

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Modificação de superfície de nanocristais
para entrega e aumento de atividade de
fármacos**

Beatriz Ideriha Mathiazzi

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo.

Orientador:
Prof. Dr. Gabriel Lima Barros de Araújo

São Paulo

2022

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVO(S)	6
2.1. Objetivo geral.....	6
2.2. Objetivos específicos.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
a. Obtenção das nanosuspensões.....	7
b. Revestimento dos nanocristais	7
c. Caracterização físico-química dos nanocristais revestidos.....	8
d. Determinação de concentração inibitória mínima (CIM)	8
e. Determinação de IC ₅₀ e internalização celular	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
a. Caracterização físico-química das nanosuspensões de NCL, NCL/HA e NCL/FA .	9
b. Determinação e avaliação da atividade antimicrobiana das nanosuspensões pela concentração inibitória mínima (CIM)	10
c. Determinação e avaliação da atividade antitumoral das nanosuspensões pelo IC ₅₀ e internalização celular	14
5. CONCLUSÕES	17
6. REFERÊNCIAS.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS

WHO	<i>World Health Organization</i>
NCL	Niclosamida
FA	Ácido fólico
HA	Ácido hialurônico
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
Dz	Distribuição do tamanho médio das partículas
P	Polidispersidade
ζ	Potencial Zeta
NCL/HA	Nanocristal de niclosamida revestido com HA
NCL/FA	Nanocristal de niclosamida revestido com FA
TSB	Caldo triptona soja
ATCC	American Type Culture Collection
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UFC	Unidade formadora de colônia

RESUMO

MATHIAZZI, B.I. **Modificação de superfície de nanocristais para entrega e aumento de atividade de fármacos.** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, ano.

Palavras-chave: Niclosamida; revestimento; antimicrobiano; antitumoral

INTRODUÇÃO: Frente aos desafios do desenvolvimento de novos fármacos para os tratamentos de infecções bacterianas ou doenças crônicas, como câncer, os nanomateriais têm demonstrado grande potencial. Os fármacos na forma de nanocristais podem solucionar problemas relacionados à biodisponibilidade e, quando recobertos por diferentes revestimentos, podem possuir sua eficácia aumentada. Assim, é proposto o reposicionamento da niclosamida na forma de nanocristal revestido para aumentar a sua atividade antimicrobiana e antitumoral. **OBJETIVO:** Avaliar o potencial do uso de nanocristais revestidos com ácido hialurônico ou ácido fólico para aumento da atividade antimicrobiana da niclosamida e aumento da atividade antitumoral. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foi feito o revestimento do nanocristal de niclosamida com ácido hialurônico ou ácido fólico. Em seguida, os arranjos foram caracterizados por espalhamento de luz dinâmico em relação ao seu diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta. As atividades antimicrobianas foram avaliadas por meio de concentração inibitória mínima. A atividade antitumoral dos arranjos foi avaliada determinando-se o IC₅₀ e a internalização celular em células tumorais de pulmão. **RESULTADOS:** Os arranjos de nanocristal revestido com ácido hialurônico ou ácido fólico foram formados e o principal indicativo foi o aumento do Dz. O nanocristal sozinho possui o Dz de 73,4 ± 1,2 nm, o nanocristal revestido com HA possui 151,3 ± 2,2 nm e com FA 141,8 ± 1,6. As concentrações inibitórias mínimas em log obtidas contra *Staphylococcus aureus* foram de -0,19 para a NCL e +0,18 para NCL/HA ou NCL/FA. Não foi observado inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em nenhuma das formulações. Os valores de IC₅₀ *in vitro* foram obtidos para as nanosuspensões de NCL/FA (120,5 µM), de NCL (32,7 µM) e da solução de HA (537,1 µM). Os valores para NCL/HA e FA foram muito altos (>1000 µM). **CONCLUSÃO:** Apesar dos nanocristais revestidos possuírem atividade antimicrobiana e antitumoral, os revestimentos não conferiram aumento de atividade nos sistemas *in vitro* quando comparado a atividade do nanocristal de niclosamida sem revestimento, ao contrário do observado para outros fármacos já reportados na literatura.

1. INTRODUÇÃO

Há muitos desafios na medicina quimioterápica em relação às principais doenças da sociedade contemporânea. Entre elas, estão as infecções bacterianas causadas por bactérias multiresistentes, que são de preocupação de saúde global e que foram listadas pela World Health Organization (WHO) na lista de prioridade crítica global para desenvolvimento de novos antibióticos (TACCONELLI et al., 2018). A descoberta de novos antibióticos tem como desafio o design de produtos com propriedades físico-químicas adequadas, que atendam às diferentes condições farmacocinéticas ou farmacodinâmicas e que possuam perfis de toxicidade aceitáveis (BUTLER et al., 2022). Nanopartículas e nanoantibióticos vêm demonstrando potencial para combater as infecções por bactérias multiresistentes, seja administrados sozinhos ou em associação a outras substâncias. Os nanomateriais têm apresentado boa biocompatibilidade e eficácia devido às diferentes possibilidades de formulação e ao seu tamanho reduzido (ALEJO et al., 2022; MATHIAZZI; CARMONA-RIBEIRO, 2020; MODI et al., 2022).

Além das infecções bacterianas, os diversos tipos de câncer também representam um problema alarmante. Em 2020, foram registrados cerca de 2,21 milhões de novos casos de câncer de pulmão mundialmente, sendo o cancer de pulmão um dos neoplasmas mais letais (SHARMA, 2022). Os nanomateriais também vêm sendo aplicados para o tratamento de câncer, os quais podem ser combinados a drogas convencionais para aumentar sua eficácia e reduzir a morbidade associada ao câncer. Lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanotubos de carbono, peptídeos e partículas inorgânicas são exemplos de compostos que vêm sendo utilizados para formar nanopartículas antitumorais (AGRAWAL et al., 2018; CHIANG; CHENG; LIN, 2021). Uma melhor compreensão dos obstáculos das interações entre os fármacos antitumorais nanométricos e os targetings celulares pode ser explorada para reestruturar os nanomateriais para superar as barreiras biológicas de forma mais eficiente e, assim, superar as terapias com medicamentos originais, não nanométricos (DE LÁZARO; MOONEY, 2021).

