**, v. 180, p. 7–10, 2016.

AZZI, J. et al. Novel findings for quercetin encapsulation and preservation with cyclodextrins, liposomes, and drug-in-cyclodextrin-in-liposomes. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 328–340, 2018.

BIRJEES BUKHARI, S. et al. Synthesis, characterization and investigation of antioxidant activity of cobalt-quercetin complex. **Journal of Molecular Structure**, v. 892, n. 1–3, p. 39–46, 2008.

BRITO, A. F. et al. Quercetin in Cancer Treatment, Alone or in Combination with Conventional Therapeutics? **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 26, p. 3025–3039, 2015.

BUKHARI, S. B. et al. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper-quercetin complex. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, n. 5, p. 1901–1906, 2009.

CHAACHOUAY, H. et al. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. **Radiotherapy and Oncology**, v. 99, n. 3, p. 287–292, 2011.

CHEN, H. et al. Heat transfer and flow behaviour of aqueous suspensions of titanate nanotubes (nanofluids). **Powder Technology**, v. 183, n. 1, p. 63–72, 2008.

COSTANTINI, C.; MILLARD, F. Update on chemotherapy in the treatment of urothelial carcinoma. **TheScientificWorldJournal**, v. 11, p. 1981–1994, 2011.

DAI, H. et al. Delicate photoelectrochemical sensor for folic acid based on carbon nanohorns supported interwoven titanate nanotubes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 222, p. 120–126, 2016.

DE CARVALHO, D. C. et al. Titanate nanotubes as acid catalysts for acetalization of glycerol with acetone: Influence of the synthesis time and the role of structure on the catalytic performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p. 1454–1467, 2017.

DIETRICH, F. et al. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 contributes to the radiosensitivity of T24 human bladder cancer cell line. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 3, p. 469–482, 2018.

DU, A. J.; SUN, D. D.; LECKIE, J. O. Sequestration of cadmium ions using titanate nanotube. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, n. 1–3, p. 401–406, 2011.

ERJAVEC, B.; KAPLAN, R.; PINTAR, A. Effects of heat and peroxide treatment on photocatalytic activity of titanate nanotubes. **Catalysis Today**, v. 241, n. PA, p. 15–24, 2015.

FARIQ, A.; KHAN, T.; YASMIN, A. Microbial synthesis of nanoparticles and their potential applications in biomedicine. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 15, n. 4, p. 241–248, 2017.

FERNÁNDEZ-WERNER, L. et al. Characterization of titanate nanotubes for energy applications. **Journal of Energy Storage**, v. 12, p. 66–77, 2017.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

GHOSH, N. et al. Acute, 28 days sub acute and genotoxic profiling of Quercetin-Magnesium complex in Swiss albino mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 86, p. 279–291, 2017.

GÓMEZ-GAETE, C. et al. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 331, n. 2, p. 153–159, 2007.

HAIDER, A. J. et al. Exploring potential Environmental applications of TiO₂ Nanoparticles. **Energy Procedia**, v. 119, p. 332–345, 2017.

HAINFELD, J. F.; SLATKIN, D. N.; SMILOWITZ, H. M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. **Physics in Medicine and Biology**, v. 49, n. 18, 2004.

HUANG, J. et al. Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: Preparation and in vitro characterization studies. **Journal of Food Engineering**, v. 215, p. 1–12, 2017.

HUSKIĆ, M.; ŽAGAR, E. Catalytic activity of mineral montmorillonite on the reaction of phenol with formaldehyde. **Applied Clay Science**, v. 136, p. 158–163, 2017.

INCA, I. N. DE C. Estimativa 2016 Incidência de Câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, p. 124, 2016.

INCA, I. N. DO C. Estimativa 2014 Incidência de Câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, p. 124, 2014.

INCA, I. N. DO C. Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, p. 130, 2017.

JABEEN, E. et al. DFT predictions, synthesis, stoichiometric structures and anti-diabetic activity of Cu (II) and Fe (III) complexes of quercetin, morin, and primuletin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1150, p. 459–468, 2017.

JACOBS, B.L., LEE, C.T., MONTIE, J. E. Bladder Cancer in 2010. **CA Cancer J Clin**, v. 60, n. 4, p. 244–72, 2010.

JUKAPLI, N. M.; BAGHERI, S. Recent developments on titania nanoparticle as photocatalytic cancer cells treatment. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 163, p. 421–430, 2016.

JUN, T.; BOCHU, W.; LIANCAI, Z. Hydrolytic cleavage of DNA by quercetin zinc(II) complex. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 5, p. 1197–1199, 2007.

KALINOWSKA, M. et al. Spectroscopic, thermogravimetric and biological studies of Na(I), Ni(II) and Zn(II) complexes of quercetin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 126, n. 1, p. 141–148, 2016.

