



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIAS E NANOBIOTECNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

Nanopartículas poliméricas contendo clorambucil
funcionalizadas com peptídeo direcionador: produção,
caracterização e ensaios biológicos com células tumorais

DIEGO JUSCELINO SANTOS DIAS

BRASÍLIA – DF

2017

DIEGO JUSCELINO SANTOS DIAS

Nanopartículas poliméricas contendo clorambucil
funcionalizadas com peptídeo direcionador: produção,
caracterização e ensaios biológicos com células tumorais

Orientador:

Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes

Coorientadora:

Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Nanotecnologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Nanociências e Nanotecnologia.

BRASÍLIA – DF

2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Pós-Graduação em Nanociências e Nanobiotecnologia

Tese de Doutorado

Diego Juscelino Santos Dias

Título:

Nanopartículas poliméricas contendo clorambucil
funcionalizadas com peptídeo direcionador: produção,
caracterização e ensaios biológicos com células tumorais

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes
Presidente / Orientador
FCE / UnB

Profa. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro
FUP / UnB

Prof. Dr. Vinícius Ricardo de Souza
SEE / DF

Profa. Dra. Camila Alves Areda
FCE / UnB

Prof. Dr. Diego Madureira de Oliveira
FCE / UnB

Brasília – DF, 28 de agosto de 2017.

Dedico este trabalho à minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Como sempre, tenho que começar agradecendo à minha mãe! Foi ela quem sempre esteve ao meu lado nos bons e maus momentos. A ela agradeço também pela inspiração, pois, é muito bom fazer um trabalho acreditando em um dia poder ajudar pessoas que passarão pelo que vivemos em um passado cada vez mais distante.

Agradeço ao meu pai José Dias, aos meus irmãos Marlon, Charles, Maione, Elizabeth e suas respectivas famílias. Lembro também de familiares muito importantes que estiveram sempre próximos, como minha amada tia Camila, as amigas Teodomira, Dona Maria, tia Helena, Thatiane, Patrícia, Eleuza, Glória, Marcília, Sinadia, Cecília, Neire, meu padrinho João Batista e minha madrinha Nilza, meus primos Roulien, Alexandre, Nalbert, Jéssica, Dayse, Hugo e sobrinhos Talysson e Rayssa.

Pela paciência, atenção, dedicação e por conseguir mais uma vez aturar um orientando tão enrolado como eu, agradeço ao Professor Dr. Anderson de Jesus Gomes, que ao longo desses “oito” anos fez muito mais do que me orientar. Com ele e a Professora Dra. Claire Nain Lunardi Gomes iniciei meus estudos na área das nanociências, sendo-me fornecidas condições para ver todo sentido que havia nos conteúdos obtidos na leitura de inúmeros artigos científicos da área e ministrados nas disciplinas. Gostaria muito de seguir caminho semelhante ao que eles trilharam para chegar onde se encontram atualmente. Incluo no agradecimento todos os alunos do grupo de pesquisa de ambos os professores, em especial ao Doutor Vinícius e ao Mestre Igor, que muito me ajudaram e serviram de inspiração nessa reta final.

Agradecimento especial dedico à Professora Dra. Jaqueline, pela imensa atenção a mim dispensada nos vários dias em que se deslocou até o laboratório do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, onde o Professor Dr. Ricardo Bentes de Azevedo disponibilizou estrutura e materiais para realização de ensaios biológicos. A este professor e pesquisador, imensamente reconhecido, também agradeço por todo apoio a mim dispensado. Aproveito para agradecer à Professora Dra. Sônia Nair Bão e todos os técnicos, alunos e estagiários de seu laboratório, por permitir que fosse realizado o preparo e

a metalização das formulações que foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura.

Expresso imensa gratidão ao Professor Dr. Juliano Alexandre Chaker por ter me ajudado com seus comentários sobre metodologias de análises térmicas e interpretação de espectros de infravermelho com transformada de Fourier. Agradeço por ele ter permitido o uso do seu equipamento de calorimetria exploratória diferencial, adquirido mediante projeto de pesquisa, para realização das minhas análises térmicas. Aproveito para registrar agradecimento tão especial quanto ao Professor Dr. Marcelo Henrique Souza por todas as lições ensinadas e, principalmente, por sua amizade, que muito prezo.

Agradeço ao Professor Dr. Araken dos Santos Werneck Rodrigues, ao Professor Dr. João Paulo Chieregato Matheus e à Professora Dra. Diana Lúcia Moura Pinho, gestores da Faculdade de Ceilândia ao longo desses anos. A perseverança e dedicação desses líderes locais fizeram e fazem com que a Universidade de Brasília alcance de maneira ampla a população do Distrito Federal e, com excelência, cada vez mais gradua e capacita diversos profissionais da área de saúde. Sou muito grato à Faculdade, pois, nela trabalho, estudo e pesquiso! Devido a essa gestão, que sempre se demonstrou muito democrática, a mim foi concedida a oportunidade de poder concluir este trabalho da melhor forma possível mediante afastamento de três meses. Sou muito grato por isso!

Aos amigos de trabalho da FCE, Jean, Evilásio, Leopoldo, Alisson(s), Frederico, Marcos, Modoaldo, Renata, Lorena, Nara, Rafaela, Elias, Leandra, Leonardo, Pedro, Lauro, Carol, Jéssika, Henriqueta, Poliane, Helena, Vilene, Antônio, Lynce, Dionisio e da ETC, Hélio, Guidborgongne, Viviane, Sebastião, Anderson, Francis, Odelizia, Neirifran, Renato, Mariane, e muitos outros, que muito me ajudaram até aqui, obrigado!

Aos amigos Edney, Eder, Ederson, Michel, professor Alex (representando todos os amigos fiz no Jiu Jitsu), agradeço pela companhia, amizade e por muitas vezes terem me ouvido quando me encontrava angustiado ou passando por momentos turbulentos de minha vida. Muito obrigado a todos, inclusive aos que possam não ter sido mencionados e que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

“... Um homem consegue intuir como as coisas poderiam ser num vislumbre do que é se sentir vivo por inteiro. Talvez, quando está sozinho numa praia ou no alto de uma montanha e, de repente, percebe a glória do mundo físico, como se fosse parte do vento e do céu. (...) Mas é só um momento ...”

Steve Biddulph, *Por Que Os Homens São Assim?*

RESUMO

O câncer de mama é uma doença que causa temor e morte entre as mulheres. Com o intuito de melhorar a qualidade de vida de pacientes e elevar a eficiência de tratamentos já empregados clinicamente, foram estudadas novas formulações para transporte e liberação sustentada de um fármaco. Pelo método de emulsificação e evaporação do solvente, foram produzidas partículas poliméricas contendo o antitumoral clorambucil submetidas a dois procedimentos diferentes para funcionalização primária (acoplamento com EDC/NHS e associação com DOPA) e posterior funcionalização secundária com o peptídeo direcionador ciclo-RGD. As formulações obtidas foram avaliadas quanto às características morfológicas, citotóxicas e físico-químicas (diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanho, potencial zeta, perfil de liberação *in vitro*, eficiência de encapsulamento, análises térmicas diferenciais e termogravimétricas, análises espectroscópicas na região UV-vis, de FTIR e de emissão de fluorescência). Imagens de MEV demonstraram que as formulações apresentam forma esférica, com pouca porosidade e, considerando os dados obtidos por DLS, apresentaram tamanho entre 290 e 370 nm e PDI entre 0,200 e 0,250. Valores negativos de potencial zeta (-10,77 mV) demonstram que as partículas possuem baixa tendência à agregação em meio aquoso. Foram obtidos elevados valores de eficiência de encapsulamento (média de 88,0%). Estudos da citotoxicidade por meio de ensaios de viabilidade com MTT e da internalização das partículas *in vitro* com células tumorais de mama (MCF-7) e de fibroblastos (NIH-3T3) demonstram que as formulações funcionalizadas com o tripeptídeo tiveram mais eficiência no tratamento quando comparadas com as formulações controle ou sem funcionalização. Pelos ensaios realizados, foi possível concluir que as formulações produzidas correspondem a promissores sistemas de transporte e liberação sustentada e poderão contribuir para o aumento dos índices de seletividade e eficiência terapêutica, biodisponibilidade, elevação da sítio-especificidade e conseqüente redução de efeitos adversos do clorambucil.

Palavras-chave: PLGA, CHB, EDC/NHS, DOPA, ciclo-RGD, funcionalização, câncer de mama.

ABSTRACT

The breast cancer is a disease that causes fear and death among women. In order to improve the quality of life of patients and to increase the efficiency of treatments already employed clinically, new formulations for the transport and sustained release of a drug were studied. Polymorphic particles containing the chlorambucil antitumor were submitted to two different procedures for primary functionalization (EDC/NHS coupling and DOPA association) and subsequent secondary functionalization with the cyclo-RGD targeting peptide. The obtained samples were evaluated for morphological, cytotoxic and physicochemical characteristics (hydrodynamic diameter and size distribution, zeta potential, *in vitro* release profile, encapsulation efficiency, thermogravimetric and thermal analysis, spectroscopic analysis in the UV-vis region, FTIR and fluorescence emission). SEM images showed that the samples had spherical shape, low porosity and, considering the data obtained by DLS, presented a size between 290 and 370 nm and PDI between 0,200 and 0,250. Negative values of zeta potential (-10.77 mV) demonstrate that the particles in aqueous medium have low tendency to aggregate. High values of encapsulation efficiency were obtained (mean of 88.0%). Cytotoxicity studies via MTT viability assays and *in vitro* particle internalization with breast tumor cells (MCF-7) and fibroblast cells (NIH-3T3) demonstrated that the tripeptide functionalized samples were more efficient in the treatment when compared to control samples or without functionalization. Through the carried out tests, it was possible to conclude that the produced samples are promising systems for transport and sustained release and they could contribute to the increase of selectivity and therapeutic efficiency indexes, bioavailability of site-specificity and consequent reduction of adverse effects of this drug.

Key words: PLGA, CHB, EDC/NHS, DOPA, cyclo-RGD, functionalization, breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do CHB.....	26
Figura 2: Fórmula estrutural do PLGA, monômeros de ácido láctico e de ácido glicólico.	34
Figura 3: Ilustração do processo de adesão de (a) uma célula que contém receptores superficiais integrina às proteínas com RGD presentes na MEC e (b) na presença de um biomaterial funcionalizado com RGD.	41
Figura 4: Sequência do tripeptídeo RGD (Arg–Gly–Asp).	42
Figura 5: Modelos propostos para as NP produzidas.....	56
Figura 6: Simples emulsificação e evaporação do solvente para preparação de NP de PLGA.....	58
Figura 7: Espectros de absorção na região UV-Vis das NP sem CHB.....	76
Figura 8: Espectros de absorção na região UV-Vis das NP com CHB.....	77
Figura 9: Espectro de absorção na região UV-Vis do fármaco CHB livre.	77
Figura 10: Espectros FTIR das NP sem CHB.	80
Figura 11: Espectros FTIR das NP com CHB.	80
Figura 12: Espectros FTIR dos reagentes utilizados no preparo das formulações..	81
Figura 13: Comparação entre os espectros FTIR da (1) NP.vazia, (2) NP.CHB e (3) CHB livre.	81
Figura 14: Espectros de emissão na região UV-Vis das NP com CHB.	84
Figura 15: Curva de calibração utilizada nos ensaios em que foi necessário determinar a concentração do fármaco.....	86
Figura 16: Espectros de absorção na região UV-Vis obtidos durante a realização do experimento de PL das NP de PLGA contendo CHB.	88
Figura 17: Medidas de absorbância ao longo do tempo para uma formulação de NP de PLGA contendo apenas CHB entre os primeiros minutos de preparo da suspensão e seis horas de liberação do fármaco.	89
Figura 18: PL da formulação NP.CHB para o período de 12 dias.	90
Figura 19: PL das formulações (a) NP.CHB.EDC/NHS, (b) NP.CHB.EDC/NHS.PEP, (c) NP.CHB.DOPA e (d) NP.CHB.DOPA.PEP para o período de 12 dias, com intervalo de 5,0 minutos nas primeiras seis horas e posterior de 12 horas.....	90
Figura 20: Diâmetro hidrodinâmico em função do volume e PDI das formulações. ...	94
Figura 21: Termogramas das formulações de NP formuladas sem CHB.....	99
Figura 22: Termogramas das formulações de NP com CHB.....	99
Figura 23: Termogramas DTA para NP.vazia (— preta) e NP.CHB (— vermelha).	101
Figura 24: Análise termogravimétrica para NP.Vazia (— preta) e NP.CHB (— vermelha).	102

Figura 25: Micrografia eletrônica de varredura utilizada para avaliar a morfologia da superfície das partículas da formulação NP.CHB.	103
Figura 26: Micrografia eletrônica de varredura utilizada para avaliar a morfologia da superfície das partículas da formulação NP.CHB.EDC/NHS.PEP.	104
Figura 27: Micrografia eletrônica de varredura utilizada para avaliar a morfologia da superfície das partículas da formulação NP.CHB.DOPA.PEP.	104
Figura 28: Ensaio de viabilidade com MTT de células da linhagem NIH-3T3 tratadas com NP de PLGA vazias e contendo CHB com ou sem funcionalização.....	108
Figura 29: Ensaio de viabilidade com MTT de células da linhagem MCF-7 tratadas com NP de PLGA vazias e contendo CHB com ou sem funcionalização.....	109
Figura 30: Avaliação da sítio-especificidade das NP produzidas por meio de processos de adesão <i>in vitro</i> pelo período de incubação de 24 horas na concentração de 63,0 mg _(partículas) /L em células da linhagem MCF-7.....	113
Figura 31: Avaliação da sítio-especificidade das NP produzidas por meio de processos de adesão <i>in vitro</i> pelo período de incubação de 72 horas na concentração de 63,0 mg _(partículas) /L em células da linhagem MCF-7.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação das formulações preparadas pelo método de simples emulsificação e evaporação do solvente sem e com funcionalização superficial.....	56
Tabela 2: Comprimentos de máxima absorvância e intensidades observados nos espectros das formulações contendo CHB em suspensão e do CHB livre em solução aquosa.	78
Tabela 3: Comprimentos de máxima emissão e intensidades dos espectros das formulações contendo CHB.....	84
Tabela 4: Valores de EE% do fármaco CHB determinados pelo método direto.....	87
Tabela 5: Porcentagem de fármaco liberada em três momentos do ensaio de PL para as formulações contendo o fármaco CHB.....	91
Tabela 6: Medidas de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão das formulações produzidas.	95
Tabela 7: Medidas de potencial zeta das formulações produzidas.	97
Tabela 8: Temperaturas de T_g das formulações produzidas.	98
Tabela 9: Valores de temperatura e energia dos eventos observados nas curvas de DTA das formulação de NP vazias e com CHB.	101
Tabela 10: Valores de porcentagem de células viáveis tratadas com formulações controle (vazias) e contendo CHB (com e sem funcionalização) para 24 e 72 horas de tratamento em células da linhagem NIH-3T3.	108
Tabela 11: Valores de porcentagem de células viáveis tratadas com formulações controle (vazias) e contendo CHB (com e sem funcionalização) para 24 e 72 horas de tratamento nas células da linhagem MCF-7.....	109

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

%EE: eficiência de encapsulamento

®: marca registrada

ADAM: do inglês, *disintegrin and metalloproteinase*

ADAMTS: do inglês, *disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*

ASTM: do inglês, *American Society for Testing and Materials*

BRCA: do inglês, *breast cancer*

Ciclo-RGD: ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys)

CHB: clorambucil, do inglês, *chlorambucil*

DDS: sistema de liberação de fármacos, do inglês, *drug delivery system*

DLS: espalhamento dinâmico da luz, do inglês, *dynamic light scattering*

D-MEM: do inglês, *Dulbecco's modified eagle medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico, do inglês, *deoxyribonucleic acid*

DOPA: dopamina polimerizada

DSC: calorimetria exploratória diferencial, do inglês, *differential scanning calorimetry*

DTA: análise térmica diferencial, do inglês, *differential thermal analysis*

EDC: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

EPR: efeito de elevação da permeabilidade e retenção, do inglês, *enhanced permeability and retention*

FCE: Faculdade de Ceilândia

FDA: do inglês, *Food and Drug Administration*

ETC: Escola Técnica de Ceilândia

FTIR: infravermelho com transformada de Fourier, do inglês, *Fourier transform infrared*

FUP: Faculdade de Planaltina

GAG: glicosaminoglicanas

HER: fator de crescimento epidérmico humano, do inglês, *Human Epidermal growth factor Receptor*

IB: Instituto de Biologia

IGF: do inglês, *Insulin-like Growth Factor*

MEC: matriz extracelular

MEFP: do inglês, *Mytilus Edulis foot protein*

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MMP: do inglês, *matrix metalloproteinases*
MRP: do inglês, *multidrug resistance proteins*
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium
NHS: 1-hidroxi-2,5-pirrolidinediona
NP: nanopartícula(s)
NP.CHB: formulação com CHB
NP.CHB.DOPA: formulação com CHB e DOPA
NP.CHB.DOPA.PEP: formulação com CHB, DOPA e PEP
NP.CHB.EDC/NHS: formulação com CHB e EDC/NHS
NP.CHB.EDC/NHS.PEP: formulação com CHB, EDC/NHS e PEP
NP.Vazia: formulação vazia (apenas PLGA)
NP.Vazia.DOPA: formulação vazia com DOPA
NP.Vazia.DOPA.PEP: formulação vazia com DOPA e PEP
NP.Vazia.EDC/NHS: formulação vazia com EDC/NHS
NP.Vazia.EDC/NHS.PEP: formulação vazia com EDC/NHS e PEP
OMS: Organização Mundial da Saúde
P.A.: para análise
PBS: do inglês, *phosphate buffered saline*
PDI: do inglês, *polydispersity index*
PEG: polietilenoglicol
PGA: ácido poliglicólico, do inglês, *polyglycolic acid*
pH: colog da concentração hidrogeniônica no meio
PL: perfil de liberação
PLA: ácido poliláctico, do inglês, *polylactic acid*
PLGA: ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico), do inglês, *poly(lactic-co-glycolic acid)*
PVA: álcool polivinílico
RES: do inglês, *reticulo endothelial system*
rpm: rotações por minuto
RGD: tripeptídeo Arg-Gly-Asp
SBF: Soro Fetal Bovino
SD: desvio padrão, do inglês, *standard deviation*
TGA: análise termogravimétrica, do inglês, *Thermogravimetric Analysis*
Tris: tris(hidroximetil)aminometano
UnB: Universidade de Brasília
US\$: dolar

UV-Vis: ultravioleta-visível

λ : comprimento de onda

~: aproximadamente

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Eficiência de Encapsulamento pelo Método Direto	65
Equação 2: Eficiência de Encapsulamento pelo Método Indireto.....	65
Equação 3: Porcentagem de Liberação do CHB.....	66
Equação 4: Volume de suspensão celular para o ensaio de viabilidade.....	69
Equação 5: Porcentagem de células viáveis.....	71
Equação 6: Volume de suspensão celular para o ensaio de uptake.....	71
Equação 7: Equação da curva para determinar a concentração de CHB em mg/L. .	86

SUMÁRIO

Introdução	18
Câncer.....	19
Câncer de Mama.....	21
Tratamentos.....	24
Clorambucil.....	25
Sistemas de Entrega/Liberação de Fármacos.....	28
NP Poliméricas.....	33
Funcionalização.....	38
Objetivos	46
Objetivo Geral.....	47
Objetivos Específicos.....	47
Materiais e Métodos	48
Materiais.....	49
Reagentes.....	49
Equipamentos.....	51
Soluções.....	52
Soluções Estoque de Álcool Polivinílico.....	53
Solução Tampão Fosfato de Sódio.....	53
Solução Tampão Acetato de Sódio e Ácido Acético.....	54
Solução Salina Tampão de TRIS.....	54
Solução Aquosa de Glutaraldeído 2,5% _(m/v)	55
Métodos.....	55
Preparo das NP.....	55
Simple Emulsificação e Evaporação do Solvente.....	57
Funcionalização das NP Por Meio de Acoplamento (EDC/NHS).....	58
Funcionalização das NP com Agente de Recobrimento (DOPA).....	59
Funcionalização das NP com Ciclo-RGD: Acoplamento com EDC/NHS e Associação com DOPA.....	60
Caracterização das NP.....	61
Medidas Espectroscópicas.....	61
Espectroscopia de Fluorescência.....	61
Espectroscopia FTIR.....	62

Espectroscopia de Absorção na Região UV-Vis	62
Curva de Calibração.....	63
Análises Térmicas	63
Termogravimétrica e Diferencial Simultânea (TGA/DTA)	63
Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	64
Eficiência de Encapsulamento	64
Perfil de Liberação	66
Diâmetro Hidrodinâmico e Índice de Polidispersão	67
Potencial Zeta	68
Análise Morfológica das NP	68
Avaliação Citotóxica	69
Condições de Cultura	69
Avaliação da Ação Superficial das NP sobre as Células (<i>Uptake</i>).....	71
Análises Estatísticas e Gráficas	73
Referências Bibliográficas	73
Resultados e Discussão	74
Produção das Formulações.....	75
Análises Espectroscópicas.....	76
Ultravioleta-Visível.....	76
Infravermelho com Transformada de Fourier	79
Espectroscopia de Emissão	84
Eficiência de Encapsulamento	85
Perfil de Liberação	87
Diâmetro Hidrodinâmico.....	93
Potencial Zeta	96
Análises Térmicas	98
TGA/DTA e DSC	98
Análise Morfológica das NP	103
Ensaio de Viabilidade.....	107
Conclusão	117
Referências.....	120

INTRODUÇÃO

Câncer

O câncer corresponde a um grupo de mais de 100 variedades de doenças complexas e heterogêneas caracterizadas pela multiplicação contínua de células (1–3). Esta doença tem sido motivo de preocupação por parte da população mundial e corresponde a uma das principais causas de mortes entre humanos com 7,6 milhões de casos registrados em 2008 e 8,2 milhões de casos em 2012 segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (3–7).

Com base nas informações do projeto Globocan, os tipos de câncer mais incidentes no mundo em 2012 foram pulmão (1,82 milhão), mama (1,67 milhão), intestino (1,36 milhão) e próstata (1,1 milhão) (4,5,8–10). Em mulheres, as maiores frequências foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (4,5,8–10). Na América Latina e Caribe, os tipos mais incidentes foram o de próstata em homens (152 mil) e o de mama em mulheres (152 mil) (4,5,8–10).

Segundo estudo apresentado por Dieleman e sua equipe, no ano de 2013, foram gastos por volta de 115 bilhões de dólares no tratamento de 29 condições classificadas como neoplasias apenas nos Estados Unidos (6,11). Apesar desse elevado custo, o número de sobreviventes de câncer continua a crescer em reflexo aos avanços obtidos ao longo dos anos no diagnóstico e tratamento da doença (12). Em 2016, somente para os Estados Unidos, foi estimado que os três tipos de câncer mais frequentes foram: próstata (3.306.760), colo retal (724.690) e melanoma (614.460) nos homens, e mama (3.560.570), útero (757.190) e colo retal (727.350) nas mulheres (4,12).

Apenas 57% dos casos e 65% das mortes por câncer em todo o mundo são registrados em países menos desenvolvidos, apesar de possuírem uma população relativamente maior (12). Esse fato se deve em grande parte à estrutura etária mais jovem e à menor frequência do tabagismo nessas comunidades (12). Contudo, já se prevê que essa incidência deverá aumentar nos próximos anos, pois está ocorrendo o envelhecimento dessas populações (12). Em países desenvolvidos o câncer de próstata é o mais diagnosticado entre os homens e o de pulmão é a principal causa de morte entre as mulheres (12). Já nos países menos desenvolvidos, o câncer de fígado e o de estômago correspondem ao segundo e ao terceiro tipos mais diagnosticados, respectivamente, e as principais causas de morte (12).

No Brasil, foi estimado que, em 2016, ocorreram cerca de 600 mil novos casos de câncer (5). Desconsiderando o câncer de pele não melanoma, ocorreram cerca de 420 mil novos casos de câncer, sendo os mais frequentes os tumores de próstata em homens, com aproximadamente 61 mil casos, e de mama em mulheres, com aproximadamente 58 mil casos (5).

Sua complexidade reside em fatores genéticos e fenotípicos que implicam sua diversidade clínica (5,13). Células tumorais replicam muito mais rapidamente do que células saudáveis e, conseqüentemente, são favorecidas pelo fornecimento de nutrientes (inclusive, tornando-as mais susceptíveis à ação de quimioterápicos) (14). Elas não sofrem apoptose em ambientes com baixa quantidade de nutrientes e capturam nutrientes essenciais de células saudáveis (13,14). Para que ocorra expansão contínua, novos vasos sanguíneos surgem, e um tumor vascularizado é capaz de crescer mais e é mais propício a gerar metástase (14). Várias pesquisas estão direcionadas ao desenvolvimento de tratamentos para retardar a angiogênese e limitar o crescimento do tumor e o aparecimento de metástase (13–15).

Uma vasculatura incompleta e imatura dentro do tumor desempenha papel fundamental na resistência ao fármaco (1). A vasculatura imatura oxigena e nutre de modo limitado as células cancerosas e elas tendem a se adaptar a essas condições críticas (1). A adaptação leva a alterações na expressão de genes e vias metabólicas, o que contribui para a diminuição dos valores de pH no tumor até que um pH ácido seja alcançado e mantido (1). Nessas condições, os fenômenos de resistência ao fármaco podem ocorrer, uma vez que muitos deles se tornam ionizados, devido possuírem valores de pKa entre 5,8 – 8,5, podendo, assim, se tornarem menos ativos (1).

O uso de fármacos para eliminar células cancerosas em tratamentos clínicos convencionais pode ocasionar resistência intrínseca ou adquirida à quimioterapia, ocasionando o reaparecimento de tumores, o mau prognóstico para o paciente e conduzindo assim ao fracasso do tratamento (15–17). Essa resistência ocorre em mais de 50% dos pacientes cujo câncer reaparece, sendo responsável em grande parte pela alta mortalidade associada à doença (16). Este é um obstáculo difícil de ser superado, e os mecanismos de resistência do tumor podem ter várias origens (15–17). Para superar essa resistência, muitas tentativas são feitas utilizando estratégias que consideram os diferentes mecanismos quimioterápicos (17). Muitas moléculas diferentes estão envolvidas na angiogênese e existem muitos alvos em potencial para diversas terapias (17).

Câncer de Mama

O câncer de mama possui a maior incidência e a maior mortalidade na população feminina (4,5,8). Aproximadamente 1,67 milhões de novos casos desse

tipo de câncer foram diagnosticados em 2012 em todo o mundo, correspondendo à aproximadamente 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados em mulheres (4,5,8,10,9). Foi estimado que, em 2012, ocorreram 522 mil óbitos por este tipo de câncer (4,5,8,10,9). Nos países desenvolvidos, ocorre cerca da metade de todos esses casos e 38% do total de óbitos (12).

No Brasil, o risco estimado é de 56 casos para cada 100 mil mulheres (8,18). Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (74 para cada 100 mil mulheres), Sudeste (68 para cada 100 mil mulheres), Centro-Oeste (56 para cada 100 mil mulheres) e Nordeste (39 para cada 100 mil mulheres), e o segundo tumor mais incidente na região Norte (22 para cada 100 mil mulheres) (8). As taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil (14 óbitos para cada 100 mil mulheres em 2013) (8,18).

A OMS reconhece mais de 20 subtipos diferentes de câncer de mama (8). A maioria dos tumores de mama têm origem no epitélio ductal (cerca de 80%) e são conhecidos como carcinomas ductais invasivos (8). Entretanto, como o câncer de mama se caracteriza por ser um grupo heterogêneo de doenças, existem outros subtipos de carcinomas que podem ser diagnosticados, como lobular, tubular, mucinoso, medular, micropapilar e papilar (8).

As taxas de incidência de câncer de mama em diversos países refletem as diferenças que há na disponibilidade de métodos de detecção precoce e na presença de fatores de risco (12). É um tipo de câncer considerado multifatorial, envolvendo fatores reprodutivos e hormonais, como histórico menstrual, uso de contraceptivos, nunca ter tido filhos, além do comportamento e do estilo de vida (4,8). Envelhecimento, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, histórico

familiar de câncer de mama, alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama) são os mais bem conhecidos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (8). Além desses, o uso de hormônios como terapia na menopausa, o consumo de álcool, a obesidade ou o sobrepeso, o sedentarismo e a exposição à radiação ionizante também são considerados agentes potenciais para o desenvolvimento desse câncer (4,8). Já se sabe que, ao dar à luz e amamentar, ocorre a diminuição do risco de incidência desse tipo de câncer (12).

O câncer de mama incidente em mulheres jovens apresenta características clínicas e epidemiológicas bem diferentes das observadas em mulheres mais idosas (8,19–21). Geralmente são mais agressivos, apresentam altas taxas de mutação dos genes BRCA1 e BRCA2 (do inglês, *breast cancer*), além de superexpressarem o gene HER2 (fator de crescimento epidérmico humano) (8,19–24). Alterações em genes, como os da família BRCA, aumentam o risco de desenvolver câncer de mama (8,19–21,24). Mecanismos biológicos ligados a alterações nos genes da família IGF (do inglês, *Insulin-like Growth Factor*), como o IGF-1, assim como alterações nos níveis séricos de hormônios como insulina e leptina, medeiam essa associação (8,25,26).

A mamografia é um exame capaz de detectar o câncer de mama em sua fase inicial, possibilitando que o tratamento mais eficaz ocorra o mais rápido possível, aumentando, assim, a expectativa de uma provável cura (12). Porém, o rastreio nesse tipo de exame não é perfeito e nem todos os tumores serão detectados para imediato prognóstico (12). Outras vezes, a mamografia pode ocasionar resultado falso-positivo, ocasionando um diagnóstico errado e possível tratamento para um tumor que não exista (12). Por isso, se faz necessário realizar pesquisas que

desenvolvam novos métodos de diagnóstico mais eficientes ou aprimorar os já existentes, além de investir em novos tratamentos.

Tratamentos

Atualmente, terapias utilizadas para combater o câncer envolvem processos invasivos, como implantação de cateteres que permitam a aplicação local de quimioterápico(s) para diminuir o tamanho do tumor, cirurgia(s) para remoção do(s) tumor(es), seguida por mais quimioterapia e radioterapia (17). Frequentemente, as melhores respostas são obtidas mediante a utilização da combinação de terapias (27). O fracasso de uma quimioterapia para curar um paciente com câncer está normalmente relacionado com o crescimento excessivo de células insensíveis e resistentes (27). Embora as células cancerosas sejam mais vulneráveis, os fármacos antitumorais livres não são seletivos e causam lesões em tecidos saudáveis (27,28).

Por meio da administração de doses elevadas de um medicamento, podem surgir efeitos adversos tão intensos que o tratamento precisa ser interrompido (14). Infelizmente, nem todos os tratamentos realizados com especificações oncológicas são capazes de destruir o câncer, porém, os avanços no tratamento do câncer estão progredindo rapidamente, tanto em termos de novos agentes contra o câncer como novas vias de entrega (14).

Sistemas de liberação de fármacos (DDS, *do inglês, Drug Delivery System*) estão sendo desenvolvidos para permitir rotas e dosagens alternativas, novos alvos terapêuticos e terapias sítio-específicas (14,15,17,29). O objetivo desses novos DDS é aumentar o tempo de sobrevida e a qualidade de vida de pacientes com câncer (14). Em todos os casos, a eficácia está diretamente relacionada com a capacidade

do tratamento em eliminar células cancerosas atingindo paralelamente o mínimo de células saudáveis (14). O uso de um DDS pode melhorar a eficácia do tratamento reduzindo a toxicidade do fármaco e aumentando sua sítio-especificidade (30).

Para contornar os efeitos adversos que fármacos antitumorais causam em células normais, vem sendo amplamente discutida a possibilidade de conjugar fármacos anticâncer a proteínas e/ou macromoléculas transportadoras (31). As vantagens dessa proposta são distribuição tecidual específica, meia-vida prolongada do medicamento no plasma e liberação sustentada do fármaco (31,32). Além disso, esses conjugados podem se acumular em tumores sólidos devido à microvasculatura com arquitetura defeituosa associada à má drenagem linfática em um efeito de permeabilidade e retenção aumentados (EPR, do inglês, *Enhanced Permeability and Retention*) (14,16,29,31). Estudos demonstram que macromoléculas se acumulam em maior quantidade e durante períodos mais longos no tecido tumoral quando comparadas com compostos de baixa massa molecular, devida este efeito (33).