Os fármacos na forma de nanocristais, que são os cristais dos fármacos puros processados até atingirem a escala nanométrica (menores que 1 μm), também são propostas promissoras de nanotecnologia para atender ao tratamento dessas doenças, porque melhoram a performance biofarmacêutica. Os nanocristais alcançam maior solubilidade e possuem vantagens de aumento da permeabilidade pelos tecidos e necessidade de uma dose menor a ser administrada, indicando que há aumento, também,

da sua biodisponibilidade (MCGUCKIN et al., 2022). Além disso, são facilmente escalonáveis a grandes proporções industriais (AGRAWAL et al., 2018; DEMIR et al., 2018; PAWAR et al., 2014). Os nanocristais de vários fármacos lipossolúveis com tamanhos variando de 110 nm a 425 nm, como danazol, loratadina, sinvastatina, entre outros, demonstraram melhora na dissolução e biodisponibilidade por via oral (LV et al., 2022). Nanocristais administrados por via intravenosa podem ter sua dissolução prolongada e, conseqüentemente, gerar um perfil de concentração plasmática do fármaco sustentável com apenas uma administração, como foi demonstrado com o itraconazol (LV et al., 2022).

A niclosamida (NCL) é um fármaco que, originalmente, foi desenvolvido para o tratamento de infecções por *Taenia solium*, através do mecanismo de desacoplamento da fosforilação oxidativa das mitocôndrias do parasita (BARBOSA et al., 2019, p. 202). Nos últimos anos, tem sido proposto o reposicionamento da NCL para várias outras patologias devida à sua capacidade de agir como inibidor e antagonista em várias vias farmacológicas e também induzir apoptose celular. Além disso, é possível fazer a sua combinação a outros fármacos para atuar em sinergia ou como adjuvante aos tratamentos (DOMALAON et al., 2019; LU et al., 2022). Estudos vêm mostrando seu sucesso principalmente como fármaco antimicrobiano (GONTIJO; PEREIRA; DE LACERDA BONFANTE, 2021; GWISAI et al., 2017; MOHAMMAD et al., 2018; ZHANG et al., 2022), antitumoral (FU et al., 2020; HUANG et al., 2022; NAQVI; MOHIYUDDIN; GOPINATH, [s.d.]; YEH et al., 2022; ZHAO et al., 2021), antiviral (CAIRNS et al., 2022) e também para o tratamento de doenças pulmonares e respiratórias crônicas (OUSINGSAWAT et al., 2022). Um dos maiores problemas da niclosamida é a sua baixa solubilidade em água, o que dificulta a sua absorção em algumas mucosas, como a intestinal e a pulmonar. Esforços têm se concentrado para contornar este problema através das estratégias anteriormente mencionadas, como a incorporação da NCL em nanoestruturas (OUSINGSAWAT et al., 2022) ou através de sistemas utilizando o seu nanocristal revestido (JARA; WARNKEN; WILLIAMS, 2021). Esses revestimentos têm a capacidade de aderir à superfície do cristal do fármaco, seja por interação eletrostática ou por interações intermoleculares, e recobri-lo. Assim, esses revestimentos interagem com as membranas celulares e receptores das células dos tecidos para, então, aumentarem a interação com o alvo farmacológico, facilitando a adesão do fármaco no tecido, a sua solubilização, sua liberação e o *targeting celular*.

No presente trabalho, é proposto o revestimento dos nanocristais de NCL com ácido

hialurônico (HA) ou ácido fólico (FA). O HA é um polímero linear, não ramificado, solúvel em água, viscoelástico contendo repetições de dissacarídeos de ácido glucurônico -N-acetilglucosamina, que não é sulfatado (ALIPOOR et al., 2022). O HA é muito utilizado em produtos cosméticos, como produtos de *skin care*, protetores solares, produtos capilares, preenchedores da derme e produtos de cuidado com as unhas (AL-HALASEH et al., 2022). Esse uso consolidado do HA em cosméticos é devido às sua capacidade de reter água, de proteger contra raios UVB e sua propriedade de boa adesão em superfícies (AL-HALASEH et al., 2022). De maneira geral, o HA pode afetar vários processos celulares (diferenciação, proliferação, desenvolvimento e reconhecimento molecular) e também processos fisiológicos (lubrificação, equilíbrio de hidratação, construção de matriz e interações estéricas) (ALIPOOR et al., 2022). O HA é utilizado em alguns tipos de câncer para monitorar o progresso do neoplasma devido à sua propriedade mucoadesiva e porque pode combinar-se com alguns receptores de superfície celular de órgãos como rins, vasos, fluidos corporais, fígado e principalmente tecidos tumorais, o que é vantajoso para direcionar o drug delivery de proteínas, ácidos nucleicos, peptídeos e diferentes agentes anticancerígenos (YASIN et al., 2022). A sinalização intracelular do HA ocorre por meio da sua ligação a alguns receptores, como CD44, RHAMM e LYVE-1. O CD44, que é um dos principais receptores de adesão celular do HA, é abundantemente encontrado na matriz extracelular de tumores. Dessa maneira, o HA pode sinalizar seletivamente as células cancerosas que expressam CD44 em excesso e é foco de muitos estudos com nanomateriais contendo HA como direcionador para melhorar a terapia do câncer sem efeitos colaterais (KIM et al., 2019). O HA também pode ser conjugado com o FA no tratamento de tumores (YASIN et al., 2022). Já o FA é a forma monoglutamil oxidada do folato. O folato é uma vitamina B solúvel em água amplamente utilizada e a sua deficiência em humanos está sendo investigada em relação à patogênese de várias doenças, como câncer. O FA está presente em alimentos fortificados e as recomendações da sua ingestão são baseadas no conhecimento de seu papel protetor na anemia, aterosclerose, defeitos do tubo neural e para o câncer. A entrada celular de FA ocorre por meio do transportador de folato reduzido, o receptor de folato acoplado a prótons e também do receptor de folato (HELMY et al., 2022). O alfa-receptor de folato é superexpresso em muitos tipos de câncer e, por causa disso, o FA tem sido amplamente utilizado para formar nanopartículas com o intuito de direcionamento ativo no câncer, seja para fins terapêuticos ou diagnósticos (MOHARIL et al., 2022; RAMEZANI FARANI et al., 2022).

O HA e o FA também têm sido utilizados para desenvolver nanomateriais de antimicrobianos. O HA pode atuar de maneira sinérgica a antimicrobianos porque possui propriedades bacteriostáticas e de impedimento de formação de biofilme contra algumas cepas bacterianas. Além disso, como o CD44 é um receptor superexpressado em macrófagos, as nanopartículas híbridas com HA podem ser utilizadas para direcionar e destruir seletivamente infecções bacterianas intracelulares (MOHAMMED et al., 2022). A hidrólise do HA é feita principalmente pela família das enzimas HAase, que está presente em mamíferos e também em bactérias, ambas com alvo para clivar a ligação glicosídica β 1-4 do HA. O conceito de desenvolvimento de nanopartículas de carreamento de antibióticos responsivas a enzima HAase tem sido empregado para permitir a liberação sob demanda de antibióticos encapsulados, melhorando a segurança e efetividade na entrega de antibióticos (MOHAMMED et al., 2022). O FA pode ser associado a nanopartículas para a formação de nanocompósitos ou filmes com atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus* (MALLAKPOUR; SEYFI, 2022) e podem impedir a formação de biofilme contra *P. aeruginosa* (EIVAZZADEH-KEIHAN et al., 2022).

