



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

**NANOPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO CLORAMBUCIL E
FUNCIONALIZADAS COM *O*-ESTEAROIL MANOSE: SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA AÇÃO CITOTÓXICA EM
CÉLULAS TUMORAIS MCF-7**

ANTONIO OLIVEIRA DA COSTA

BRASÍLIA
2019



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

ANTONIO OLIVEIRA DA COSTA

**NANOPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO CLORAMBUCIL E
FUNCIONALIZADAS COM *O*-ESTEAROIL MANOSE: SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA AÇÃO CITOTÓXICA EM CÉLULAS
TUMORAIS MCF-7**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes

Brasília – DF
2019

Dedico este trabalho a minha esposa Maria, meu filho Adriel, minha mãe e meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a YHWH (יהוה) por ser meu ajudador e suporte durante todo o caminho trilhado até aqui. Agradeço ao orientador Professor Dr. Anderson de Jesus Gomes e à Professora Dra. Claire Nain Lunardi Gomes, por terem me aceitado como orientando, pela confiança, ajuda, apoio, ensinamento das técnicas, pelos momentos de orientação, correção, advertência, e pela paciência para comigo durante a realização do trabalho.

Agradeço ao colega Dr. Diego Juscelino Santos Dias pela ajuda dada no uso dos equipamentos do laboratório de pesquisa e, portanto, ao desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço a Professora Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva do laboratório do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, pela realização dos testes biológicos, pelas dicas e conversas muito proveitosas.

Agradeço a todos os professores que tive durante este programa de pós-graduação; todas as aulas foram muito proveitosas e sempre aprendi coisas novas. Por ordem cronológica: Professor Dr. Anderson de Jesus Gomes e Professora Dra. Claire Nain Lunardi Gomes; Professora Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos; Professor Dr. Luciano Paulino da Silva; Professor Dr. Sebastião William da Silva, Professor Dr. Paulo Eduardo Narciso de Souza e Professor Dr. José Antonio Huamaní Coaquira; Professora Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava; Professor Dr. Marcelo Henrique Sousa, Professora Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva e Professora Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro; Professora Dra. Sônia Nair Bão.

Agradeço a CAPES, uma vez que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, que indiretamente patrocina o Sistema de Pós-graduação Brasileiro.

Agradeço ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Acre – IFAC (instituição da qual sou servidor) por ter me concedido a oportunidade de participar deste programa de pós-graduação.

Não poderia deixar de agradecer a minha esposa Maria da Conceição da Silva Alves Oliveira pelo companheirismo e dedicação, sendo meu suporte familiar. Agradeço também a minha mãe Maria Araújo de Oliveira que a pesar de está a mais de 3.000 km de distância sempre esteve próxima.

Os céus declara a glória do El, e sua expansão mostra as obras de suas mãos. ²Dia após dia transmite este discurso, e noite após noite revela o conhecimento. ³Não há termos nem linguagem onde a sua voz não se escute. ⁴O seu cordel passou por toda a terra, e as suas palavras até aos confins do mundo. (...) ¹²Quem pode compreender o seu próprio erro? Limpa-me dos pecados que me são secretos. ¹³Retém teu servo dos pecados da presunção também, não lhes permita que dominem sobre mim; então tornar-me-ei um justo, e então estarei inocente da grande transgressão. ¹⁴Sejam as palavras da minha boca e a meditação do meu coração aceitáveis à tua vista, Óh יהוה, minha força e meu Redentor.

(Salmos 19)

RESUMO

COSTA, A. O. **Nanopartículas de PLGA contendo clorambucil e funcionalizadas com *O*-estearoil manose: Síntese, caracterização e avaliação da ação citotóxica em células tumorais MCF-7.** 2019. 106f. Tese (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia). Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

O clorambucil (CLB) é um fármaco que vem sendo utilizado no tratamento de uma diversidade de cânceres, tais como leucemia linfóide crônica, linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, coriocarcinoma, carcinoma de ovário e carcinoma de mama. No entanto, o mesmo ainda tem uso limitado devido a seus efeitos adversos. Uma abordagem promissora para minimizar esses efeitos é a sua entrega direcionada por meio de sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados, como as nanopartículas poliméricas de PLGA. Outra abordagem promissora para minimizar os efeitos adversos do fármaco é a funcionalização superficial do sistema nanoparticulado com ligantes específicos que visam à entrega direcionada do fármaco para o alvo específico. Assim, o objetivo deste trabalho foi formular e caracterizar nanopartículas de PLGA contendo o fármaco clorambucil funcionalizadas com *O*-estearoil manose, bem como avaliar a sua citotoxicidade em células tumorais MCF-7 e não tumorais NIH-3T3. Para isto, a *O*-estearoil manose (OEM) foi sintetizada a partir do cloreto de estearoil e D-manose que foi posteriormente utilizada na formulação das nanopartículas (NPs). As nanopartículas foram obtidas pelo método de simples emulsificação e evaporação do solvente, sendo caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz, espalhamento eletroforético, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia UV-VIS, espectroscopia de fluorescência, espectroscopia FTIR, análises térmicas TGA e DSC, eficiência de encapsulamento do fármaco e perfil de liberação do fármaco a partir das nanopartículas. Foi avaliada ainda a cinética de liberação do fármaco por meio de quatro modelos matemáticos e também a citotoxicidade das nanopartículas em células tumorais MCF-7 e não tumorais NIH-3T3. Como resultado, as nanopartículas tiveram o tamanho do diâmetro hidrodinâmico médio variando de 185,5 a 220,7 nm, potencial zeta entre -14,2 a -17,7 mV, PDI entre 0,186 a 0,288, apresentaram uma eficiência de encapsulamento superior a 61%. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que as NPs apresentaram morfologia esférica, com as NPs que continham OEM na formulação apresentando um aspecto rugoso. As análises espectroscópicas por UV-VIS, fluorescência e FTIR confirmaram a incorporação e a integridade do CLB nas NPs, bem como a funcionalização das NPs com o OEM. Os resultados das análises térmicas mostraram

que as NPs se mantêm termicamente estáveis sem perda de massa até os 200 °C e que a matriz polimérica tem temperatura de transição vítrea acima dos 43 °C. Os estudos de liberação *in vitro* mostraram um perfil de liberação bifásica e sustentado tanto para as NPs funcionalizadas como para as NPs não funcionalizadas, as quais foram analisadas considerando os modelos matemáticos de Korsmeyer-Peppas, primeira ordem, difusão de Fick e a combinação dos modelos de primeira ordem e difusão de Fick, onde a liberação do CLB a partir das NPs obteve o melhor ajuste com a combinação dos modelos matemáticos de primeira ordem e difusão de Fick. Os resultados dos ensaios de viabilidade celular em células MCF-7 e NIH-3T3 indicaram a que funcionalização das NPs com a OEM pode promover uma maior interiorização das mesmas, e que as NP-CLB-OEM na concentração de 64 µg/mL foram mais eficientes em reduzir a viabilidade celular das células MCF-7, comparando-se com demais NPs na mesma concentração. Desta forma, as NPs formuladas se apresentam como um sistema de liberação de fármaco com liberação sustentada promissor, que pode contribuir para o aumento dos índices de seletividade e eficiência terapêutica e diminuição dos efeitos adversos.

Palavras-chaves: Nanopartículas de PLGA, *O*-estearoil manose, clorambucil, câncer de mama.