Clorambucil

O clorambucil (CHB, do inglês, *chlorambucil*, Figura 1) ou (4-[bis(2-cloretil)amino]benzenobutanóico), comercialmente conhecido como Leukeran[®], é um potente fármaco antitumoral derivado da mostarda nitrogenada utilizado clinicamente no tratamento de leucemia linfática crônica, linfomas e carcinomas avançados de ovário e de mama (13,31,33–40). Apresenta citotoxicidade significativa quando administrado em pacientes com câncer, sendo um agente alquilante bifuncional que interage hidrofobicamente com o ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês,

DeoxyriboNucleic Acid) (13,36,41). Seu mecanismo de ação ocasiona a intercalação do DNA impedindo a replicação celular (33,36,41). É um fármaco predominantemente ciclo celular não específico e apresenta boa biodisponibilidade oral, assim como outros agentes alquilantes (37).

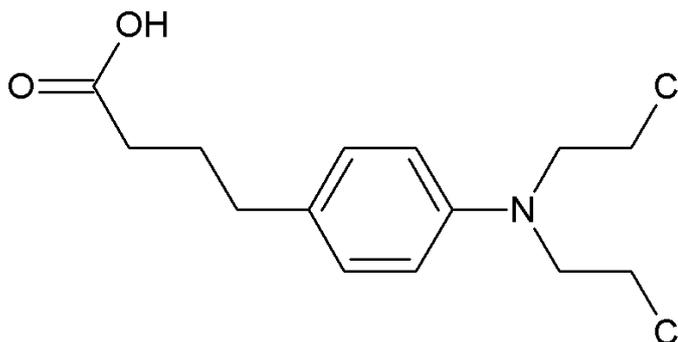


Figura 1: Fórmula estrutural do CHB.

A aplicação clínica deste fármaco antitumoral é, no entanto, limitada devido seus efeitos tóxicos secundários, tais como mielossupressão e neurotoxicidade e sintomas, como náuseas (27,31,33,34,37). Estudos clínicos mostram que ele causa depressão da medula óssea, incluindo neutropenia e trombocitopenia reduzindo seu índice terapêutico (42). Apesar de suas limitações, o CHB continua sendo o fármaco de primeira linha de escolha para o tratamento de leucemia linfocítica crônica e escolha de segunda linha para terapia de câncer avançado de ovário e de mama (36). Pesquisas demonstram que agentes alquilantes, como mostardas nitrogenadas e nitrosuréias estão entre os compostos mais ativos contra gliomas em humanos e meduloblastomas em animais (27).

Esse fármaco se encontra entre os citotóxicos que são substratos das proteínas de resistência a múltiplos fármacos classificadas como transportadoras de membrana do tipo MRP-1 (do inglês, *Multidrug Resistance Proteins*) (38). Esse fato

se relaciona a resistência que tumores podem vir a apresentar após o tratamento com esses agentes quimioterápicos (15,31,38).

O CHB foi um dos primeiros agentes antitumorais utilizado para preparar conjugados com anticorpos, sendo fisicamente adsorvido ou quimicamente ligado ao transportador por meio de incubação ou por acoplamento direto, utilizando N-hidroxissuccinimida/N,N'-di-ciclo-hexilcarbodiimida (31,34). Este método tem a desvantagem de que durante a preparação os produtos formados não são quimicamente bem definidos no que diz respeito à ligação química entre o fármaco à proteína e/ou ao polímero transportador (31,34).

É um agente antitumoral pouco solúvel em água (lipofílico) que possui um log P de 1,7, ou seja, o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água é igual à 1,7 (33,37,41). Apresenta baixo ponto de fusão (64 – 66° C), alta solubilidade em lipídios e, apesar da sua baixa solubilidade em água, sofre hidrólise em meio aquoso (41). Esta hidrólise é afetada por vários fatores, incluindo o pH e as espécies iônicas presentes junto à molécula (41). A instabilidade química do CHB é uma de suas limitações para obter o seu desempenho terapêutico ótimo (41).

Agentes ácidos fracos, como o CHB, têm a vantagem em termos de distribuição dentro do tumor e sequestro citoplasmático por causa do pH interno ir de neutro para ácido (1). O CHB é um agente apropriado para a modificação química, devido à presença de apenas um grupo carboxílico em sua molécula (34). A base reacional para variar a estabilidade da ligação química e avaliar a significância da interação entre o fármaco e o DDS *in vitro* e a atividade *in vivo* depende do pH (34). Durante a internalização, o pH é reduzido de 7,4 para 5,5 – 5,0, e esta alteração de pH pode ser explorada por meio da clivagem ácida de um ponto de ruptura pré-determinado de modo que o fármaco possa ser liberado no interior da célula tumoral

(31,34). Em pH fisiológico, ocorre a ionização do CHB fazendo com que esse fármaco se ligue a constituintes do plasma (27).

Reações do CHB com álcoois apropriados, em condição azeotrópica, podem produzir variados ésteres (27). E, após esterificação, a presença da carbonila do grupo éster pode ser confirmada pela presença de uma banda em 1.725 cm^{-1} em um espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier Transform InfraRed*) (42).

Uma abordagem promissora para contornar os efeitos tóxicos do CHB é seu encapsulamento em um DDS (33). Dessa forma, a habilidade de controlar efeitos adversos poderia ser utilizada para minimizar sua toxicidade sistêmica e aumentar sua concentração local no sítio alvo (37). Além disso, a incorporação do CHB numa nanoestrutura pode melhorar seu perfil farmacocinético e aumentar a sua atividade terapêutica em relação a uma solução de CHB livre (37).

Sistemas de Entrega/Liberação de Fármacos

Devido ao aumento da idade média da população, em 2050 deverá haver por volta de 1,7 bilhões de pessoas com 60 anos ou mais, sendo extremamente necessário intensificar o desenvolvimento de novos DDS, pois a frequência de aparecimento de doenças como o câncer também deverá progredir (17). Nos últimos anos, muita atenção tem sido dispensada no desenvolvimento de tecnologias de mecanismos de entrega de fármacos (33,43). Frequentemente tem sido demonstrado em experimentos *in vitro* e *in vivo* que o encapsulamento de um fármaco não afeta sua atividade anticâncer (30).

Dentre os diversos campos de aplicação dos DDS, o tratamento do câncer continua a ser o alvo mais estudado devido esses sistemas fornecerem vantagens claras para a quimioterapia (32). Na terapia anticâncer, os DDS são projetados para alterar as propriedades desfavoráveis de moléculas "livres" que tenham pouca especificidade e alta toxicidade (33,41). O aumento da especificidade local e da internalização pode elevar a eficácia terapêutica e reduzir efeitos secundários graves (28). Por exemplo, em um estudo, nanopartículas (NP) dendríticas funcionalizadas com ácido fólico e transportando o fármaco metotrexato apresentaram aumento da atividade antitumoral, diminuição acentuada da toxicidade e resposta terapêutica melhor do que as observadas para o fármaco livre (28,44).

A nanotecnologia farmacêutica se concentra na formulação de DDS constituídos por compostos biocompatíveis de escala nanométrica (17,43). Dentre esses sistemas, podem ser listados: lipossomas, micelas, conjugados, dendrímeros, partículas lipídicas, estruturas poliméricas como nanoestruturas, entre outros (17,28,43,45,46). Sendo muitas vezes difícil demonstrar a localização da substância incorporada, os termos "nanoesferas" e "nanocápsulas" são melhores expressos pelo termo generalista "NP", mencionado anteriormente (17). Esses sistemas têm sido extensivamente estudados para serem utilizados nas terapias contra o câncer e apresentam inúmeras vantagens (28,43). Ampla variedade de compostos ativos pode ser incorporada ou conjugada às nanoestruturas (28).

Por meio da nanotecnologia é possível oferecer meios adequados para a entrega de vários agentes terapêuticos e de diagnóstico, incluindo moléculas lipofílicas e hidrofílicas, de pequena ou elevada massa molecular, bem como macromoléculas, tais como proteínas, peptídeos, plasmídeos, ácidos nucleicos e

genes, que estejam adsorvidos ou conjugados sobre a superfície da nanoestrutura, por administração local ou entrega sítio-específica (28,30,43,47).

A escala nanométrica oferece distintas vantagens para a entrega de fármacos (43). O termo nanopartículas, ou simplesmente NP, é aplicável a uma estrutura que tenha pelo menos uma de suas dimensões inferior a 100 nm, embora alguns cientistas as definam com dimensões entre 1 e 1.000 nm (definição utilizada ao longo deste trabalho) (17,48). As NP utilizadas como DDS, apresentam pelo menos nove vantagens marcantes:

- I. São passíveis de serem produzidas em larga escala,
- II. Mantêm suas características físicas e químicas inalteradas durante longos períodos de tempo, permitindo armazenamento prolongado,
- III. Transportam grande quantidade de fármaco quando comparados com as administrações de fármacos livres,
- IV. Dispersam fármacos pouco solúveis em meio fisiológico,
- V. Melhoram a estabilidade de agentes terapêuticos evitando degradações enzimáticas prematuras,
- VI. Evitam a eliminação rápida *in vivo* devido ao volume inferior ao das células e a capacidade de circulação prolongada,
- VII. NP poliméricas podem apresentar liberação prolongada do(s) composto(s) ativo(s) e assim manter sua concentração dentro da janela terapêutica durante o período necessário para que haja maior eficácia, devido à manipulação das características de sua matriz e da taxa de biodegradação,
- VIII. Podem ser entregues em alvos distantes utilizando cateteres por meio de procedimentos pouco invasivos, ou ser conjugada(s) com ligante(s)

sítio-específico que possa(m) direcioná-la ao tecido ou órgão de interesse melhorando a potência e reduzindo efeitos adversos do(s) agente(s) ativo(s) devido à melhora da biodistribuição,

- IX. Podem superar os mecanismos de resistência a múltiplos fármacos por meio das bombas de efluxo de passagem, entrando nas células por fagocitose, pinocitose ou por endocitose mediada por receptores (1,15,17,28,32,43,45–47,49,50).

Desta forma, é possível melhorar a biodisponibilidade oral, manter o efeito do composto ativo no tecido-alvo, solubilizar compostos ativos lipossolúveis – como o CHB – e facilitar a entrega intravascular (1,43). A nanotecnologia tem sido utilizada com sucesso para criar DDS que possam resolver o problema da fraca solubilidade em água, característica muito comum entre os fármacos antitumorais disponíveis e promissores (1). Frequentemente, fármacos antitumorais lipossolúveis requerem a adição de solventes, para que possam ser absorvidos pelas células cancerosas, porém, estes solventes não só diluem o fármaco, como também aumentam sua toxicidade (1).

NP podem penetrar profundamente nos tecidos por meio de capilares finos e fenestras presentes no revestimento epitelial atingindo órgãos como fígado, baço, pulmão, medula espinal e sistema linfático sendo absorvidas em quantidades superiores pelas células (43). Por meio da administração intravenosa, os transportadores coloidais são capazes de deixar a corrente sanguínea em órgãos que possuem capilares endoteliais porosos (como fígado, baço e medula óssea) e em processos patológicos (inflamação e tumores), que são acompanhados por maior permeabilidade dos vasos (17). A capacidade de circular no sangue durante longos períodos de tempo é um requisito importante para os sistemas coloidais,

pois, o sistema reticuloendotelial (RES, do inglês, *Reticulo Endothelial System*) é o principal responsável por remover transportadores coloidais presentes no plasma (17).

A captura de NP por células do RES depende do seu tamanho, carga e demais propriedades superficiais (17). O tamanho e a forma das NP ajudam os DDS a trafegar de forma eficaz nos sistemas biológicos, e tem estimulado a sua produção por meio de variados métodos (*top-down* e *bottom-up*) (47). Técnicas como nanoprecipitação, emulsão à base de inversão de fases, microfluídos à base de automontagem, camada por camada e nanoimpressão têm sido utilizadas na produção de DDS (47).

Células internalizam NP tipicamente abaixo de 100 nm, e é o tamanho, a carga e a composição das nanoestruturas que determinam a sua biodistribuição (1,47). O tamanho das partículas deve ser suficientemente grande (30 – 100 nm) para evitar fugas para capilares sanguíneos, mas não tão grande (< 100 nm) que se tornem suscetíveis à depuração por macrófagos (1,29). NP menores que 20 nm são eliminadas da circulação por meio do RES dentro de algumas horas (47). Há estudos que indicam que a microvasculatura tumoral permite a penetração de NP que tenham diâmetro de até 400 nm (33,47). Quando injetadas por via intravenosa, NP maiores ficam retidas no fígado e no baço após poucos minutos (47). Diminuir o tamanho das NP permite aumentar a duração da sua circulação no sangue, no entanto, a absorção de surfactantes à sua superfície tem sido demonstrada como sendo mais eficaz para esse prolongamento (1,17).

Desde a aprovação, em 1990, da anfotericina B lipossomal pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), vários DDS foram disponibilizados comercialmente para tratamento de diversas doenças (32,47). A última década tem

sido caracterizada por avanços no desenvolvimento de novos medicamentos com nanotecnologia (17). Em 2012, o FDA aprovou 39 novos medicamentos, sendo este o maior número desde a década de 1990 e quase o dobro do número de aprovados em 2010 (17). Incorporar um medicamento existente em um DDS pode não só melhorar o seu desempenho como também prolongar sua vida de patente como um novo produto (47). O custo e o tempo médio necessário para desenvolver um DDS (aproximadamente U\$ 20 a 50 milhões e de 3 a 4 anos) é significativamente inferior ao do desenvolvimento de um novo fármaco (aproximadamente U\$ 500 milhões e de mais de 10 anos) (47). O mercado mundial gastou cerca de U\$ 60 bilhões com o desenvolvimento de DDS à base de polímeros em 2010 (47). Os desafios para aprovar esses novos sistemas tem retardado a sua imediata aplicação clínica, mas seus enormes benefícios deverão promover o surgimento de inúmeros outros novos DDS (47).

NP Poliméricas

NP poliméricas representam sistemas coloidais sólidos compostos por diversos polímeros e/ou copolímeros, sintéticos, naturais ou híbridos, que, na maioria das vezes, são biocompatíveis, biodegradáveis e apresentam baixa solubilidade em água (17,43,45–47). Polímeros biodegradáveis são considerados como uma alternativa para o uso de lipídeos devido à melhora da estabilidade *in vivo* (47).

Dentre os polímeros utilizados como matrizes para formulação de NP, incluem-se polímeros sintéticos, como, poliacrilatos de alquila e demais poliacrilatos, poliésteres alifáticos, como ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico

(PGA) e seu copolímero ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA, Figura 2) em diversas proporções, policaprolactonas, polietilenoiminas e polímeros naturais, como, polissacarídeos, gelatina, alginato, colágeno, quitosana, entre outros (17,28,32,43,47,48,50–52). As principais vantagens destes polímeros são a baixa toxicidade, a susceptibilidade para biodegradação, a presença de grupos funcionais na superfície, estabilidade farmacotecnológica, a excelente capacidade de incorporação e a possibilidade de influenciar a taxa de liberação do agente terapêutico (17,28,30,32,50,52). Polímeros sintéticos apresentam a vantagem de manter a liberação do agente terapêutico encapsulado em períodos prolongados (30,43). Já polímeros naturais possuem uma duração relativamente mais curta de liberação e, em geral, sua utilização é limitada, devido à necessidade do uso de solventes orgânicos nocivos (como halogenados) e condições severas durante processo de formulação (43).

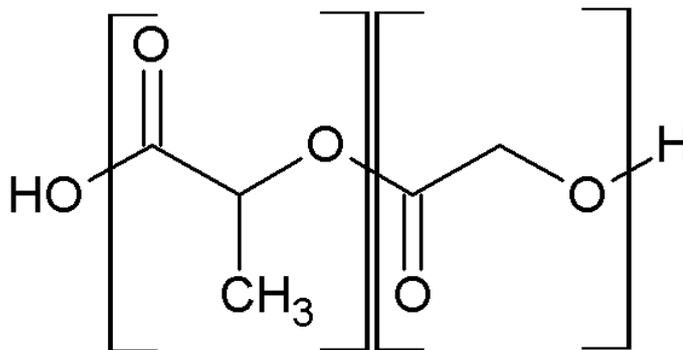


Figura 2: Fórmula estrutural do PLGA, monômeros de ácido láctico e de ácido glicólico.

NP feitas com PLA, PGA e PLGA são predominantemente formuladas pelo método de emulsificação, difusão, seguida pela evaporação do solvente e precipitação ou por meio de técnicas de deslocamento de solvente, enquanto que as de policianoacrilatos de alquila são NP sintetizadas por polimerização em emulsão e

nanoprecipitação (17,43). Infelizmente, NP de PLGA formuladas utilizando a técnica de dupla emulsão seguida pela evaporação do solvente apresentam geralmente distribuição heterogênea de tamanho (43). O tamanho dessas partículas pode ser ajustado por meio da alteração da composição química, bem como, do método de fabricação (47). Vários métodos de extrusão têm sido desenvolvidos para formular partículas de tamanho menor em larga escala (43).

Variados agentes terapêuticos podem ser encapsulados em NP utilizando a técnica de emulsão seguida pela evaporação do solvente (43). Essas NP são capazes de transportar substâncias adsorvidas à sua superfície, ligadas covalentemente, incorporadas à matriz polimérica, ou encapsuladas (17).

Aprovadas pelo FDA para determinadas aplicações médicas e disponíveis comercialmente, as matrizes de PLA, PGA e PLGA são extensivamente investigadas para produção de DDS desde 1970 (28,32,46,51–53). Seus DDS são versáteis na entrega de fármacos e estas matrizes são amplamente utilizadas devido sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e facilidade de processamento (43,47). Como poliésteres, na natureza, sofrem hidrólise simples da cadeia base do éster em meio aquoso, levando a clivagem da cadeia polimérica que, quando implantados no corpo, formam subprodutos biologicamente compatíveis e metabolizáveis (ácidos láctico e/ou glicólico) que, eventualmente, são metabolizados no organismo pelo ciclo de Krebs gerando como produtos da degradação CO_2 e H_2O (43,46,54–57). Esterases inespecíficas, predominantemente carboxilesterases e arilesterases, são as principais responsáveis pela hidrólise das ligações ésteres em substratos não carregados no plasma (27).

Os produtos de degradação dos polímeros biodegradáveis são formados a um ritmo muito lento e, portanto, não alteram o funcionamento normal das células

(43). Esses polímeros foram testados quanto à toxicidade e segurança em vários estudos com animais e atualmente são muito utilizados em seres humanos para uma variedade de aplicações médicas regenerativas como suturas, implantes, dispositivos de fixação (parafusos, pinos, varetas), contraceptivos, enxerto para órgãos artificiais, suporte para produção de tecidos, entre outros (30,43,52,56).

A biodegradabilidade e a taxa de liberação do fármaco de NP de PLGA pode ser alterada variando a proporção polimérica dos monômeros (ácido láctico e ácido glicólico), sendo este o fator predominante na determinação da taxa de degradação da matriz (43,46,47,51,52). A taxa de degradação também pode ser afetada pela massa molecular do polímero, cristalinidade, tamanho e condições como temperatura, pH, fluxo de fluido, carga mecânica, presença de enzimas no ambiente em que o sistema esteja (43).

Estudos também demonstraram a possibilidade de controlar a degradabilidade dos DDS de PLA, PGA e PLGA mesclando esses poliésteres com outros polímeros biodegradáveis, sendo assim modificadas as propriedades físicas das matrizes presentes no sistema (51). Dependendo das propriedades termodinâmicas dos polímeros escolhidos, diferentes graus de separação de fases podem ser observados a partir dos polímeros misturados, provocando a variação do comportamento de degradação (51). Nos estudos de Park, Cohen e Langer a matriz de PLA foi misturada com PGA, óxido de polietileno, óxido de polipropileno e acetato de polietilenovinílico a fim de modificar a taxa de degradação dos DDS de PLA e avaliar o comportamento de liberação do fármaco (58). A miscibilidade, degradabilidade e liberação de fármacos em DDS nas misturas de PLGA/quitina, PLGA/polifosfazeno e PLGA/PVA foram estudadas pelos grupos de pesquisa de Fwu-Long, Ibim e Pitt *et. al.*, respectivamente (51,59,60).

O fármaco aprisionado na matriz de PLGA é liberado a uma taxa sustentada por meio da sua difusão por meio da malha polimérica e por degradação da mesma (30). Desta forma, a liberação do agente terapêutico encapsulado pode ocorrer em uma escala variada de tempo, que pode durar de horas a meses (30,43). Há evidências de que a incorporação de enantiômeros de PLA em bloco leva à formação de estereocomplexos com melhoria de propriedades mecânicas e degradação mais lenta (47).

NP de PLGA podem ser facilmente modificadas com polietilenoglicol (PEG) para acomodar elementos de direcionamento sítio-específico que respondam a algum tipo de estímulo quando presentes em um determinado ambiente (47). Estudos de biodistribuição demonstram que NP de PLGA aumentam o acúmulo de agentes de diagnóstico e/ou terapêuticos no tumor alvo, aumentando a permeabilidade e o efeito de retenção (28). NP de PLA copolimerizado com PEG e superfície modificada com ligantes, tal como o tripeptídeo Arg-Gly-Asp (RGD), demonstraram aumento da carga de fármacos, redução de efeitos adversos, prolongamento do tempo de residência *in vivo*, diminuição do reconhecimento e absorção por macrófagos e melhoria na entrega sítio-específica em tumores (53). Utilizando transportadores micelares poliméricos à base de PLA, foi possível observar que a taxa de liberação do fármaco CHB pode ser controlada de maneira eficaz alterando o pH do meio (53).

O álcool polivinílico (PVA) tem sido o agente emulsificante mais comumente utilizado para a formulação de NP de PLGA, pois as partículas formadas usando este composto são relativamente uniformes e de menor tamanho, e são fáceis de serem re-dispersas em meio aquoso (43). Após preparo, uma pequena fração de PVA permanece associada à superfície das NP e afeta as propriedades físicas e de

absorção celular das mesmas (43). As NP com maior quantidade de PVA associado são relativamente mais hidrofílicas e reduzem a absorção celular quando comparadas com partículas com menor quantidade de PVA associado (43). Assim, as propriedades físicas e de absorção celular das NP podem ser modificadas por meio da variação da quantidade de PVA que permanece associada nas mesmas (43).

O medicamento Lupron Depot[®] consiste em microesferas de PLGA contendo acetado de leuprorelina e foi um dos primeiros DDS polimérico de liberação aprovado pela FDA, em 1989, para o tratamento de câncer de próstata e endometriose, sendo comercialmente bem sucedido desde então, atingindo vendas anuais de aproximadamente U\$ 1,0 bilhão (32). Outros medicamentos aprovados pela FDA que utilizam nanoestruturas poliméricas biodegradáveis são: Nutropin Depot[®] (aprovado desde 1999), Risperdal[®] Consta[®] (aprovado desde 2003), Vivitrol[®] (aprovado desde 2006), Bydureon[®] (aprovado desde 2012), Doxil[®] (aprovado desde 1995), Marqibo[®] (aprovado desde 2012), Abraxane[®] (aprovado desde 2005), entre outros (32). Vários desses medicamentos são encontrados comercialmente no Brasil.

Funcionalização

Para prolongar a meia-vida de circulação evitando o reconhecimento pelo RES, pode ser realizada a modificação da superfície das NP por meio da adsorção física ou ligação química de polímeros hidrofílicos tais como PEG, PVA, óxido de polietileno, poloxâmeros, poloxaminas, polisorbato 80, polissacarídeos, entre outros (1,17,28). A adsorção ou ligação química de PEG é a prática mais frequente utilizada para modificação superficial com finalidade de proporcionar permanência

plasmática prolongada (16,17,28). As moléculas de PEG formam uma camada hidrofílica de proteção sobre a superfície das partículas promovendo uma barreira que impede a ligação não específica de proteínas do sangue às NP (redução da opsonização e da ativação complementar), fazendo com que as partículas circulem por mais tempo pelo sistema atravessando sem problemas órgãos como pulmão, rim, células de Kupffer do fígado e reduzindo a taxa de fagocitose dos macrófagos do baço e conseqüentemente a eliminação pelo RES (16,17,28).

Células interagem constantemente com a matriz extracelular (MEC) (61). A MEC é formada principalmente por proteínas fibrosas que servem como base estrutural e elástica dos tecidos tais como fibronectina e laminina que realizam a adesão entre a MEC e as células. Além disso, é formada por cadeias de polissacarídeos como as glicosaminoglicanas (GAG) e proteoglicanas, que formam um material gelatinoso resistente à compressão e que permite a difusão de nutrientes, hormônios e outros compostos (61,62). A MEC pode ser associada diretamente ao volume e à força dos tecidos, além de servir de base para o crescimento, a divisão e a migração celular, desempenhando importantes funções de suporte e organização além de servir como meio para acesso às células e realização da comunicação celular (61,62). É um sistema dinâmico e interativo que desempenha papel importante na regulação do comportamento celular, sendo constantemente remodelado de acordo com a demanda dos tecidos (61).

Moléculas presentes na MEC podem ser extensíveis e flexíveis, e a distensão mecânica pode expor os sítios de interação dos receptores de adesão e fatores de crescimento presentes na superfície celular, como representado na Figura 3A (62). No entanto, a função da MEC vai além da estrutura e suporte, pois influencia ativamente o comportamento, polaridade, diferenciação, proliferação e sobrevivência

das células, fornecendo sinais transmitidos ao citoesqueleto o que determina o destino celular (62).

No câncer, a MEC tem papel de extrema relevância, principalmente em processos metastáticos (63). A colonização de sítios secundários exige eventos de desadesão e posterior adesão das células à MEC de maneira direta e controlada (63,64). A organização do microambiente tecidual e o processamento de fatores de crescimento e ativação de moléculas de adesão celular são essenciais para a progressão tumoral (64). A degradação da MEC é um pré-requisito para o reparo tecidual, migração celular e liberação de fatores de crescimento e peptídeos bioativos (65). Diferentes proteases têm sido associadas a esses processos, tais como as MMP (do inglês, *matrix metalloproteinases*), outras famílias de proteases (serino, cisteína e aspártico proteases), as ADAM (do inglês, *disintegrin and metalloproteinase*) e as ADAMTS (do inglês, *disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) (64,65). Diante da importância e da complexidade de suas interações, a MEC tornou-se alvo de pesquisas, visto que seu entendimento representa avanços em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antimetastáticos e tratamentos do câncer (64).

Integrinas são mediadoras e promovem a comunicação do citoesqueleto com proteínas plasmáticas presentes na MEC (65). Além de promover a adesão, as integrinas são reconhecidas moléculas de sinalização capazes de realizar a transdução de mensagens por vias de sinalização clássica, graças a sua estrutura molecular (65,66). Desse modo, as integrinas podem ser consideradas fundamentais para a proliferação, migração, longevidade e manutenção das funções específicas de diferenciação celular (65,66).

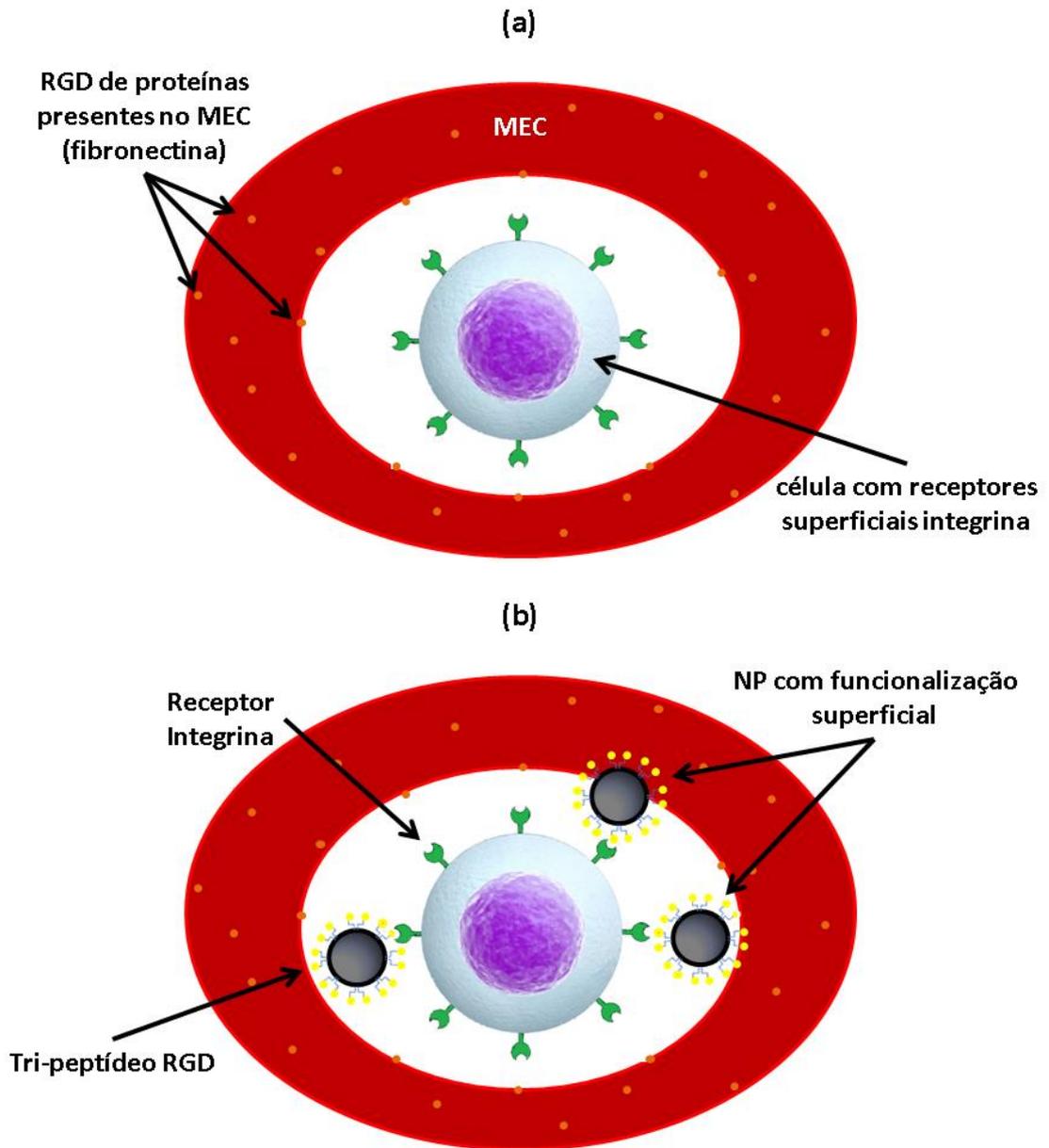


Figura 3: Ilustração do processo de adesão de (a) uma célula que contém receptores superficiais integrina às proteínas com RGD presentes na MEC e (b) na presença de um biomaterial funcionalizado com RGD.

A entrega de agentes terapêuticos em tecidos específicos foi possibilitada devido a uma série de descobertas, tais como os anticorpos monoclonais, receptores específicos expressos apenas em determinados tecidos e do desenvolvimento de técnicas de conjugação que ligam anticorpos, peptídeos ou outros ligantes aos DDS (43). A primeira classe de anticorpos monoclonais

direcionadores foi apresentada em 1975, porém, foram necessários 20 anos para o desenvolvimento de ferramentas contendo esses anticorpos para tratamentos de câncer (14,43). Uma característica ideal para uma molécula direcionadora é que ela seja expressa em células tumorais, mas não em células saudáveis (14). Vários tratamentos de câncer utilizando anticorpos direcionadores para tipos específicos de câncer já foram aprovados pelo FDA e são aplicados em tratamentos clínicos (14).

Proteínas adesivas, embora estruturalmente sejam diferentes, requerem sequências de reconhecimento semelhante para se ligarem às integrinas e possuem em comum um resíduo de ácido aspártico ou de ácido glutâmico exposto, geralmente, em dobras estendidas e flexíveis (67,68). Das sequências de aminoácidos que contêm ácido aspártico capazes de se ligarem às integrinas, a mais frequente e mais estudada é a sequência arginina-glicina-ácido aspártico (Arg-Gly-Asp ou RGD, Figura 4), também conhecida como "sítio universal de reconhecimento celular" (67,68).