Levando em consideração o reposicionamento da niclosamida como fármaco antimicrobiano e antitumoral, neste trabalho é preterido obter nanosuspensões revestidas dos nanocristais de niclosamida com HA ou FA com o objetivo de aumentar a sua atividade e eficácia. Assim, investigar quais as consequências deste revestimento sobre as atividades antimicrobiana e antitumoral em relação à nanosuspensão original de niclosamida.

2. OBJETIVO(S)

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial do uso de nanocristais revestidos com ácido hialurônico ou ácido fólico para aumento da atividade antimicrobiana da niclosamida e aumento da atividade antitumoral.

2.2. Objetivos específicos

- I. Preparar e caracterizar físico-quimicamente os arranjos formados pela combinação do nanocristal de niclosamida e o revestimento com ácido hialurônico ou ácido fólico;
- II. Avaliar e comparar as concentrações inibitórias mínimas das nanosuspensões de niclosamida e niclosamida revestida com ácido hialurônico ou ácido fólico;

- III. Avaliar e comparar o IC₅₀ da atividade antitumoral e internalização celular das nanosuspensões de niclosamida e niclosamida revestida com ácido hialurônico ou ácido fólico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

a. Obtenção das nanosuspensões

Foi realizada a obtenção das nanosuspensões a partir do preparo dos nanocristais por pulverização e por moagem em alta energia. O agente estabilizante utilizado foi o surfactante não iônico Tween 80 (polissorbato 80) a concentração de 3% (w/w) para a concentração de fármaco a 6% (w/w) em água destilada.

O processo de nanopulverização foi realizado em duas etapas, aplicando diferentes velocidades, tempos e volumes da solução aquosa estabilizada. Como nos métodos realizados no trabalho de BARBOSA, 2014, a primeira etapa consistiu de 2,6 g de niclosamida mais 20 mL da solução do tensoativo no recipiente de mistura e, então, foi adicionado 35 g de esferas de zircônia estabilizadas com ítrio, de diâmetro igual a 0,5 mm como meio de moagem em moinho de alta energia (Emax, Retsch Technologies). Nesta etapa as condições de nanopulverização foram de 1500 rpm por 15 minutos. Na segunda etapa 20 mL de solução estabilizante serão adicionadas ao recipiente a 400 rpm por 1 minuto.

b. Revestimento dos nanocristais

Para a preparação das nanopartículas de NCL/revestimento, foi utilizado o método similar ao trabalho de AGRAWAL et al., 2018. Os revestimentos escolhidos para recobrir o nanocristal de niclosamida foram o ácido hialurônico (HA) e o ácido fólico (FA). Foram preparadas soluções estoques na concentração de 10 mg.mL⁻¹ de HA ou FA em água ultrapura. Em um béquer, foram adicionados 1,92 mL da nanosuspensão de niclosamida e 19,955 mL de água ultrapura. Sob agitação vigorosa, 3,125 mL de solução de HA ou FA foram gotejadas e o sistema permaneceu em agitação por mais 15 min, formando, então NCL revestida com HA (NCL/HA) ou NCL revestida com FA (NCL/FA). Cada sistema foi, em seguida, centrifugado a 15.000 rpm por 1h para remover o revestimento livre em solução e resuspendido em 0,5 mL de água ultrapura. Após, as formulações foram armazenadas a 4°C.

c. Caracterização físico-química dos nanocristais revestidos

A distribuição do tamanho médio das partículas (Dz), índice de polidispersidade e potencial zeta (ζ) foram medidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando um Zeta plus-Zeta potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA). As amostras que foram submetidas às medições DLS foram diluídas a partir das dispersões originais para leituras ideais (10–100 μ L de dispersões em 2 mL de solução de 1 mM de NaCl). Todas as medições ocorreram a 25 ± 1 °C.

d. Determinação de concentração inibitória mínima (CIM)

Para avaliar a eficácia da atividade antimicrobiana das nanopartículas, foi utilizado o método de diluição de meio de cultura em caldo triptona soja (TSB). *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 6538 ou *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 foram semeadas separadamente em tubos contendo ágar Muller-Hinton e incubadas de 18h-24h a 37°C em CO₂. A turbidez das suspensões de bactéria foram ajustadas de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland a 625 nm, para atingir a absorbância de 0,100 (CHAPIN; LAUDERDALE, 1996) em solução a 0,9% de NaCl, que contém uma concentração de células entre $10^8 - 2.10^8$ UFC/mL (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Da dispersão de bactéria, foi utilizada uma alíquota de 100 μ L para inocular 100 mL de caldo TSB estéril.

O meio foi distribuído em poços de placas de microtitulação de 96 poços (microdiluição). Em cada poço, foram adicionados 180 μ L de caldo TSB previamente inoculado com a suspensão de bactéria. No primeiro poço, foram adicionados 20 μ L da nanosuspensão original de NCL, de NCL/HA ou NCL/FA ou das soluções de HA ou FA e homogeneizada. Em seguida, foi feita a diluição de 1:10, 1:100 e assim sucessivamente até 1:10⁸. As placas foram incubadas por 24h a 37°C, em CO₂. Para realizar a leitura da concentração inibitória mínima, foi utilizado o indicador redox cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), seguindo o método descrito por Francisco et al. no qual 50 μ L de solução de 0,5% de TTC em 0,9% NaCl é adicionado em cada poço para, então, prosseguir a uma incubação por 10 min a 37°C (FRANCISCO et al., 2014).

e. Determinação de IC₅₀ e internalização celular

Células cancerosas de pulmão humano (A549 ATCC® CCL-185™) foram utilizadas nos ensaios *in vitro* de determinação do IC₅₀ e internalização do nanocristal. As células foram mantidas em Meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) com 10% soro

fetal bovino e 1% de penicilina/streptomicina, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24h-48h.