ABSTRACT

COSTA AO. **Chlorambucil-containing PLGA nanoparticles functionalized with *O*-stearoyl mannose: Synthesis, characterization and evaluation of cytotoxic action in MCF-7 tumor cells** [Thesis]. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Brasília; 2019.

Chlorambucil (CLB) is a drug that has been used to treat a variety of cancers, such as chronic lymphoid leukemia, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, choriocarcinoma, ovarian carcinoma, and breast carcinoma. However, it still has limited use due to its adverse effects. One promising approach to minimizing these effects is their targeted delivery through nanostructured drug delivery systems such as PLGA polymer nanoparticles. Another promising approach for minimizing adverse drug effects is the surface functionalization of the nanoparticulate system with specific ligands aimed at targeted delivery of the drug to the specific target. Thus, the objective of this work was to formulate and characterize PLGA nanoparticles containing the chlorambucil drug and functionalized with *O*-stearoyl mannose, as well as to evaluate their cytotoxicity in MCF-7 and non-tumor NIH-3T3 tumor cells. For this, *O*-stearoyl mannose (OEM) was synthesized from stearoyl chloride and D-mannose which was later used in the formulation of nanoparticles (NPs). The nanoparticles were obtained by the simple emulsification and solvent evaporation method, characterized by dynamic light scattering, electrophoretic scattering, scanning electron microscopy, UV-VIS spectroscopy, fluorescence spectroscopy, FTIR spectroscopy, TGA and DSC thermal analysis, drug encapsulation efficiency and drug release profile from nanoparticles. The drug release kinetics was also evaluated by four mathematical models and nanoparticle cytotoxicity was evaluated in MCF-7 and NIH-3T3 cells. As a result, the nanoparticles had an average hydrodynamic diameter size ranging from 185.5 to 220.7 nm, zeta potential from -14.2 to -17.7 mV, PDI from 0.186 to 0.288, had encapsulation efficiency greater than 61%. Scanning electron microscopy showed that the NPs showed spherical morphology, with the NPs containing OEM in the formulation having a hough appearance. UV-VIS, fluorescence and FTIR spectroscopic analyzes confirmed the incorporation and integrity of CLB in the NPs, as well as the functionalization of the NPs with the OEM. The results of thermal analysis showed that the NPs remain thermally stable without mass loss up to 200 °C and that the polymer matrix has a glass transition temperature above 43 °C. *In vitro* release studies showed a biphasic and sustained release profile for both systems, functionalized and non-

functionalized NPs, which were analyzed considering first-order, Korsmeyer-Peppas mathematical models, Fick diffusion and the combination of the first order and Fick diffusion, where the release of CLB from the NPs obtained the best fit with the combination of first order and Fick diffusion mathematical models. Results of MCF-7 and NIH-3T3 cell viability assays indicated that the functionalization of the NPs with the OEM can promote their greater internalization, and that the NP-CLB-OEM at the concentration of 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were higher efficient in reducing cell viability of MCF-7 cells compared to other NPs at the same concentration. Thus, the formulated NPs present themselves as a promising sustained release drug release system, which may contribute to the increase of selectivity and therapeutic efficiency indices and reduction of adverse effects.

Keywords: PLGA nanoparticles, *O*-estearoyl mannose, chlorambucil, breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proporção de mortes globais causadas por doenças não transmissíveis estimadas para o ano de 2016.....	18
Figura 2: Perdas de produtividade relacionadas ao câncer (em dólares) nos países do BRICS estimada para o ano de 2012.....	18
Figura 3: Desenvolvimento de um tecido tumoral a partir de um tecido normal.....	20
Figura 4: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.	22
Figura 5: Fases do ciclo celular.....	24
Figura 6: Representação da geometria molecular e fórmula estrutural condensada do clorambucil.	25
Figura 7: Mecanismo de ação do clorambucil.	26
Figura 8: Nanomedicina.	28
Figura 9: Tipos de nanopartículas.	29
Figura 10: Biodistribuição das nanopartículas em alguns órgãos do corpo humano.....	31
Figura 11: Biodegradabilidade do PLGA com base na hidrólise do copolímero.	32
Figura 12: Sistema de Liberação Controlada.	34
Figura 13: Funcionalização de nanopartículas.	36
Figura 14: Via de sinalização intracelular simples ativada por uma molécula-sinal extracelular.	38
Figura 15: A família de receptores de manose.....	39
Figura 16: Nível de expressão de uPARAP/Endo180 em linhagens celulares.	41
Figura 17: Ilustração esquemática da síntese da O-estearoil manose a partir da D-manose e do cloreto de estearoil.....	48
Figura 18: Ilustração esquemática para a síntese das nanopartículas de PLGA.	50
Figura 19: Ensaio da viabilidade celular em células MCF-7 e NIH-3T3 submetidas ao tratamento com NPs.	59
Figura 20: Fórmula estrutural da D-manose, cloreto de estearoil e O-estearoil manose.	61
Figura 21: Representação esquemática das nanopartículas produzidas.	62
Figura 22: Diâmetro médio e distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas produzidas.....	64
Figura 23: Micrografia MEV das NP-CLB e NP-CLB-OEM.	65
Figura 24: Histograma com a distribuição de tamanho das NPs.....	66

Figura 25: Espectros FTIR da D-manose, cloreto de estearoil e O-estearoil manose.....	68
Figura 26: Comparação entre os espectros de FTIR das NPs, CLB e OEM.....	70
Figura 27: Espectro de absorção normalizado na região UV-Vis do CLB livre.....	72
Figura 28: Espectros de absorção normalizados na região UV-Vis das nanopartículas de PLGA.....	72
Figura 29: Curva de calibração obtida para determinar a concentração do CLB.	73
Figura 30: Espectros de fluorescência do CLB e NPs de PLGA	74
Figura 31: Curvas TGA das NP-VAZ, NP-CLB, NP-CLB-OEM, CLB e OEM.....	76
Figura 32: Curvas DSC das NP-VAZ, NP-CLB, NP-CLB-MAN, CLB e OEM.....	77
Figura 33: Perfil de liberação do CLB a partir das nanopartículas.	79
Figura 34: Plotagem dos resultados obtidos pelos modelos de cinética de liberação para a liberação do CLB a partir das NP-CLB.....	80
Figura 35: Plotagem dos resultados obtidos pelos modelos de cinética de liberação para a liberação do CLB a partir das NP-CLB-OEM.....	81
Figura 36: Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células NIH-3T3 submetidas às nanopartículas no tempo de 24h.....	84
Figura 37: Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células NIH-3T3 submetidas às nanopartículas no tempo de 72h.....	85
Figura 38: Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células MCF-7 submetidas às nanopartículas no tempo de 24h.....	87
Figura 39: Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células MCF-7 submetidas às nanopartículas no tempo de 72h.....	88
Figura 40: Viabilidade celular de células NIH-3T3 submetidas às nanopartículas no tempo de 24h e 72h versus concentração de CLB.....	92
Figura 41: Viabilidade celular de células MCF-7 submetidas às nanopartículas no tempo de 24h e 72h versus concentração de CLB.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta das amostras produzidas.	63
Tabela 2: Eficiência de Encapsulamento das NPs.....	74
Tabela 3: Eventos térmicos observados durante as análises TGA para as amostras de NP-VAZ; NP-CLB, NP-CLB-OEM, CLB e OEM.....	76
Tabela 4: Eventos térmicos observados durante as análises DSC para as amostras de NP-VAZ; NP-CLB, NP-CLB-OEM, CLB e OEM.....	77
Tabela 5: Parâmetros da liberação do CLB a partir das NP-CLB e NP-CLB-OEM.....	82
Tabela 6: Análise de variância entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPS frente às células NIH-3T3 no tempo de 24h e 72h.	85
Tabela 7: Teste de Tukey realizado entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células NIH-3T3 no tempo de 24h e 72h.	86
Tabela 8: Análise de variância entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células MCF-7 no tempo de 24h e 72h.	88
Tabela 9: Teste de Tukey realizado entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células MCF-7 no tempo de 24h e 72h.	89
Tabela 10: Teste de Tukey realizado entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células NIH-3T3 e MCF-7 no tempo de 24h.	90
Tabela 11: Teste de Tukey realizado entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células NIH-3T3 e MCF-7 no tempo de 72h.	91