KASUGA, T. et al. Formation of Titanium Oxide Nanotube. **Langmuir**, v. 14, n. 12, p. 3160–3163, 1998.

KULKARNI, M. et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 26, n. 6, p. 62002, 2015.

LEE, G. H. et al. Antioxidative and antiinflammatory activities of quercetin-loaded silica nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 511–517, 2016.

LEI, C.-S. et al. Effects of quercetin combined with anticancer drugs on metastasis-associated factors of gastric cancer cells: in vitro and in vivo studies. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 51, p. 105–113, 2018.

LESJAK, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 40, n. October 2017, p. 68–75, 2018.

LINGHU, W. et al. Macroscopic and spectroscopic exploration on the removal performance of titanate nanotubes towards Zn(II). **Journal of Molecular Liquids**, v. 244, p. 146–153, 2017.

LIU, Y. et al. Effects of quercetin on proliferation and migration of human glioblastoma U251 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 33–38, 2017.

MA, L. ET AL. Growth inhibitory effects of quercetin on bladder cancer cell. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 2275–2285, 2006.

MARQUES, T. M. F. et al. Study of the growth of CeO₂ nanoparticles onto titanate nanotubes. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 87, p. 213–220, 2015.

MARTIN, D. T. et al. Surface-Modified Nanoparticles Enhance Transurothelial Penetration and Delivery of Survivin siRNA in Treating Bladder Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, n. 1, p. 71–81, 2014.

MIRJOLET, C. et al. The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: A proof-of-concept. **Radiotherapy and Oncology**, v. 108, p. 136–142, 2013.

MIRJOLET, C. et al. 207 The enhancement of radiotherapy efficacy with docetaxel-titanate nanotubes as a new nanohybrid for localized high risk prostate cancer. **European Journal of Cancer**, v. 50, p. 67, 2014.

MIRJOLET, C. et al. Docetaxel-titanate nanotubes enhance radiosensitivity in an androgen-independent prostate cancer model. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 6357–6364, 2017.

MOHAN, L.; ANANDAN, C.; RAJENDRAN, N. Drug release characteristics of quercetin-loaded TiO₂ nanotubes coated with chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1633–1638, 2016.

MONTEIRO, W. F. **NANOTUBOS DE TITANATOS E SUA APLICAÇÃO EM MATRIZES DE POLIURETANO**. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2015.

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

NICOLETTI, N. F. et al. Pre-clinical evaluation of voltage-gated calcium channel blockers derived from the spider *P. nigriventer* in glioma progression. **Toxicon**, v. 129, p. 58–67, 2017.

NIU, G. et al. Absorption of Cr(VI) onto amino-modified titanate nanotubes using 2-Bromoethylamine hydrobromide through SN₂ reaction. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 401, p. 133–140, 2013.

NOMOTO, H. et al. Chemoprevention of colorectal cancer by grape seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in proliferation and increase in apoptosis. **Nutrition and Cancer**, v. 49, n. 1, p. 81–88, 2004.

OLIVEIRA, W. F. et al. Functionalization of titanium dioxide nanotubes with biomolecules for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 81, n. May, p. 597–606, 2017.

OU, H. H.; LO, S. L. Review of titania nanotubes synthesized via the hydrothermal treatment: Fabrication, modification, and application. **Separation and Purification Technology**, v. 58, n. 1, p. 179–191, 2007.

PAN, H. et al. Construction of layer-by-layer assembled chitosan/titanate nanotubes based nanocoating on cotton fabrics: flame retardant performance and combustion behavior. **Cellulose**, v. 22, n. 1, p. 911–923, 2015.

PARK, J. C. et al. Multimodal management of muscle-invasive bladder cancer. **Current Problems in Cancer**, v. 38, n. 3, p. 80–108, 2014.

PAVON, L. F.; OKAMOTO, O. K. Aplicações de recursos nanobiotecnológicos em câncer Applications of nanobiotechnology in cancer. **Einstein: Revendo Ciências Básicas**, v. 5, n. 1, p. 74–77, 2007.

POMPEO, A. C. L. et al. Cancro da bexiga - tratamento do carcinoma invasivo e metastático. **Sociedade Brasileira de Urologia e Sociedade Brasileira de Patologia**, v. 54(4), p. 290–292, 2008.

POPOVA, M. et al. Experimental and theoretical study of quercetin complexes formed on pure silica and Zn-modified mesoporous MCM-41 and SBA-16 materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 228, p. 256–265, 2016.

PORTER, M. P. et al. Patterns of use of systemic chemotherapy for Medicare beneficiaries with urothelial bladder cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 29, n. 3, p. 252–258, 2011.

RAFFA, D. et al. Recent discoveries of anticancer flavonoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 213–228, 2017.