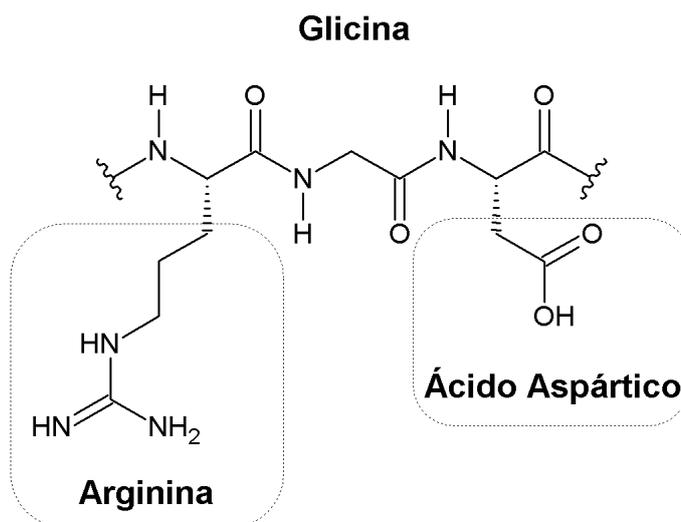


Figura 4: Sequência do tripeptídeo RGD (Arg-Gly-Asp).

A expressão de receptores específicos ocorre em algumas células cancerosas proporcionando marcadores distintos para entrega de agentes de contraste, quimioterápicos e/ou de diagnóstico (69). Processos angiogênicos são regulados por receptores como a integrina $\alpha\beta3$, a qual funciona como receptor de proteínas reconhecidas por meio da sequência do RGD (70). Este tripeptídeo tem elevada afinidade com a integrina $\alpha\beta3$ e, por isso, é muito utilizado em experimentos para entrega sítio-específica de fármacos, gene e agentes de imagem (69). A integrina $\alpha\beta3$ é muito expressa em células tumorais de mama e glioblastomas (70).

O uso de DDS pode ocasionar a entrega sítio-específica de fármacos por vias de direcionamento ativas e/ou passivas (43). Entretanto, para alguns grupos de pesquisa, a nanotecnologia ainda não permite especificidade para tumores e a dita liberação controlada do agente encapsulado (1). Mas, já se sabe que NP que reúnem funções de direcionamento passiva e/ou ativa têm maior potencial de aplicação clínica (Figura 3B) (69).

Processos de modificação superficial empregando rotas húmidas, tratamento com gás ionizante e aplicação de monocamadas de silanos exigem condições que podem acabar por limitar e até mesmo impossibilitar a aplicação (57). Uma alternativa viável para funcionalizar a superfície de poliésteres é pela conjugação de grupos amina não ligados a terminais de ácidos carboxílicos livres do polímero formando carbodiimidas (71). A conjugação com biomoléculas pode ser realizada por meio da ligação com N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e 1-hidroxi-2,5-pirrolidinediona (NHS) (72). Desta forma, grupos carboxílicos livres do PLGA reagem com EDC e NHS e, em seguida, pode ser introduzido um ligante sítio-específico à superfície da NP (71). Sendo este ligante um peptídeo, por exemplo,

seus terminais amino devem estar disponíveis para formar ligação com o EDC/NHS ligado previamente à superfície da NP (71–74).

A formação de ligações altamente adesivas entre mexilhões marinhos com materiais presentes em seu *habitat* instigou pesquisadores a estudar esses mecanismos (75). Outra forma simples e eficaz de modificação da superfície de NP, é pelo uso de substâncias orgânicas extraídas desses organismos, pois apresentam excelente capacidade adesiva em diversas superfícies inorgânicas e/ou orgânicas (69,75). O composto proteico 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina e seus derivados, como a 3,4-dihidroxi-feniletanamina (dopamina), são muito utilizados em métodos para modificação superficial (57,66). Correspondem a estruturas miméticas da proteína Mefp-5 (do inglês, *Mytilus edulis foot protein*) que exibe elevada capacidade de adesão superficial (57,75). O processo de polimerização da dopamina à polidopamina (DOPA) envolve a oxidação de catecol a quinona, que reage com outros catecóis e/ou outras quinonas para formar dopamina polimerizada de maneira muito semelhante à formação de melanina (57,66). Estando a superfície das NP recoberta com DOPA, novas ligações podem ser formadas por meio de adições de Michael ou reações com bases de Schiff incorporando-os à superfície (66). Esse método pode ser utilizado para funcionalizar ampla gama de NP independente da sua reatividade superficial. A única exigência é que a molécula do ligante apresente grupos funcionais nucleofílicos tais como aminas ou tióis (66). Sobre a camada de DOPA da superfície das NP pode assim ser realizada a funcionalização secundária com peptídeos ou outros tipos de ligantes (57,76).

No presente trabalho, NP de PLGA contendo o fármaco antitumoral CHB foram produzidas pelo método de simples emulsificação e evaporação do solvente utilizando PVA como agente surfactante. Alíquotas dessas NP foram submetidas a

dois procedimentos distintos de funcionalização superficial primária (EDC/NHS e DOPA) e em seguida ambas foram funcionalizadas de maneira secundária com o peptídeo direcionador ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) (ciclo-RGD). Essas formulações foram então caracterizadas espectroscopicamente, termicamente, morfologicamente e quanto à toxicidade e a sua ação na superfície de células tumorais.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver sistemas nanoestruturados biodegradáveis constituídos pelo copolímero ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) incorporando em sua estrutura o fármaco antitumoral clorambucil e funcionalizando a sua superfície com dois ligantes diferentes (EDC/NHS e DOPA) para acoplar o peptídeo sítio-específico ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) e avaliar a sua citotoxicidade para tratar câncer de mama.

Objetivos Específicos

- Otimizar a técnica de produção dos sistemas nanoestruturados de modo que sejam obtidas partículas que apresentem tamanho, superfície e demais características adequadas para aplicação *in vivo*,
- Determinar características físico-químicas das nanoestruturas produzidas: diâmetro, potencial zeta, eficiência de encapsulamento, estabilidade, temperatura de transição vítrea, composição, capacidade de emissão de fluorescência, comportamento de liberação,
- Caracterizar morfologicamente as NP produzidas por meio de microscopia eletrônica de varredura,
- Avaliar o potencial para aplicabilidade terapêutica dos nanossistemas produzidos por meio de ensaios de citotoxicidade,
- Estudar a sítio-especificidade das NP produzidas por meio de processos de difusão intercelular *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Reagentes

Listados abaixo, encontram-se os reagentes utilizados para produzir, caracterizar e avaliar as NP:

- 1-hidroxi-2,5-pirrolidinediona, NHS, $C_4H_5NO_3$, massa molar de 115,1 g/mol, grau de pureza superior a 97%, marca Sigma-Aldrich[®],
- Acetato de sódio anidro P.A., CH_3COONa , massa molar de 82,0 g/mol, teor mínimo de 99,0%, marca Vetec Química Fina[®],
- Ácido acético glacial P.A., $C_2H_4O_2$, massa molar de 60,0 g/mol, dosagem mínima de 99,7%, marca Vetec Química Fina[®],
- Ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico), PLGA, do inglês, *poly(lactic-co-glycolic acid)*, $[C_3H_4O_2]_x[C_2H_2O_2]_y$, proporção 50:50, massa molar entre 40.000,0 – 75.000,0 g/mol, grau de pureza acima de 99,9%, marca Sigma-Aldrich[®],
- Álcool polivinílico, PVA, do inglês, *Polyvinyl Alcohol*, $[-CH_2CHOH-]_n$, massa molar entre 13.000,0 – 23.000,0 g/mol, hidrolisado entre 87,0 – 89,0%, marca Sigma-Aldrich[®],
- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium, MTT, $C_{18}H_{16}BrN_5S$, massa molar de 414,3 g/mol, grau de pureza acima de 98,0%, marca Sigma-Aldrich[®],
- Brometo de potássio, KBr, massa molar de 119,0 g/mol, grau FTIR, pureza acima de 99,0%, marca Sigma-Aldrich[®],

- Ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys), peptídeo, $C_{27}H_{41}N_9O_7$, massa molecular de 603,7 g/mol, marca Peptides International[®],
- Clorambucil, CHB, do inglês, *chlorambucil*, $C_{14}H_{19}Cl_2NO_2$, massa molar de 304,2 g/mol, grau de pureza acima de 98,0%, marca Sigma-Aldrich[®],
- Cloridrato de dopamina, $(HO)_2C_6H_3CH_2CH_2NH_2 \cdot HCl$, massa molar de 189,6 g/mol, marca Sigma-Aldrich[®],
- Diclorometano P.A., CH_2Cl_2 , grau analítico de pureza, teor acima de 99,0%, marca J.T.Baker[®],
- Dimetilsulfóxido P.A., DMSO, C_2H_6OS , massa molar de 78,1 g/mol, grau biológico de pureza, teor acima de 99,9%, marca Sigma-Aldrich[®],
- D-MEM, do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, com alta concentração de glicose, em forma de pó liofilizado, marca Gibco[®],
- Fosfato de sódio bibásico dihidratado P.A., $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, massa molar de 178,0 g/mol, grau de pureza acima de 99,0%, marca Vetec Química Fina[®],
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A., $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, massa molar de 138,0 g/mol, grau de pureza acima de 98,0%, marca Vetec Química Fina[®],
- Mistura de antibióticos, 5,0 mg/mL de penicilina, 5,0 mg/mL de estreptomicina e 10,0 mg/mL de neomicina em solução salina, marca Gibco[®],
- N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, EDC, $C_8H_{17}N_3$, massa molar de 155,2 g/mol, grau de pureza superior a 97,0%, marca Sigma-Aldrich[®],
- Pastilha para preparo de solução salina tampão de TRIS (tris(hidroximetil)aminometano), $(HOCH_2)_3CNH_2$, pH 8,0 a 25,0°C, marca Sigma-Aldrich[®],
- Solução aquosa de glutaraldeído, $OHC(CH_2)_3CHO$, massa molar de 100,1 g/mol, grau II, teor de 25,0%, marca Sigma-Aldrich[®],

- Soro fetal bovino, SBF, certificado, originado dos Estados Unidos da América, nível de endotoxinas abaixo de 5,0 unidades/mL e nível de hemoglobina abaixo de 10.0 mg/dL, marca Gibco[®],
- Tripsina de pâncreas bovino, pó liofilizado, massa molar de 23,3 kDa, acima de 7.500,0 unidades BAEE/mg, marca Sigma-Aldrich[®].

Todos os demais reagentes utilizados durante a execução deste projeto apresentaram grau analítico de pureza e não foram necessários processos extras de purificação.

Equipamentos

Abaixo estão listados os equipamentos que foram utilizados durante a execução deste projeto:

- Agitador de tubos tipo vortex, marca IKA[®], modelo labdance,
- Agitador magnético, marca IKA[®], modelo Topolino,
- Balança analítica, marca Shimadzu[®], modelo AX200,
- Capela de fluxo laminar unidirecional, marca Veco[®], modelos CFLV 12,
- Centrífuga de bancada para microtubos, marca Eppendorf[®], modelo MiniSpin,
- Dispersador de alto desempenho Ultraturrax, marca IKA[®], modelos T25, equipado com o elemento de dispersão S25N-25F,
- Dispersador de alto desempenho Ultraturrax, marca IKA[®], modelos T10, equipado com o elemento de dispersão S10N-5G,

- Espectrofotômetro de fluorescência, marca Hitachi High-Technologies Corporation[®], modelo F-7000,
- Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier, marca Shimadzu[®], modelo IRPrestige-21,
- Espectrofotômetro para microplacas, marca SpectraMax[®], modelo M2,
- Espectrofotômetro Ultravioleta-visível (UV-vis), marca Hitachi High-Technologies Corporation[®], modelo U-3900H,
- Estufa incubadora de CO₂, marca Thermo Scientific[®], modelo 8000 WJ,
- Instrumento para análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC), marca Shimadzu[®], modelo DSC-60A,
- Instrumento para medida simultânea de análise termogravimétrica (TGA) e térmica diferencial (DTA), marca Shimadzu[®], modelo DTG-60A,
- Medidor de tamanho e potencial zeta, marca Malvern Instruments Limited[®], modelo Zetasizer Nano ZS,
- Micropipetas automáticas com escalas variáveis de 2-20 µL, 20-200 µL e 100-1.000 µL, marca Capp[®], modelo Ecopipette,
- Microscópio eletrônico de varredura marca FEI[®], modelo Quanta 250 FEG,
- Microscópio óptico de luz invertido marca Olympus[®], modelo CK2.

Soluções

Quando necessário, medidas de massa foram realizadas em triplicata, zerando a balança antes de cada medição, usando luvas, pinças e espátulas. Soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura obtida de um sistema ultrapurificador de água da marca Elga[®], modelo Purelab Classic DI MK2, operado

próximo a 14,00 mΩ.cm. Com a finalidade de dar mais agilidade aos processos de produção dos sistemas nanoestruturados e aumentar a reprodutibilidade dos ensaios propostos, foram preparadas as soluções estoque descritas a seguir. Após preparo, todas as soluções foram estocadas em refrigerador.

Soluções Estoque de Álcool Polivinílico

Solução estoque de PVA na concentração de 2,0%_(m/v) foi preparada pela adição de 2,0 g de PVA em béquer de vidro contendo 99,0 mL de água aquecida (temperatura inferior a 60,0°C) e sob agitação branda até completa solubilização. A esta mistura foi adicionado 1,0 mL de solução de antibiótico para prevenir o possível crescimento de micro-organismos. Quando pronta, a solução foi transferida para recipientes plásticos esterilizados contendo 50,0 mL de solução cada.

Solução Tampão Fosfato de Sódio

Para preparo de um litro de solução tampão fosfato (PBS, do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) 0,1 mol/L, com pH 7,4, foram medidas as seguintes massas: 9,000 g de cloreto de sódio, 0,520 g de fosfato de sódio monobásico e 2,300 g de fosfato de sódio bibásico. Esses compostos foram solubilizados em 1,0 L de água ultrapura. Foi medido o pH da solução, sendo necessário, o mesmo foi ajustado utilizando solução de HCl 0,1 mol/L ou de NaOH 0,1 mol/L disponíveis no laboratório.

Solução Tampão Acetato de Sódio e Ácido Acético

Para o preparo dessa solução, inicialmente foi preparado 100,0 mL de solução de ácido acético 0,1 mol/L, transferindo 570,0 μ L de ácido acético glacial P.A. para um balão volumétrico de 100,0 mL e completando o volume com água ultrapura. Em seguida, foi preparada uma solução de acetato de sódio na concentração de 0,1 mol/L. Para isso, foi medido aproximadamente 0,820 g desse sal anidro P.A. sendo em seguida essa massa solubilizada com água ultrapura e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100,0 mL. Ambas as soluções foram então misturadas e a solução resultante foi transferida para um frasco com tampa. O pH da solução obtida foi medido e, quando necessário, ajustado para 4,7 com a adição das soluções de HCl 0,1 mol/L ou NaOH 0,1 mol/L disponíveis no laboratório.

Solução Salina Tampão de TRIS

Para preparo da solução estoque salina de tampão TRIS, uma pastilha contendo sais foi dissolvida em 75,0 mL de água ultrapura, obtendo-se uma solução na concentração de 0,01 mol/L de TRIS e 0,03 mol/L de NaCl. O pH dessa solução foi medido e, se necessário, ajustado para 8,6 com a adição das soluções de HCl 0,1 mol/L ou de NaOH 0,1 mol/L disponíveis no laboratório.

Solução Aquosa de Glutaraldeído 2,5%_(m/v)

Para realizar a fixação das formulações biológicas foi preparada uma solução de glutaraldeído 2,5%_(m/v) pela diluição de 10,0 mL de solução de glutaraldeído 25,0%_(m/v) em 90,0 mL de água ultrapura. Em seguida, a solução obtida foi então transferida para dois frascos de plástico de 50,0 mL cada.

Métodos

Preparo das NP

Foi proposta a incorporação do fármaco antineoplásico CHB na matriz de partículas esféricas compostas pelo polímero PLGA obtidas pelo método de simples emulsificação seguido pela evaporação do solvente. Procedimento semelhante já foi realizado e descrito em trabalho anterior do presente autor desta tese (50).

As NP foram funcionalizadas ou não por meio de duas formas distintas:

- a) incorporação na superfície do peptídeo sítio-específico ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) por meio da ligação carbodiimida utilizando EDC/NHS (ligação direta),
- b) incorporação na superfície do peptídeo sítio-específico ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) por meio da associação utilizando DOPA (ligação indireta).

As formulações produzidas estão listadas na Tabela 1, sendo em seguida detalhados os procedimentos adotados para obtenção de cada uma delas.

Tabela 1: Relação das formulações preparadas pelo método de simples emulsificação e evaporação do solvente sem e com funcionalização superficial.

Denominação	Composição
NP.Vazia	Vazia (apenas PLGA)
NP.Vazia.EDC/NHS	Vazia com EDC/NHS
NP.Vazia.EDC/NHS.PEP	Vazia com EDC/NHS e Peptídeo
NP.Vazia.DOPA	Vazia com Dopamina
NP.Vazia.DOPA.PEP	Vazia com Dopamina e Peptídeo
NP.CHB	Com CHB
NP.CHB.EDC/NHS	Com CHB, com EDC/NHS
NP.CHB.EDC/NHS.PEP	Com CHB, com EDC/NHS e Peptídeo
NP.CHB.DOPA	Com CHB, com Dopamina
NP.CHB.DOPA.PEP	Com CHB, com Dopamina e Peptídeo

Na Figura 5 são apresentados modelos propostos para as formulações produzidas sendo evidenciadas as modificações superficiais realizadas.

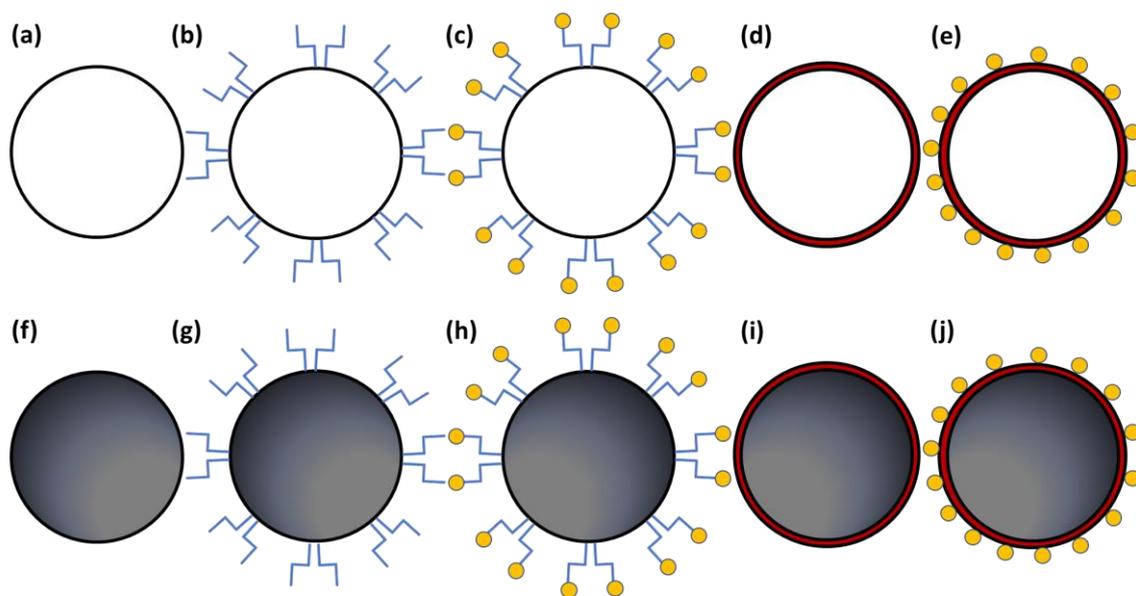


Figura 5: Modelos propostos para as NP produzidas. Na sequência: (a) NP.Vazia, (b) NP.Vazia.EDC/NHS, (c) NP.Vazia.EDC/NHS.PEP, (d) NP.Vazia.DOPA, (e) NP.Vazia.DOPA.PEP, (f) NP.CHB, (g) NP.CHB.EDC/NHS, (h) NP.CHB.EDC/NHS.PEP, (i) NP.CHB.DOPA e (j) NP.CHB.DOPA.PEP.

Simplem Emulsificação e Evaporação do Solvente

Para preparo de cada formulação, aproximadamente 0,100 g do polímero PLGA foi medido e solubilizado em 10,0 mL de diclorometano. Em seguida, foram adicionados aproximadamente 0,010 g de CHB à solução orgânica contendo o polímero. Essa solução foi então adicionada lentamente sobre 10,0 mL de solução aquosa de PVA 2,0%_(m/v) que se encontrava sob agitação a 17.000 rpm em processo de emulsificação. Após adição e emulsificação, a emulsão obtida foi submetida à agitação magnética no interior de uma capela de exaustão ligada até que houvesse a completa evaporação do solvente orgânico e a precipitação das NP esféricas de fármaco/polímero. Em seguida, as formulações foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos e lavadas três vezes com água ultrapura. Por fim, essas NP foram ressuspensas em um volume de aproximadamente 1,0 mL de solução tampão PBS e estocadas em freezer a -20,0° C. Todas as formulações contendo CHB foram submetidas a esse procedimento inicial. As formulações de NP vazias foram obtidas pelo mesmo procedimento, exceto pela não adição do fármaco à fase orgânica no início do processo. Todas as formulações deste trabalho foram obtidas pelo procedimento descrito acima (52,74,77,78,79,80).

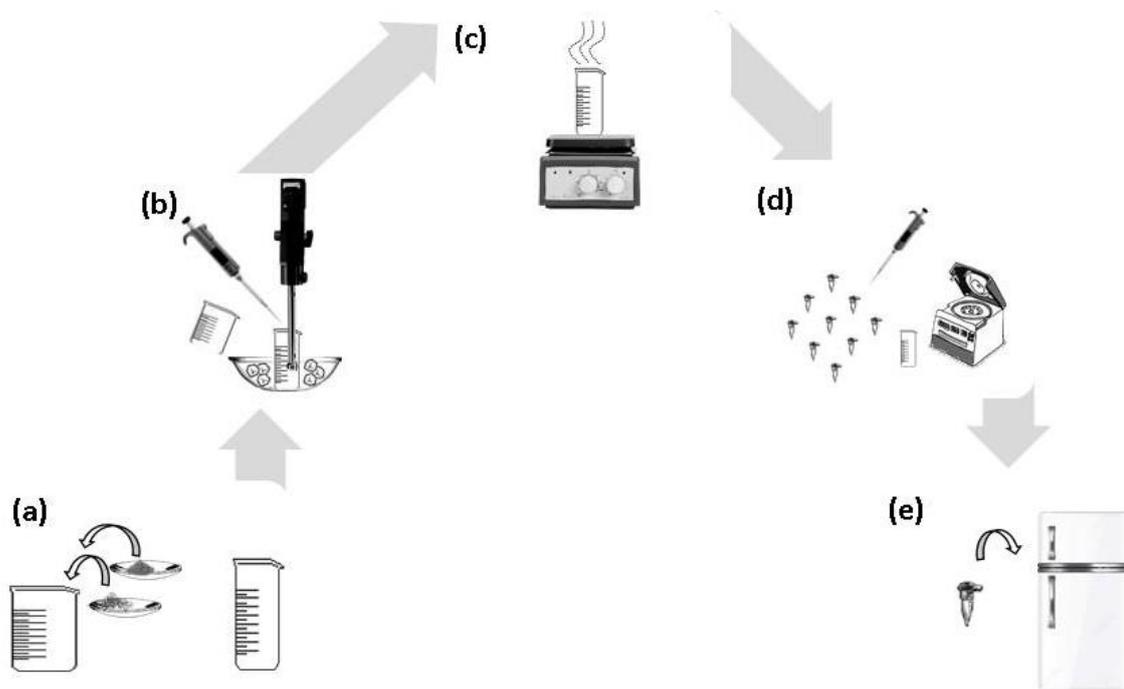


Figura 6: Simples emulsificação e evaporação do solvente para preparação de NP de PLGA. (a) 0,100 g de PLGA e 0,010 g de CHB solubilizados com 10,0 mL de diclorometano, (b) sobre 10,0 mL de PVA 2,0%_(m/v) em agitação de 17.000 rpm foi adicionada a fase orgânica, (c) agitação magnética da emulsão até que ocorresse a completa evaporação do solvente, (d) as NP precipitadas foram centrifugadas a 10.000 rpm e lavadas três vezes com água ultrapura, (e) a formulação foi guardada em freezer à -20,0° C.

Funcionalização das NP Por Meio de Acoplamento (EDC/NHS)

Para funcionalização direta das partículas com ciclo-RGD, foi utilizado como agente de ligação superficial EDC/NHS em condição levemente ácida. Foram medidas aproximadamente 0,004 g de NHS e 0,065 g de EDC em microtubos separados. Após, cada massa foi solubilizada separadamente com 2.000 µL de solução tampão acetato mantida em pH 4,7. Para uma formulação contendo aproximadamente 0,100 g de NP em um microtubo de 2,0 mL foram adicionados 500 µL da solução de NHS e 500 µL da solução de EDC. Uma pequena barra de agitação magnética foi adicionada a este microtubo e, sendo mantido ao abrigo da luz, foi realizada a agitação da suspensão resultante pelo período de 4 horas sobre

uma chapa de agitação. Após esse período, a agitação foi suspensa e as formulações foram centrifugadas a 3.000 rpm pelo período de 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante de cada tubo foi descartado e 500 µL de solução tampão PBS mantido em pH 7,4 foi adicionado ao precipitado. Após esse procedimento, as formulações já funcionalizadas com EDC/NHS foram acondicionadas a -20°C em sistema de refrigeração (69,74,81–83).

As formulações submetidas a esse procedimento foram: NP.Vazia.EDC/NHS, NP.Vazia.EDC/NHS.PEP, NP.CHB.EDC/NHS e NP.CHB.EDC/NHS.PEP.

Funcionalização das NP com Agente de Recobrimento (DOPA)

Para funcionalização indireta com DOPA como agente de recobrimento superficial e substrato para associação secundária do ciclo-RGD, foi realizada uma polimerização da dopamina em condição levemente alcalina. Aproximadamente 0,002 g de cloridrato de dopamina foi solubilizado com 2.000 µL de solução tampão TRIS mantida em pH 8,6. Para cada formulação contendo aproximadamente 0,100 g de NP que seriam funcionalizadas, foram adicionados 500 µL dessa solução. Uma pequena barra de agitação magnética foi adicionada em cada microtubo que foi mantido ao abrigo da luz. A agitação da suspensão resultante ocorreu pelo período de 4 horas sobre uma chapa de agitação. As formulações foram então centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos, sendo em seguida o sobrenadante descartado. Um segundo procedimento de incubação com solução de cloridrato de dopamina foi realizado. Para isso, foi medido aproximadamente 0,003 g de cloridrato de dopamina solubilizado com 2.000 µL de solução tampão TRIS. Em cada formulação foi adicionado 500 µL dessa solução. Novamente, barras de agitação magnéticas foram

adicionadas aos microtubos, e, ao abrigo da luz, foi realizada a agitação da suspensão pelo período de 2 horas. Após essa segunda incubação, a agitação foi suspensa e as formulações foram centrifugadas à 3.000 rpm pelo período de 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 500 µL de solução tampão PBS mantida em pH 7,4 foi adicionado ao precipitado. Após esse procedimento as formulações já funcionalizadas com DOPA foram acondicionadas em sistema de refrigeração a -20°C. (76,84,85)

As formulações submetidas a esse procedimento foram: NP.Vazia.DOPA, NP.Vazia.DOPA.PEP, NP.CHB.DOPA e NP.CHB.DOPA.PEP.

Funcionalização das NP com Ciclo-RGD: Acoplamento com EDC/NHS e Associação com DOPA

Para adicionar à superfície das partículas o peptídeo, inicialmente foi adicionado 50 µL de DMSO e 950 µL de solução tampão PBS ao frasco contendo 1,0 mg do peptídeo ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) liofilizado. Em cada microtubo contendo as formulações que seriam funcionalizadas com esse peptídeo, foram adicionados 100 µL da solução de peptídeo e uma pequena barra de agitação magnética. Ao abrigo da luz, foi realizada agitação da suspensão resultante pelo período de 1 hora sobre uma chapa de agitação. As formulações foram então centrifugadas a 3.000 rpm pelo período de 5 minutos sendo, em seguida, o sobrenadante descartado e 100 µL de solução tampão PBS adicionado a cada formulação. Ao final, as formulações foram acondicionadas a -20°C em sistema de refrigeração (69).

As formulações submetidas a esse procedimento foram: NP.Vazia.EDC/NHS.PEP, NP.CHB.EDC/NHS.PEP, NP.Vazia.DOPA.PEP, NP.CHB.DOPA.PEP.

Caracterização das NP

Foram realizadas análises espectroscópicas e calorimétricas das NP e seus constituintes, medidas de distribuições de tamanho por meio da técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS, do inglês, *Dynamic Light Scattering*), a determinação da carga superficial por meio de medidas de potencial zeta, a avaliação da quantidade de fármaco encapsulado, o estudo da cinética de liberação do fármaco, a avaliação morfológica dos sistemas realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e estudos sobre a citotoxicidade e internalização das NP nas células.

Medidas Espectroscópicas

Espectroscopia de Fluorescência

Espectros de emissão de fluorescência foram obtidos para os compostos em estudo utilizando um espectrofluorímetro modelo F-7000 da marca Hitachi®. Os registros foram realizados utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico contendo as suspensões em estudo. Os espectros foram registrados de maneira a cobrir uma faixa espectral de 200,0 a 800,0 nm, escaneamento com velocidade de 1.200,0 nm/min e janelas de emissão e excitação com 5,0 nm de

abertura(78). Os dados foram tratados com o software FL Solutions 2.1[®] e transferidos para o programa de construção de gráficos GraphPad Prism 6.01[®].

Espectroscopia FTIR

Espectros de infravermelho das diversas formulações produzidas e reagentes utilizados foram obtidos utilizando um espectrofotômetro FTIR (do inglês, *Fourier Transform Infrared*), modelo IR Prestige 21 da marca Shimadzu[®]. Para leitura foram utilizadas pastilhas de brometo de potássio com massa média de 70,0 mg preparadas com aproximadamente 2,5% de formulação, prensadas a 80,0 KN pelo período de 3,0 minutos. Para cada leitura foram obtidos 40 medidas, com resolução de 4,0 cm⁻¹ na região compreendida entre 400,0 e 4.000,0 cm⁻¹ no modo de porcentagem de transmitância (78). Os dados foram tratados com o software IR Solution 1.50[®] e transferidos para o programa de construção gráfica GraphPad Prism 6.01[®].

Espectroscopia de Absorção na Região UV-Vis

Espectros de absorção eletrônica dos sistemas em estudo foram obtidos utilizando um espectrofotômetro UV-Vis de duplo feixe, duplo monocromador e com fotomultiplicador da marca Hitachi[®], modelo U-3900H. Durante as medidas a fenda para passagem de luz foi mantida com 2,0 nm de abertura e foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Antes do início das leituras, foi obtida linha de base utilizando apenas o meio no qual as formulações estariam suspensas. Em seguida, foram realizadas as análises posicionando a cubeta

contendo a formulação solubilizada ou em suspensão aquosa no equipamento. Foram obtidas medidas de absorvância pelo modo de varredura dentro da faixa espectral de 200,0 a 800,0 nm, com velocidade de escaneamento de 600,0 nm/min (78). Os dados obtidos foram tratados com o software UV Solutions 3.0[®] e transferidos para o programa GraphPad Prism 6.01[®].

Curva de Calibração

Por meio de medidas espectrofotométricas na região UV-Vis, foi obtida uma curva de calibração para o fármaco antitumoral CHB solubilizado em meio aquoso. Para cada ponto da curva foram preparadas três soluções padrões de mesma concentração utilizadas para realizar medidas em triplicata. Nos ensaios em que foi necessário determinar a concentração do fármaco em análise, esta curva foi utilizada.