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%EE – Eficiência de encapsulamento

ATM – Gene da ataxia-telangiectasia mutada (do inglês *ataxia telangiectasia mutated*)

BRCA1 – Gene humano pertencente à classe dos genes supressores de tumor (do inglês, *breast cancer 1*)

BRCA2 – Gene humano pertencente à classe dos genes supressores de tumor (do inglês, *breast cancer 2*)

BRICS – Agrupamento de países de mercado emergente em relação ao seu desenvolvimento econômico que inclui Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul

BRIP1 – Gene da proteína C-terminal helicase 1 de interação com BRCA1

BT-474 – Linhagem celular de câncer de mama humano

CASP 8 – Gene caspase 8

CDH1 – Gene da e-caderina

CHEK2 – Gene checkpoint quinase 2 (do inglês *checkpoint kinase 2*)

CLB – Clorambucil

cm – Centímetro

DEC-205 – Proteína da família dos receptores de manose

DMEM – Meio de cultura modificado (do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

DSC – Calorimetria exploratória diferencial (do inglês *differential scanning calorimetry*)

EDC – Cloridrato de 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EPR – Efeito de permeabilidade e retenção aumentada (do inglês *enhanced permeability and retention effect*)

et al. – E outros

FDA – Agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (do inglês *Food and Drug Administration*)

FGFR2 – Gene receptor 2 do fator de crescimento de fibroblastos

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier (do inglês *Fourier-transform infrared*)

h – Hora

He-Ne – Laser hélio-neônio

HER2 - Proteína tirosina-quinase transmembrana que liga o fator de crescimento epidérmico (do inglês *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*)

INCA – Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva

KBr – Brometo de potássio

kDa – Quilodalton

kN – Quilonewtons

kV – Quilovolts

LSP1 – Gene da proteína específica para linfócitos 1 (do inglês *Lymphocyte Specific Protein 1*)

m/v – Massa por volume

MAP3K1 – gene da proteína quinase ativada por mitogênio quinase quinase 1 (do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1*)

MCF-7 – Linhagem celular de câncer de mama humano, MCF-7 é o acrônimo de *Michigan Cancer Foundation-7*

MDA-MB361 – Linhagem celular de câncer de mama humano (do inglês *MD Anderson-Metastatic Breast-361*)

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

mg – Miligrama

min – Minuto

mL – Mililitro

MR – Proteína receptora de manose (do inglês *mannose receptor*)

MTT – (brometo de 3-(4,5)-dimetilialzólil)-2,5 difeniltetrazólio

mV – Milivolts

mW – Miliwatt

NHS – N-Hidroxisuccinimida

NIH-3T3 – Linhagem celular de fibroblasto murino

nm – Nanômetro

NP-CLB – Nanopartículas de PLGA contendo clorambucil

NP-CLB-OEM – Nanopartículas de PLGA contendo clorambucil e funcionalizadas com *O*-estaroil manose

NP-OEM – Nanopartículas de PLGA vazias funcionalizadas com *O*-estaroil manose

NPs – Nanopartículas

NP-VAZ – Nanopartículas de PLGA vazias

OEM – *O*-estearoil manose

OMS – Organização Mundial de Saúde

PALB2 – gene parceiro e localizador do BRCA2 (do inglês *partner and localizer of BRCA2*)

PdI – Índice de polidispersividade (do inglês *polydispersity index*)

PEG – Polietileno glicol

pH – Potencial hidrogeniônico

PLA2R – Proteína receptora de fosfolipase A₂ do tipo M

PLGA – Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) do inglês *Poly(lactic-co-glycolic acid)*

PTEN – Gene da fosfatase homóloga à tensina (do inglês *phosphatase and tensin homolog*)

PVA – Álcool polivinílico

R² – Coeficiente de determinação

RE – Proteína receptora de estrógeno

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)

rpm – Rotação por minuto

SKBR-3 – Linhagem celular de câncer de mama humano isolada pelo Memorial Sloan-Kettering Cancer Center

STK11/LKB – Gene da serina treonina- quinase 11 (do inglês *Serine/threonine kinase 11*)

SUM-190 – Linhagem celular de câncer de mama humano

TAMs – Macrófagos associados ao tumor - (do inglês *tumor-associated macrophages*)

TGA – Análise termogravimétrica (do inglês *thermogravimetric analysis*)

TGFB1 – Gene do fator de transformação do crescimento beta 1 (do inglês *Transforming Growth Factor Beta 1*)

TOX3 – Gene TOX High Mobility Group Box Family Member 3

TP53 – Gene da proteína de tumor P53 (do inglês tumor protein p53).

UACC-812 – Linhagem celular de câncer de mama humano (do inglês *University of Arizona Cell Culture-812*)

UACC-893 – Linhagem celular de câncer de mama humano (do inglês *University of Arizona Cell Culture-893*)

uPARAP/Endo180 – Proteína da família dos receptores de manose

UV-VIS – Ultravioleta visível

ZR-75-1 – Linhagem celular de câncer de mama humano

ZR-75-30 – Linhagem celular de câncer de mama humano

µL – Microlitro

SUMÁRIO

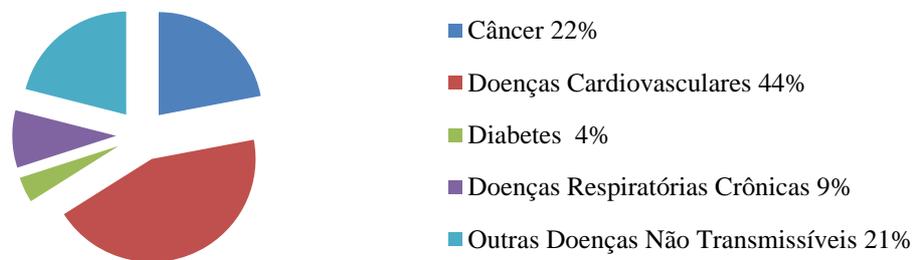
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 O Câncer.....	20
2.1.1 O Câncer de Mama.....	22
2.2 O Clorambucil como um Agente Antitumoral.....	25
2.3 A Nanotecnologia Aplicada a Área da Saúde.....	27
2.4 Nanopartículas de PLGA como Sistema de Liberação de Fármaco.....	31
2.5 Funcionalização de Nanopartículas.....	35
2.6 Receptores de Manose.....	37
2.7 A <i>O</i> -Estearoil Manose como agente direcionador.....	42
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo Geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Materiais.....	45
4.1.1 Reagentes.....	45
4.1.2 Equipamentos.....	46
4.2 Metodologia.....	47
4.2.1 Síntese da <i>O</i> -Estearoil Manose.....	47
4.2.2 Preparo das Nanopartículas.....	49
4.2.3 Medida do Diâmetro Hidrodinâmico e Índice de Polidispersão.....	50
4.2.4 Medida do Potencial Zeta.....	51
4.2.5 Análises Espectroscópicas.....	51
4.2.6 Eficiência de Encapsulamento.....	52
4.2.7 Estudo do Perfil de Liberação.....	53
4.2.8 Análise Matemática da Cinética de Liberação.....	54