RAIE, D. S. et al. Effect of novel quercetin titanium dioxide-decorated multi-walled carbon nanotubes nanocomposite on *Bacillus subtilis* biofilm development. **Materials**, v. 11, n. 1, 2018.

RAVICHANDRAN, R.; RAJENDRAN, M.; DEVAPIRIAM, D. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. **Food Chemistry**, v. 146, p. 472–478, 2014.

RHO, W. Y. et al. Enhancement of power conversion efficiency with TiO₂nanoparticles/nanotubes-silver nanoparticles composites in dye-sensitized solar cells. **Applied Surface Science**, v. 429, p. 23–28, 2018.

RIEGER, C. et al. Characterization of different carbon nanotubes for the development of a mucoadhesive drug delivery system for intravesical treatment of bladder cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, n. 2, p. 357–363, 2015.

ROCKENBACH, L. et al. Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 31, n. 7, p. 1204–1211, 2013.

SALLEM, F. et al. Synthesis and characterization of chitosan-coated titanate nanotubes: Towards a new safe nanocarrier. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 44, p. 15386–15398, 2017.

SANDOVAL, A.; HERNÁNDEZ-VENTURA, C.; KLIMOVA, T. E. Titanate nanotubes for removal of methylene blue dye by combined adsorption and photocatalysis. **Fuel**, v. 198, p. 22–30, 2017.

SANTOS, S. R. A. et al. Multifunctional catalysts based on carbon nanotubes and titanate nanotubes for oxidation of organic compounds in biphasic systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 483, p. 211–219, 2016.

SAPINO, S. et al. Mesoporous silica as topical nanocarriers for quercetin: Characterization and in vitro studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 89, p. 116–125, 2015.

SARKAR, A. et al. Targeted delivery of quercetin loaded mesoporous silica nanoparticles to the breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 10, p. 2065–2075, 2016.

SIPOS, B. et al. Physicochemical characterisation and investigation of the bonding mechanisms of API-titanate nanotube composites as new drug carrier systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 518, n. 1–2, p. 119–129, 2017.

SOUNDARYA, S. P. et al. Effects of flavonoids incorporated biological macromolecules based scaffolds in bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 74–87, 2017.

SREE LATHA, T. et al. In vitro and in vivo evaluation of anti-cancer activity: Shape-dependent properties of TiO₂ nanostructures. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 969–977, 2017.

SRUTHI, S. et al. In vitro interaction and biocompatibility of titanate nanotubes with microglial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 353, n. June, p. 74–86, 2018.

SUN, M. et al. Quercetin-nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 15–24, 2014.

SURENDRA, T. V. et al. Vegetable Peel Waste for the Production of ZnO Nanoparticles and its Toxicological Efficiency, Antifungal, Hemolytic, and Antibacterial Activities. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, 2016.

TRENDAFILOVA, I. et al. Preparation of efficient quercetin delivery system on Zn-modified mesoporous SBA-15 silica carrier. **Materials Science and Engineering C**, v. 73, p. 285–292, 2017.

TSAI, C. C. et al. In situ Sn²⁺-incorporation synthesis of titanate nanotubes for photocatalytic dye degradation under visible light illumination. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 546, p. 95–101, 2013.

VAN DE PUTTE, E. E. F. et al. The World Health Organization 1973 classification system for grade is an important prognosticator in T1 non-muscle-invasive bladder cancer. **BJU International**, p. 1–8, 2018.

VIMALRAJ, S. et al. Mixed-ligand copper(II) complex of quercetin regulate osteogenesis and angiogenesis. **Materials Science and Engineering C**, v. 83, n. July 2017, p. 187–194, 2018.

WANG, L. S. et al. Synthesis, characterization, and photocatalytic activities of titanate nanotubes surface-decorated by zinc oxide nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 1, p. 49–54, 2009.

XU, L. et al. Utilizing cellulose sheets as structure promoter constructing different micro-nano titanate nanotubes networks for green water purification. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, n. August, p. 756–764, 2017.

YANG, X. et al. Pd nano-particles (NPs) confined in titanate nanotubes (TNTs) for hydrogenation of cinnamaldehyde. **Catalysis Communications**, v. 59, p. 184–188, 2015.

ZABIRNYK, O.; YEZHELYEV, M.; SELEVERSTOV, O. Nanoparticles as a novel class of autophagy activators. **Autophagy**, v. 3, n. 3, p. 278–281, 2007.

ZHOU, J. et al. A novel local drug delivery system: Superhydrophobic titanium oxide nanotube arrays serve as the drug reservoir and ultrasonication functions as the drug release trigger. **Materials Science and Engineering: C**, v. 82, n. August 2017, p. 277–283, 2017.

ZHU, J. et al. Preparation of polyaniline-TiO₂nanotube composite for the development of electrochemical biosensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 221, p. 450–457, 2015.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br