Após as células serem dissociadas e semeadas em placa de 96 poços, para a avaliação a viabilidade celular, as células foram tratadas com as nanosuspensões de NCL, NCL/HA ou NCL/FA e soluções controle de HA ou FA concentrações crescentes para determinação de IC₅₀ (concentração inibitória necessária para matar 50% da população de células) e na concentração fixa de 100 µg.mL⁻¹ para a avaliação da internalização. Uma solução com 10% de AlamarBlue® em meio de cultura RPMI foi preparada e, feita a lavagem de cada poço com PBS por três vezes, foram adicionados 100 µL da solução em cada poço, exceto nos poços de internalização, que permaneceram apenas com o meio RPMI. Os inóculos foram incubados por 2 horas, a 37°C. Ao final do período de incubação, a fluorescência foi medida no Molecular Devices FlexStation® 3, com o comprimento de onda de excitação/emissão de 560/590 nm para as leituras de IC₅₀. Já para a leitura de internalização, foi retirado o meio dos poços, foram lavados os poços com PBS e adicionados 200 µL de PBS para prosseguir a leitura em comprimento de onda de excitação/emissão de 650/670 nm. Os dados de viabilidade foram expressos como variações percentuais em relação ao grupo controle (EILENBERGER et al., 2018), assim:

$$\text{Viabilidade (\%)} = 100 - [(\text{Absorção do C+} - \text{Absorção obtida}) / \text{Absorção do C+} \times 100].$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

a. Caracterização físico-química das nanosuspensões de NCL, NCL/HA e NCL/FA

As diferentes amostras contendo os nanocristais de niclosamida foram caracterizadas por DLS e potencial zeta. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Caracterização físico-química das nanosuspensões de niclosamida com tween (NCL), nanosuspensão de niclosamida após 3 meses desde o processamento, nanosuspensão de niclosamida revestida com ácido hialurônico (NCL/HA) e nanosuspensão de niclosamida revestida com ácido fólico (NCL/FA). Foram obtidos os seu diâmetro médio (Dz), potencial zeta (ζ) e polidispersidade (P).

Amostra	Dz (nm)	ζ (mV)	P
NCL	48,2 ± 0,1	-20,9 ± 1,02	0,489 ± 0,036
NCL 3 meses	73,4 ± 1,2	-21,2 ± 0,6	0,013 ± 0,009
NCL/HA	151,3 ± 2,2	-21,0 ± 0,4	0,262 ± 0,009
NCL/FA	141,8 ± 1,6	-23,2 ± 2,8	0,272 ± 0,005

Fonte: elaborado pelo autor (2022)

Os nanocristais de niclosamida possuíam, inicialmente, o diâmetro de 48,2 nm, polidispersidade de 0,489 e -20,9 mV de potencial ζ . Após o revestimento com HA, ocorreu o aumento do diâmetro para 151,3 nm e diminuição da polidispersidade para 0,262, enquanto o potencial ζ não sofreu alteração significativa (-21,0 mV). De maneira similar, o revestimento com FA também aumentou o diâmetro (141,8 nm), diminuiu a polidispersidade (0,272) e não foi observada grande alteração do potencial ζ (-23,2 mV). A superfície do nanocristal de niclosamida é negativamente carregada, assim como ocorre com a molécula ionizada em água ou PBS (FU et al., 2020). Comparando o diâmetro da nanopartícula de niclosamida antes e após a adição de HA ou FA, percebe-se o aumento do diâmetro após a adição dos ácidos, indicando que ocorreu o revestimento do nanocristal e a formação dos arranjos NCL/HA ou NCL/FA. O potencial permaneceu negativo porque o ácido hialurônico e o ácido fólico possuem resíduos de carga negativa quando ionizados em água. Os potenciais estão coerentes com o revestimento porque não era esperado que a carga superficial dos arranjos tivesse alteração em valor ou em módulo e permanecessem de característica aniônica.

Foi possível perceber que a nanosuspensão de NCL teve seu diâmetro aumentado após 3 meses desde a sua preparação, atingindo 73,4 nm, além de ter a polidispersidade diminuída para 0,013, enquanto que o potencial ζ não teve seu valor drasticamente alterado (-21,2 mV). Esse resultado é um indicativo da estabilidade da formulação, mostrando que ocorre agregação entre os nanocristais de niclosamida, porém praticamente não altera sua carga superficial total.

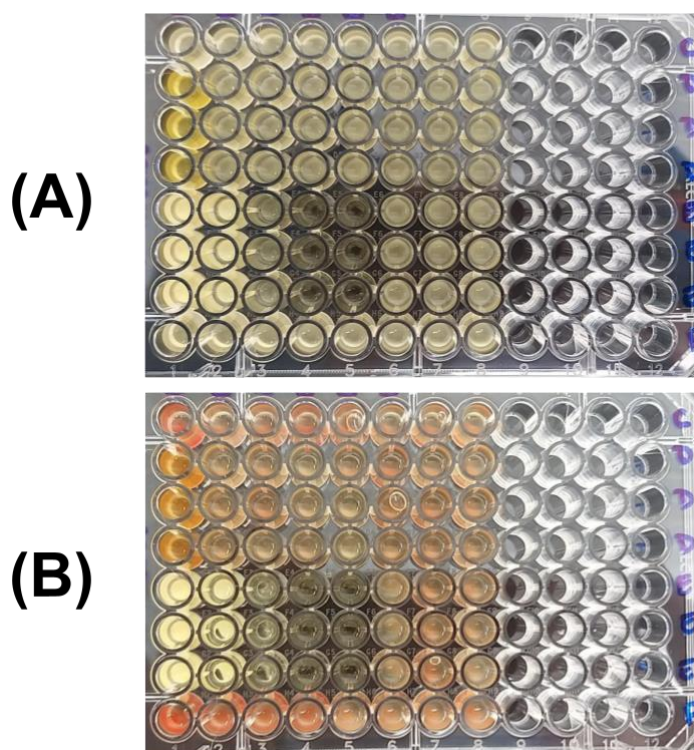
b. Determinação e avaliação da atividade antimicrobiana das nanosuspensões pela concentração inibitória mínima (CIM)

Foram realizadas as determinações da concentração inibitória mínima (CIM) das nanosuspensões de NCL, NCL/HA e NCL/FA para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os nanocristais de NCL possuem cor amarelada e, por conta disso, as amostras geraram opacidade nos poços, o que dificultou a leitura do resultado. Para facilitar a diferenciação dos poços onde ocorreu o crescimento microbiano e onde ocorreu a inibição, após a incubação, foi utilizado o indicador redox cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). O TTC já era muito utilizado para distinguir partículas alimentares de crescimento microbiano (BELOTI et al., 1999) e, mais recentemente, foi desenvolvido o método rápido de identificação de crescimento microbiano para ensaios laboratoriais (FRANCISCO et

al., 2014). O seu sal em meio aquoso estéril é incolor, porém, o TTC sofre redução por ação das células bacterianas vivas e sua molécula reduzida possui cor avermelhada. Assim, foi considerada a CIM a última concentração com o meio que não adquiriu cor avermelhada. Na **Figura 1** há uma demonstração da comparação entre a placa contendo nanosuspensão de NCL e os controles com a suspensão de HA, FA e controle negativo antes da adição do TTC **(A)** e após a adição e incubação com TTC **(B)**.

Figura 1 - Comparação entre a placa de crescimento antes da adição de TTC **(A)** após a adição de TTC e incubação **(B)** por 10 min.