4.2.9 Análises Térmicas.....	57
4.2.10 Análise da Morfologia das Nanopartículas	58
4.2.11 Avaliação da Citotoxicidade das Nanopartículas	58
4.2.12 Análises Estatísticas e Gráficas	60
4.3 Estrutura de Apresentação do Trabalho Acadêmico	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Síntese da <i>O</i> -Estearoil Manose.....	61
5.2 Obtenção das Nanopartículas	62
5.3 Caracterização das Nanopartículas	63
5.3.1 Tamanho do Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta..	63
5.3.2 Morfologia das Nanopartículas	65
5.3.3 Avaliação Espectroscópica	67
5.3.4 Eficiência de Encapsulamento.....	74
5.3.5 Análises Térmicas.....	75
5.3.6 Perfil de Liberação e Cinética de Liberação.....	78
5.4 Citotoxicidade das Nanopartículas	83
5 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1 INTRODUÇÃO

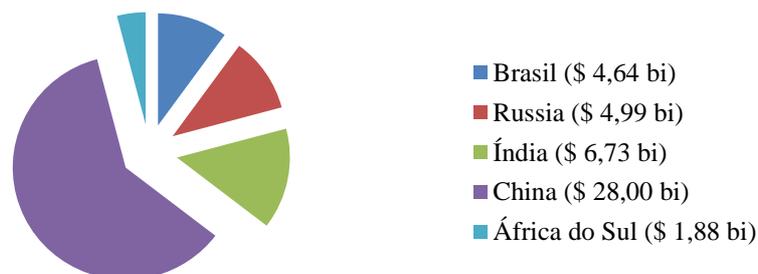
O câncer é a segunda doença não transmissível mais incidente no mundo, e conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2016 representou 22% das causas de mortes a nível mundial nesta categoria (Figura 1), e 16% de todas as mortes a nível global (WHO, 2018). Desta forma, pesquisas que venham contribuir nesta área com o intuito de melhorar o tratamento, bem como reduzir a taxa de mortalidade desta doença são de elevada importância do ponto de vista humanitário, social e econômico. Essa importância do ponto de vista econômico é ressaltada em diversos estudos, como exemplo, no estudo realizado recentemente envolvendo os países Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul (BRICS), que demonstrou que as perdas econômicas relacionadas a essa doença foram da ordem de 46 bilhões de dólares para o ano de 2012 (Figura 2) (PEARCE et al., 2018), bem como os dados da OMS que relataram um custo econômico anual total do câncer em 2010 estimado em aproximadamente 1,16 trilhão de dólares (STEWART e WILD, 2014). Ainda podemos citar os gastos globais com medicamentos contra o câncer, tanto para uso terapêutico quanto para os cuidados de suporte, estimados em 133 bilhões de dólares em 2017 (AITKEN et al., 2018).

Figura 1: Proporção de mortes globais causadas por doenças não transmissíveis estimadas para o ano de 2016.



Fonte: WHO, 2018.

Figura 2: Perdas de produtividade relacionadas ao câncer (em dólares) nos países do BRICS estimada para o ano de 2012.



Fonte: PEACE et al., 2018.

Entre as diversas possibilidades e estratégias existentes que buscam melhorar o tratamento do câncer, podemos citar a utilização de sistemas de liberação de fármaco baseados na nanotecnologia (MIRAKABAD et al., 2014). Nesse sentido, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia – FCE/UnB, o grupo de pesquisa Fotoquímica e Nanobiotecnologia vêm realizando estudos para o encapsulamento de fármacos antitumorais em diferentes matrizes poliméricas. Dentro desta linha de pesquisa, Dias e colaboradores (DIAS, 2012; DIAS et al., 2015) desenvolveram nanopartículas de PLGA contendo o fármaco antitumoral clorambucil com o objetivo de evitar a precipitação sistêmica do fármaco, reduzir os efeitos adversos, aumentar a seletividade e a eficiência quimioterápica. Essas nanopartículas se mostraram mais eficientes quando comparadas com o fármaco livre em testes com células tumorais de mama MCF-7. Posteriormente, Dias desenvolveu novas nanopartículas de PLGA contendo clorambucil, porém funcionalizadas, ou seja, com a superfície recoberta com o peptídeo direcionador ciclo-RGD. Esta funcionalização visava o direcionamento do fármaco para receptores específicos expressos em células tumorais, para assim, obter uma maior especificidade e uma melhor interiorização por estas células. Estas nanopartículas foram novamente testadas contra células tumorais MCF-7 e mostraram-se mais eficientes quando comparadas as nanopartículas não funcionalizadas (DIAS, 2017).

Dando sequência a esses estudos já realizados pelo grupo de pesquisa, este trabalho tem como objetivo desenvolver nanopartículas de PLGA contendo o fármaco clorambucil e funcionalizadas com *O*-estearoil manose. Essa funcionalização visa melhorar o direcionamento do fármaco que já apresenta uso clínico em uma diversidade de cânceres, mas que apresentam efeitos adversos. A estratégia de funcionalização com a molécula *O*-estearoil manose é adotada devido ao conhecimento de que uma diversidade de tumores apresenta expressão elevada de proteínas de membrana que são receptoras de manose (ENGELHOLM et al., 2009), de maneira que a funcionalização das nanopartículas possa aumentar a intensidade e a especificidade de ligação entre as nanopartículas e os receptores de manose expressos nas células tumorais e assim melhore a captação dessas nanopartículas por essas células.

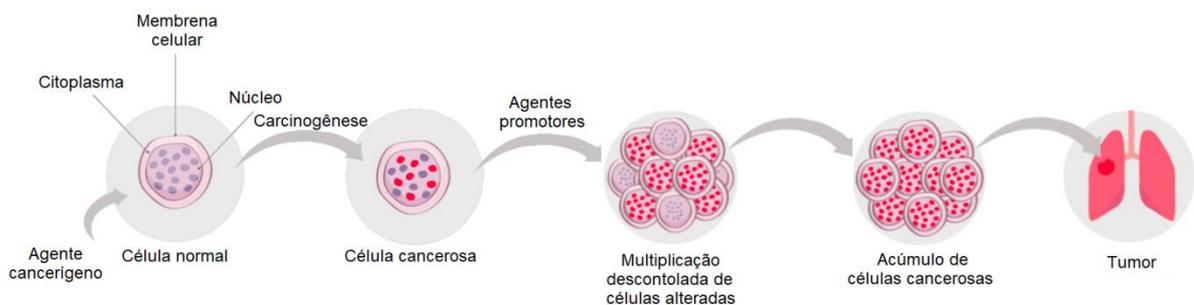
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O Câncer

O câncer é um conjunto de doenças causadas por alterações no genoma, o que quer dizer que o mesmo é uma doença causada devido a alterações nos genes. O gene é definido como uma sequência de DNA cromossômico que é necessária para a produção de um produto funcional, seja este um polipeptídeo ou uma molécula funcional de RNA. Os genes que estão relacionados ao surgimento do câncer são agrupados em oncogenes ou em genes supressores de tumor. Quando ocorre uma alteração anormal nos genes responsáveis pela sinalização de vias que regulam o ciclo celular, ou seja, a transformação de proto-oncogenes em oncogenes, isso pode levar a uma proliferação celular aumentada (surgimento do tumor), por outro lado os genes supressores de tumor atuam freando a proliferação, de modo que quando eles não sofrem mutação funcionam inibindo o surgimento do tumor (tumorigênese) (DEVITA JR et al., 2011).