Análises Térmicas

Termogravimétrica e Diferencial Simultânea (TGA/DTA)

Para obtenção das curvas TGA/DTA as formulações foram maceradas e, então, massas entre 3,0 e 7,0 mg foram medidas e transferidas para um cadinho de platina. Os ensaios foram realizados em sistema de análise térmica diferencial e termogravimétrica da marca Shimadzu[®], modelo DTG-60A, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50,0 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 5,0^o C.min⁻¹, no intervalo de temperatura compreendido entre 30,0 e 400,0^o C. O equipamento de TGA/DTA

foi calibrado previamente, utilizando como padrão oxalato de cálcio monohidratado conforme norma ASTM 1582-93. As curvas obtidas foram tratadas usando o software TA-60WS[®] e transferidas para o programa de construção de gráficos GraphPad Prism 6.01[®].

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para obtenção da curva de DSC (do inglês, *Differential Scanning Calorimetry*), a formulação foi masserada e transferida para um cadinho de alumínio onde foi medida a massa de aproximadamente 3,0 mg. Em seguida, o material a ser analisado foi selado pelo uso de uma prensa apropriada. Os ensaios foram realizados em um aparelho da marca Shimadzu[®], modelo DSC-60A, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio de 50,0 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 5,0^o C.min⁻¹, no intervalo de temperatura compreendido entre 30,0 e 150,0^o C. O equipamento de DSC foi previamente calibrado com índio metálico (pureza acima de 99,99%, T_{fusão} = 156,4^o C). A caracterização dos eventos térmicos das formulações foram identificados nas curvas obtidas que foram tratadas utilizando o software TA-60WS[®] e transferidas para o programa GraphPad Prism 6.01[®].

Eficiência de Encapsulamento

A avaliação da eficiência de encapsulamento (%EE) visa determinar a quantidade de fármaco incorporada ao sistema de liberação após a produção das formulações. A quantidade de fármaco que havia nas NP foi determinada pelo método direto empregando medidas espectroscópicas no máximo da absorção do

fármaco, com medidas em triplicata, e aplicando os valores obtidos na Equação 1. Para cada medida, aproximadamente 10,0 mg de NP foram adicionados a um microtubo juntamente com 1,0 mL de diclorometano. Para acelerar a desestruturação das NP, cada microtubo foi colocado em um vortex e mantido sob forte agitação durante dois minutos. Após, o solvente orgânico foi completamente evaporado no interior de um dessecador a pressão reduzida durante 24 horas. Foi adicionado então 1,0 mL de solução estoque água/etanol 10:1 às formulações contendo as NP desfeitas pela adição de diclorometano ocorrendo apenas a solubilização do fármaco. Essas soluções foram analisadas no espectrofotômetro UV-Vis obtendo uma estimativa da concentração do composto e, conseqüentemente, do quanto havia sido encapsulado (78). A quantificação da eficiência de encapsulamento foi determinada utilizando a seguinte equação (Equação 1):

$$\%EE (\%)_{(DIRETO)} = \left(\frac{\text{Quantidade de Fármaco Incorporado}}{\text{Quantidade de Fármaco Inicial}} \right) \times 100\%$$

O método indireto para determinar a %EE também foi empregado como ensaio confirmatório. Para obter essa estimativa, a quantidade incorporada de fármaco foi indiretamente determinada por meio da quantificação da concentração de fármaco presente na fase aquosa formada pelos sobrenadantes das lavagens realizadas no preparo das NP. Para realizar essa medida indireta foi aplicada a Equação 2.

$$\%EE (\%)_{(INDIRETO)} = 100\% - \left(\frac{\text{Quantidade de Fármaco não Incorporado}}{\text{Quantidade de Fármaco Inicial}} \right) \times 100\%$$

A aplicação desta segunda equação forneceu valores inferiores aos obtidos com o método direto (primeira equação), mas, não muito distintos.

Perfil de Liberação

A determinação do perfil de liberação (PL) foi realizada para as formulações contendo o fármaco CHB utilizando a técnica de espectroscopia na região UV-Vis (86). Foi transferido aproximadamente 0,0010 g de NP para um microtubo e, em seguida, foi adicionado 1.000 µL de solução tampão PBS. Essa suspensão foi agitada com o emprego de um homogeneizador mecânico (T10) em seu nível de velocidade 6 (aproximadamente 30.000 rpm) pelo período de 1,0 minuto. Após esse procedimento, 100 µL dessa suspensão foram transferidos para uma cubeta de quartzo e o volume foi completado para 3,0 mL com a adição de 2.900 µL de solução tampão PBS. Por doze dias, em intervalos de tempo previamente determinados, a quantidade liberada de CHB foi determinada por meio de medidas da absorbância dessa suspensão. A equação da curva de calibração do CHB foi utilizada para se determinar a concentração do fármaco em suspensão (78). Os resultados obtidos foram apresentados na forma de porcentagem de liberação cumulativa do composto ao longo do tempo utilizando para isso a Equação 3 (77,87,88):

$$CHB \text{ Liberado (\%)} = \left(\frac{\text{Quantidade de CHB Liberado}_t}{\text{Quantidade de CHB Encapsulado}} \right) \times 100\%$$

Utilizando a Equação 3, para cada momento t (sendo feita uma medida a cada cinco minutos durante as primeiras 6 horas, posteriormente às 12 e 24 horas e,

em seguida, a cada 12 horas até o décimo segundo dia) a quantidade de fármaco liberada foi dividida pela quantidade de fármaco que havia sido determinada como incorporada pelos cálculos de %EE pelo método direto descrito anteriormente (Equação 1). Esse ensaio foi realizado apenas com as formulações preparadas com o fármaco CHB e a média de cada triplicata foi considerada para construção das curvas de quantidade de fármaco liberada em função do tempo.

Diâmetro Hidrodinâmico e Índice de Polidispersão

Para realizar a caracterização dos parâmetros de diâmetro hidrodinâmico médio, distribuição de tamanho e potencial zeta foi utilizado um equipamento de espalhamento dinâmico de luz modelo Zetasizer Nano ZS da Malvern Instruments[®]. O equipamento possui como fonte de luz um laser vermelho de 5 mW, He-Ne, com comprimento de onda de 633,0 nm. As medidas foram realizadas com o detector posicionado no ângulo fixo de 12,5° em relação ao ângulo de incidência. Para realização das medições, aproximadamente 0,001 g de NP foram ressuspensas com 1.000 µL de água ultrapura com auxílio de um homogeneizador mecânico (T10) em seu nível 6 de velocidade (~30.000 rpm) pelo período de 1,0 minuto. Desse volume, apenas 100 µL foram transferidos para uma cubeta de poliestireno com 1,0 cm de caminho óptico, juntamente com 900 µL de água ultrapura (concentração aproximada de 1,0 mg/mL de NP). Para cada formulação preparada foram realizadas três medidas de tamanho e PDI (do inglês, *PolyDispersity Index*), sendo que, para cada medida, foram executadas 30 leituras (33,36,41,78). Os dados foram coletados a 25,0° C e tratados com o programa Zetasizer 6.20[®], e quando possível, foram transferidos para o programa GraphPad Prism 6.01[®].

Potencial Zeta

Para determinar o potencial zeta das NP, 1.000 μL da suspensão coloidal preparada para medida de diâmetro hidrodinâmico e PDI, foram transferidos para uma célula eletroforética e as medidas foram realizadas utilizando o mesmo aparelho (Zetasizer Nano ZS), alterando a configuração do equipamento do modo size para o modo zeta (33,36,41,78). Como anteriormente, os dados foram coletados a 25,0° C e tratados com o programa Zetasizer 6.20[®].

Análise Morfológica das NP

Para realização das medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), aproximadamente 0,001 g de NP foi transferido para um microtubo e suspenso com 900 μL de água ultrapura com o homogeneizador mecânico (T10) em seu nível 6 de velocidade (~30.000 rpm) pelo período de 1,0 minuto. Em uma lamínula circular limpa e esterilizada foram depositados 30 μL dessa suspensão. Em seguida, esse material foi introduzido no interior de um dessecador à temperatura ambiente e pressão reduzida por 24 horas. Foi decidido por não realizar qualquer tipo de fixação química adicional nessas formulações. Após desidratação, a lâmina foi fixada com fita adesiva condutora dupla face sobre um suporte de alumínio (frequentemente denominado como *stub*). Devido à baixa condutividade elétrica das NP, uma fina camada de ouro (com aproximadamente 40 nm de espessura) foi depositada revestindo as formulações por meio de um processo de metalização em atmosfera de argônio. Esse procedimento foi realizado utilizando um equipamento da marca Balzers[®], modelo SCD-050. As formulações foram examinadas e fotografadas nos

aumentos entre 1.000 e 5.000 vezes, operando em tensão de aceleração de 5,0 kV no modo de detecção de elétrons secundários (78,80).

Avaliação Citotóxica

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados no laboratório do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília (UnB) em colaboração estabelecida com a Professora Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva. A avaliação citotóxica foi realizada com células tumorais de mama da linhagem MCF-7 e células não tumorais da linhagem NIH-3T3. Foram utilizados materiais esterilizados e os procedimentos foram executados no interior de uma câmara de fluxo laminar da marca Veco, modelos CFLV 12, cuja luz ultravioleta permaneceu ligada por, pelo menos, 20 minutos antes de iniciar os procedimentos. Todas as formulações produzidas foram avaliadas ao longo deste ensaio.

Condições de Cultura

Para esse ensaio, foram utilizadas placas de cultura de 96 poços, sendo adotada a densidade padrão de $2,5 \times 10^3$ células/mm². O volume de suspensão celular que deveria ser transferido para cada poço foi determinado inserindo a concentração de células obtido na garrafa por meio da Equação 4 (81):

$$\text{Volume de suspensão celular em mL/poço} = \frac{2,5 \times 10^4 \text{ células}}{n^{\circ} \text{ de células/mL}}$$

Após adicionar o volume de suspensão celular, as placas foram acondicionadas em estufa incubadora com 5% de CO₂ mantidas à 37° C pelo período de 24 horas. Em seguida, o meio de cultura contido nelas foi descartado e, em seu lugar, adicionado 100 µL de suspensão contendo a formulação em estudo na concentração preestabelecida, sendo assim iniciada a fase de tratamento após confirmação da adesão das células nas paredes das placas.

Foram avaliadas suspensões das diversas formulações de NP produzidas em seis concentrações diferentes (9,0, 19,0, 31,0, 63,0, 156,0 e 313,0 mg_(partículas)/L). Para cada concentração, foi realizada uma triplicata e, após o tratamento, as células foram mantidas incubadas em estufa pelo período de 24, 48 ou 72 horas.

Para preparar as formulações em suspensão, 0,200 g de NP foram ressuspensas com 2.000 µL de meio D-MEM, preparado pela equipe técnica e disponibilizado pelo laboratório, com o auxílio do homogeneizador mecânico (T10) em seu nível 6 de velocidade (~30.000 rpm) pelo período de 5 minutos.

Passado o período de incubação, foi removido cuidadosamente o meio contendo o material em estudo e adicionado em seu lugar 15 µL de solução estoque de MTT e 135 µL de meio de cultura fresco. As placas foram novamente introduzidas em estufa de CO₂ pelo período de três horas. Após esse período, foi removido o meio de cultura que continha MTT e adicionado em seu lugar 150 µL de DMSO. As placas foram então homogeneizadas com o emprego de uma micropipeta para que os cristais de formazano formados fossem completamente solubilizados. Empregando um leitor de microplacas da marca SpectraMax[®], modelo M2, foi possível realizar a identificação espectroscópica deste composto na região do comprimento de onda de 595,0 nm, e conseqüentemente, assim, realizar uma estimativa do quanto as células tratadas estariam viáveis. Para cada placa utilizada no ensaio houve um grupo controle. A viabilidade das células não tratadas e

mantidas sob as mesmas condições das tratadas foi considerada como máxima (100,0%). A porcentagem de células viáveis que haviam sido submetidas a algum dos tratamentos foi determinada de acordo com a Equação 5:

$$\text{Células viáveis (\%)} = \left(\frac{\text{Absorbância para grupo tratado}}{\text{Absorbâncias para grupo controle}} \right) \times 100\%$$

Após experimento, as células desprezadas e todo material utilizado durante o ensaio foram lavados com solução aquosa de hipoclorito de sódio 5%_(cloro ativo) e detergente (disponibilizados pelo laboratório) sendo posteriormente descartados após 24 horas.

Avaliação da Ação Superficial das NP sobre as Células (*Uptake*)

Semelhante ao que foi realizado ao longo do ensaio de viabilidade, para o ensaio de *Uptake* foram utilizadas placas de cultura, agora com 12 poços, sendo adotada a concentração padrão de $1,0 \times 10^5$ células/poço. O volume de suspensão celular que deveria ser transferido para cada poço foi determinado inserindo o dado da concentração obtido com o uso da Equação 6 (81):

$$\text{Volume de suspensão celular em mL/poço} = \frac{1,0 \times 10^5 \text{ células}}{n^{\circ} \text{ de células/mL}}$$

Antes de adicionar as células às placas, lamínulas circulares de vidro com diâmetro de 10,0 mm previamente limpas e esterilizadas foram adicionadas em cada poço sendo, em seguida, adicionada a suspensão celular. Na sequência, as placas

foram acondicionadas em estufa pelo período de 24 horas sendo após o meio de cultura contido nelas descartado e, em seu lugar, adicionado 1.000 µL de meio fresco contendo a formulação em estudo suspensa na concentração preestabelecida, sendo iniciado neste momento a fase de tratamento.

Foram avaliadas suspensões contendo as diversas formulações de NP produzidas em duas concentrações (63,0 e 31,0 mg_(partículas)/L). Para cada concentração, foi realizado uma duplicata e, durante o tratamento as células, foram mantidas incubadas em estufa pelo período de 24, 48 ou 72 horas.

Para preparar cada formulação, 0,100 g de NP foi ressuspensa com 1.000 µL de meio D-MEM disponível no laboratório com o auxílio do homogeneizador mecânico (T10) em seu nível 6 de velocidade (~ 30.000 rpm) pelo período de 5,0 minutos.

Passado o período de tratamento, as placas foram retiradas da estufa, o meio removido cuidadosamente com o auxílio de um pipeta de Pasteur e descartado em solução aquosa de hipoclorito de sódio 5%_(cloro ativo). Cada poço foi lavado duas vezes com água ultrapura e, em seguida, foi realizada a fixação química das células e demais materiais contidos na superfície da lamínula com a adição de 1.000 µL/poço de solução aquosa de glutaraldeído a 2,5%_(m/v). As placas foram então acondicionadas por 24 horas em refrigerador a -20°C (89).

Após esse período, a solução de fixação era descartada, as lamínulas retiradas dos poços e, após estarem secas, eram cuidadosamente fixadas com fita adesiva dupla face condutora sobre um suporte de alumínio (*stub*) sem que fossem realizados tratamentos extra de desidratação celular, como o uso de um equipamento de ponto crítico. Uma fina camada de ouro era então depositada revestindo as formulações por meio de um processo de metalização em atmosfera de argônio. Esse procedimento foi realizado utilizando um equipamento da marca

Balzers[®], modelo SCD-050. As formulações foram examinadas e fotografadas no aumento de 5.000 vezes, operado em tensão de aceleração de 5,0 kV no modo de detecção de elétrons secundários (89).

Análises Estatísticas e Gráficas

Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados numéricos apresentados como uma média \pm desvio padrão (SD, do inglês, *Standard Deviation*). As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism[®], versão 6.01. A diferença estatística entre grupos foi determinada pela ANOVA e pelo teste *t* de *Student*, teste de Tukey, sendo considerado estatisticamente significativo $P < 0,0010$. Para auxílio da construção dos gráficos também foi empregado o software Excel[®], versão 2010.

Referências Bibliográficas

As referências apresentadas neste trabalho foram geradas empregando o programa Mendeley Desktop[®], versão 1.17.9 da Glyph & Cog[®], obtido gratuitamente pelo site <https://www.mendeley.com/>.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção das Formulações

Pelo método de simples emulsificação e evaporação do solvente, foi possível produzir formulações de partículas de PLGA contendo ou não o fármaco CHB. Esse método foi escolhido devido à sua grande versatilidade, ampla gama de aplicações, facilidade de transposição para escala industrial e possibilidade de ajuste de parâmetros, como tamanho e carga da partícula, por meio de mudanças simples das condições de realização do processo (77,78).

Incubações breves ocorreram a fim de realizar a funcionalização primária da superfície dessas NP mediante ligação direta, mantendo-as em solução aquosa levemente ácida contendo EDC e NHS, ou por meio de ligação indireta (associação), mantendo-as em solução levemente alcalina contendo cloreto de dopamina. A polimerização superficial da dopamina e a conjugação formando ligações carbodiimidadas (PLGA-EDC/NHS) ocorreram por meio de procedimentos simples, que modificaram a superfície das NP preparando-as para posterior funcionalização secundária com o ligante direcionador (82).

A segunda funcionalização também ocorreu mediante a incubação das formulações. Em procedimento tão simples quanto aos promovidos para funcionalização primária, as partículas foram mantidas sob agitação e ao abrigo da luz em solução aquosa contendo o peptídeo ciclo-RGD solubilizado.

As formulações obtidas foram armazenadas em refrigeração para evitar que houvesse a hidrólise do fármaco e a degradação prematura dos demais constituintes das partículas.

Em seguida, as formulações produzidas foram analisadas utilizando as técnicas mencionadas no capítulo “Materiais e Métodos” e os resultados obtidos serão apresentados e discutidos a seguir.

Análises Espectroscópicas

Ultravioleta-Visível

Os espectros na região UV-Vis das formulações preparadas com CHB estão apresentados na Figura 8, e os espectros das formulações preparadas sem o fármaco na Figura 7.

Ocorreu um elevado espalhamento de luz em todas as preparações. Tal comportamento é característico desses sistemas e foi descrito na literatura por Gomes et al. utilizando sistemas de liberação semelhantes aos produzidos neste trabalho (78).

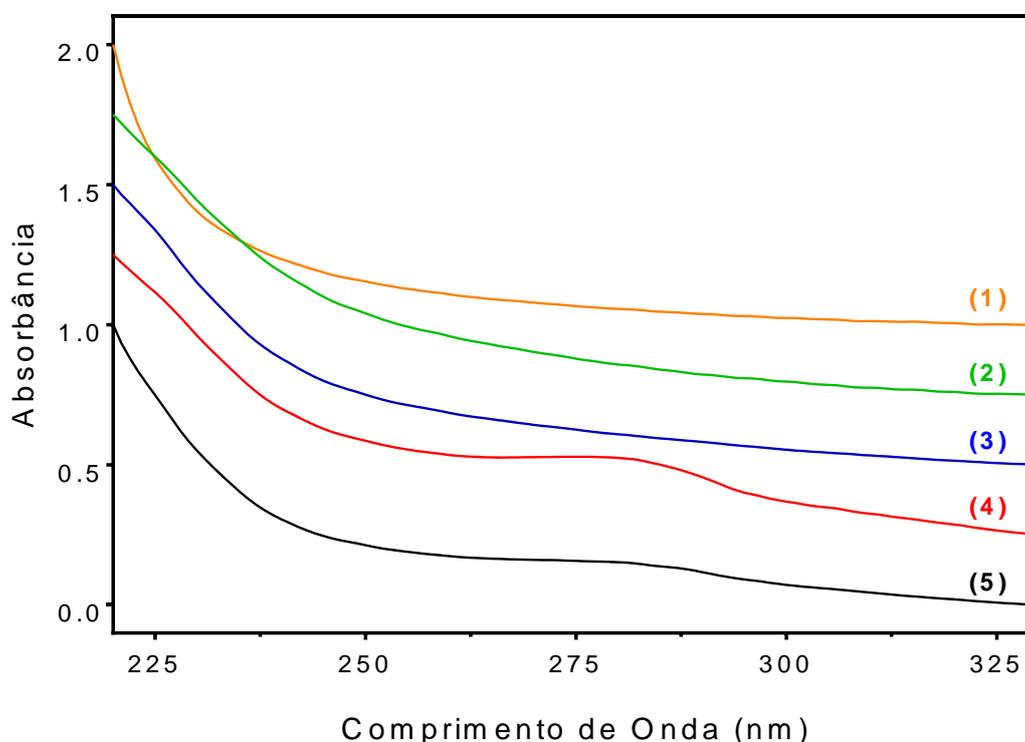


Figura 7: Espectros de absorção na região UV-Vis das NP sem CHB. Na sequência: (1) NP.Vazia, (2) NP.Vazia.EDC/NHS, (3) NP.Vazia.EDC/NHS.PEP, (4) NP.Vazia.DOPA e (5) NP.Vazia.DOPA.PEP.

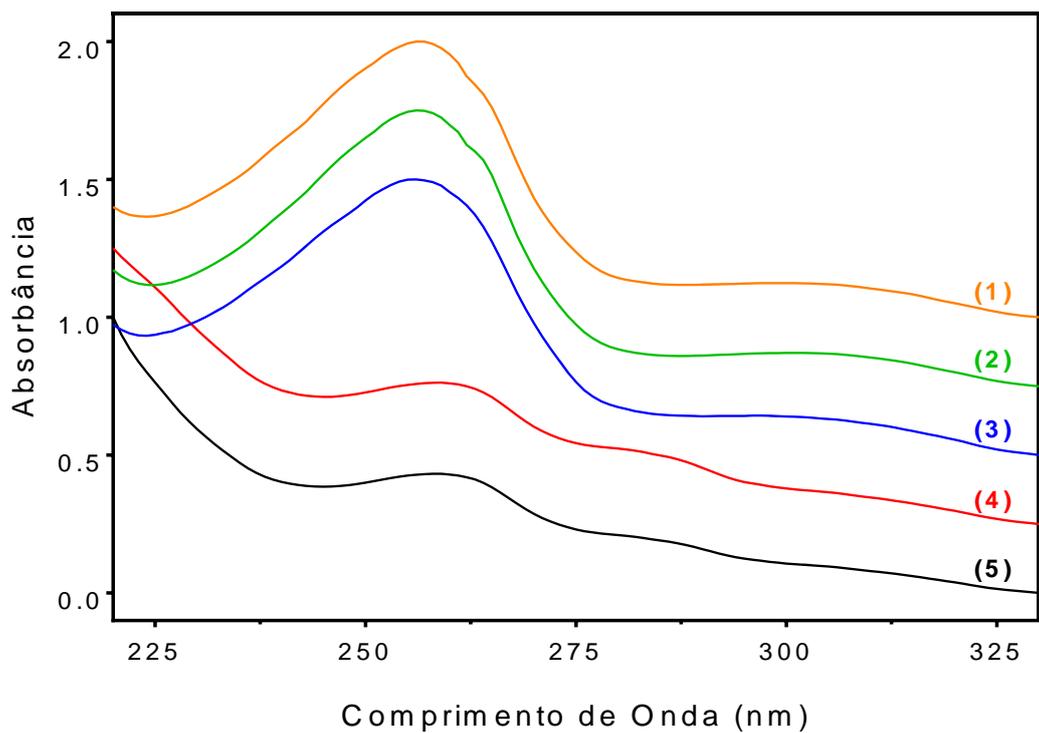


Figura 8: Espectros de absorção na região UV-Vis das NP com CHB. Na sequência: (1) NP.CHB, (2) NP.CHB.EDC/NHS, (3) NP.CHB.EDC/NHS.PEP, (4) NP.CHB.DOPA e (5) NP.CHB.DOPA.PEP.

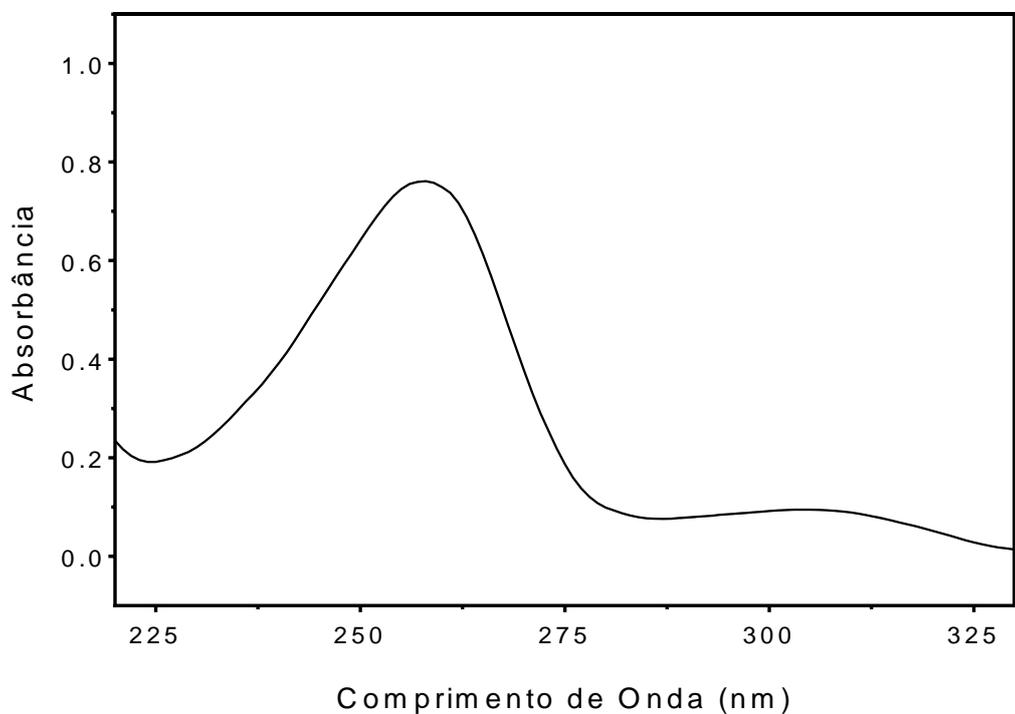


Figura 9: Espectro de absorção na região UV-Vis do fármaco CHB livre, em solução água/etanol 9:1, na concentração de 10,0 mg/L.

Tabela 2: Comprimentos de máxima absorvância e intensidades observados nos espectros das formulações contendo CHB em suspensão e do CHB livre em solução aquosa.

Formulação	Máximo de Absorvância	Intensidade
NP.CHB	260,0 nm	0,6003
NP.CHB.EDC/NHS	260,0 nm	0,7757
NP.CHB.EDC/NHS.PEP	262,0 nm	0,6375
NP.CHB.DOPA	263,0 nm	0,4190
NP.CHB.DOPA.PEP	263,0 nm	0,3797
CHB livre	258,0 nm	0,7616

Nas formulações contendo CHB, foi identificado um pico de absorção intenso que permaneceu entre 260,0 e 263,0 nm nas diversas formulações como descrito nos dados da Tabela 2. Este sinal espectral é atribuído às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ características do CHB que apresenta em sua fórmula estrutural um anel aromático ligado a uma amina terciária e cadeia contendo carbonila de ácido carboxílico.

Com pequeno deslocamento, esse pico também foi observado na Figura 9, em 258,0 nm, que contém o espectro do fármaco livre. Esse deslocamento batocrômico do pico espectral observado para as formulações contendo CHB em relação ao fármaco livre pode ser associado ao meio diferente em que as medidas foram realizadas (solução tampão PBS e solução água/etanol 9:1, respectivamente).

A observação da Figura 8 demonstra que houve a manutenção da integridade química do fármaco encapsulado e provável %EE elevada, pois, os picos apresentaram alta intensidade. Desta forma, pode-se constatar que a estrutura do CHB não foi alterada ao longo do processo de encapsulamento e funcionalização, durante armazenamento e liberação (demonstrado mais a frente).

Essas medidas também evidenciam que as NP produzidas são estáveis, não propícias à agregação e que durante preparação as formulações retiveram o fármaco na superfície da matriz polimérica (90–92).

Foi observado nos espectros das formulações NP.CHB.DOPA e NP.CHB.DOPA.PEP uma considerável redução da intensidade do pico do fármaco (de aproximadamente 0,7 para 0,4). Essa redução é consequência da funcionalização superficial das NP com DOPA, que é um composto que apresenta absorção em região próxima da região de absorção do fármaco CHB.

Absorbância em 280,0 nm também foi observada nos espectros das formulações NP.Vazia.DOPA e NP.Vazia.DOPA.PEP, confirmando assim que essas formulações absorvem devido à presença da dopamina polimerizada em suas superfícies, ratificando o sucesso do procedimento de funcionalização. Por meio de medidas espectroscópicas na região UV-Vis, Shin et al. também observaram um pico de absorção em 280,0 nm para NP incorporadas com DOPA (93).

Infravermelho com Transformada de Fourier

Espectros de FTIR foram utilizados para avaliar a estrutura química do CHB, do PLGA e demais constituintes aprisionados nas formulações produzidas. Desta forma, pretendia-se obter informações sobre possíveis alterações estruturais e interações após os processos de produção das partículas (78).

Foram obtidos espectros de FTIR das formulações de NP vazias (Figura 10), contendo CHB encapsulado (Figura 11) e dos reagentes utilizados no preparo das formulações (Figura 12). Na Figura 13, estão apresentados apenas os espectros do composto antitumoral, das NP vazias e das NP contendo apenas CHB.

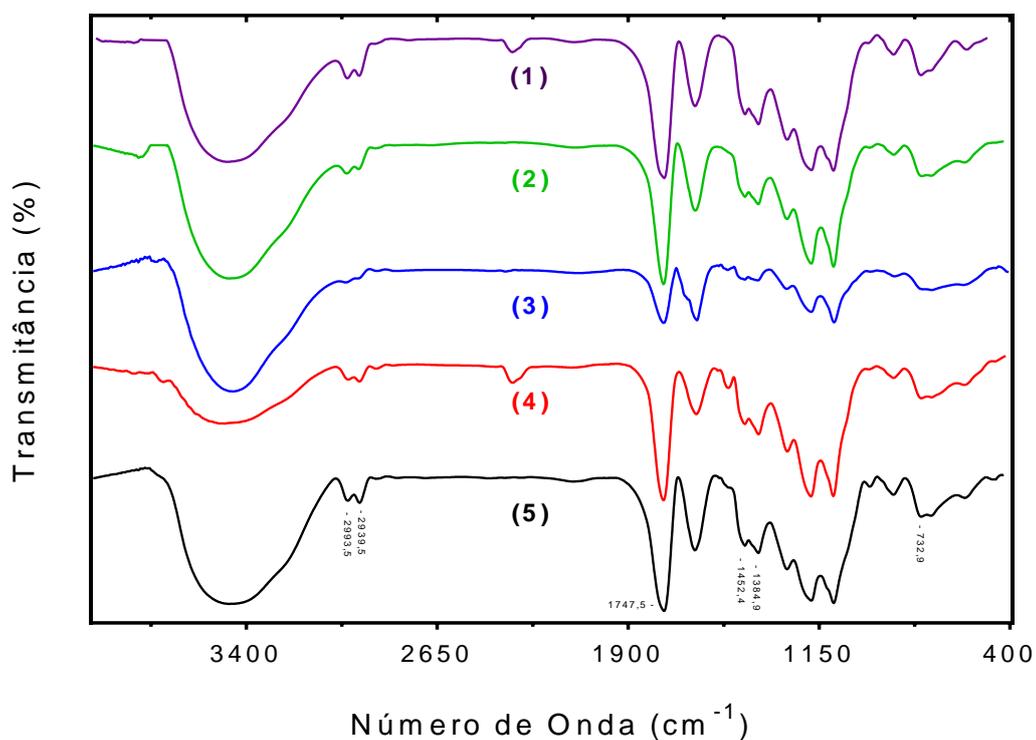


Figura 10: Espectros FTIR das NP sem CHB. Na sequência: (1) NP.Vazia, (2) NP.Vazia.EDC/NHS, (3) NP.Vazia.EDC/NHS.PEP, (4) NP.Vazia.DOPA e (5) NP.Vazia.DOPA.PEP. Foram preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70,0 mg sendo 2,5% de formulação.