Fonte: elaborado pelo autor (2022)

Os resultados obtidos com a leitura após a adição de TTC estão apresentados na **Tabela 2** abaixo. A suspensão inicial foi inoculada com cerca de 2.10^8 UFC/mL. Assim, em cada poço, a concentração de bactéria que interagiu com as nanosuspensões foi cerca de $3,6.10^6$ UFC/mL.

Tabela 2 - Resultados da determinação da CIM contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

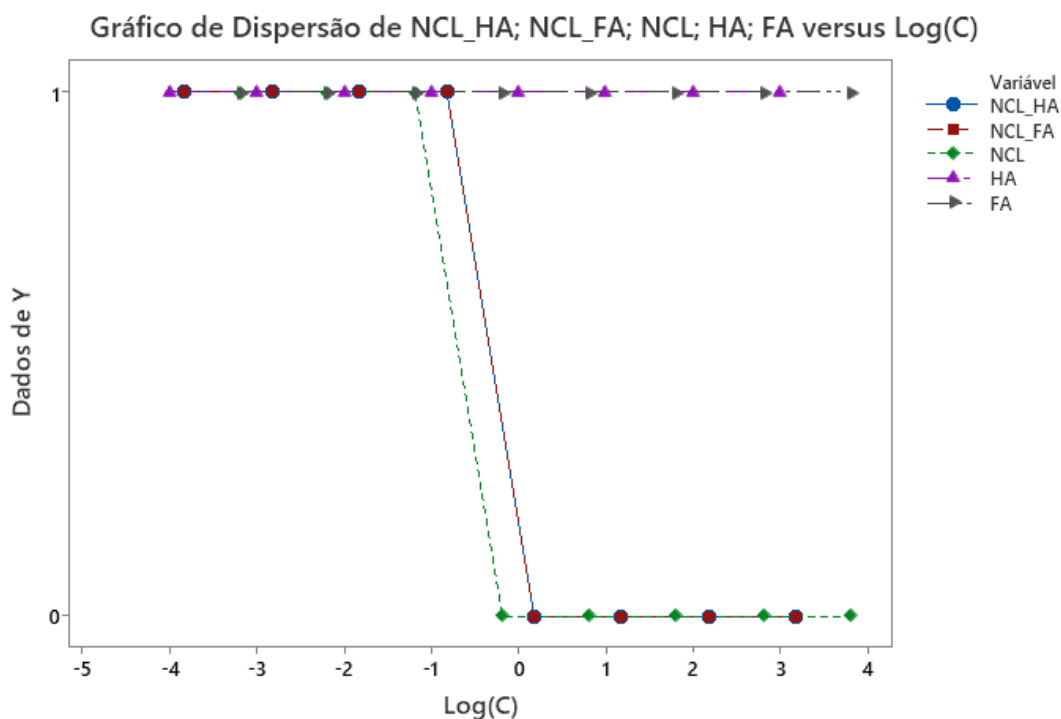
Amostra	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Presença de crescimento <i>Staphylococcus aureus</i>	Presença de crescimento <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
NCL	6500	Não	Não foi observada inibição

	650	Não			
	65	Não			
	6,5	Não			
	0,65	Não			
	0,065	Sim			
	0,0065	Sim			
	0,00065	Sim			
NCL/HA	1500	Não			
	150	Não			
	15	Não			
	1,5	Não	Não foi observada inibição		
	0,15	Sim			
	0,015	Sim			
	0,0015	Sim			
	0,00015	Sim			
1500	Não				
150	Não				
15	Não				
NCL/FA	1,5	Não	Não foi observada inibição		
	0,15	Sim			
	0,015	Sim			
	0,0015	Sim			
	0,00015	Sim			
	HA	1000 - 0,0001		Não foi observada inibição	Não foi observada inibição
	FA	1000 – 0,0001		Não foi observada inibição	Não foi observada inibição

Fonte: elaborado pelo autor (2022)

Cada uma das amostras foi testada em triplicata. Expressando os resultados em log da concentração (logC), é possível realizar a comparação da concentração de inibição de maneira padronizada utilizando o gráfico de dispersão dos valores e obtendo as curvas sigmoidais para cada amostra. Na **Figura 2** está o gráfico da presença ou não de crescimento de *Staphylococcus aureus* versus a concentração de cada nanosuspensão testada.

Figura 2 - Curvas de CIM para *Staphylococcus aureus* expressas em log da concentração de cada amostra. À direita, há a legenda para identificar as curvas das amostras das nanosuspensões de niclosamida revestida com ácido hialurônico (NCL_HA), niclosamida revestida com ácido fólico (NCL_FA) e niclosamida (NCL) e também as soluções controle de ácido hialurônico (HA) e ácido fólico (FA).



Fonte: elaborado pelo autor (2022)

Nos resultados obtidos não ocorreu a inibição de crescimento *in vitro* da NCL com ou sem revestimento contra *Pseudomonas aeruginosa*, corroborando os resultados de Domalaon et al. e Rajamuthiah et al. (DOMALAON et al., 2019; RAJAMUTHIAH et al., 2015). Além disso, a NCL não teve atribuição de atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* pelo revestimento com HA ou FA. Contudo, na literatura, alguns trabalhos descrevem que a NCL possui a capacidade de bloquear algumas vias de sinalização celular de *Pseudomonas aeruginosa*. Imperi et al. descrevem que a NCL afeta a transcrição de cerca de 250 genes e inibe a sua resposta de *quorum sense* por inibir a produção da molécula sinalizadora acil-homoserina lactona, além de suprimir fatores de virulência de *P. aeruginosa* (IMPERI et al., 2013). Em outros trabalhos, também foi identificada que a NCL pode potencializar a eficácia da colistina contra bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa* (LU et al., 2022). É conhecido que a hidrofobicidade e o peso molecular são fatores que restringem a permeabilidade de muitos antibióticos pela membrana externa das bactérias Gram-negativas, como a NCL (SCHWEIZER; RAMIREZ; SCHWEIZER, 2022). Porém, neste caso, incorporar elementos hidrofílicos ao fármaco não foi suficiente para agregar atividade contra Gram-negativas. Uma boa estratégia seria associá-lo a revestimentos que aumentem a permeabilidade da

membrana externa das bactérias.