O processo de desenvolvimento de um tumor ou tecido neoplásico (massa anormal de tecido, cujo crescimento é excessivo, descontrolado e persistente) a partir de um tecido normal é um complexo de múltiplas etapas que envolvem alterações múltiplas das células e dos mecanismos de controle fisiológico, e isso reflete nos longos períodos requeridos pela maioria dos cânceres humanos para se desenvolverem (Figura 3). Essas alterações envolvem a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor que afetam múltiplos circuitos regulatórios distintos nas células e funcionam de modo complementar para criar o fenótipo celular neoplásico (WEINBERG, 2018).

Figura 3: Desenvolvimento de um tecido tumoral a partir de um tecido normal.



Fonte: adaptado de (INCA, 2019)

As células cancerosas apresentam características que as diferenciam das demais células do corpo, como: sustentar a sinalização proliferativa; escapar dos supressores de

crescimento; resistir à morte celular; permitir a imortalidade replicativa; induzir a angiogênese (surgimento de novos vasos sanguíneos), ativar a invasão ao tecido adjacente e a metástase. Subjacente a estas características tem-se a instabilidade genômica, que gera uma diversidade genética que acelera a aquisição do câncer, e a inflamação, que promove múltiplas funções características importantes para a aquisição do câncer. Ainda, pode-se adicionar a essa lista, a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição pelo sistema imunológico. Além de células cancerosas, os tumores exibem outra dimensão de complexidade: eles contêm um repertório de células recrutadas, aparentemente normais que contribuem para a aquisição de traços característicos, criando o microambiente do tumor (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

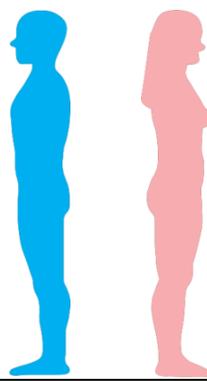
Quanto aos tipos de tecidos que podem dar origem ao câncer, sabe-se que todos os tipos celulares do organismo possuem esta capacidade (WEINBERG, 2018), porém, em humanos os mais comuns são os de origem epitelial, denominados de carcinomas, sendo responsáveis por mais de 80% dos óbitos relacionados ao câncer no mundo ocidental. Os carcinomas são divididos em carcinomas de célula escamosa, desenvolvendo-se do epitélio que formam camadas protetoras, e os adenocarcinomas, desenvolvendo-se de células epiteliais secretoras. Ainda, podemos citar outros tipos de cânceres que tem origem em tecidos distintos, como os sarcomas, originando-se de células mesenquimais; cânceres hematopoiéticos, desenvolvendo-se a partir de células dos sistemas circulatório e imune; e os tumores neuroectodermais, desenvolvendo-se de componentes do sistema nervoso. Outros tumores não se encaixam nesse tipo de classificação, ocorrendo ainda aqueles que não têm sua origem identificada devido à perda de todas as características tecido-específicas, tornando-os indiferenciáveis, sendo denominados de anaplásticos (WEINBERG, 2018).

Referente às causas do câncer, o mesmo não tem uma única causa, existindo vários fatores de risco, ou seja, fatores que aumentam a possibilidade do surgimento do câncer em um indivíduo. Esses fatores podem ser de origem física, como a exposição a radiações ionizantes ou exposição excessiva à radiação solar; ou de origem química, estando relacionados às substâncias oriundas da poluição química, de uma alimentação inadequada, do uso excessivo do álcool e do tabagismo. Os fatores podem ainda ser de origem biológica, como algumas infecções virais que podem promover o câncer, havendo também fatores como a inatividade física e o envelhecimento que favorecem o seu surgimento (AMES e GOLD, 1998; INCA, 2013).

O câncer, como citado acima, é uma doença que vem causando um grande número de mortes. Como exemplo, para o ano de 2016 foi estimado um número de nove milhões de mortes, representando a segunda maior causa de mortes por doenças não transmissíveis para aquele ano e 16% de todas em nível mundial (WHO, 2018).

Em nível mundial, o câncer mais incidente nos homens é o câncer de pulmão, e nas mulheres o câncer de mama (STEWART e WILD, 2014). No Brasil, o número estimado de novos casos de câncer para os dez tipos de cânceres mais incidentes em homens e em mulheres (excluindo-se o câncer de pele não melanoma) para o ano de 2018 foi de 308.640 novos casos, sendo o câncer de próstata o mais incidente entre homens (com 68.220 novos casos) e o câncer de mama entre as mulheres (com 59.700 novos casos) (INCA, 2017). A Figura 4 ilustra a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, onde se exclui o câncer de pele não melanoma, o câncer mais incidente tanto em homens (85.170 novos casos), como em mulheres (80.410 novos casos) (INCA, 2017).

Figura 4: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,70%	Homens 	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,50%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,70%			Cólon e Reto	18.980	9,40%
Cólon e Reto	17.380	8,10%			Colo do Útero	16.370	8,10%
Estômago	13.540	6,30%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,20%
Cavidade Oral	11.200	5,20%			Glândula Tireoide	8.040	4,00%
Esôfago	8.240	3,80%			Estômago	7.750	3,80%
Bexiga	6.690	3,10%			Corpo do Útero	6.600	3,30%
Laringe	6.390	3,00%			Ovário	6.150	3,00%
Leucemias	5.940	2,80%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,70%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,70%			Leucemias	4.860	2,40%

Fonte: INCA, 2017

2.1.1 O Câncer de Mama

O câncer de mama é um entre os diversos tipos de carcinoma, e se configura como uma doença heterogênea que entre as suas causas estão envolvidas a acumulação progressiva de aberrações genéticas, como mutações pontuais, ampliações cromossômicas, deleções, rearranjos, translocações e duplicações. Todas essas alterações genéticas podem ocorrer tanto

em células somáticas, bem como em células germinativas, o que neste caso ocorrem em menor frequência (10%) (DEVITA JR et al., 2011).

A maioria dos casos de câncer de mama, reportados na literatura, são esporádicos, isto é, não possui uma associação com o histórico familiar. Por outro lado, estes associados ao histórico familiar, são em maior parte, atribuídos a mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 (VIEIRA et al., 2008). Além dos genes já citados, diversos outros genes estão relacionados ao câncer de mama, dos quais podemos citar: ATM, BRIP1, CASP 8, CDH1, CHEK2, FGFR2, LSP1, MAP3K1; PALB2, PTEN, STK11/LKB, TGFB1, TOX3 e TP53 (DEVITA JR et al., 2011).