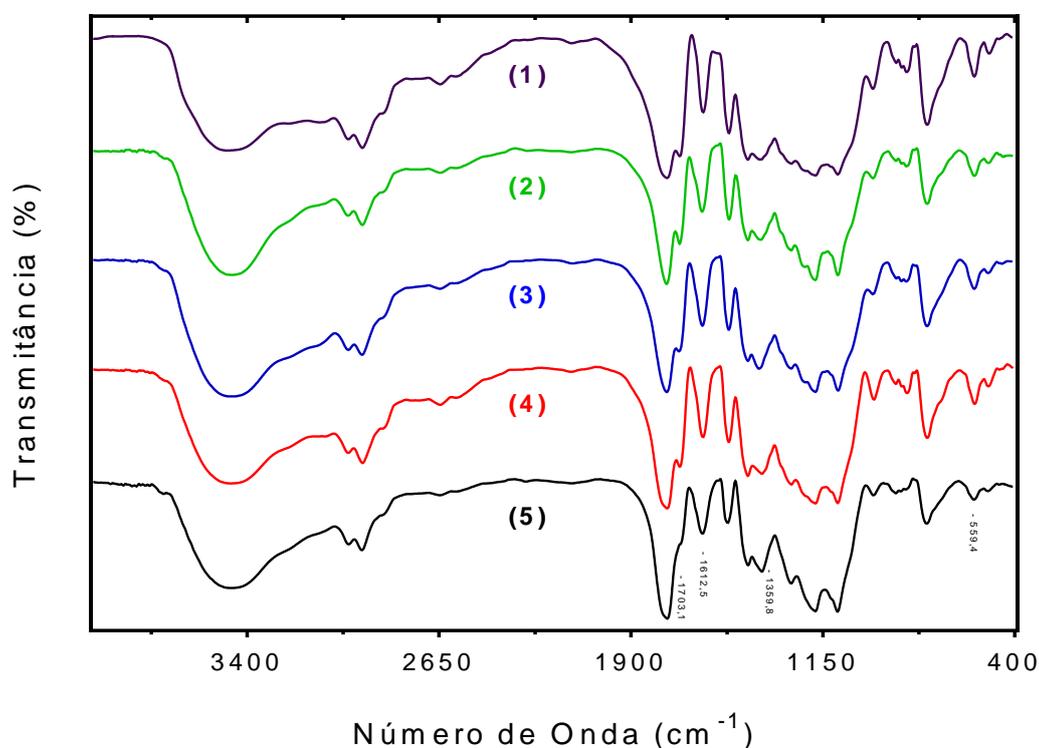


Figura 11: Espectros FTIR das NP com CHB. Na sequência: (1) NP.CHB, (2) NP.CHB.EDC/NHS, (3) NP.CHB.EDC/NHS.PEP, (4) NP.CHB.DOPA e (5) NP.CHB.DOPA.PEP. Foram preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70,0 mg sendo 2,5% de formulação.

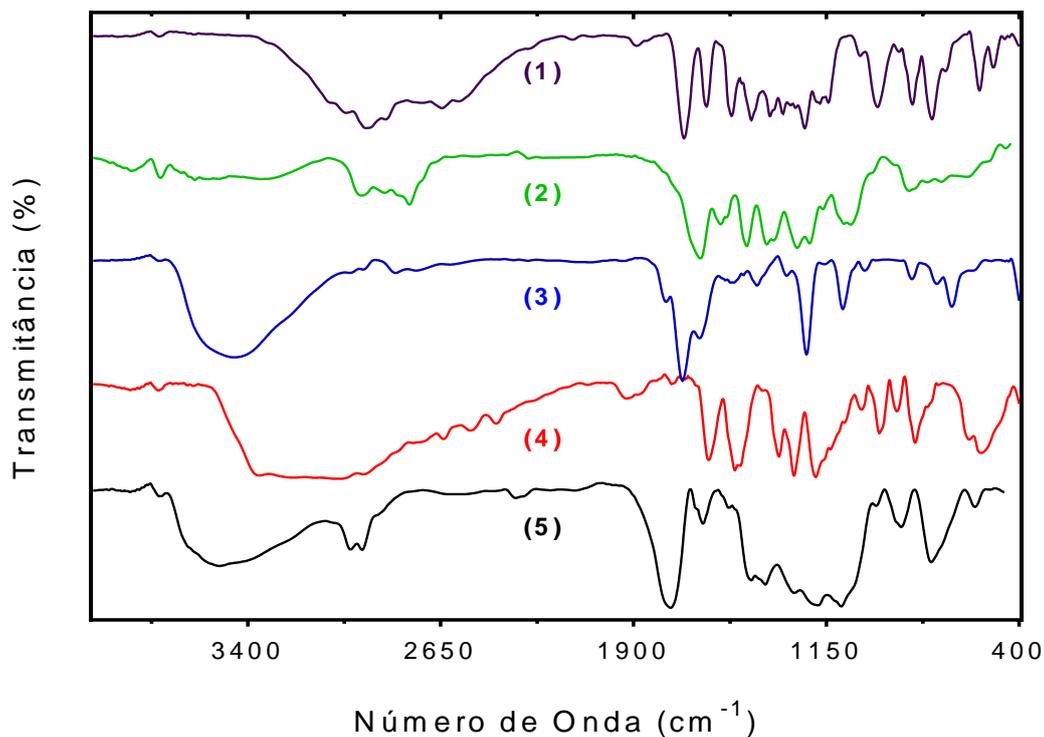


Figura 12: Espectros FTIR dos reagentes utilizados no preparo das formulações. Na sequência: (1) CHB, (2) EDC, (3) NHS, (4) cloridrato de dopamina e (5) PLGA. Foram preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70,0 mg e 2,5% de formulação.

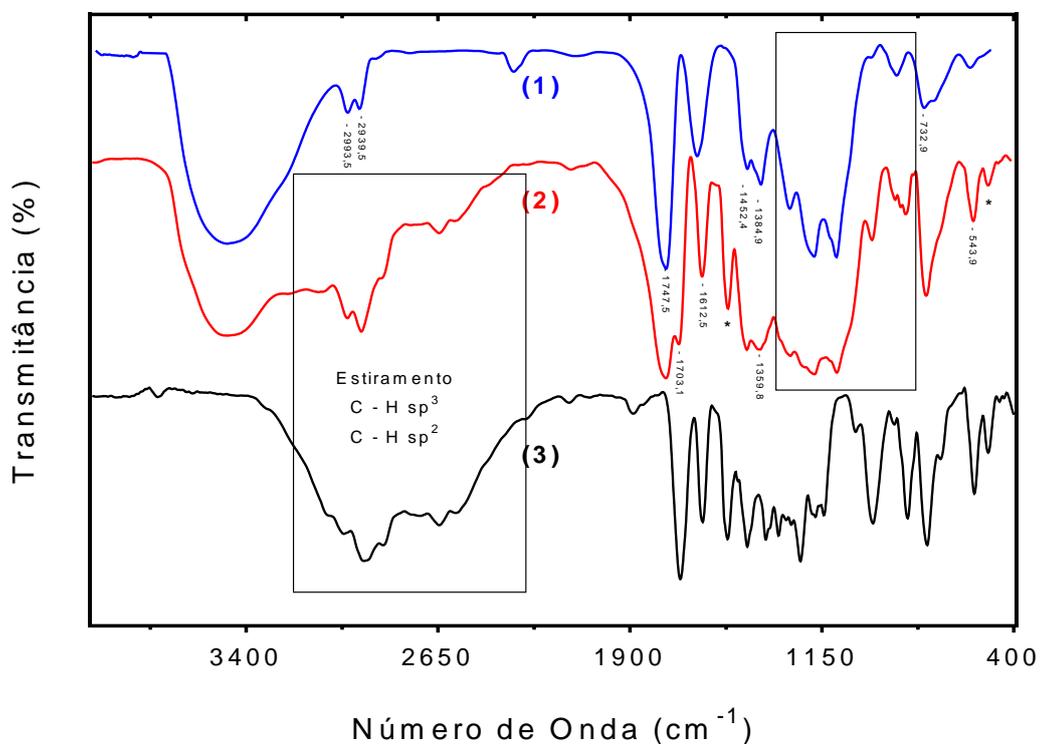


Figura 13: Comparação entre os espectros FTIR da (1) NP.vazia, (2) NP.CHB e (3) CHB livre.

Durante a preparação das formulações os picos característicos do PLGA não sofreram alteração significativa (78). As formulações produzidas apresentaram as seguintes bandas de absorção associadas ao PLGA: entre 2.993,5 – 2.939,5 cm^{-1} (CH_2 , CH_3), 1.747,5 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$, característico do grupo éster), 1.452,4 – 1.384,9 cm^{-1} (CH_3) e 732,9 cm^{-1} (CH) (identificadas nas Figuras 10 e 13) (59).

A presença do fármaco encapsulado à matriz polimérica das nanoestruturas pode ser confirmada pela presença de três bandas características do CHB livre no espectro das NP contendo o fármaco. Essas bandas foram associadas às vibrações de deformação axial da molécula do CHB que ocorrem em 1.703,1 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), 1.612,5 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$), 1.359,8 cm^{-1} ($\text{C}-\text{N}$) e 528,0 cm^{-1} ($\text{C}-\text{Cl}$) (identificadas nas Figuras 11 e 13) (42,94–96).

A frequência de estiramento da ligação dupla de uma carbonila ($\text{C}=\text{O}$) resulta em uma banda forte observada entre 1.850,0 – 1.630,0 cm^{-1} (97,98). A localização dessa banda depende da origem em cetona, aldeído, ácido carboxílico ou outra função orgânica carbonilada. A banda de estiramento axial da carbonila para ácido carboxílico alifático saturado aparece próxima de 1.760,0 cm^{-1} . Foi possível observar a presença de duas carbonilas nas NP de PLGA contendo CHB. Isso ocorreu devido em cada formulação estar presente uma carbonila de ácido carboxílico da molécula do CHB e uma de éster do copolímero. Cada carbonila apresentou esse deslocamento devido possuírem diferentes valores energéticos para ocorrência do seu movimento molecular.

Hidroxilas são fáceis de serem reconhecidas em espectros FTIR, pois, apresentam vibrações de estiramento axial da ligação $\text{O}-\text{H}$ de álcoois, fenóis e ácidos carboxílicos na região entre 1.260,0 – 1.000,0 cm^{-1} e a vibração angular no plano da ligação $\text{O}-\text{H}$ aparece na região entre 1.420,0 – 1.330,0 cm^{-1} . Uma larga e intensa banda associada ao estiramento de hidroxilas do PVA, PLGA e CHB pode

ser confirmada entre 3.700,0 – 3.000,0 cm^{-1} para todas as formulações (78). Essas interações fornecem informações sobre o possível estabelecimento de ligações de hidrogênio.

As vibrações de estiramento C–O–H e C–N–H que poderiam ser observadas na região entre 3.600,0 – 3.000,0 cm^{-1} para estiramentos do catecol da DOPA não foram evidentes nas análises das partículas funcionalizadas indiretamente com este composto devido aparecem superpostas com a banda da hidroxila mencionada anteriormente (93,96).

Quando comparados os espectros das formulações NP.Vazia e NP.Vazia.DOPA, foi verificada a diminuição nas intensidades das bandas sem que houvesse outras alterações significativas. Resultado semelhante foi encontrado por Chen et al. que associaram esse comportamento a uma alteração na conformação da cadeia após funcionalização com o agente de associação indireta DOPA (57). A necessidade de mais energia para ocorrência das vibrações é indicativo de que ocorreu o enrijecimento do movimento. Fato este associado às interações mais fortes que surgem entre os segmentos C–O–C que restringem o movimento da matriz polimérica (57).

Ao comparar as formulações produzidas com os reagentes utilizados para formulação, foi observado que há uma similaridade entre estes na região considerada como impressão digital (entre 1.400,0 – 900,0 cm^{-1}). Desta forma, pode-se constatar que durante os processos de produção realizados não houve alteração considerável das estruturas das substâncias utilizadas para obtenção das formulações (96,99).

Esses resultados também sugerem que o CHB foi aprisionado com sucesso nas formulações produzidas e que os procedimentos de funcionalização superficial ocorreram como esperado.

Espectroscopia de Emissão

Espectros de emissão na região UV-Vis das formulações preparadas com CHB foram obtidos e estão apresentados na Figura 14.

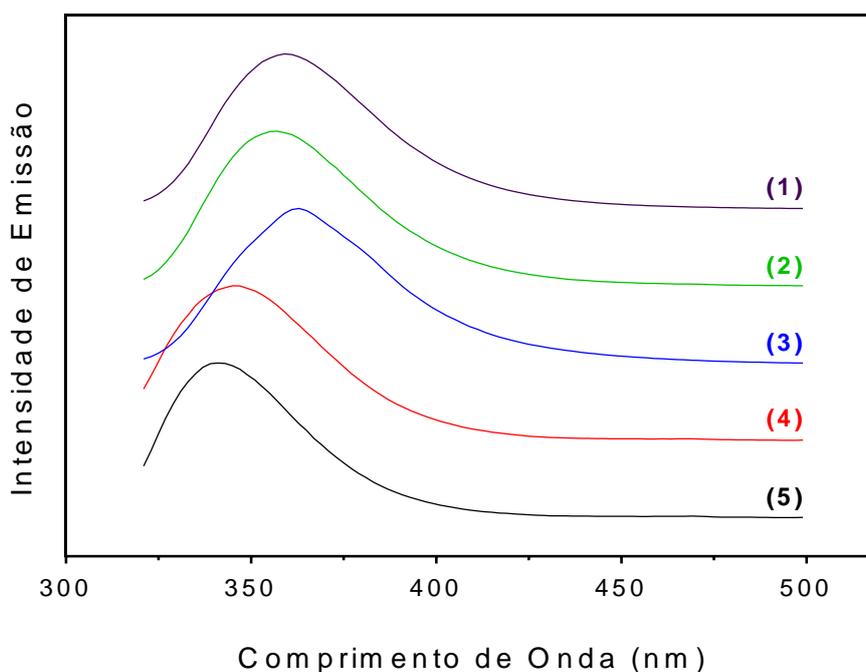


Figura 14: Espectros de emissão na região UV-Vis das NP com CHB. Na sequência: (1) NP.CHB, (2) NP.CHB.EDC/NHS, (3) NP.CHB.EDC/NHS.PEP, (4) NP.CHB.DOPA e (5) NP.CHB.DOPA.PEP. As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda entre 325,0 e 500,0 nm sendo as formulações excitadas em 258,0 nm.

Tabela 3: Comprimentos de máxima emissão e intensidades dos espectros das formulações contendo CHB.

Formulação	Máximo ($Ex_{258\text{ nm}}$)	Intensidade
NP.CHB	359 nm	$223,7 \pm 0,4$
NP.CHB.EDC/NHS	361 nm	$207,4 \pm 0,4$
NP.CHB.EDC/NHS.PEP	363 nm	$246,5 \pm 0,7$
NP.CHB.DOPA	347 nm	$189,7 \pm 1,1$
NP.CHB.DOPA.PEP	341 nm	$207,9 \pm 0,6$

A análise da Figura 14 e da Tabela 3 mostra que as NP produzidas com CHB apresentaram capacidade de emitir luz quando suspensas em meio aquoso

tamponado (PBS). As formulações formuladas sem a presença do fármaco não apresentaram o mesmo comportamento. Quando encapsulado, o fármaco estudado apresentou perfil espectral em solução tampão PBS com excitação em 258,0 nm (comprimento de máxima absorção observado para o CHB no espectro UV-vis, Figura 9) com emissão máxima próxima de 355,0 nm (78).

Foi observado um pico de emissão médio em $354,0 \pm 9,0$ nm e os espectros apresentaram um deslocamento batocrômico de até 22,0 nm entre si (90,92). Essa mudança batocrômica foi atribuída à diferença no índice de refração dos meios.

Assim como os resultados apresentados anteriormente nas análises de UV-Vis e FTIR, esses resultados também indicam que ocorreu o encapsulamento do fármaco na matriz polimérica, uma vez que o polímero quando só não emite fluorescência (92). Os processos de funcionalização superficial não alteraram significativamente o comportamento de emissão das formulações analisadas.

Eficiência de Encapsulamento

Para determinar a concentração do CHB nos ensaios de perfil de liberação (PL) e eficiência de encapsulamento (%EE), uma curva de calibração foi construída e, a partir dela, a equação obtida pela regressão linear dos pontos foi determinada para calcular a concentração do fármaco nesses ensaios. Essa curva está apresentada a seguir, na Figura 15.

Este método espectrofotométrico é extremamente simples, preciso e rápido para proceder com a estimativa da concentração de CHB nos ensaios em que esse procedimento de medição se fez necessário (100,101).

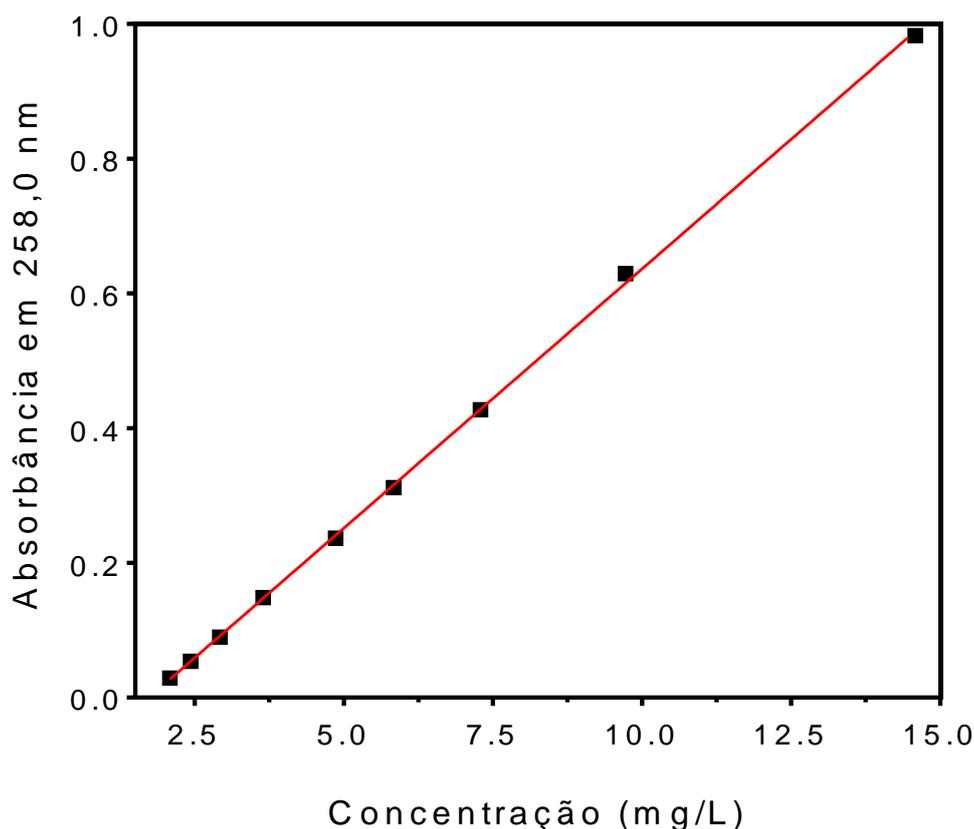


Figura 15: Curva de calibração utilizada nos ensaios em que foi necessário determinar a concentração do fármaco. Nove soluções padrões de CHB foram preparadas em concentrações que variavam entre 2,0 - 14,5 mg/L solubilizadas em água/etanol 9:1. Espectro de absorção na região UV-Vis foram obtidos em triplicata, sendo considerada a média do valor da absorbância medido no comprimento de onda de 258,0 nm para cálculo da regressão.

Foi obtida linearidade para o intervalo de concentração de 2,0 – 14,5 mg/L com coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9996. Devido o CHB ser pouco solúvel em água, inicialmente ele foi solubilizado em uma parte de álcool etílico absoluto sendo o volume posteriormente completado com nove partes de água. Foi considerado o comprimento de onda máximo de absorção de 258,0 nm (como observado na Figura 9) e por meio da curva foi obtida a Equação 7, utilizada em todos os ensaios em que foi necessário determinar a concentração do CHB (100).

$$\text{Concentração de CHB (mg/L)} = \frac{\text{Absorbância} + 0,1331}{76,9520}$$

Como visto anteriormente, para o preparo das NP foi utilizado aproximadamente 0,100 g de PLGA e 0,010 g de CHB. Para determinar a EE% nas formulações de NP foram utilizadas as Equações 1 e 2 (33,37,41,53,78,79,102). Desta forma, os valores de EE% das formulações produzidas foram determinados pelo método direto e estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de EE% do fármaco CHB determinados pelo método direto.

Formulação	Eficiência de Encapsulamento (%)
NP.CHB	88,9 ± 0,2
NP.CHB.EDC/NHS	88,6 ± 0,4
NP.CHB.EDC/NHS.PEP	87,5 ± 0,3
NP.CHB.DOPA	87,8 ± 0,3
NP.CHB.DOPA.PEP	87,2 ± 0,5

Tais valores podem ser atribuídos a hidrofobicidade do fármaco e ao fato de que sistemas de administração de fármacos à base de PLGA geralmente apresentam EE% elevada para fármacos lipossolúveis com massas moleculares reduzidas, como o CHB (53,79).

Perfil de Liberação

Os perfis de liberação *in vitro* das partículas que apresentaram tamanho na escala nano (dados que serão apresentados em breve) foram determinados pelo cálculo da porcentagem cumulativa liberada de CHB ao longo de um período predeterminado (78). A cinética de liberação foi avaliada por meio de medidas indiretas da concentração de CHB em meio tamponado (PBS) realizando medidas de espectroscopia na região UV-Vis em função do tempo durante doze dias. Nas medições foi observado que o comportamento de liberação do fármaco ocorreu mais

intensamente nas seis primeiras horas de experimento. Espectros obtidos ao longo desse período inicial são apresentados na Figura 16.

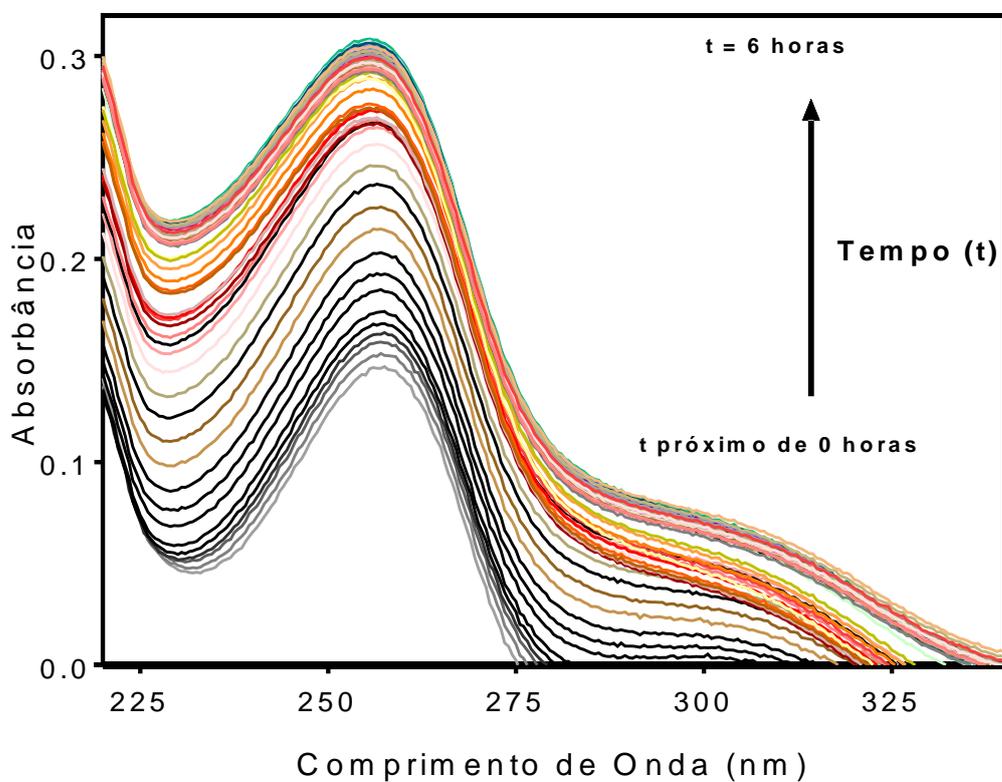


Figura 16: Espectros de absorção na região UV-Vis obtidos durante a realização do experimento de PL das NP de PLGA contendo CHB entre os primeiros minutos de preparo da suspensão e seis horas de liberação. Intervalo de 5,0 minutos entre cada medida.

Os espectros de absorbância apresentados na Figura 16 revelam que o fármaco foi liberado das NP ao longo do tempo de análise. Não houve deslocamento do pico de absorbância do CHB nas medidas espectroscópicas realizadas ao longo deste período do ensaio de PL, pois o meio não sofreu alteração significativa em sua composição (93). Isso também demonstrou a manutenção da estabilidade do CHB.

Com os valores de absorbância obtidos no comprimento de onda de máxima absorção (258,0 nm) dos espectros da Figura 16 foi plotado o gráfico da Figura 17. Este gráfico demonstra um comportamento de cinética de liberação do fármaco ao longo das seis primeiras horas de suspensão.

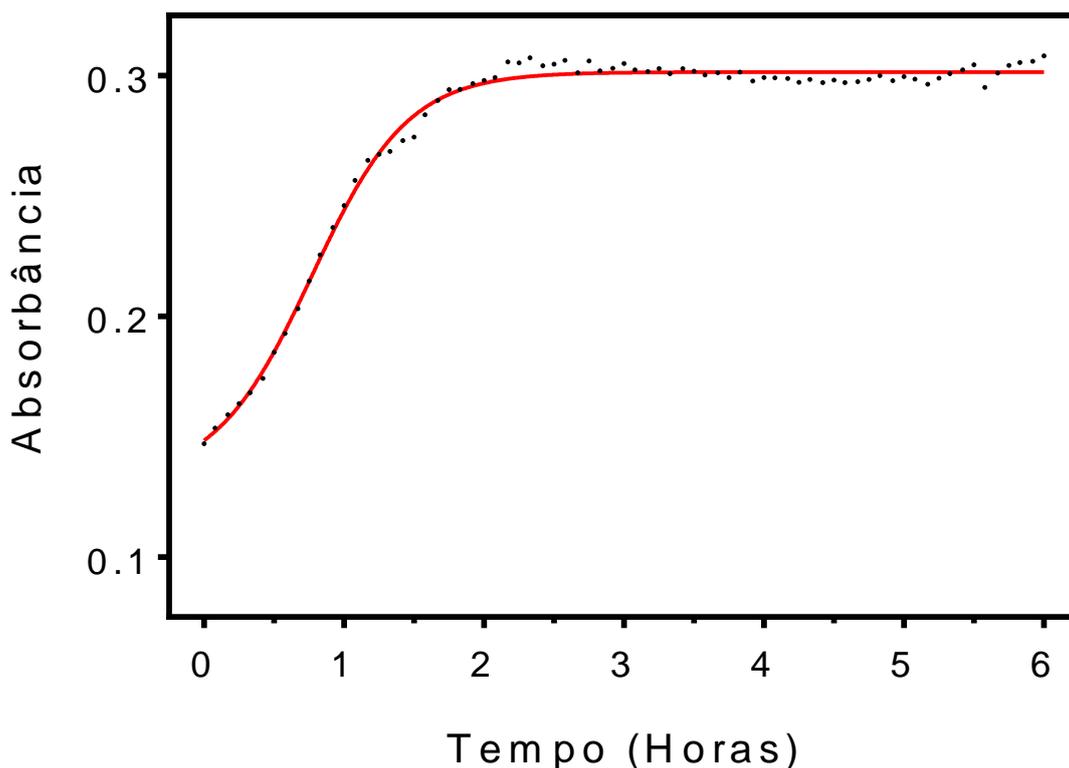


Figura 17: Medidas de absorbância ao longo do tempo para uma formulação de NP de PLGA contendo apenas CHB entre os primeiros minutos de preparo da suspensão e seis horas de liberação do fármaco. Foram realizadas 72 medidas com intervalo de 5 minutos entre cada.

A disponibilidade do CHB pode alterar sua eficácia e a quantidade associada à NP desempenha papel significativo na taxa e na duração da liberação (69). As formulações produzidas apresentaram elevado valor de EE% (88,0%, média dos valores apresentados na Tabela 4). Formulações com grande quantidade de fármaco apresentam intensa liberação de ruptura inicial devido a elevada razão fármaco/polímero (46,78,103). Pelo período de doze dias, em intervalos de tempo previamente estabelecidos, a quantidade liberada do fármaco CHB foi determinada por meio de medidas da absorbância de suspensões. A equação da curva de calibração obtida para o fármaco livre (Equação 7) foi utilizada para determinar a concentração do fármaco na solução sobrenadante. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de porcentagem de liberação cumulativa do composto ao longo do tempo utilizando para isso a Equação 3 (104).

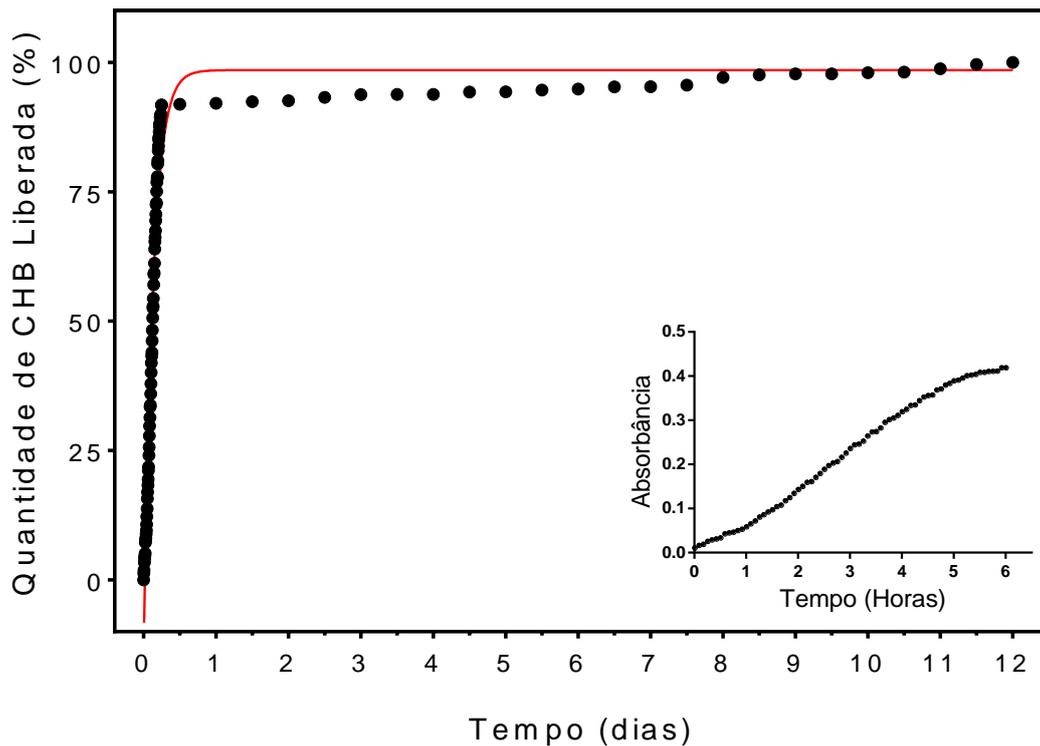


Figura 18: PL da NP.CHB no período de 12 dias. Foram realizadas 97 medidas com intervalo de 5,0 minutos nas primeiras seis horas e 12 horas até o final. Em destaque no canto direito inferior medidas de absorvância para as primeiras seis horas.