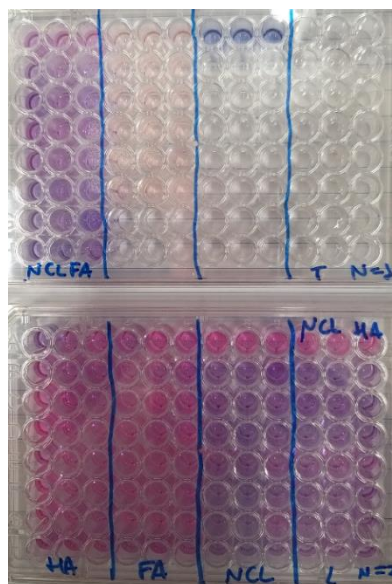
Já para a bactéria *Staphylococcus aureus* as nanosuspensões de NCL, de NCL/HA e de NCL/FA apresentaram atividade antimicrobiana. É necessário destacar que, para as três nanosuspensões, a inibição ocorreu a baixas concentrações: a $0,65 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para NCL e a $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para NCL/HA ou NCL/FA. Isso representa uma vantagem para tratamentos quimioterápicos com antibióticos (BUTLER et al., 2022), já que seria necessário administrar baixas dosagens dos nanocristais para atingir o efeito de inibição do crescimento. Porém, comparando os decaimentos das curvas, é possível perceber que a nanosuspensão de NCL gera inibição no valor de $\log C -0,19$, que é um pouco menor em relação ao $\log C$ das nanosuspensões com cristal revestido ($+0,18$). Assim, pode-se concluir que o revestimento não atribuiu vantagem para a atividade antimicrobiana do nanocristal de niclosamida porque houve inibição de crescimento em $\log Cs$ muito próximos. Ao mesmo tempo, é possível afirmar que a atividade antimicrobiana dos arranjos NCL/HA e NCL/FA ocorre em função somente da concentração de NCL, o que pode ser considerado um ponto positivo, já que o revestimento do nanocristal não diminuiu consideravelmente a sua atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva.

c. Determinação e avaliação da atividade antitumoral das nanosuspensões pelo IC_{50} e internalização celular

Foram realizados os procedimentos propostos para a determinação do IC_{50} e da internalização celular das nanosuspensões de NCL, NCL/HA, NCL/FA e das soluções controle de HA e FA. O valor de IC_{50} é o valor inibitório médio, ou seja, o valor da concentração da nanosuspensão necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular. As células utilizadas foram células cancerosas de pulmão humano. Para realizar a leitura da viabilidade celular ou da internalização, foi utilizado o reagente AlamarBlue®. Na **Figura 3**, está representada a placa após a incubação com o reagente.

Figura 3 - Determinação do IC_{50} e internalização celular dos nanocristais de NCL, NCL/HA, NCL/FA e os controles HA e FA. Os poços das placas para determinação do IC_{50} foram incubados por 2h em meio

RPMI com AlamarBlue®, a 37°C.

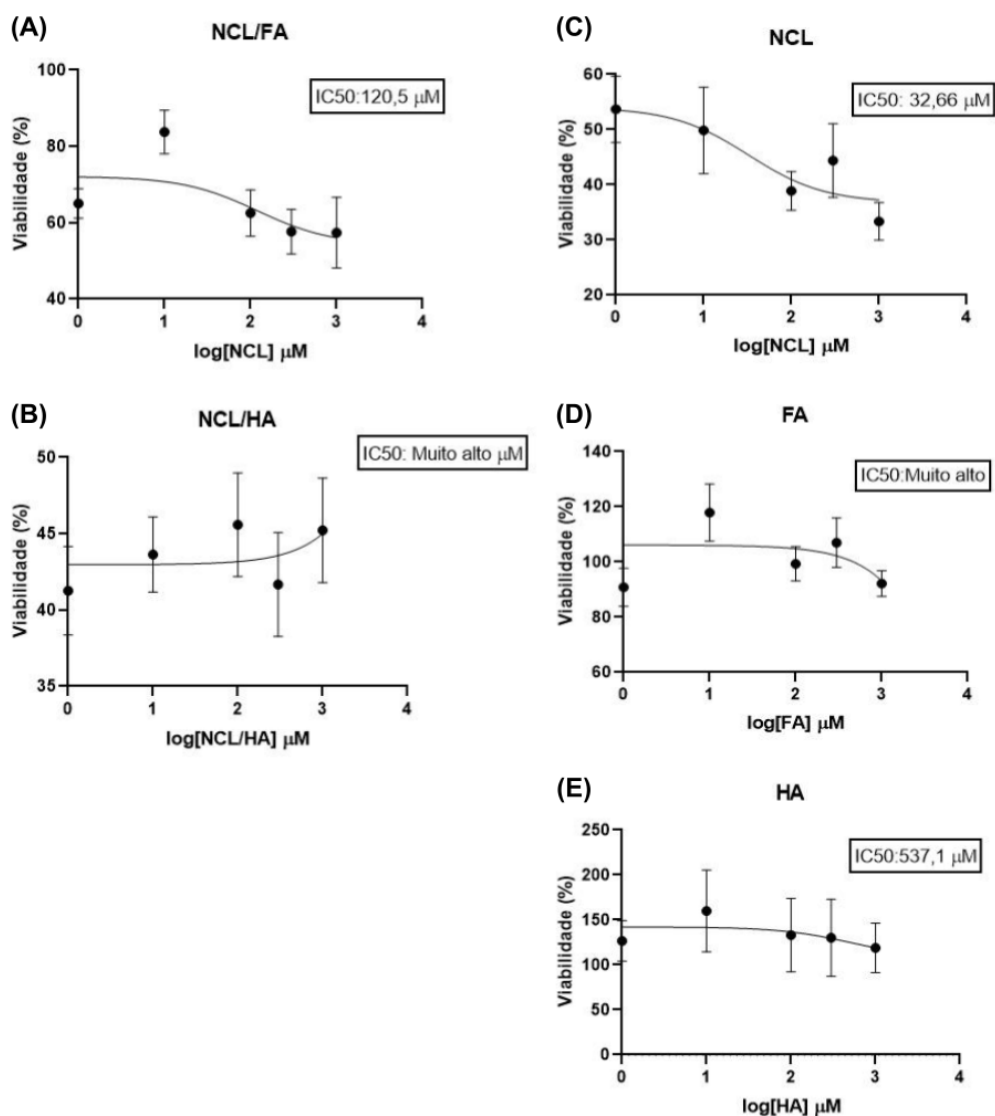


Fonte: elaborado pelo autor (2022)

Não foi possível determinar a internalização celular utilizando o método de fluorescência em comprimento de onda de excitação/emissão de 650/670 nm. Ocorreu muita variação dos dados e os resultados obtidos não foram conclusivos. Já para o IC₅₀, foram obtidos os valores com base na viabilidade celular calculada a partir dos valores de absorção. Os resultados expressos em porcentagem de células viáveis estão apresentados na **Figura 4**.