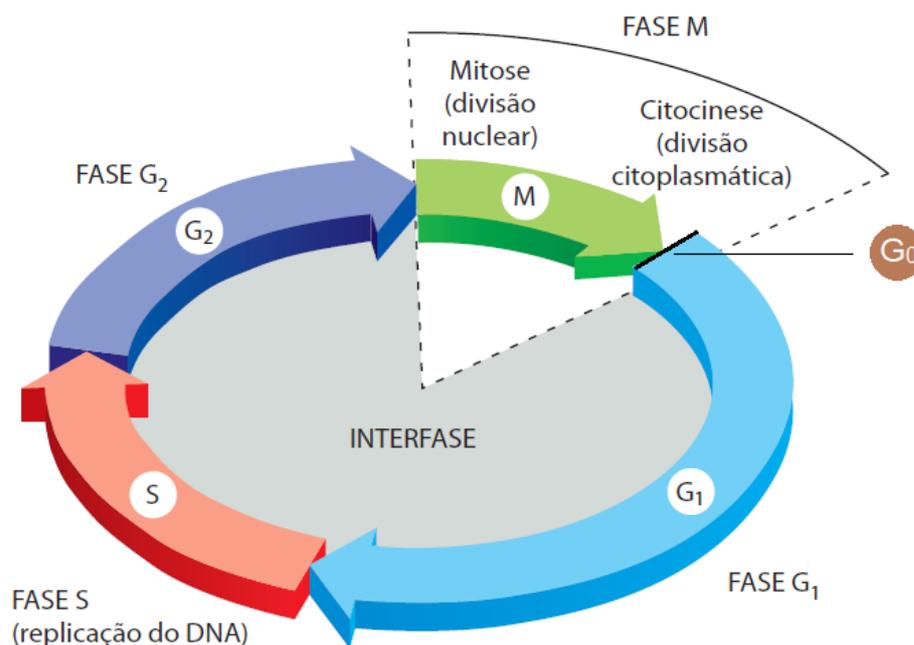
Embora o câncer de mama seja heterogêneo ele pode ser classificado em cinco tipos diferentes de acordo com suas características, sendo assim, classificado em luminal A, luminal B, *superexpressão* do HER2, basal e normal *breast-like*. Os cânceres de mama do tipo luminal A apresentam elevada expressão de genes representados pelas células epiteliais luminais e são RE positivo, isto é, essas células tumorais expressam receptores de estrogênio e HER2 negativo (HER2 = proteína tirosina-quinase transmembrana que liga o fator de crescimento epidérmico); os do tipo luminal B são RE positivo e HER2 positivo, apresentando baixa ou moderada expressão de genes de células epiteliais luminais; o tipo *superexpressão* do HER2 é RE negativo, HER2 positivo e *superexpressa* a proteína HER2; o tipo basal é RE negativo, HER2 negativo e expressa proteínas que são expressas nas células basais/mioepiteliais; o tipo normal *breast-like* tem como característica a expressão de muitos genes conhecidos por serem expressos pelo tecido adiposo e por outros tipos de células não epiteliais (VIEIRA et al., 2008).

Quanto ao tratamento, o câncer de mama pode ser tratado por meio de cirurgia (mastectomia), radioterapia, hormonioterapia e quimioterapia, e a depender do caso, o tratamento pode ser combinado, como exemplo, cirurgia e quimioterapia; radioterapia e quimioterapia; quimioterapia e hormonioterapia. Na quimioterapia diversos fármacos podem ser utilizados no tratamento de forma individual ou combinados (INCA/MS, 2001).

Os fármacos utilizados na quimioterapia podem apresentar duas rotas diferentes na forma como atuam, assim, esses fármacos podem exercer sua ação sobre as células que se encontram em uma determinada fase do ciclo celular, sendo denominados de fármacos ciclo-celular específicos, ou apresentar capacidade de eliminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo, ou de estarem no estado de repouso G_0 , sendo denominados de fármacos ciclo-celular não específicos (ALMEIDA et al., 2005). Na

Figura 5 são mostradas as quatro fases do ciclo celular (M, G₁, S e G₂) com a inclusão do estado de repouso G₀ (ALBERTS et al., 2010). Entre alguns quimioterápicos relacionados ao tratamento do câncer de mama podemos citar a ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil, doxorubicina, epirrubicina (EBCTCG, 2005), paclitaxel (PEREZ et al., 2008) e o clorambucil (DIAS et al., 2015), sendo este último, o fármaco utilizado neste trabalho.

Figura 5: Fases do ciclo celular.



Fases do ciclo celular. Na maioria das células, fases de intervalo separam os principais eventos da fase S e da fase M. A G₁ é o intervalo entre a fase M e a fase S, enquanto a G₂ é o intervalo entre a fase S e a fase M. G₀ é o estado de repouso. Adaptado de Alberts et al., 2010.

No âmbito da pesquisa, as atividades que contribuem para uma eventual aprovação e uso de novos medicamentos, como para o câncer de mama, por exemplo, são provenientes de laboratórios acadêmicos, pequenas e grandes empresas farmacêuticas e várias outras organizações de pesquisa. Assim, entre os tipos de atividades de pesquisa necessárias e requeridas para produzir um novo medicamento estão listados (MOHS e GREIG, 2017):

- Identificação do alvo – novo receptor, enzima, via, proteína, outros;
- Validação do alvo – dados que ligam o alvo à doença humana;
- Encontrar novas moléculas – de origem química ou biológica;
- Ensaios de rastreio – em linhagens celulares, modelos animais, outros.
- Elaboração de dados sobre características semelhantes a outros medicamentos – farmacocinética e toxicologia;

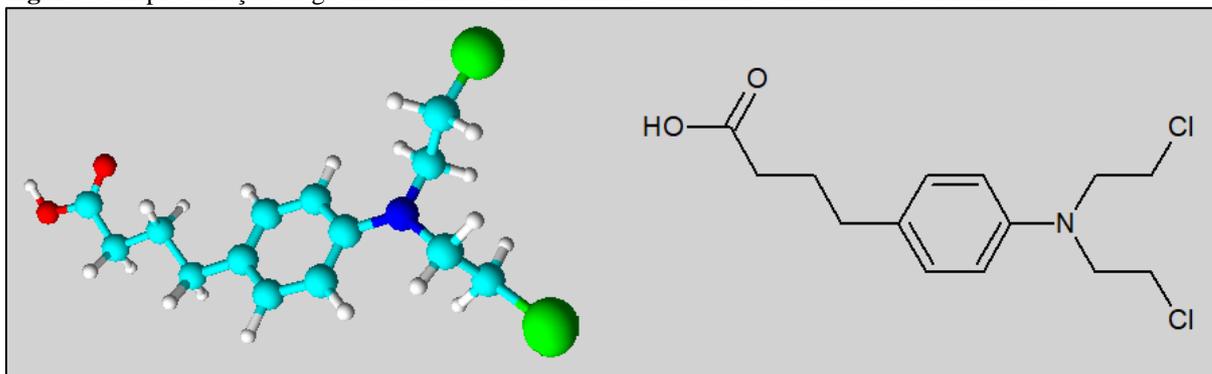
- Desenvolvimento de ferramentas – biomarcadores farmacodinâmicos, incluindo ensaios bioquímicos, medidas eletrofisiológicas, outros.
- Medidas de eficácia - escalas clínicas, testes cognitivos, medidas funcionais, resultados auto relatados, registro eletrônico.
- Tecnologias para melhorar a eficiência da conclusão de testes - tecnologias de recrutamento, captura e rastreamento eletrônico de dados, simulação de testes, monitoramento de segurança, outros.

Os ensaios de rastreio realizados para o câncer de mama se utilizam de linhagens celulares de câncer de mama humano como um dos primeiros passos para testar a eficácia desses compostos. Na atualidade, existem diversas linhagens celulares de câncer de mama humano disponíveis para estudo, das quais podemos citar: BT-474, SKBR-3, UACC-893, UACC-812, MDA-MB361, SUM-190, ZR-75-1, ZR-75-30 e MCF-7.