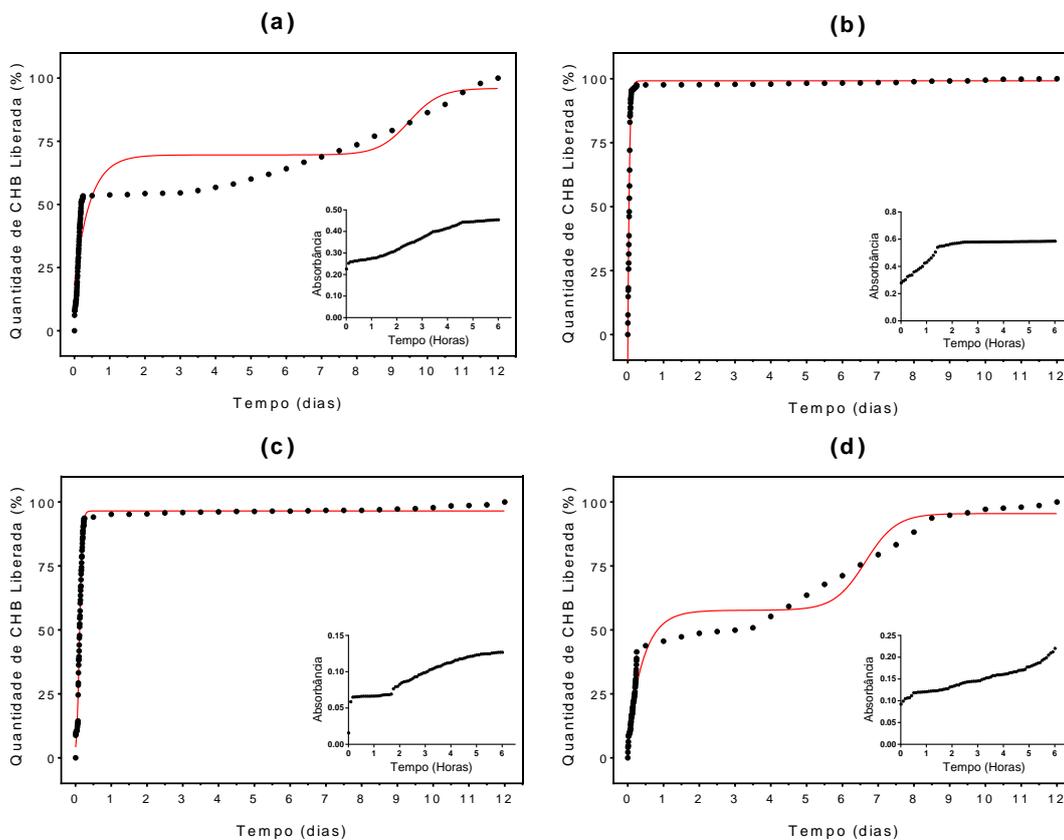


Figura 19: PL das formulações (a) NP.CHB.EDC/NHS, (b) NP.CHB.EDC/NHS.PEP, (c) NP.CHB.DOPA e (d) NP.CHB.DOPA.PEP para o período de 12 dias, com intervalo de 5,0 minutos nas primeiras seis horas e posterior de 12 horas, no total de 97 medidas. No canto direito inferior de cada gráfico, medidas de absorvância para as primeiras seis horas de experimento.

O PL do fármaco nas formulações ocorreu em duas fases, sendo uma inicial rápida e intensa seguida por outra lenta e controlada pela difusão (78). Entre o início e as seis primeiras horas de medição *in vitro* foi observada a liberação rápida do CHB localizado na superfície das partículas (adsorvido ou fracamente ligado) seguida por uma liberação lenta e sustentada do fármaco internalizado na matriz durante os dias subsequentes (Figuras 18 e 19).

Como observado nos dados da Tabela 5, as formulações NP.CHB, NP.CHB.EDC/NHS.PEP e NP.CHB.DOPA alcançaram mais de 90,0% de liberação do fármaco em 6 horas e até 99,0% com 10 dias de experimento. O comportamento de liberação observado para essas formulações é classificado como bifásico (77).

Já as formulações NP.CHB.EDC/NHS e NP.CHB.DOPA.PEP apresentaram elevada liberação nas primeiras seis horas (53,4 e 41,4%, intensidades inferiores às observadas para as formulações discutidas antes), alcançando um platô próximo de 24 horas (53,8 e 45,6%) e havendo um novo salto de liberação após 9 dias para a formulação NP.CHB.EDC/NHS (79,3%) e 7 dias para a formulação NP.CHB.DOPA.PEP (79,4%). A formulação NP.CHB.DOPA.PEP alcançou 97,2% de liberação no décimo dia de experimento e a formulação NP.CHB.EDC/NHS apenas 86,4% (69).

Tabela 5: Porcentagem de fármaco liberada em três momentos do ensaio de PL para as formulações contendo o fármaco CHB.

Formulação	6 horas (%)	1 dia (%)	10 dias (%)	12 dias (%)
NP.CHB	91,7	92,1	98,0	99,5
NP.CHB.EDC/NHS	53,4	53,8	86,4	98,9
NP.CHB.EDC/NHS.PEP	97,5	97,6	99,5	99,7
NP.CHB.DOPA	93,7	95,2	97,8	99,6
NP.CHB.DOPA.PEP	41,4	45,6	97,2	99,8

O PLGA sofre degradação por hidrólise clivando suas ligações ésteres e consequentemente liberando frações oligoméricas e unidades monoméricas para o meio. Muitas são as variáveis que influenciam esse processo sendo difícil prever um padrão para PL de diferentes formulações submetidas a diferentes condições. O principal fator responsável por essa degradação é a infiltração da água na matriz ocasionando difusão e erosão interna e superficial (46).

A presença de constituintes que possuem características hidrofóbicas na superfície das NP (como CHB e DOPA) pode dificultar processos de hidratação e consequente erosão da matriz polimérica. Além disso, a difusão superficial destes constituintes provavelmente neutralizaria o influxo da água nas NP, alterando o perfil de liberação das formulações (76). Partículas com tamanhos menores normalmente apresentam uma liberação inicial mais intensa e uma liberação mais rápida devido à sua maior área de superfície (78).

Sistemas de administração de fármacos baseados em PLGA descrevem um padrão bifásico semelhante, como observado para as formulações NP.CHB, NP.CHB.EDC/NHS.PEP e NP.CHB.DOPA. Curvas bifásicas de liberação de fármaco exibem o seguinte padrão: I – ocorre uma elevada liberação inicial do fármaco da superfície e II – o fármaco é liberado progressivamente como resultado da biodegradação da matriz de PLGA. A primeira fase está relacionada com a hidrofobicidade e concentração do fármaco presente na região superficial da partícula. Quando em contato com o meio, o fármaco é liberado de acordo com sua solubilidade e porosidade da nanoestrutura que pode ou não permitir a permeação do solvente. A cisão da matriz polimérica não tem papel importante na primeira fase da liberação. Já a segunda fase está associada diretamente com a permeabilidade da água na matriz e consequente hidrólise do copolímero. Desta forma, o fármaco é liberado por difusão e pelas passagens que surgem com a erosão da matriz.

Os processos de desorção superficial, difusão e dissolução seguidos pela liberação sustentada e prolongada (consequência da degradação e erosão da matriz de PLGA) também podem ser constatados na observação dos gráficos de PL das formulações NP.CHB.EDC/NHS e NP.CHB.DOPA.PEP. A liberação inicial intensa dessas formulações também é atribuída à difusão do CHB adsorvido na superfície das NP (na primeira fase), o padrão sustentado envolve a liberação do fármaco retido na matriz polimérica disponível devido à erosão desta (como na segunda fase) e o segundo salto intenso de liberação observado se deve ao rompimento de bolsões com elevada concentração de fármaco, formados no interior das partículas durante o processo de preparo das formulações (76).

Os resultados apresentados são semelhantes ao PL observado em outros trabalhos com fármacos hidrofóbicos de pequena estrutura molecular que apresentam liberação de 50 – 70% durante as primeiras horas de experimento (93). No trabalho de Baykara et al., que produziram micropartículas de poli- ϵ -caprolactona pelo método de dupla emulsão seguido pela evaporação do solvente, também foi observado intensa liberação do fármaco durante as 6 primeiras horas de experimento (13).

Diâmetro Hidrodinâmico

Inicialmente, a distribuição de tamanho foi avaliada por meio da técnica de dispersão (ou espalhamento) dinâmico da luz. As médias de diâmetro hidrodinâmico e PDI das três medidas obtidas para cada formulação, por meio da técnica de DLS, estão apresentadas na Tabela 6 e na Figura 20.

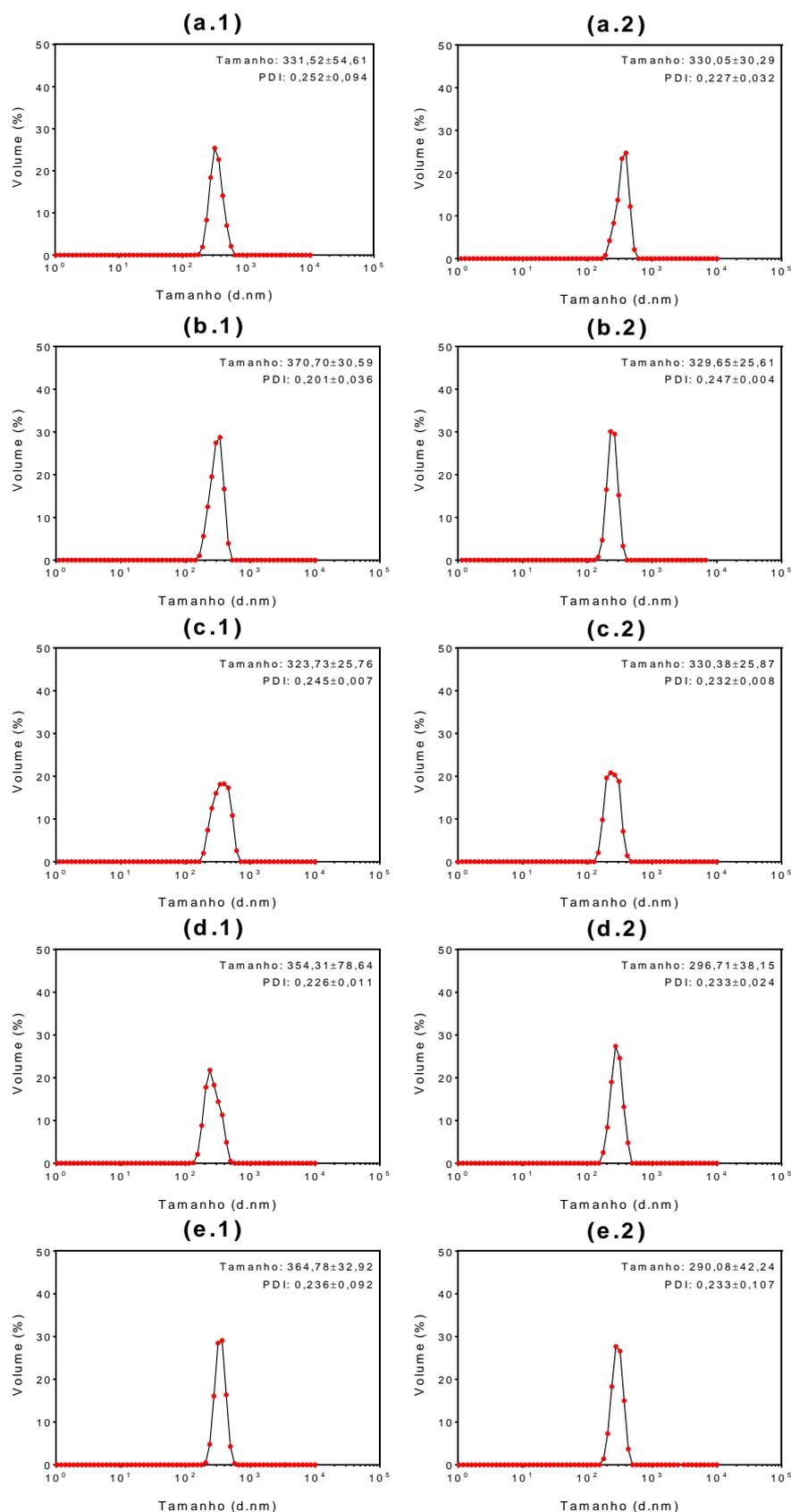


Figura 20: Diâmetro hidrodinâmico em função do volume e PDI das formulações: (a.1) NP.Vazia, (b.1) NP.Vazia.EDC/NHS, (c.1) NP.Vazia.EDC/NHS.PEP, (d.1) NP.Vazia.DOPA (e.1) NP.Vazia.DOPA.PEP, (a.2) NP.CHB, (b.2) NP.CHB.EDC/NHS, (c.2) NP.CHB.EDC/NHS.PEP, (d.2) NP.CHB.DOPA (e.2) NP.CHB.DOPA.PEP. Valores obtidos em triplicata, considerado os dados obtidos com o detector posicionado no ângulo de 12,5°.

A observação da Figura 20 demonstra uma distribuição unimodal de tamanho e índice de polidispersividade que pode ser considerado como bom para todas as formulações obtidas. O tamanho das partículas de um DDS é um parâmetro muito importante que influencia diretamente os parâmetros farmacocinéticos de administração terapêutica. A irregularidade desses parâmetros pode afetar a farmacocinética, circulação e distribuição e, também, a eficiência terapêutica do DDS.

Os dados da Tabela 6 mostram que o diâmetro hidrodinâmico médio de todas as partículas correspondeu a $332,2 \pm 26,1$ nm, o que demonstra que o tamanho das formulações produzidas está dentro da escala nanométrica. Esses resultados demonstram também que as partículas coloidais produzidas (< 400 nm) poderiam ser administradas por meio da via intravenosa e não seriam rapidamente absorvidas pelo RES. Desta forma, poderiam alcançar e permanecer significativamente no tumor, devido ao aumento da permeabilidade na vasculatura tumoral (4).

Tabela 6: Medidas de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão das formulações produzidas.

Formulação	Size	Pdl
NP.Vazia	$331,5 \pm 54,6$	$0,252 \pm 0,094$
NP.Vazia.EDC/NHS	$370,7 \pm 30,6$	$0,201 \pm 0,036$
NP.Vazia.EDC/NHS.PEP	$323,7 \pm 25,8$	$0,245 \pm 0,007$
NP.Vazia.DOPA	$354,3 \pm 78,6$	$0,226 \pm 0,011$
NP.Vazia.DOPA.PEP	$364,8 \pm 32,9$	$0,236 \pm 0,092$
NP.CHB	$330,1 \pm 30,3$	$0,227 \pm 0,032$
NP.CHB.EDC/NHS	$329,7 \pm 25,6$	$0,247 \pm 0,004$
NP.CHB.EDC/NHS.PEP	$330,4 \pm 25,9$	$0,232 \pm 0,008$
NP.CHB.DOPA	$296,7 \pm 38,2$	$0,233 \pm 0,024$
NP.CHB.DOPA.PEP	$290,1 \pm 42,2$	$0,233 \pm 0,107$

Um reduzido valor de PDI indica uma adequada homogeneidade na distribuição de tamanho (78). O PDI médio encontrado foi de $0,233 \pm 0,014$ para as

formulações, podendo ser considerado como baixo refletindo assim a uniformidade no tamanho das partículas produzidas.

Entre a produção e as diversas medidas realizadas, as formulações demonstraram ser estáveis. Alguns dias após preparação, as partículas se decantavam devido influência da gravidade. No entanto, esse processo não pode ser considerado como indicativo de instabilidade ou agregação, pois, as partículas eram facilmente dispersas mediante a realização de agitação branda (78).

A área superficial e o volume das partículas são características que se relacionam diretamente com a degradação das NP. Quanto maior for a área superficial mais rápido ocorrerá a degradação da matriz, o que torna a liberação do fármaco mais rápida nos dispositivos que possuem menor volume. O pequeno valor encontrado para volume hidrodinâmico das partículas produzidas tem importante relação com os PL apresentados anteriormente e está diretamente relacionado com a rápida liberação inicial observada e seguido por uma liberação sustentada.

Potencial Zeta

Outro parâmetro analisado foi o potencial zeta, que pode ser relacionado com a agregação das partículas em função da carga superficial (78). Valores negativos de potencial zeta podem ser atribuídos à estabilidade e à baixa tendência à agregação das partículas que se encontram em suspensão coloidal. Fato este que se deve a essa carga impedir que ocorra a coalescência das partículas mediante colisões aleatórias (33).

Três medidas de potencial zeta foram realizadas para cada uma das formulações produzidas sendo a média \pm desvio padrão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Medidas de potencial zeta das formulações produzidas.

Formulação	Potencial Zeta (mV)
NP.Vazia	-11,10 ± 1,11
NP.Vazia.EDC/NHS	-10,88 ± 0,18
NP.Vazia.EDC/NHS.PEP	-10,76 ± 0,83
NP.Vazia.DOPA	-10,75 ± 0,17
NP.Vazia.DOPA.PEP	-10,28 ± 0,20
NP.CHB	-11,17 ± 0,97
NP.CHB.EDC/NHS	-10,49 ± 1,05
NP.CHB.EDC/NHS.PEP	-10,51 ± 1,54
NP.CHB.DOPA	-11,17 ± 1,01
NP.CHB.DOPA.PEP	-10,55 ± 0,84

Neste estudo, não foi encontrada diferença significativa entre as formulações. As medidas não mostraram alterações consideráveis após a adição do fármaco à formulação (média de -10,75 mV para formulações sem CHB e -10,77 mV para formulações com CHB).

Formulações de PLGA geralmente apresentam carga superficial negativa que pode ser atribuída à presença de grupos carboxílicos terminais do polímero sobre a superfície, conforme relatado por vários autores (33,36,41,78,105).

Era esperada uma diminuição da negatividade superficial devido à interação dos grupamentos de ácidos carboxílicos do PLGA com aminas do CHB, DOPA, EDC/NHS ou mesmo do PEP, mas este efeito não foi observado (15,78).

Aparentemente seriam desnecessárias estas medidas de tamanho hidrodinâmico e potencial zeta dos sistemas produzidos, uma vez que as modificações de funcionalização das partículas ocorreram com elas já prontas e não durante o processo de emulsificação ou evaporação do solvente. Entretanto, este estudo foi realizado para avaliar se o processo de funcionalização modificaria ou não o tamanho e o potencial zeta das formulações produzidas.

Conclui-se assim que a carga inicialmente negativa das partículas de PLGA não sofreu alteração relativa após adição do fármaco e funcionalizações primárias com ligantes e secundária com o peptídeo ciclo-RGD.

Análises Térmicas

TGA/DTA e DSC

Termogramas do tipo DSC mostram como o calor (em mW) varia em função da temperatura (51,94,95,106,107). As análises de DSC das formulações produzidas sem a presença do fármaco estão apresentadas na Figura 21, e das formulações preparadas com o fármaco CHB nas formulações na Figura 22.

Foi destaque nesses termogramas a transição térmica descrita como transição vítrea (T_g , observada como uma mudança na linha de base) das formulações. O comportamento térmico das formulações foi semelhante e apresentou uma fase de T_g próxima de 34,5°C. Os valores das temperaturas de T_g para as formulações analisadas estão listados na Tabela 8.

Tabela 8: Temperaturas de T_g das formulações produzidas.

Formulação	Pico (°C)
NP.Vazia	34,3
NP.Vazia.EDC/NHS	34,4
NP.Vazia.EDC/NHS.PEP	34,4
NP.Vazia.DOPA	34,5
NP.Vazia.DOPA.PEP	34,5
NP.CHB	35,3
NP.CHB.EDC/NHS	34,6
NP.CHB.EDC/NHS.PEP	34,6
NP.CHB.DOPA	34,5
NP.CHB.DOPA.PEP	34,4

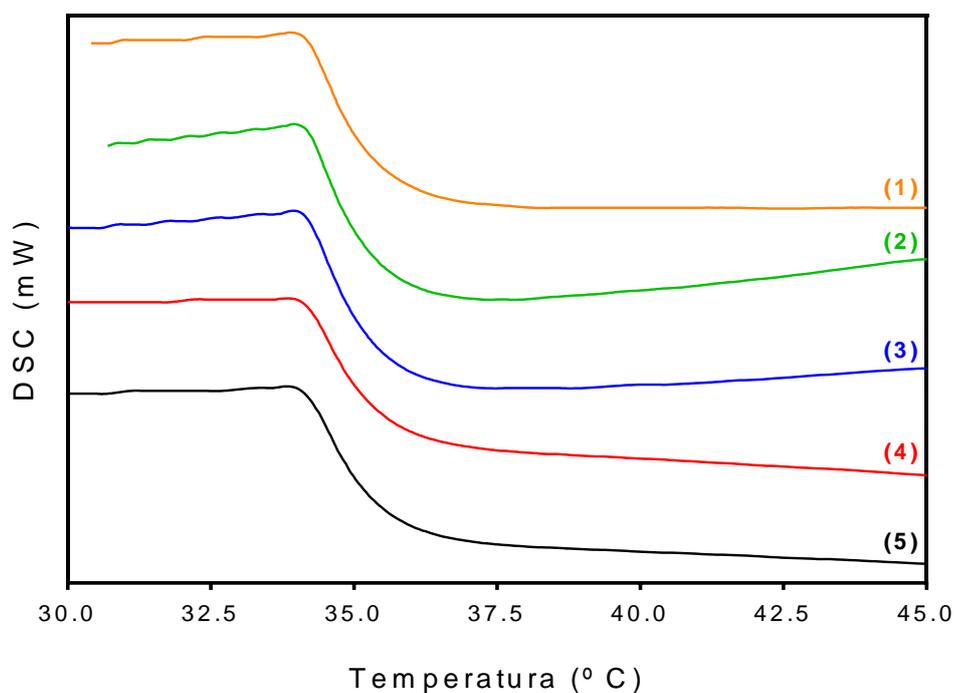


Figura 21: Termogramas das formulações de NP formuladas sem a presença do CHB. Na sequência, (1) NP.Vazia, (2) NP.Vazia.EDC/NHS, (3) NP.Vazia.EDC/NHS.PEP, (4) NP.Vazia.DOPA e (5) NP.Vazia.DOPA.PEP. Realizadas com aproximadamente 3,0 mg de formulação masserada e acondicionada em cadinho de alumínio selado, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50,0 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 5,0° C.min⁻¹, no intervalo de temperatura de 30 a 150° C.

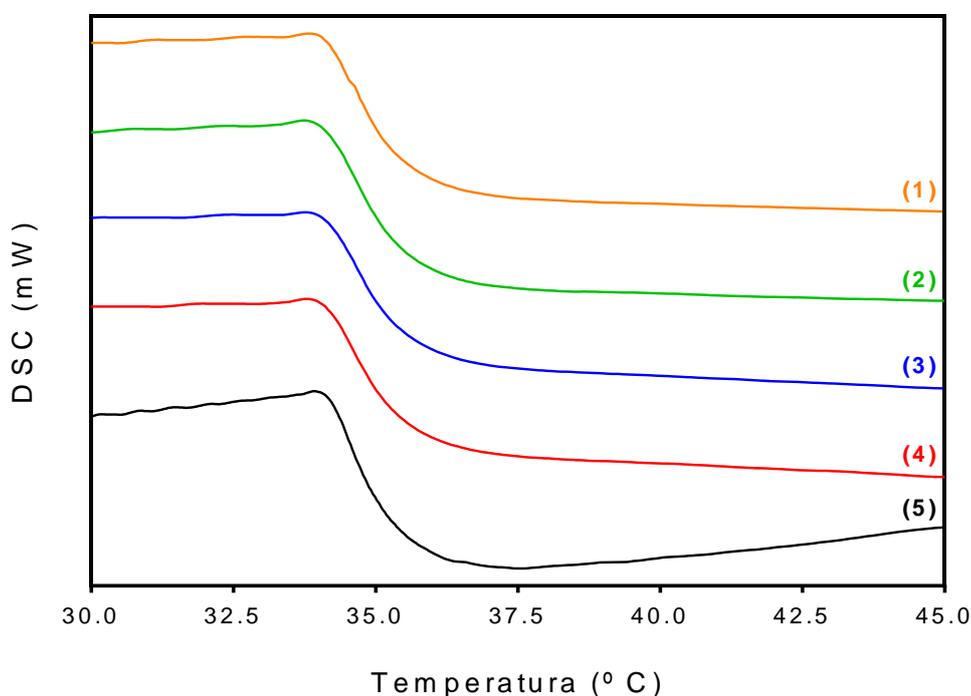


Figura 22: Termogramas das formulações de NP com CHB. Na sequência, (1) NP.CHB, (2) NP.CHB.EDC-NHS, (3) NP.CHB.EDC-NHS.PEP, (4) NP.CHB.DOPA e (5) NP.CHB.DOPA.PEP. Realizadas com aproximadamente 3,0 mg de formulação masserada e acondicionada em cadinho de alumínio selado, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50,0 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 5,0° C.min⁻¹, no intervalo de temperatura de 30 a 150° C.

O copolímero PLGA apresenta temperatura de T_g próxima da temperatura fisiológica (37,0°C) e natureza vítrea (46). A rigidez de sua estrutura diminui à medida que ocorre redução do teor de ácido láctico em sua composição ou do seu peso molecular (46).

A presença de apenas uma temperatura T_g como observado nesses termogramas é característica de materiais compostos por PLGA amorfo, podendo ser inferido que as formulações são classificadas como amorfas. Fato este que pode ser atribuído à constituição das formulações formadas em sua maior parte pelo copolímero de PLGA composto em sua estrutura por 50% de ácido glicólico (segundo vários autores, isso sempre irá acontecer quando essa porcentagem for inferior que 85%) (51,94,95,106,107).

Os valores obtidos para T_g são muito semelhantes e próximos indicando comportamento térmico parecido e, portanto, estrutura e morfologia semelhantes para as formulações. Comparando as médias das temperaturas T_g das formulações sem fármaco (34,39°C) com as temperaturas T_g das formulações com fármaco (34,66°C). pode-se inferir que não houve deslocamento significativo ocasionado pela adição do fármaco à formulação ou funcionalização das partículas. Sendo assim, não houve o aumento ou a redução da desordem estrutural dos sistemas produzidos (57).

Os valores apresentados são similares aos encontrados por Mi F. et al. que encapsularam o fármaco CHB em uma blenda de PLGA e quitina (51).

Na Figura 23, são apresentadas apenas as curvas de DTA obtidas para as formulações NP.Vazia e NP.CHB. Esses resultados corroboram com o que foi apresentado e discutido para as análises de DSC e destacam o evento térmico da temperatura de T_g destas formulações.

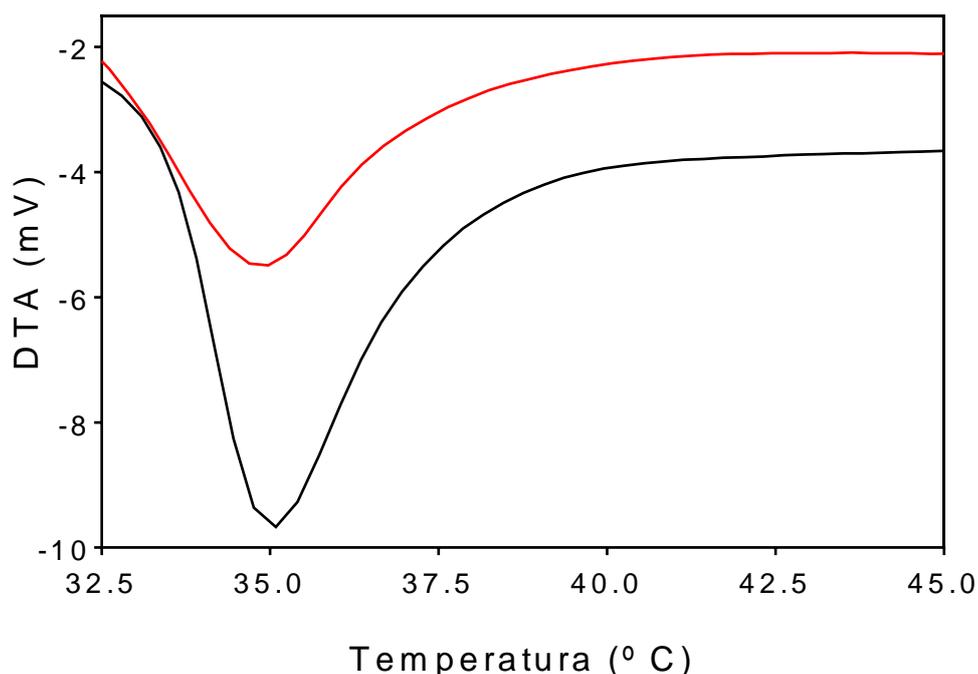


Figura 23: Termogramas DTA para NP.vazia (— preta) e NP.CHB (— vermelha). Massas de aproximadamente 5,0 mg de formulação transferidas para cadinho de platina, colocado em sistema de análise térmica diferencial e termogravimétrica sob atmosfera dinâmica de nitrogênio de 50,0 mL/min e razão de aquecimento de 5,0° C/min, no intervalo de temperatura de 30,0 a 400,0° C.

Os termogramas do tipo DTA das formulações com e sem fármaco apresentaram um pico endotérmico (relaxamento entálpico) acima de 34,0° C. Os resultados obtidos nessas medidas estão listados na Tabela 9. Os valores para T_g encontrados nos termogramas do tipo DTA estão de acordo com os dados discutidos nos termogramas do tipo DSC (46,56,58,59).

Tabela 9: Valores de temperatura e energia dos eventos observados nas curvas de DTA das formulações de NP vazias e com CHB.

Formulação	Pico (°C)	Energia
NP.Vazia	34,3	-112,73 J/g
NP.CHB	35,3	-81,05 J/g

A cristalinidade associada ao valor da T_g está diretamente relacionada com a composição do copolímero e afeta propriedades importantes com efeitos indiretos na taxa de degradação da matriz polimérica. Ikada et al. propuseram que a

cristalinidade aumenta a taxa de degradação polimérica devido à presença de ácido lático aumentar da hidrofiliabilidade da matriz (108). Em contraste, outros estudos demonstram a diminuição da taxa de degradação com o aumento da cristalinidade da formulação (46). Por fim, a degradação do PLGA depende da razão molar entre os ácidos lático e glicólico na cadeia polimérica, do peso molecular do copolímero, do grau de cristalinidade e da T_g do polímero (46). A perda de massa é identificada pela inflexão das curvas de TGA apresentadas na Figura 24.

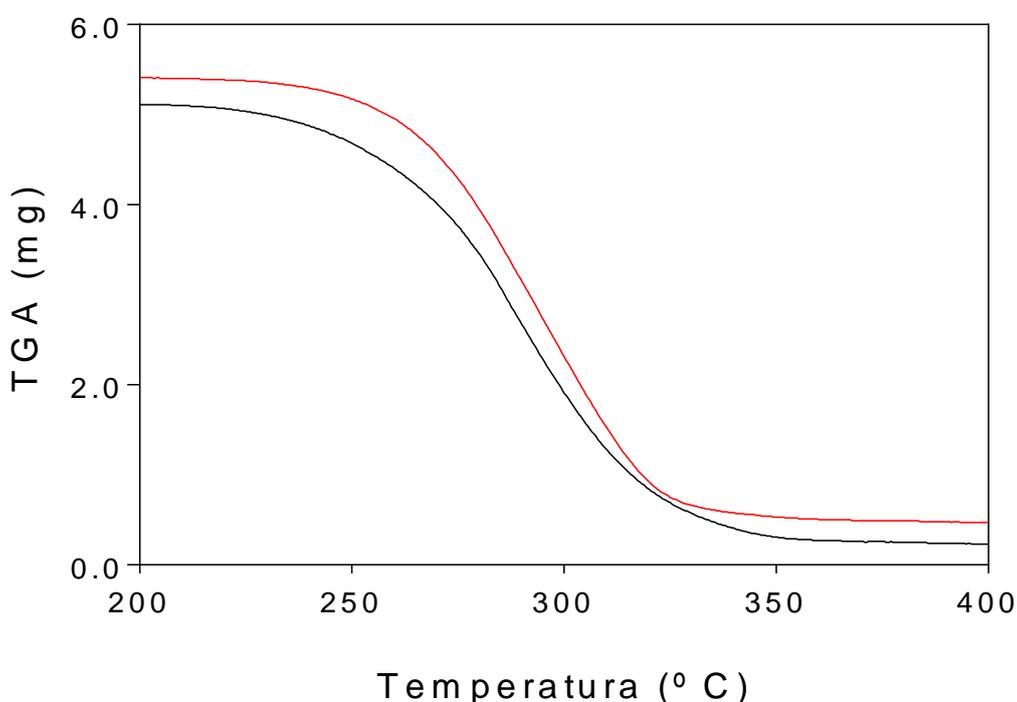


Figura 24: Análise termogravimétrica para NP.Vazia (— preta) e NP.CHB (— vermelha). Massas de 5,0 mg foram transferidas para cadinho de platina analisados sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50,0 mL/min) e razão de aquecimento de 5°C/min, no intervalo de temperatura de 30 à 400°C.

Nestas análises termogravimétricas, pôde ser observada a decomposição da matriz polimérica das formulações. Este fato ocorreu a 286,0°C para a formulação NP.Vazia e 298,0°C para a formulação NP.CHB.

Análise Morfológica das NP

Em seguida, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos utilizando a técnica de MEV empregados para avaliar a morfologia das NP de PLGA produzidas pelo método de simples emulsificação e evaporação do solvente utilizando PVA como agente estabilizante.