Figura 4 - Gráficos da determinação do IC₅₀ das nanosuspensões de NCL/FA (A), NCL/HA (B), NCL (C) e os controles FA (D) e HA (E). Os valores de viabilidade celular estão expressos em porcentagem (%) e as

concentrações estão expressas em logaritmo



Fonte: elaborado pelo autor (2022)

Foi possível obter os valores de IC₅₀ *in vitro* para as nanosuspensões de NCL/FA (120,5 μM), de NCL (32,7 μM) e da solução de HA (537,1 μM). Os valores para NCL/HA e FA foram muito altos (>1000 μM), indicando que não tiveram atividade de morte celular pronunciada nas concentrações testadas. Ao comparar os valores de IC₅₀ para o nanocristal de NCL sem revestimento e das nanosuspensões de NCL/HA ou NCL/FA, percebe-se que o IC₅₀ da NCL é menor, indicando que foi necessária uma menor concentração para gerar morte das células cancerosas. Para alcançar atividade antitumoral, é preciso uma maior concentração das nanosuspensões com nanocristal revestido. Assim, é possível afirmar que, aparentemente, os revestimentos não contribuíram para a morte celular das células tumorais. Contudo, comparando as duas nanosuspensões revestidas, a NCL/FA teve maior atividade antitumoral em relação a

NCL/HA. Já para as soluções de HA ou FA, ocorreu um leve aumento na porcentagem de células viáveis a baixas concentrações (entre 1 e 10 μM) e, a partir de 30 μM , ocorreu decaimento da porcentagem de viáveis. Portanto, a baixas concentrações o HA e o FA podem contribuir para o crescimento de células tumorais, mas a altas concentrações, as células tumorais perdem viabilidade.

Apesar de não ter sido observado aumento da atividade antitumoral *in vitro* com o revestimento dos nanocristais, já foi constatado na literatura que nanocristais revestidos com moléculas hidrofílicas podem contribuir para o aumento da atividade antitumoral em modelos *in vivo*. Agrawal et. al., viram que o lapatinibe, fármaco de característica lipofílica utilizado no tratamento de câncer de mama, teve sua atividade aumentada quando foi formulado na forma de nanocristais e essa atividade foi melhorada quando o nanocristal foi revestido com HA (AGRAWAL et al., 2018). Os autores puderam observar que houve melhora dos parâmetros farmacocinéticos nos camundongos tratados com nanocristais revestidos com HA em relação ao lapatinibe na sua forma de nanocristais. Isso é devido à carga negativa conferida pelo HA que pode proteger o fármaco de ser liberado rapidamente. Além disso, os autores observaram também que ocorreu maior regressão do tumor pelo o tratamento com o lapatinibe revestido com HA, principalmente por causa do maior direcionamento do fármaco ao receptor CD44 e por aumentar a permeação e retenção do fármaco no tumor, conseqüentemente, melhorando a bioacumulação nos tecidos e biodistribuição do fármaco no corpo (AGRAWAL et al., 2018). Da mesma maneira, seria esperado que outras moléculas de característica hidrofílica e negativamente carregadas pudessem causar estas melhoras de eficácia, como o FA. Contudo, o teste *in vitro* não revela a situação de distribuição e acumulação das nanosuspensões como nos modelos animais. Assim, os testes realizados possuem a limitação de observação da viabilidade celular em situação de um sistema sem biodistribuição.

5. CONCLUSÕES

Após o revestimento com HA ou FA, o Dz das nanosuspensões foi aumentado, indicando que houve formação de revestimento dos nanocristais. Foi possível perceber que a nanosuspensão de NCL teve seu diâmetro aumentado após 3 meses, indicando a estabilidade do nanocristal. Nos experimentos de determinação de CIM, as nanosuspensões não geraram inibição de crescimento *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa*, corroborando os resultados da literatura. Já para a bactéria *Staphylococcus*

aureus, as nanosuspensões de NCL, de NCL/HA e de NCL/FA apresentaram atividade antimicrobiana a baixas concentrações, tendo a NCL sem revestimento apresentado menor CIM. O revestimento não atribuiu vantagem para a atividade antimicrobiana do nanocristal de NCL porque houve inibição de crescimento para as três nanosuspensões em logCs muito próximos. Enquanto isso, nos experimentos com células tumorais de pulmão, foram obtidos os IC₅₀ para as nanosuspensões de NCL/FA, de NCL e para a solução de HA. Os valores obtidos para NCL/HA e FA foram muito altos. O IC₅₀ da nanosuspensão de NCL indica atividade antitumoral maior em relação às nanosuspensões de NCL/HA ou NCL/FA, sendo que a NCL/FA demonstrou maior atividade em relação à NCL/HA. A avaliação *in vitro* pode apresentar uma limitação para o teste de atividade antitumoral e também atividade antimicrobiana, já que os efeitos dos revestimentos são fortemente observados em modelos animais, onde é possível mapear a bioacumulação e biodistribuição do fármaco no corpo.

6. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, S. et al. CD44 targeting hyaluronic acid coated lapatinib nanocrystals foster the efficacy against triple-negative breast cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 2, p. 327–337, 1 fev. 2018.
- ALEJO, T. et al. Hybrid thermoresponsive nanoparticles containing drug nanocrystals for NIR-triggered remote release. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 607, p. 1466–1477, 1 fev. 2022.
- AL-HALASEH, L. K. et al. A review of the cosmetic use and potentially therapeutic importance of hyaluronic acid. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 12, n. 7, p. 034–041, 5 jul. 2022.
- ALIPOOR, R. et al. Hyaluronic Acid-Based Nanomaterials as a New Approach to the Treatment and Prevention of Bacterial Infections. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 913912, 8 jun. 2022.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 1 abr. 2016.
- BARBOSA, E. J. et al. Niclosamide repositioning for treating cancer: Challenges and nano-based drug delivery opportunities. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 141, p. 58–69, 1 ago. 2019.
- BELOTI, V. et al. Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 137–140, abr. 1999.
- BUTLER, M. S. et al. Analysis of the Clinical Pipeline of Treatments for Drug-Resistant Bacterial Infections: Despite Progress, More Action Is Needed. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. e01991-21, 15 mar. 2022.

CAIRNS, D. M. et al. Efficacy of Niclosamide vs Placebo in SARS-CoV-2 Respiratory Viral Clearance, Viral Shedding, and Duration of Symptoms Among Patients With Mild to Moderate COVID-19: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. **JAMA Network Open**, v. 5, n. 2, p. e2144942, 9 fev. 2022.

CHAPIN, K.; LAUDERDALE, T. L. Comparison of Bactec 9240 and Difco ESP blood culture systems for detection of organisms from vials whose entry was delayed. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 543–549, mar. 1996.

CHIANG, C.-L.; CHENG, M.-H.; LIN, C.-H. From Nanoparticles to Cancer Nanomedicine: Old Problems with New Solutions. **Nanomaterials**, v. 11, n. 7, p. 1727, jul. 2021.

DE LÁZARO, I.; MOONEY, D. J. Obstacles and opportunities in a forward vision for cancer nanomedicine. **Nature Materials**, v. 20, n. 11, p. 1469–1479, nov. 2021.