2.2 O Clorambucil como um Agente Antitumoral

O clorambucil (Figura 6) – ácido 4-(*p*-[bis(2-cloroetil)amino]fenil)butírico – é um derivado aromático da mecloretamina (mostarda nitrogenada), e foi sintetizado pela primeira vez pelos químicos britânicos Everett, Roberts e Ross em 1953 (EVERETT et al., 1953). Este fármaco tem se revelado de grande interesse por apresentar atividades biológicas em uma variedade de malignidades humanas, as quais incluem leucemia linfóide crônica, linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, coriocarcinoma, carcinoma de ovário e carcinoma de mama (TARIQ e AL-BADR, 1987; DAVIES et al., 1999).

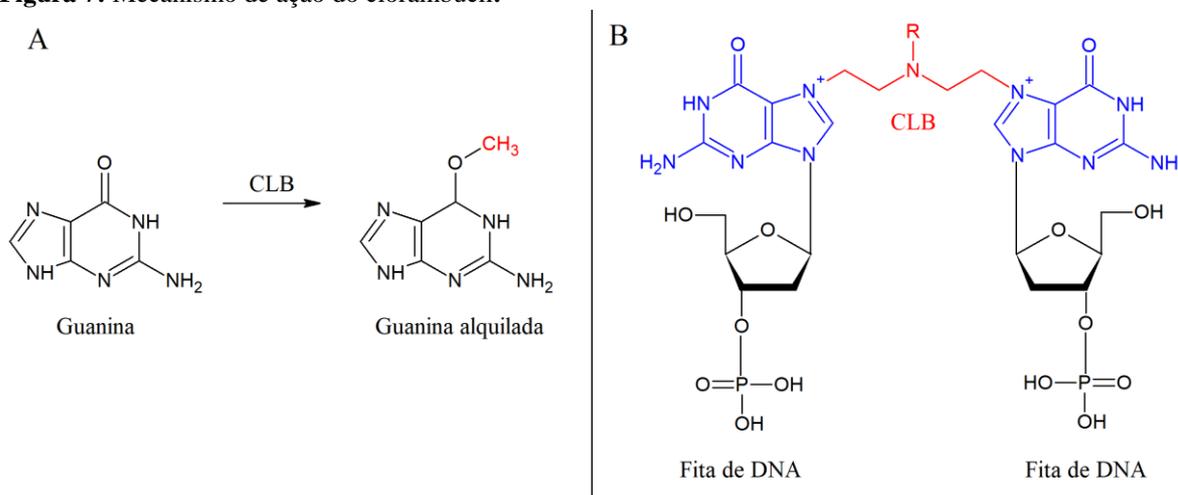
Figura 6: Representação da geometria molecular e fórmula estrutural condensada do clorambucil.



Clorambucil. À esquerda temos a representação da geometria molecular do clorambucil, onde as esferas em ciano representam o carbono; a esfera em azul representa o nitrogênio; as esferas em vermelho representam o oxigênio; as verdes, o cloro, e as brancas, os hidrogênios. A direita tem-se a fórmula estrutural do clorambucil, onde se percebe a presença do anel aromático, do grupo carboxila e do grupo cloreto. Imagem gerada pelos softwares 3D Viewer e ChemSketch do pacote ACDLabs Freeware 2018.

Na forma de medicamento, o clorambucil, também conhecido como LeukeranTM (DAVIES et al., 1999) tem sido recorrentemente utilizado no tratamento inicial da leucemia linfóide crônica, particularmente em pacientes idosos (IARC, 2012). O mesmo é um fármaco ciclo-celular não específicos e atua como um agente alquilante bifuncional (Figura 7), ou seja, apresenta dois grupos reativos capaz de reagir com dois sítios no DNA; desta forma, seu efeito citotóxico é devido à introdução de grupos alquil na cadeia de DNA, em particular no local do N7 das bases da guanina (JI et al., 2015). Esta alquilação pode levar a ligação cruzada, pareamento de bases incorreto ou quebra da fita no DNA, e por consequência a interferência no processo de replicação celular (HANG et al., 2016).

Figura 7: Mecanismo de ação do clorambucil.



Mecanismos de ação do clorambucil. A) Um dos mecanismos de ação do clorambucil é a adição de grupos alquil na cadeia de DNA, em especial, a alquilação da guanina, o que pode levar ao pareamento de bases incorreto. B) Um segundo mecanismo é a formação de ligações cruzadas, ou seja, ligações entre átomos no DNA. Nesse processo, duas bases são ligadas pelo CLB que possui dois locais de ligação ao DNA. As ligações podem ser formadas dentro de uma única molécula de DNA, ou uma ligação cruzada pode conectar duas moléculas de DNA diferentes. Esta ligação impede que o DNA seja separado para síntese ou transcrição. Imagem gerada pelo software ChemSketch, do pacote ACD/Labs Freeware 2018.

O clorambucil (CLB) é um fármaco muito pouco solúvel em água, sendo solúvel em etanol, clorofórmio, acetona, éter etílico e soluções diluídas de hidróxidos alcalinos, sendo ainda sensível à oxidação e a umidade (IARC, 1981).

Estudos realizados com pacientes com linfoma de Hodgkin com objetivo de avaliar a farmacocinética do clorambucil após administração oral do fármaco em uma dose de 10 mg mostraram que níveis máximos de clorambucil foram detectados em torno de 30 minutos a 1 hora após a administração, decaindo posteriormente com um tempo de meia vida de 1,7 horas (NEWELL et al., 1979). Em outro estudo, utilizando uma dose oral de 30 mg de clorambucil em combinação com outras moléculas em pacientes com linfoma não-Hodgkin e carcinoma

de mama, foi encontrado um tempo de meia vida na circulação sanguínea de 1,32 horas para o CLB, quando administrado juntamente com a prednisolona, com a concentração plasmática máxima média ocorrendo em torno de 2,5 horas após a administração (LOOS et al., 1991).

O clorambucil é um fármaco que pode ser administrado por via intravenosa ou por via oral, sendo que quando administrado por via oral é bem absorvido pelo trato gastrointestinal, apresentando uma rápida absorção e depuração plasmática, com tempo de meia vida na circulação sanguínea de 2 horas. Sua metabolização ocorre no fígado, sendo excretado pela urina (IARC, 1981; DRUGBANK, 2019; GLOWM, 2019).

Embora o clorambucil atue no combate aos cânceres citados acima, o mesmo ainda tem uso limitado devido a seus efeitos adversos, como a mielotoxicidade e neurotoxicidade (DIAS et al., 2015). Ensaios clínicos indicam que ele produz supressão da medula óssea, incluindo neutropenia e trombocitopenia (JIN et al., 2001). Desta forma, uma abordagem promissora para minimizar seus efeitos adversos é a sua entrega direcionada por meio de sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados (FAN et al., 2015).

2.3 A Nanotecnologia Aplicada a Área da Saúde

A nanotecnologia é uma área bastante recente, onde as ideias percursoras deste novo ramo surgiram em meados da década de 1950, com os escritos de Artur von Hippel em 1956 e 1959 e com a palestra de Richard Feynman em 1959 (SCHULZ, 2018). O termo nanotecnologia foi citado por Norio Taniguchi em 1974 para designar o processo de transformação por meio de separação, consolidação ou deformação de materiais por átomos ou moléculas (BINNS, 2010). Na atualidade, o termo é definido como o entendimento e controle da matéria em dimensões entre 1 e 100 nm, onde fenômenos únicos permitem novas aplicações (HULLA et al., 2015; ISO, 2015). Dentro desse contexto estão os nanomateriais, que são definidos como materiais que apresentam pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica, que vai de 1 a 100 nm (ISO, 2015).