As Figuras 25, 26 e 27 apresentam imagens obtidas para as formulações NP.CHB, NP.CHB.EDC/NHS.PEP e NP.CHB.DOPA.PEP, respectivamente. Para realizar essas medidas, as formulações foram resuspensas em água ultra pura na concentração de $1,0 \text{ mg}_{(\text{partículas})}/\text{mL}$. Em seguida, alíquotas de $10,0 \text{ }\mu\text{L}$ foram depositadas sobre lamínulas redondas de vidro que foram colocadas em dessecador para proceder com desidratação e posterior metalização, como descrito em Materiais e Métodos.

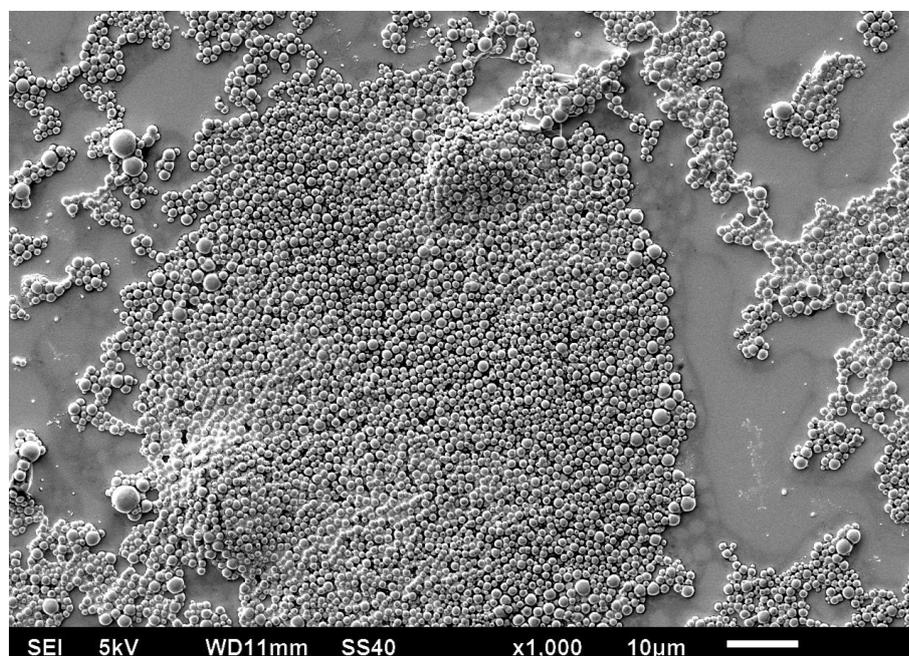


Figura 25: Micrografia eletrônica de varredura utilizada para avaliar a morfologia da superfície das partículas. Aproximadamente 0,003 g da formulação NP.CHB desidratada foi depositada sobre uma lamínula fixada em suporte e recoberta com fina camada de ouro para análise em MEV operado sob tensão de 5,0 kV no modo de detecção de elétrons secundários com ampliação de 1.000 X.

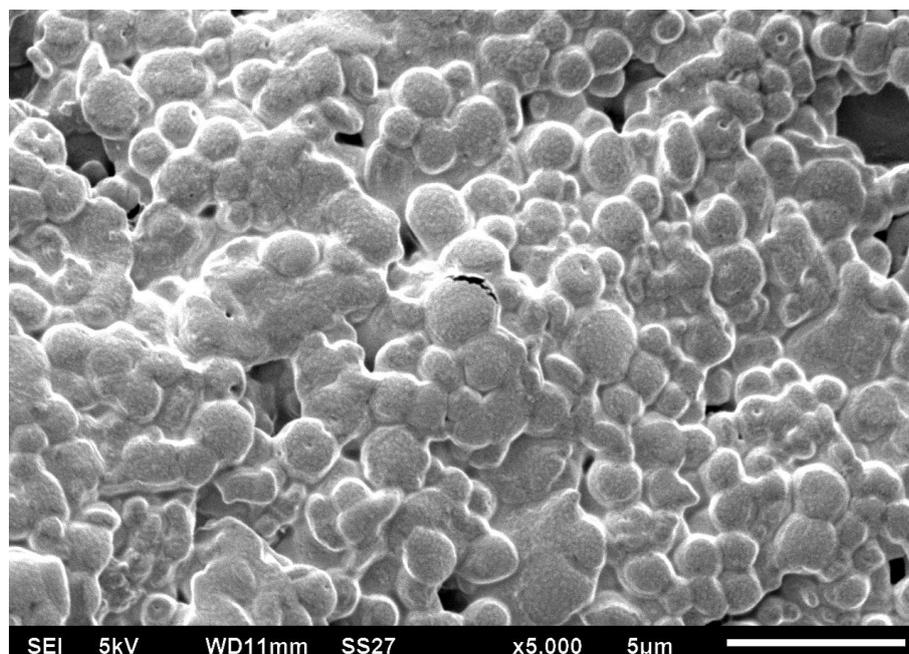


Figura 26: Micrografia eletrônica de varredura utilizada para avaliar a morfologia da superfície das partículas obtidas pelo método de simples emulsificação e evaporação do solvente. Aproximadamente 0,003 g da formulação NP.CHB.EDC/NHS.PEP desidratada foi depositada sobre uma lamínula fixada em suporte e recoberta com fina camada de ouro para análise em MEV operado sob tensão de 5,0 kV no modo de detecção de elétrons secundários com ampliação de 5.000 X.



Figura 27: Micrografia eletrônica de varredura utilizada para avaliar a morfologia da superfície das partículas obtidas pelo método simples emulsão e evaporação do solvente. Aproximadamente 0,003 g da formulação NP.CHB.DOPA.PEP desidratada foi depositada sobre uma lamínula fixada em suporte e recoberta com uma fina camada de ouro para análise em MEV operado sob tensão de aceleração de 5,0 kV no modo de detecção de elétrons secundários com ampliação de 5.000 X.

As NP apresentaram formato esférico e superfícies irregulares com porosidade variada. O formato esférico é responsável por atribuir a esses sistemas a característica de serem transportados de maneira fácil por meio da corrente sanguínea, devido oferecerem menor resistência ao fluxo.

A morfologia da superfície é importante para determinar a cinética de liberação do fármaco encapsulado em uma NP. Nos modelos de liberação do tipo Higuchi ou Korsmeyer-Peppas, por exemplo, a liberação do fármaco aprisionado depende da porosidade das partículas (109). Superfícies porosas são diretamente relacionadas com o aumento da área superficial total, com a eficiência de encapsulamento e com a taxa de liberação do fármaco (96).

A porosidade superficial das partículas, observada principalmente nas partículas da figura 27, pode ser atribuída à velocidade de evaporação do solvente ou à presença de substâncias porogênicas no meio de formulação durante o processo de produção das formulações. Quanto maior a taxa de evaporação do solvente mais porosa é a superfície das partículas. Essa porosidade facilita a entrada da solução tampão no interior das partículas ocasionando a liberação mais rápida do fármaco. Este fato também facilita a formação de regiões no interior das partículas contendo grande quantidade de fármaco precipitado (os ditos bolsões de fármaco mencionados anteriormente).

Não foram adicionadas durante a produção das formulações substâncias consideradas porogênicas, como fosfatos ou outros sais. Já o controle da temperatura de evaporação do solvente não pôde ser feito, e variou conforme o dia de preparo das formulações e a temperatura ambiente. Este fato pode estar relacionado com a diferença observada entre o PL apresentado na Figura 19 para as formulações NP.CHB.EDC/NHS.PEP e NP.CHB.DOPA.PEP. A Figura 27 demonstra que a formulação NP.CHB.DOPA.PEP apresenta uma superfície mais porosa que a

formulação NP.CHB.EDC/NHS.PEP, mostrada na Figura 26. Como justificado anteriormente, a formação de bolsões de fármacos no interior das partículas é responsável por um segundo salto de liberação ocorrido nesse sistema. Esses bolsões podem ter sido formados devido a maior velocidade de evaporação do solvente orgânico no preparo dessas formulações em relação às demais.

Algumas partículas puderam ser encontradas dipostas de maneira isolada, porém, devido à falta de definição das imagens, elas foram omitidas deste trabalho. Apesar das imagens das Figuras 26 e 27 indicarem uma possível tendência à aglomeração das partículas, pode-se dizer que este efeito foi devido à incidência do feixe de elétrons sobre a região em análise ocasionando o aquecimento e consequente fusão superficial delas. Como apresentado anteriormente, as formulações possuem baixa temperatura de transição vítrea o que facilita este fenômeno.

Não foi observada diferença significativa na morfologia ou nas características superficiais das NP com ou sem funcionalização. As imagens de MEV obtidas sugerem que o tamanho real das NP seja próximo de 400,0 nm. Este valor é um pouco superior que os 350,0 nm encontrados nos resultados apresentados por meio das medidas de DLS. Este fato se dá devido ao experimento utilizando a técnica de DLS ter sido realizado em condições úmidas enquanto que as partículas analisadas no experimento realizado com MEV proceder em condições desidratadas. Este fato era esperado, uma vez que as imagens do MEV demonstram um diâmetro efetivo das partículas e dos agregados poliméricos.

Na Figura 25, que apresenta magnificação inferior, é possível identificar maior isolamento entre as partículas e a tendência delas não estarem completamente aglomeradas quando desidratadas. Uma pequena quantidade de PVA permanece associada à superfície das partículas favorecendo a não aglomeração e precipitação

rápida delas. Além disso, já é bem conhecido que os sistemas de administração de fármacos baseados em NP são rapidamente removidos da circulação pelo sistema reticuloendotelial (RES) devido à absorção de proteínas plasmáticas em sua superfície levando ao reconhecimento e retirada de circulação pelas células de Kupffer no fígado e macrófagos do baço evitando assim a circulação desses sistemas e limitando sua capacidade de atingir o tecido alvo (82). A permanência de uma pequena fração de PVA aderido na superfície das NP também confere a esses sistemas uma barreira estérica hidrofílica que atrasa a opsonização e o reconhecimento rápido pelo RES.

Ensaio de Viabilidade

Os dados coletados pelo ensaio de viabilidade foram obtidos em triplicata para tratamentos realizados com seis diferentes concentrações das formulações produzidas (9,0, 19,0, 31,0, 63,0, 156,0 e 313,0 mg_(partículas)/L) durante três períodos distintos (24, 48 e 72 horas). Serão apresentados apenas os resultados obtidos com o tratamento realizado no período de 24 e 72 horas e na concentração de 63,0 mg_(partícula)/L, devido terem sido essas as condições que apresentaram resultados com maior diferença significativa entre os dados coletados.

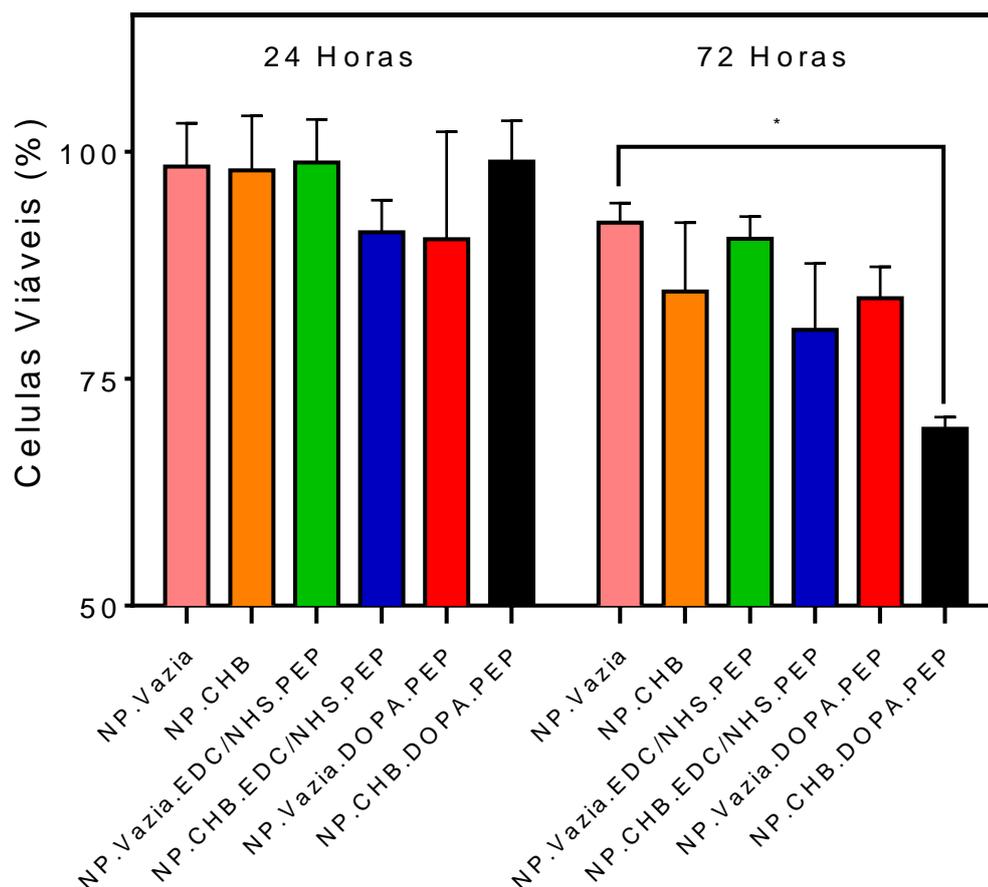


Figura 28: Ensaio de viabilidade com células da linhagem NIH-3T3 tratadas com NP de PLGA vazias e contendo CHB com ou sem funcionalização. Na sequência () NP.Vazia, () NP.CHB, () NP.Vazia.EDC/NHS.PEP, () NP.CHB.EDC/NHS.PEP, () NP.Vazia.DOPA.PEP e () NP.CHB.DOPA.PEP. Foram utilizadas placas de 96 poços, cada um com $2,5 \times 10^4$ células e a concentração de $63,0 \text{ mg}_{(\text{partículas})}/\text{L}$. Para cada formulação foi realizada uma triplicata e após o tratamento as células foram mantidas incubadas em estufa pelos períodos de 24 e 72 horas.

Tabela 10: Valores de porcentagem de células viáveis tratadas com formulações controle (vazias) e contendo CHB (com e sem funcionalização) para 24 e 72 horas de tratamento em células da linhagem NIH-3T3.

Formulação	24 horas	72 horas
NP.Vazia	98,4±1,9%	92,2±1,2%
NP.CHB	97,9±2,5%	84,6±3,8%
NP.Vazia.EDC/NHS.PEP	98,8±1,9%	90,4±1,4%
NP.CHB.EDC/NHS.PEP	91,1±1,4%	80,4±4,2%
NP.Vazia.DOPA.PEP	90,3±4,8%	83,9±2,0%
NP.CHB.DOPA.PEP	98,9±1,8%	69,5±0,7%

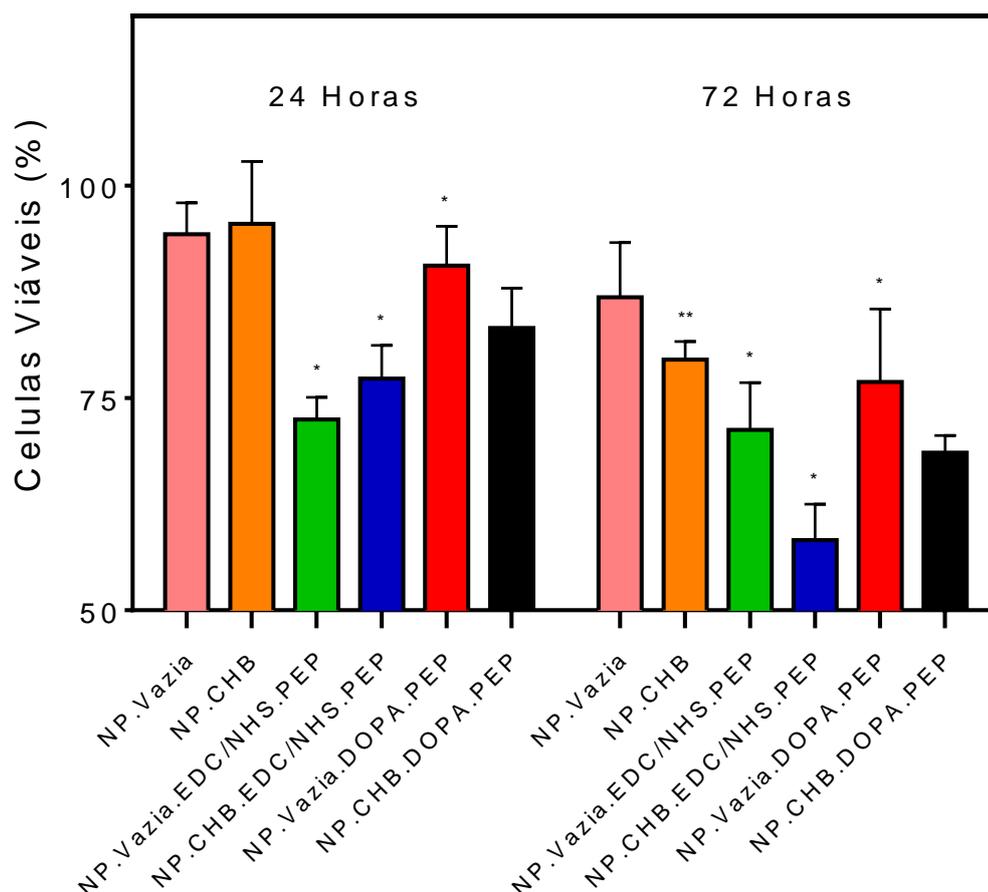


Figura 29: Ensaio de viabilidade com células da linhagem MCF-7 tratadas com NP de PLGA vazias e contendo CHB com ou sem funcionalização. Na sequência () NP.Vazia, () NP.CHB, () NP.Vazia.EDC/NHS.PEP, () NP.CHB.EDC/NHS.PEP, () NP.Vazia.DOPA.PEP e () NP.CHB.DOPA.PEP. Foram utilizadas placas de 96 poços, cada um com $2,5 \times 10^4$ células e a concentração de $63,0 \text{ mg}_{(\text{partículas})}/\text{L}$. Para cada formulação foi realizada uma triplicata e após o tratamento as células foram mantidas incubadas em estufa pelos períodos de 24 e 72 horas.

Tabela 11: Valores de porcentagem de células viáveis tratadas com formulações controle (vazias) e contendo CHB (com e sem funcionalização) para 24 e 72 horas de tratamento nas células da linhagem MCF-7.

Formulação	24 horas	72 horas
NP.Vazia	94,3±1,5%	86,9±3,7%
NP.CHB	95,5±3,0%	79,5±1,2%
NP.Vazia.EDC/NHS.PEP	72,5±1,1%	71,2±3,2%
NP.CHB.EDC/NHS.PEP	77,3±2,3%	58,3±2,4%
NP.Vazia.DOPA.PEP	90,6±1,9%	76,9±4,9%
NP.CHB.DOPA.PEP	83,3±2,1%	68,6±1,2%

A Figura 28 apresenta o gráfico obtido com os resultados dos tratamentos realizados na linhagem NIH-3T3 (fibroblastos, células não tumorais, de origem

murina), sendo os valores de porcentagem média de células viáveis para cada tratamento apresentados na Tabela 10. Já a Figura 29 apresenta o gráfico obtido com os resultados para os tratamentos das células da linhagem MCF-7 (tumerais de mama humano) sendo os valores de porcentagem média de células viáveis para cada tratamento apresentados na Tabela 11. Como controle, cada placa continha três poços com células que não foram submetidas a nenhum tipo de tratamento, mas que foram mantidas nas mesmas condições que as células tratadas e a média da porcentagem de viabilidade obtida para esses poços foi considerada como 100,0%.

Em cada uma dessas figuras podem ser comparados os resultados obtidos para as células tratadas com formulações de NP contendo CHB, funcionalizadas ou não, em relação às células tratadas com formulações de NP vazias.

No período de 24 horas de tratamento das células da linhagem NIH-3T3 não foi observada redução considerável da viabilidade para as formulações analisadas. Já no período de 72 horas para a mesma linhagem, pôde ser constatado maior eficiência nos tratamentos com as formulações contendo CHB em relação as formulações vazias. Entre todas as formulações testadas a NP.CHB.DOPA.PEP foi a que induziu redução mais significativa da viabilidade dessas células com 69,5%, seguido pela formulação NP.CHB.EDC/NHS.PEP com 80,4%, depois pela formulação NP.Vazia.DOPA.PEP com 83,9% e por fim pela formulação NP.CHB com 84,6%. As demais formulações não reduziram significativamente a viabilidade celular da linhagem NIH-3T3.

Já os resultados obtidos para a linhagem MCF-7, demonstraram que para o período de 24 horas de tratamento as células não sofreram redução considerável de viabilidade quando tratadas com as formulações NP.Vazia e NP.CHB. Inesperadamente a formulação NP.Vazia.EDC/NHS.PEP (72,5%) reduziu mais a

viabilidade das células do que a formulação NP.CHB.EDC/NHS.PEP (77,3%) para este período de tratamento. Esses valores foram inferiores aos encontrados para as células tratadas com as partículas funcionalizadas com polidopamina e tripeptídeo. Porém, as células tratadas com a formulação NP.CHB.DOPA.PEP (83,3%) sofreram maior redução do que as tratadas com a formulação NP.Vazia.DOPA.PEP (90,6%), como era esperado.

Por fim, os resultados mostrados para a linhagem MCF-7 submetidas ao período de tratamento de 72 horas foram os que mais demonstraram a seletividade e eficiência das formulações produzidas. A formulação NP.Vazia foi a que menos afetou as condições das células, com 86,9% de células viáveis. Em seguida, as células tratadas com NP.CHB sofreram uma redução de 79,5% seguida pelas tratadas com as formulações NP.Vazia.DOPA.PEP (76,9%) e NP.Vazia.EDC/NHS.PEP (71,2%). As formulações contendo o fármaco CHB funcionalizadas com o peptídeo direcionador foram as que se mostraram mais eficientes no tratamento dessas células para esse período, sendo a mais eficiente a formulação NP.CHB.EDC/NHS.PEP com 58,3%, seguido pela formulação NP.CHB.DOPA.PEP com 68,6% de células viáveis.

Agentes alquilantes como o CHB são inibidores do ciclo celular e interrompem o crescimento tumoral por meio da reticulação de bases do DNA, tornando difícil o desenrolar e separar das suas cadeias em dupla hélice (100). Desta forma, impedem a replicação e causam a fragmentação do DNA por enzimas de reparação, impossibilitando a transcrição de RNA. Conseqüentemente, as células param de se dividir e morrem (100). O fármaco estudado neste trabalho demonstrou ser mais eficiente quando encapsulado em NP de PLGA funcionalizadas com o peptídeo direcionador ciclo-RGD do que quando livre ou apenas encapsulado como estudado e apresentado em trabalho publicado anteriormente por Dias et al. (50).

Pôde-se concluir também que as formulações foram seletivas reduzindo de maneira mais rápida e significativa a viabilidade das células tumorais da linhagem MCF-7 em relação às células de fibroblastos da linhagem NIH-3T3. Dentre as formas de funcionalização, uma pequena vantagem pôde ser identificada para as partículas funcionalizadas pelo método de ligação direta do ciclo-RGD à superfície das NP pelo uso de EDC/NHS comparado com o método indireto utilizando a polimerização da dopamina.

Ensaio de Uptake: ação superficial em células

Após realizar o estudo dos diversos parâmetros físico-químicos e morfológicos das formulações produzidas (EE%, PL, diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta, entre outros), foi realizado o estudo cinético da captação celular e distribuição intracelular e retenção das NP formuladas.

A compreensão da distribuição intracelular e tecidular das NP é útil para elucidar o mecanismo de eficácia terapêutica melhorada de agentes encapsulados. Será descrito a seguir o processo de adesão na superfície das NP de PLGA nas células do tipo MCF-7 e NIH-3T3 (50).

Após exaustiva análise de todos os resultados obtidos no ensaio de viabilidade – apresentado e discutido anteriormente – apenas duas concentrações foram escolhidas (31,0 e 63,0 mg_(partículas)/L) para realização do próximo ensaio que será apresentado (“Uptake”).

Nas Figuras 30 e 31 são apresentadas imagens da captação pelas células das NP produzidas com o fármaco CHB funcionalizadas. Essas formulações foram aplicadas em células tumorais de mama da linhagem MCF-7 em tempos de incubação de 24 e 72 horas.

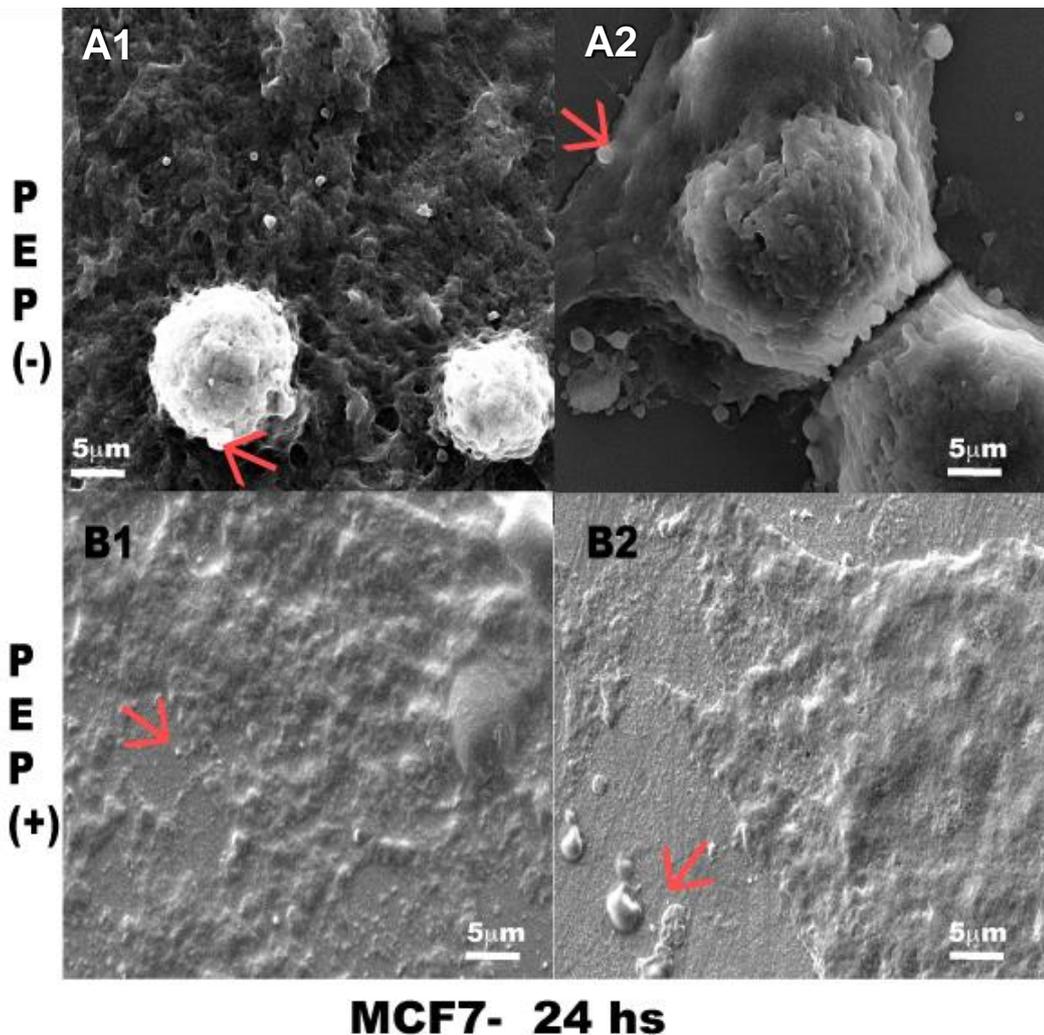


Figura 30: Avaliação da sítio-especificidade das NP produzidas por meio de processos de adesão *in vitro* pelo período de incubação por 24 horas com a concentração de 63,0 mg_(partículas)/L em células da linhagem MCF-7: (A1) formulação NP.CHB.EDC/NHS, (A2) formulação NP.CHB.DOPA, (B1) formulação NP.CHB.EDC/NHS.PEP, (B2) formulação NP.CHB.DOPA.PEP. MEV operado entre 5,0 – 10,0 kV em modo de detecção de elétrons secundários, com escala de 5,0 μm. Flechas em vermelho indicam regiões onde NP são encontradas.

Nos quadrantes A1 e A2 das Figuras 30 e 31 são apresentadas as imagens de MEV de células tratadas com NP contendo CHB sem estarem com suas superfícies funcionalizadas com o peptídeo direcionador ciclo-RGD. É possível notar que nesta etapa as NP já se encontram aderidas à superfície celular, no entanto, o dano ocasionado não é muito evidente. Já nos quadrantes B1 e B2 das mesmas figuras, não foi possível identificar claramente as NP e as células tratadas com elas, pois, nestes sistemas, as formulações aplicadas continham o fármaco CHB e foram funcionalizadas com o peptídeo direcionador ciclo-RGD e atuaram como esperado ocasionado a morte celular de maneira mais efetiva.

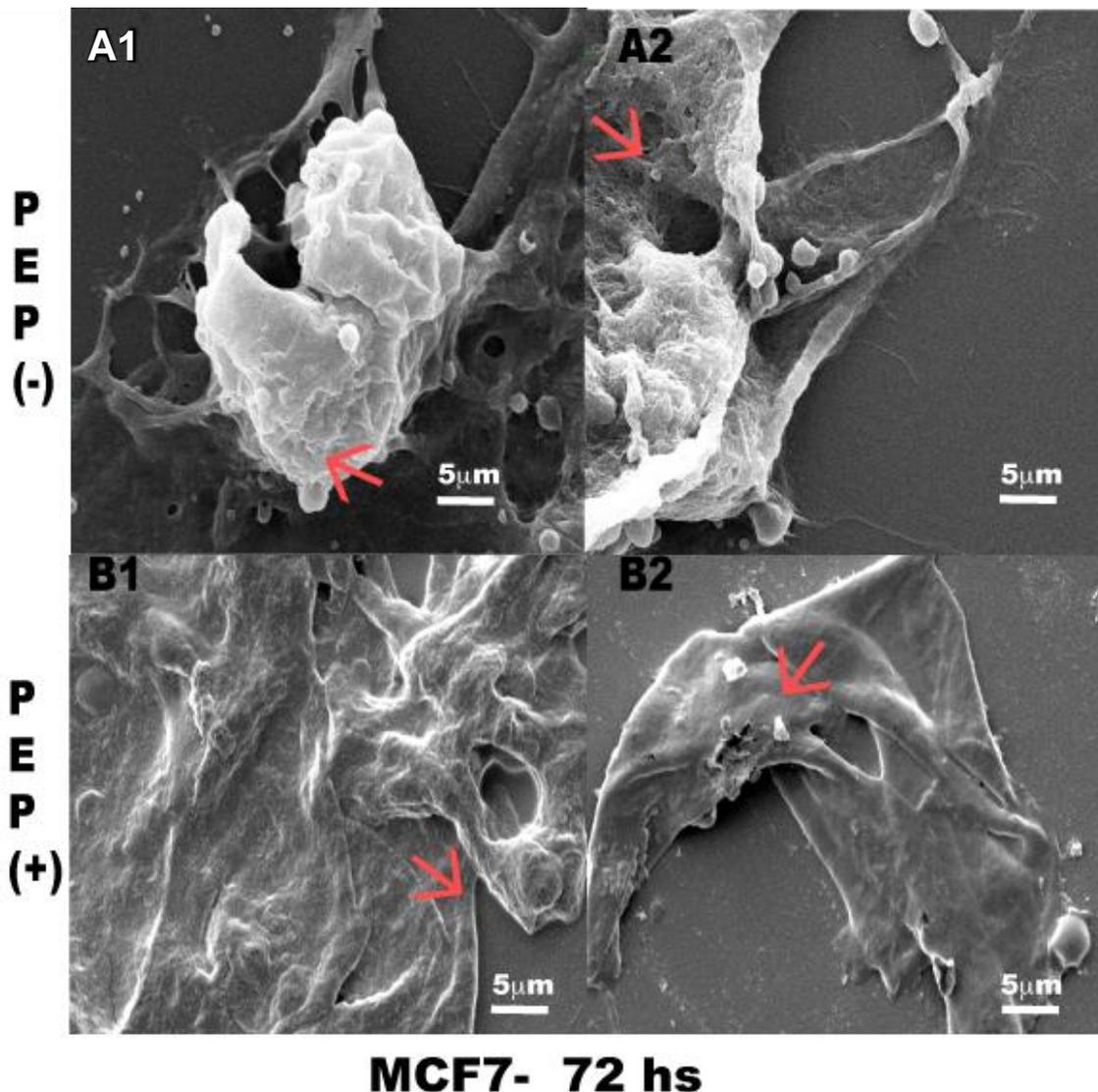


Figura 31: Avaliação da sítio-especificidade das NP produzidas por meio de processos de adesão *in vitro* pelo período de incubação de 72 horas na concentração de 63,0 mg_(partículas)/L em células da linhagem MCF-7: (A1) formulação NP.CHB.EDC/NHS, (A2) formulação NP.CHB.DOPA, (B1) formulação NP.CHB.EDC/NHS-PEP, (B2) formulação NP.CHB.DOPA-PEP. MEV operado entre 5,0 – 10 kV em modo de detecção de elétrons secundários, com escala de 5,0 μm. Flechas em vermelho indicam regiões onde são encontradas NP.