DEMIR, H. et al. Preparation and Characterization of Rivaroxaban Nanocrystals Prepared by Combination of Wet Ball Milling and High Pressure Homogenization Methods. **LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY**, v. 37, n. 12, 2018.

DOMALAON, R. et al. The Anthelmintic Drug Niclosamide Synergizes with Colistin and Reverses Colistin Resistance in Gram-Negative Bacilli. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. e02574-18, 27 mar. 2019.

EIVAZZADEH-KEIHAN, R. et al. Functionalized graphene oxide nanosheets with folic acid and silk fibroin as a novel nanobiocomposite for biomedical applications. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 6205, 13 abr. 2022.

FRANCISCO, F. L. et al. Development, optimization and validation of a rapid colorimetric microplate bioassay for neomycin sulfate in pharmaceutical drug products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 104–111, 1 ago. 2014.

FU, Q. et al. Preparation and in vitro antitumor effects on MDA-MB-231 cells of niclosamide nanocrystals stabilized by poloxamer188 and PBS. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 584, p. 119432, 30 jun. 2020.

GONTIJO, A. V. L.; PEREIRA, S. L.; DE LACERDA BONFANTE, H. Can Drug Repurposing be Effective Against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*? **Current Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 13, 14 dez. 2021.

GWISAI, T. et al. Repurposing niclosamide as a versatile antimicrobial surface coating against device-associated, hospital-acquired bacterial infections. **Biomedical Materials**, v. 12, n. 4, p. 045010, jul. 2017.

HELMY, L. A. et al. The other side to the use of active targeting ligands; the case of folic acid in the targeting of breast cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 211, p. 112289, 1 mar. 2022.

HUANG, F.-L. et al. Niclosamide suppresses T-cell acute lymphoblastic leukemia growth through activation of apoptosis and autophagy. **Oncology Reports**, v. 47, n. 2, p. 1–10, 1 fev. 2022.

IMPERI, F. et al. New Life for an Old Drug: the Anthelmintic Drug Niclosamide Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing. **Antimicrobial Agents and**

Chemotherapy, v. 57, n. 2, p. 996–1005, fev. 2013.

JARA, M. O.; WARNKEN, Z. N.; WILLIAMS, R. O. Amorphous Solid Dispersions and the Contribution of Nanoparticles to In Vitro Dissolution and In Vivo Testing: Niclosamide as a Case Study. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1, p. 97, jan. 2021.

KIM, S. et al. Biomedical Applications of Hyaluronic Acid-Based Nanomaterials in Hyperthermic Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 7, p. 306, jul. 2019.

LU, T. et al. Novel niclosamide-derived adjuvants elevating the efficacy of polymyxin B against MDR *Pseudomonas aeruginosa* DK2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 236, p. 114318, 5 jun. 2022.

LV, Y. et al. Biological and intracellular fates of drug nanocrystals through different delivery routes: Recent development enabled by bioimaging and PK modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 188, p. 114466, 1 set. 2022.

MALLAKPOUR, S.; SEYFI, B. Antibacterial nanocomposite films based on Poly(vinyl alcohol)/TiO₂-Folic acid: Study of physicochemical, optical, and thermal characteristics. **Materials Chemistry and Physics**, v. 281, p. 125809, 1 abr. 2022.

MATHIAZZI, B. I.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Hybrid Nanoparticles of Poly (Methyl Methacrylate) and Antimicrobial Quaternary Ammonium Surfactants. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 4, p. 340, abr. 2020.

MCGUCKIN, M. B. et al. Nanocrystals as a master key to deliver hydrophobic drugs via multiple administration routes. **Journal of Controlled Release**, v. 345, p. 334–353, 1 maio 2022.

MODI, S. et al. Nanostructured Antibiotics and Their Emerging Medicinal Applications: An Overview of Nanoantibiotics. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 708, jun. 2022.

MOHAMMAD, H. et al. Repurposing niclosamide for intestinal decolonization of vancomycin-resistant enterococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 6, p. 897–904, 1 jun. 2018.

MOHAMMED, M. et al. Exploring the applications of hyaluronic acid-based nanoparticles for diagnosis and treatment of bacterial infections. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 14, n. 4, p. e1799, 2022.

MOHARIL, P. et al. Engineering a folic acid-decorated ultrasmall gemcitabine nanocarrier for breast cancer therapy: Dual targeting of tumor cells and tumor-associated macrophages. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, n. 3, p. 1148–1162, 1 mar. 2022.

NAQVI, S.; MOHIYUDDIN, S.; GOPINATH, P. Niclosamide loaded biodegradable chitosan nanocargoes: an in vitro study for potential application in cancer therapy. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 11, p. 170611, [s.d.].

OUSINGSAWAT, J. et al. Airway Delivery of Hydrogel-Encapsulated Niclosamide for the Treatment of Inflammatory Airway Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1085, jan. 2022.

PAWAR, V. K. et al. Engineered nanocrystal technology: In-vivo fate, targeting and

applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 183, p. 51–66, 10 jun. 2014.

RAJAMUTHIAH, R. et al. Repurposing Salicylanilide Anthelmintic Drugs to Combat Drug Resistant Staphylococcus aureus. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0124595, 21 abr. 2015.

RAMEZANI FARANI, M. et al. Folic Acid-Adorned Curcumin-Loaded Iron Oxide Nanoparticles for Cervical Cancer. **ACS Applied Bio Materials**, v. 5, n. 3, p. 1305–1318, 21 mar. 2022.

SCHWEIZER, L.; RAMIREZ, D.; SCHWEIZER, F. Effects of Lysine N- ζ -Methylation in Ultrashort Tetrabasic Lipopeptides (UTBLPs) on the Potentiation of Rifampicin, Novobiocin, and Niclosamide in Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 335, mar. 2022.

SHARMA, R. Mapping of global, regional and national incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio of lung cancer in 2020 and 2050. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 4, p. 665–675, 1 abr. 2022.

TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 1 mar. 2018.

YASIN, A. et al. Advances in Hyaluronic Acid for Biomedical Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 910290, 4 jul. 2022.

YEH, L.-T. et al. Niclosamide Suppresses Migration and Invasion of Human Osteosarcoma Cells by Repressing TGFBI Expression via the ERK Signaling Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 484, jan. 2022.

ZHANG, W. et al. Niclosamide as a repurposing drug against Gram-positive bacterial infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkac319, 28 set. 2022.

ZHAO, D. et al. Combined chemotherapy for triple negative breast cancer treatment by paclitaxel and niclosamide nanocrystals loaded thermosensitive hydrogel. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 167, p. 105992, 1 dez. 2021.



Data e assinatura do aluno(a)



Data e assinatura do orientador(a)