Já é bem conhecido que o tripeptídeo RGD possui interação com integrinas presentes na superfície de células tumorais. Ambas as formulações produzidas e avaliadas neste estudo apresentaram para o período de 24 horas de incubação o efeito desejado. Isso porque, ocorre com estes sistemas um maior acúmulo das NP sobre a superfície das células sendo, posteriormente, internalizadas, e ocorrendo a liberação do fármaco e ocasionando conseqüentemente a morte celular.

As integrinas são grandes e complexas glicoproteínas transmembranares. Suas estruturas consistem em duas cadeias distintas constituídas por subunidades

denominadas como α e β que formam um heterodímero não covalente. As integrinas medem a adesão celular e se ligam diretamente aos componentes da MEC, como fibronectinas, vitronectinas, lamininas ou colágeno, proporcionando assim ancoragem para a mobilidade celular (110).

A expressão celular de $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ são relacionadas com possível progressão metastática em melanomas, carcinomas de mama, próstata, pâncreas e câncer de pulmão. A contribuição das integrinas para a angiogênese, progressão tumoral e metastática é amplamente aceita (67). Os vasos associados a tumores expressam as integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$ que não são detectadas em vasculaturas saudáveis. A ligação destas integrinas vasculares aos componentes da MEC no microambiente tumoral contribui para a invasão e migração de células endoteliais. Portanto, o foco das integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$ com anticorpos ou estruturas derivadas de péptidos (como o RGD) tem sido investigado como uma abordagem antiangiogênica (67).

Uma vez que várias proteínas do MEC, como vitronectinas, fibrinogênios e fibronectinas, interagem com integrinas por meio da sequência RGD linear, esse comportamento também pode ocorrer com peptídeos cíclicos que contenham a sequência RGD. Muitos destes foram produzidos e testados como agentes de funcionalização que se ligam especificamente às integrinas do tipo $\alpha v\beta 3$. Kessler et al. desenvolveram o Pentapeptídeo cRGDyK (-Arg-Gly-Asp-DTyr-Lys-), que demonstra alta afinidade e seletividade para o acoplamento com $\alpha v\beta 3$ (67,68).

As células da linhagem MCF-7 possuem receptores de estrogênio positivos não metastáticos (67). Nessas células, as integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$ são receptores heterodiméricos de superfície celular que realizam a adesão entre as células e a MEC (111). Os receptores do tipo $\alpha v\beta 3$ são associados a um papel-chave da progressão do tumor, metástase e reabsorção óssea dos osteoclastos. Os

anticorpos para a integrina $\alpha\beta 3$ e seus antagonistas como peptídeos contendo arg-glic-asp (RGD), incluindo osteopontina, sialoproteína óssea, vitronectina e fibrinogênio, são considerados eficientes inibidores que podem controlar a progressão tumoral (112). Ocorre o tráfico intracelular mediado por endocitose de ligantes pelo receptor $\alpha\beta 3$ em células da linhagem MCF-7 (113).

O uso de peptídeos RGD em biomateriais é conhecido e bem discutido no trabalho de Bellis, onde são abordados aspectos distintos entre o uso do tripeptídeo RGD adsorvido em biomateriais aplicados em culturas de células (114). Os dados *in vitro* indicaram uma direção que nem sempre pode ser confirmada *in vivo*, permitindo dizer que se deve explorar cada novo material associado ao peptídeo RGD em todos os aspectos (114).

Sendo assim, o uso de NP poliméricas biodegradáveis contendo CHB, um fármaco com ação no DNA, associada ao tripeptídeo RGD, que se associam as integrinas, através dos receptores $\alpha\beta 3$ (pouco expresso em MCF-7) (115) e $\alpha 5\beta 1$ (mais expressa em MCF-7) pode ser mais um componente no processo de entrega de fármacos em tumores levando a mais um adicional na busca pelo desenvolvimento de nanomateriais cada vez mais eficientes (7).

CONCLUSÃO

Foi relatado neste trabalho um método de preparo bem sucedido, de fácil execução, reprodutivo e que não necessitou de recursos onerosos para encapsular com alto rendimento e eficiência o agente antitumoral CHB em NP de PLGA. Devido à natureza inerte do PLGA, foi realizada a modificação superficial das NP por meio de dois métodos distintos (um utilizando EDC/NHS e outro DOPA) para posterior funcionalização com o peptídeo direcionador ciclo-RGD. Essas formulações exibiram elevada estabilidade do fármaco e demais constituintes associados, sendo caracterizadas como monodispersas e com diâmetro hidrodinâmico ($\geq 400,0$ nm) adequado para realização de ensaios *in vivo* e com potencial para futura aplicação no tratamento de câncer. A carga superficial das formulações se manteve negativa e inalterada após procedimentos de funcionalização, sendo atribuído este efeito a modificação superficial não ter sido realizada concomitantemente com o processo de produção das partículas, mas sim, em procedimentos independentes que não resultaram na redução expressiva de grupos carboxílicos presentes na superfície das NP. A modificação superficial também não alterou significativamente a %EE do CHB, sendo este um indicativo de que as formulações e suas modificações superficiais não ocasionaram a perda do fármaco que se manteve aprisionado às NP. A liberação precoce do fármaco ainda consiste em uma característica indesejada para aplicação sistêmica dessas NP, mas, este é um problema possível de ser solucionado e que deverá ser otimizado em estudos posteriores. Por fim, como esperado, as NP modificadas apresentaram vantagens em relação às NP não funcionalizadas devido à presença do ligante sítio-específico que favoreceu a entrada das partículas principalmente nas células tumorais em relação às demais formulações controle produzidas nesse trabalho. Os valores de viabilidade refletiram que as formulações das NP não foram muito citotóxicas, mas, quando utilizadas para tratar as células da linhagem MCF-7 demonstraram ser mais tóxicas em

comparação com tratamentos semelhantes nas células da linhagem NIH-3T3. É possível concluir que os sistemas produzidos são promissores DDS que poderão contribuir para o aumento dos índices de seletividade e eficiência terapêutica, biodisponibilidade elevação da sítio-especificidade e conseqüente redução de efeitos adversos para futuro uso clínico do CHB.

REFERÊNCIAS

1. Liang X, Chen C, Zhao Y, Wang PC. Multi-Drug Resistance in Cancer. 2010,596(3):1–18. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-416-6>
2. Guaragna A, Chiaviello A, Paoella C, DAlonzo D, Palumbo G, Palumbo G. Synthesis and evaluation of folate-based chlorambucil delivery systems for tumor-targeted chemotherapy. **Bioconjug Chem**. 2012,23(1):84–96.
3. Jabir NR, Tabrez S, Ashraf GM, Shakil S, Damanhoury GA, Kamal MA. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. **Int J Nanomedicine**. 2012,7:4391–408.
4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. **CA a cancer J Clin** [Internet]. 2015,65(2):87–108. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21262/abstract>
5. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**. 2015,136(5):E359–86.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**. 2016,66(1):7–30.
7. IARC. World Cancer Report 2014. Stewart B, Wild C, editors. 2014.
8. Brazil IN de CJAG da Si. ESTIMATIVA | 2016 - Incidência de Câncer no Brasil. 2015. 1-126 p.
9. GloboCan. **GloboCan** [Internet]. 2017. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
10. Organization WH. World Health Organization [Internet]. 2017. Available from: <http://www.who.int/en/>
11. Dieleman JL, Baral R, Birger M, Bui AL, Bulchis A, Chapin A, et al. US Spending on Personal Health Care and Public Health, 1996-2013. **Jama** [Internet]. 2016,316(24):2627. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2016.16885>
12. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA Cancer J Clin** [Internet]. 2016,66(4):271–89. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21349>
13. Karataş A, Sonakin Ö, KiliÇarslan M, Baykara T. Poly (ϵ -caprolactone) microparticles containing Levobunolol HCl prepared by a multiple emulsion (W/O/W) solvent evaporation technique: Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics. **J Microencapsul** [Internet]. 2009,26(1):63–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/02652040802141039>
14. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Adv Drug Deliv Rev** [Internet]. 2012,64(SUPPL.):206–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.033>
15. Kapse-Mistry S, Govender T, Srivastava R, Yergeri M. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. **Front Pharmacol**. 2014,5 JUL(July):1–22.
16. Fumoto S, Kawakami S. Combination of Nanoparticles with Physical Stimuli toward Cancer Therapy. **Biol Pharm Bull**. 2014,37(2):212–6.
17. Alyautdin R, Khalin I, Nafeeza MI, Haron MH, Kuznetsov D. Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier. **Int J Nanomedicine** [Internet]. 2014,9(1):795–811. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0->

- 84893713788&partnerID=40&md5=465e334e04d713de482a93a1d4ee7f73
18. Brazil IN de CJAG da Si. Instituto Nacional do Cancer [Internet]. 2017. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>
 19. Miki Y, Swensen J, Shattuck-eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. **Science** (80-). 1994,266(October):66–71.
 20. Venkitaraman AR. and the Functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell Press**. 2002,108:171–82.
 21. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. **Am J Hum Genet** [Internet]. 1998,62(3):676–89. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929707638488>
 22. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. **N Engl J Med** [Internet]. 2001 Mar 15,344(11):783–92. Available from: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200103153441101>
 23. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and Safety of Trastuzumab as a Single Agent in First-Line Treatment of *HER2* -Overexpressing Metastatic Breast Cancer. **J Clin Oncol** [Internet]. 2002,20(3):719–26. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2002.20.3.719>
 24. Amendola LCB, Vieira R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Rev Bras Cancerol**. 2005,51(4):325–30.
 25. Dunn SE, Hardman RA, Kari FW, Barrett JC. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) alters drug sensitivity of HBL100 human breast cancer cells by inhibition of apoptosis induced by diverse anticancer drugs. **Cancer Res** [Internet]. 1997,57(13):2687–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9205078>
 26. Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'Dwyer ST, Shalet SM, Egger M. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. **Lancet** [Internet]. 2004,363(9418):1346–53. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15110491
 27. Greig NH, Genka S, Daly EM, Sweeney DJ, Rapoport SI. Physicochemical and pharmacokinetic parameters of seven lipophilic chlorambucil esters designed for brain penetration. **Cancer Chemother Pharmacol**. 1990,25(5):311–9.
 28. Liu Y, Sun J, Han J, He Z. Long-circulating Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy. 2010,(59):347–54.
 29. Davis ME, Chen Z (Georgia), Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. **Nat Rev Drug Discov** [Internet]. 2008,7(9):771–82. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd2614>
 30. Fu YC, Fu TF, Wang HJ, Lin CW, Lee GH, Wu SC, et al. Aspartic acid-based modified PLGA-PEG nanoparticles for bone targeting: In vitro and in vivo evaluation. **Acta Biomater** [Internet]. 2014,10(11):4583–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.07.015>
 31. Kratz F, Beyer U, Roth T, Schütte MT, Unold A, Fiebig HH, et al. Albumin conjugates of the anticancer drug chlorambucil: Synthesis, characterization, and in vitro efficacy. **Arch Pharm** (Weinheim). 1998,331(2):47–53.
 32. Anselmo AC, Mitragotri S. An overview of clinical and commercial impact of

- drug delivery systems. **J Control Release** [Internet]. 2014 Sep,190(10):15–28. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365914002193>
33. Ganta S, Paxton JW, Baguley BC, Garg S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorambucil delivered in parenteral emulsion. **Int J Pharm**. 2008,360(1–2):115–21.
 34. Beyer U, Roth T, Schumacher P, Maier G, Unold A, Frahm AW, et al. Synthesis and in Vitro Efficacy of Transferrin Conjugates of the Anticancer Drug Chlorambucil. **J Med Chem** [Internet]. 1998 Jul,41(15):2701–8. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm9704661>
 35. Cummings JH, Macfarlane GT, Englyst HN. Prebiotic digestion and fermentation. **Am J Clin Nutr**. 2001,73(2 SUPPL.):415–20.
 36. Rahimi M, Kilaru S, Sleiman GEH, Saleh A, Rudkevich D, Nguyen K. Synthesis and characterization of thermo-sensitive nanoparticles for drug delivery applications. **J Biomed Nanotechnol**. 2008,4(4):482–90.
 37. Fabiilli ML, Haworth KJ, Sebastian IE, Kripfgans OD, Carson PL, Fowlkes JB. Delivery of chlorambucil using an acoustically-triggered perfluoropentane emulsion. **Ultrasound Med Biol**. 2010,36(8):1364–75.
 38. Narang AS, Varia S. Role of tumor vascular architecture in drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev** [Internet]. 2011,63(8):640–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.04.002>
 39. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions. **N Engl J Med** [Internet]. 2014,370(12):1101–10. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1313984>
 40. Capolla S, Mezzaroba N, Zorzet S, Tripodo C, Mendoza-Maldonado R, Granzotto M, et al. A new approach for the treatment of CLL using chlorambucil/hydroxychloroquine-loaded anti-CD20 nanoparticles. **Nano Res**. 2016,9(2):537–48.
 41. Sharma P, Ganta S, Denny WA, Garg S. Formulation and pharmacokinetics of lipid nanoparticles of a chemically sensitive nitrogen mustard derivative: Chlorambucil. **Int J Pharm**. 2009,367(1–2):187–94.
 42. Jin G, You Y, Kim Y, Nam N, Ahn B. Short Communication multifunctional anticancer agents. 2001,36:361–6.
 43. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Adv Drug Deliv Rev**. 2003,55(3):329–47.
 44. Kukowska-Latallo J, Candido K, Cao Z, Nigavekar S, Majoros I, Thomas T, et al. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. **Cancer Res** [Internet]. 2005,65(12):5324, 5317. Available from: <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3921>
 45. Choi Y, Joo JR, Hong A, Park JS. Development of drug-loaded PLGA microparticles with different release patterns for prolonged drug delivery. **Bull Korean Chem Soc**. 2011,32(3):867–72.
 46. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers** (Basel). 2011,3(3):1377–97.
 47. Zhang Y, Chan HF, Leong KW. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. **Adv Drug Deliv Rev** [Internet]. 2013,65(1):104–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.003>
 48. Hsieh SC, Tang CM, Huang WT, Hsieh LL, Lu CM, Chang CJ, et al. NIH Public Access. **N Engl J Med** [Internet]. 2015 Sep 15,3(2):1101–10. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2002.20.3.719>

49. Singh M. N., Hemant K. S. Y., Ram M. SHG. Microencapsulation: A promising techniques for controlled drug delivery. **Res Pharm Sci**. 2010,5(2):65–77.
50. Dias DJS, Joanitti GA, Azevedo RB, Silva LP, Lunardi CN, Gomes AJ. Chlorambucil Encapsulation into PLGA Nanoparticles and Cytotoxic Effects in Breast Cancer Cell. **J Biophys Chem**. 2015,6(February):1–13.
51. Mi FL, Lin YM, Wu YB, Shyu SS, Tsai YH. Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug-delivery system: Phase-separation, degradation and release behavior. **Biomaterials**. 2002,23(15):3257–67.
52. Qutachi O, Vetsch JR, Gill D, Cox H, Scurr DJ, Hofmann S, et al. Injectable and porous PLGA microspheres that form highly porous scaffolds at body temperature. **Acta Biomater** [Internet]. 2014,10(12):5090–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.08.015>
53. Feng N, Xu J, Zhao J-H, Liu Y, Zhang Y-T. RGD-modified poly(D,L-lactic acid) nanoparticles enhance tumor targeting of oridonin. **Int J Nanomedicine** [Internet]. 2012 Jan,211. Available from: <http://www.dovepress.com/rgd-modified-polydl-lactic-acid-nanoparticles-enhance-tumor-targeting--peer-reviewed-article-IJN>
54. Lee J-Y, Im Y-K, Ko H-M, Chin J-E, Kim I-C, Lee HB, et al. Direct utilization of purple sweet potato by sake yeasts to produce an anthocyanin-rich alcoholic beverage. **Biotechnol Lett** [Internet]. 2015 Jul 17,37(7):1439–45. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-015-1811-7>
55. Mathew A, Fukuda T, Nagaoka Y, Hasumura T, Morimoto H, Yoshida Y, et al. Curcumin loaded-PLGA nanoparticles conjugated with Tet-1 peptide for potential use in Alzheimer's disease. **PLoS One**. 2012,7(3).
56. Shirazi RN, Aldabbagh F, Erxleben A, Rochev Y, McHugh P. Nanomechanical properties of poly(lactic-co-glycolic) acid film during degradation. **Acta Biomater** [Internet]. 2014,10(11):4695–703. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.08.004>
57. Chen G, Xia Y, Lu X, Zhou X, Zhang F, Gu N. Effects of surface functionalization of PLGA membranes for guided bone regeneration on proliferation and behavior of osteoblasts. **J Biomed Mater Res - Part A**. 2013,101 A(1):44–53.
58. Park TG, Cohen S, Langer R. Poly(L-lactic acid)/Pluronic blends: characterization of phase separation behavior, degradation, and morphology and use as protein-releasing matrixes. **Macromolecules** [Internet]. 1992 Jan,25(1):116–22. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma00027a019>
59. Ibim SEM, Ambrosio AMA, Kwon MS, El-Amin SF, Allcock HR, Laurencin CT. Novel polyphosphazene/poly(lactide-co-glycolide) blends: miscibility and degradation studies. **Biomaterials** [Internet]. 1997 Dec,18(23):1565–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961297800099>
60. Pitt GG, Cha Y, Shah SS, Zhu KJ. Blends of PVA and PGLA: control of the permeability and degradability of hydrogels by blending. **J Control Release** [Internet]. 1992 Mar,19(1–3):189–99. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168365992900764>
61. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. **Nat Rev Mol Cell Biol** [Internet]. 2004 Oct,5(10):816–26. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm1490>
62. Junqueira LCU, Carneiro J. *Biologia celular e molecular* [Internet]. 8th ed. Guanabara Koogan, 2005. 230-238 p. Available from: <https://books.google.com.br/books?id=h97gAAAACAAJ>
63. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Baltimore D, Matsudaira PT. *Biologia celular e*

- molecular [Internet]. **REVINTER**, 2002. Available from: <https://books.google.com.br/books?id=2UbFAAAACAAJ>
64. Pereira ALA, Veras SSL, Silveira ÉJD, Seabra FRG, Pinto LP, Souza LB, et al. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteínas em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. **Rev Bras Otorrinolaringol** [Internet]. 2005 Feb,71(1):81–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992005000100014&lng=pt&tlng=pt
 65. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor Cell Interactions with the Extracellular Matrix During Invasion and Metastasis. **Annu Rev Cell Biol** [Internet]. 1993 Nov,9(1):541–73. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cb.09.110193.002545>
 66. Park J, Brust TF, Lee HJ, Lee SC, Watts VJ, Yeo Y. Polydopamine-Based Simple and Versatile Surface Modification of Polymeric Nano Drug Carriers. **ACS Nano** [Internet]. 2014 Apr 22,8(4):3347–56. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn405809c>
 67. Morozevich GE, Kozlova NI, Preobrazhenskaya ME, Ushakova NA, Eltsov IA, Shtil AA, et al. The role of beta1 integrin subfamily in anchorage-dependent apoptosis of breast carcinoma cells differing in multidrug resistance. **Biochemistry (Mosc)** [Internet]. 2006 May,71(5):489–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16732726>
 68. Ou Z, Wu B, Xing D, Zhou F, Wang H, Tang Y. Functional single-walled carbon nanotubes based on an integrin $\alpha v \beta 3$ monoclonal antibody for highly efficient cancer cell targeting. **Nanotechnology** [Internet]. 2009 Mar 9,20(10):105102. Available from: <http://stacks.iop.org/0957-4484/20/i=10/a=105102?key=crossref.f67ee1ce86d9f6d2cfba3244b3180cee>
 69. Wang Z, Chui WK, Ho PC. Design of a multifunctional plga nanoparticulate drug delivery system: Evaluation of its physicochemical properties and anticancer activity to malignant cancer cells. **Pharm Res**. 2009,26(5):1162–71.
 70. Flores GF. Radiofármacos de ^{99m}Tc -HYNIC/Arg-Gly-Asp y ^{177}Lu DOTA/Arg-Gly-Asp como sistemas multivalentes para la detección in vivo de angiogénesis en el diagnóstico temprano y posible tratamiento de neoplasias por técnicas de medicina nuclear molecular (II). 2017, Available from: http://inin.gob.mx/_invydes/publicaciones.cfm%0D
 71. Lewis JS, Zaveri TD, Crooks CP, Keselowsky BG. Microparticle surface modifications targeting dendritic cells for non-activating applications. **Biomaterials** [Internet]. 2012 Oct,33(29):7221–32. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961212006990>
 72. Cao Z, Yu Q, Xue H, Cheng G, Jiang S. Nanoparticles for drug delivery prepared from amphiphilic PLGA zwitterionic block copolymers with sharp contrast in polarity between two blocks. **Angew Chemie - Int Ed**. 2010,49(22):3771–6.
 73. Debele TA, Peng S, Tsai HC. Drug carrier for photodynamic cancer therapy. Vol. 16, **International Journal of Molecular Sciences**. 2015. 22094-22136 p.
 74. Chung HJ, Kim HK, Yoon JJ, Park TG. Heparin immobilized porous PLGA microspheres for angiogenic growth factor delivery. **Pharm Res**. 2006,23(8):1835–41.
 75. Sierra H, Cordova M, Chen C-SJ, Rajadhyaksha M. Confocal Imaging–Guided Laser Ablation of Basal Cell Carcinomas: An Ex Vivo Study. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2015 Feb,135(2):612–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15370834>
 76. Pahuja R, Seth K, Shukla A, Shukla RK, Bhatnagar P, Chauhan LKS, et al.

- Trans-blood brain barrier delivery of dopamine-loaded nanoparticles reverses functional deficits in parkinsonian rats. **ACS Nano**. 2015,9(5):4850–71.
77. Benita S. Microencapsulation: Methods and Industrial Applications, Second Edition [Internet]. **CRC Press**, 2005. 183-198 p. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences). Available from: <https://books.google.com.br/books?id=sz-669oFo6AC>
 78. Lunardi CN, Gomes A de J, Palepu S, Galwaduge T, Hillman EMC. PLGA nano/microparticles loaded with cresyl violet as a tracer for drug delivery: Characterization and in-situ hyperspectral fluorescence and 2-photon localization. **Mater Sci Eng C** [Internet]. 2017,70:505–11. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116311882?via%3Dihub>
 79. Ma X, Cheng Z, Jin Y, Liang X, Yang X, Dai Z, et al. SM5-1-Conjugated PLA nanoparticles loaded with 5-fluorouracil for targeted hepatocellular carcinoma imaging and therapy. **Biomaterials** [Internet]. 2014,35(9):2878–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.045>
 80. Dias DJS, Joanitti GA, Azevedo RB, Silva LP, Lunardi CN, Gomes AJ. Chlorambucil Encapsulation into PLGA Nanoparticles and Cytotoxic Effects in Breast Cancer Cell. **J Biophys Chem** [Internet]. 2015,6(1):1–13. Available from: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/jbpc.2015.61001>
 81. Hsieh SC, Tang CM, Huang WT, Hsieh LL, Lu CM, Chang CJ, et al. Comparison between two different methods of immobilizing NGF in poly(DL - lactic acid-co-glycolic acid) conduit for peripheral nerve regeneration by EDC/NHS/MES and genipin. **J Biomed Mater Res - Part A**. 2011,99 A(4):576–85.
 82. Betancourt T, Byrne JD, Sunaryo N, Crowder SW, Kadapakkam M, Patel S, et al. PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles. **J Biomed Mater Res Part A** [Internet]. 2009 Oct,91A(1):263–76. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.32247>
 83. Duan Z, Zheng Q, Guo X, Yuan Q, Chen S. Experimental research on ectopic osteogenesis of BMP2-derived peptide P24 combined with PLGA copolymers. **J Huazhong Univ Sci Technol** [Internet]. 2007 Apr,27(2):179–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11596-007-0219-6>
 84. Kondrasheva IG, Antipova TA, Barsegyan GG, Gambaryan PY, Guseva AA, Kamensky AA. Efficacy and Safety of Nasal Administration of “Na-no-L-DOPA” Based on PLGA Nanoparticles. **Engineering** [Internet]. 2012,4(10):27–9. Available from: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/eng.2012.410B007>
 85. Gullotti E, Park J, Yeo Y. Polydopamine-Based Surface Modification for the Development of Peritumorally Activatable Nanoparticles. **Pharm Res** [Internet]. 2013 Aug 23,30(8):1956–67. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-013-1039-y>
 86. Govender T. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **J Control Release** [Internet]. 1999 Feb 1,57(2):171–85. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365998001163>
 87. Washington C. Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition. **Int J Pharm** [Internet]. 1989 Nov,56(1):71–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378517389900628>

88. Washington C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **Int J Pharm** [Internet]. 1990 Jan,58(1):1–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037851739090280H>
89. Barman S, Mukhopadhyay SK, Gangopadhyay M, Biswas S, Dey S, Singh NDP. Coumarin–benzothiazole–chlorambucil (Cou–Benz–Cbl) conjugate: an ESIPT based pH sensitive photoresponsive drug delivery system. **J Mater Chem B** [Internet]. 2015,3(17):3490–7. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4TB02081B>
90. Sjöback R, Nygren J, Kubista M. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. **Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc** [Internet]. 1995 Jun,51(6):L7–21. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/058485399501421P>
91. Wang D, Xiang X, Yang X, Wang X, Guo Y, Liu W, et al. Fluorescein-based chromo-fluorescent probe for zinc in aqueous solution: Spirolactam ring opened or closed? **Sensors Actuators, B Chem** [Internet]. 2014,201:246–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.05.019>
92. Doughty MJ. PH dependent spectral properties of sodium fluorescein ophthalmic solutions revisited. **Ophthalmic Physiol Opt**. 2010,30(2):167–74.
93. Shin M, Kim HK, Lee H. Dopamine-loaded poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) microspheres: New strategy for encapsulating small hydrophilic drugs with high efficiency. **Biotechnol Prog**. 2014,30(1):215–23.
94. Jose M V., Thomas V, Johnson KT, Dean DR, Nyairo E. Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. **Acta Biomater** [Internet]. 2009,5(1):305–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.019>
95. Chen R, Okamoto H, Danjo K. Preparation of functional composite particles of salbutamol sulfate using a 4-fluid nozzle spray-drying technique. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**. 2008,56(3):254–9.
96. Zhou YZ, Alany RG, Chuang V, Wen J. Optimization of PLGA nanoparticles formulation containing L-DOPA by applying the central composite design. **Drug Dev Ind Pharm** [Internet]. 2013 Feb 21,39(2):321–30. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03639045.2012.681054>
97. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos [Internet]. **LTC**, 2006. Available from: <https://books.google.com.br/books?id=ygp9PQAACAAJ>
98. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introdução à espectroscopia [Internet]. **CENGAGE**, 2010. Available from: <https://books.google.com.br/books?id=cYwgRAAACAAJ>
99. Lopes WA, Fascio M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. 2004,27(4):670–3.
100. Dey S, Samal HB, Monica P, Reddy S, Karthik G, Gujrati R, et al. Method development and validation for the estimation of glibenclamide in bulk and pharmaceutical dosage forms using UV-Vis spectrophotometric method. **J Pharm Res**. 2011,3(2):3244–6.
101. Yordanov GG, Bedzhova ZA, Dushkin CD. Preparation and physicochemical characterization of novel chlorambucil-loaded nanoparticles of poly(butylcyanoacrylate). **Colloid Polym Sci**. 2010,288(8):893–9.
102. Rahimi M, Kilaru S, Hajj Sleiman G EL, Saleh A, Rudkevich D, Nguyen K. Synthesis and Characterization of Thermo-Sensitive Nanoparticles for Drug Delivery Applications. **J Biomed Nanotechnol** [Internet]. 2008 Dec 1,4(4):482–90. Available from: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1550->

- 7033&volume=4&issue=4&spage=482
103. Messaritaki A, Black SJ, van der Walle CF, Rigby SP. NMR and confocal microscopy studies of the mechanisms of burst drug release from PLGA microspheres. **J Control Release** [Internet]. 2005 Nov,108(2–3):271–81. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365905003755>
 104. Faisant N, Siepmann J, Benoit JP. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. **Eur J Pharm Sci** [Internet]. 2002 May,15(4):355–66. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098702000234>
 105. Stolnik S, Garnett MC, Davies MC, Davis SS. The colloidal properties of surfactant-free biodegradable nanospheres from poly(β -malic acid-co-benzyl malate)s and poly(lactic acid-co-glycolide). **Colloids Surf A Physicochem Eng Asp** [Internet]. 1995 [cited 2017 Jul 16],97(3):235–45. Available from: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3502612>
 106. Ståhl K, Claesson M, Lilliehorn P, Lindén H, Bäckström K. The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray dried insulin intended for inhalation. **Int J Pharm**. 2002,233(1–2):227–37.
 107. D’Avila Carvalho Erbeta C, Alves RJ, Resende JM, Freitas, Roberto Fernando de Souza Sousa RG de. Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. **J Biomater Nanobiotechnol** [Internet]. 2012,3(2):208–25. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33845649346&partnerID=40&md5=fff9772b77e03a01e042fe9d679f3b39>
 108. Tsuji H, Mizuno A, Ikada Y. Properties and morphology of poly(L-lactide). III. Effects of initial crystallinity on long-term in vitro hydrolysis of high molecular weight poly(L-lactide) film in phosphate-buffered solution. **J Appl Polym Sci** [Internet]. 2000 Aug 15,77(7):1452–64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/1097-4628%2820000815%2977%3A7%3C1452%3A%3AAID-APP7%3E3.0.CO%3B2-S>
 109. Costa PJC da. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Rev Bras Ciências Farm** [Internet]. 2002 Jun,38(2):141–53. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000200003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 110. Wang M-Y, Chen P-S, Prakash E, Hsu H-C, Huang H-Y, Lin M-T, et al. Connective Tissue Growth Factor Confers Drug Resistance in Breast Cancer through Concomitant Up-regulation of Bcl-xL and cIAP1. **Cancer Res** [Internet]. 2009 Apr 7,69(8):3482–91. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-08-2524>
 111. Sureshbabu A, Okajima H, Yamanaka D, Tonner E, Shastri S, Maycock J, et al. IGFBP5 induces cell adhesion, increases cell survival and inhibits cell migration in MCF-7 human breast cancer cells. **J Cell Sci** [Internet]. 2012 Apr 1,125(7):1693–705. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.092882>
 112. Bachman H, Nicosia J, Dysart M, Barker TH. Utilizing Fibronectin Integrin-Binding Specificity to Control Cellular Responses. **Adv Wound Care** [Internet]. 2015 Aug,4(8):501–11. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/wound.2014.0621>
 113. Braun K, Wiessler M, Pipkorn R, Ehemann V, Bäuerle T, Fleischhacker H, et al. A cyclic-RGD-BioShuttle functionalized with TMZ by DARinv “Click Chemistry” targeted to $\alpha\beta3$ integrin for therapy. **Int J Med Sci** [Internet]. 2010 Sep 21,7(6):326–39. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20922134>
114. Bellis SL. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. **Biomaterials** [Internet]. 2011 Jun,32(18):4205–10. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211001815>
 115. Cai W, Chen X. Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin alphavbeta3 antagonism. **Anticancer Agents Med Chem** [Internet]. 2006 Sep,6(5):407–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17017851>