Temos ainda, as nanopartículas, que são aquelas que apresentam todas as suas dimensões na escala nanométrica (ISO, 2008). Essa definição, no entanto, é controversa, pois há pesquisadores que adotam valores maiores do que 100 nm para designá-la, ou seja, adotam partículas com tamanho variando de 1 a 1000 nm como nanopartículas (MOHANRAJ e CHEN, 2006; SCENIHR, 2010; MALINOVSKAYA et al., 2017). Tal constatação pode ser observada por meio de consulta nas bases de dados do Portal de Periódico da CAPES, uma

biblioteca virtual que reúne e disponibiliza a produção científica internacional divulgada por meio de artigos científicos. Neste portal, é possível verificar que a maioria dos pesquisadores se refere às partículas poliméricas de PLGA entre 100-500 nm como nanopartículas, contrastando com um número bem menor as reportando como micropartículas (CAPES, 2018).

Inserido no contexto da nanotecnologia, também temos a nanomedicina, que está relacionada à intervenção médica altamente específica na escala molecular para diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças (Figura 8). Na nanomedicina, por vezes, ao se fazer referência à nanotecnologia, por razões práticas, também se inclui a microtecnologia e por fim ao se referir a nanofabricação inclui-se também a microfabricação (PARK, 2007).

Figura 8: Nanomedicina.

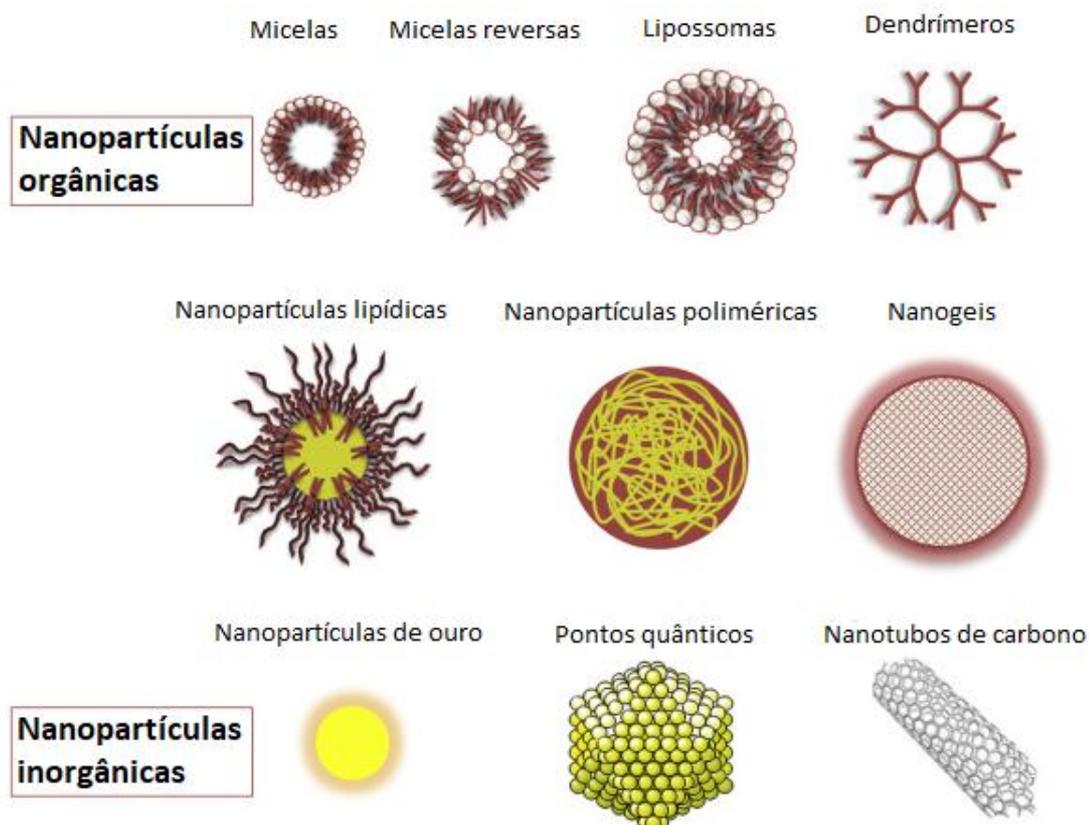


A nanomedicina está relacionada à intervenção médica altamente específica na escala molecular para diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças, onde se inclui o diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, imagiologia médica, nano-terapêuticos, vacinas e medicina regenerativa. Adaptado de (ETPN, 2019).

No contexto da nanomedicina existe uma diversidade de nanomateriais, e estes, têm ganhado uma diversidade de aplicações, podendo ser classificados como orgânicos e inorgânicos (Figura 9). Dentro da classe dos nanomateriais orgânicos podemos citar os lipossomos, as nanopartículas lipídicas sólidas, os dendrímeros e as nanopartículas/micropartículas poliméricas. Enquanto para a classe dos nanomateriais inorgânicos têm-se as nanopartículas de ouro, nanopartículas de prata, nanopartículas de óxido de ferro (nanopartículas magnéticas), nanopartículas de sílica, nanotubos de carbono,

pontos quânticos, entre outros (CAO, 2004; MOHANRAJ e CHEN, 2006; CIOFFI e RAI, 2012; ANDRÉ et al., 2016).

Figura 9: Tipos de nanopartículas.



As nanopartículas podem ser classificadas como orgânicas e inorgânicas. Dentre as orgânicas podemos citar as micelas, micelas reversas, lipossomas, dendrímeros, nanopartículas lipídicas sólidas e as nanopartículas/micropartículas poliméricas. Enquanto para as inorgânicas temos as nanopartículas de ouro, nanopartículas de prata, nanopartículas de óxido de ferro (nanopartículas magnéticas), nanopartículas de sílica, nanotubos de carbono, pontos quânticos, entre outros. Adaptado de (FRANCIA, 2018).

Entre as inúmeras aplicações que os nanomateriais podem apresentar dentro do contexto da nanomedicina, podemos destacar o diagnóstico *in vitro*, o diagnóstico por imagem, técnicas terapêuticas, produção de nanomateriais biocompatíveis para uso em implantes médicos e sistema de liberação de fármaco (SHI et al., 2010). No diagnóstico *in vitro*, biomarcadores de doenças, por exemplo, proteínas específicas, podem ser detectados por meio de dispositivos baseados na nanotecnologia, como os chips microfluídicos para volumes em nanolitros (NanoChipTM), nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas (ferrofluidos), pontos quânticos, nanofios, entre outros. Para isso, menores quantidades de amostras são necessárias e o resultado pode ser mais rápido e a detecção mais sensível quando

comparado aos exames diagnósticos tradicionais. Além disso, os exames diagnósticos tradicionais também podem ser melhorados por meio do uso da nanotecnologia (JAIN, 2003).

Podemos destacar também, o diagnóstico por imagem, que pode fornecer informações sobre estágios e progressos de doenças, o qual tem recorrido ao uso da nanotecnologia, como por exemplo, o uso das nanopartículas magnéticas, pontos quânticos e nanotubos de carbono, visando uma maneira mais rápida e menos invasiva para o diagnóstico de doenças (SHI et al., 2010).

Os nanomateriais também podem apresentar propriedades terapêuticas intrínsecas, como exemplo, as nanopartículas de prata (AHLUWALIA et al., 2014), nanopartículas de ouro (BINDHU e UMADEVI, 2014) e nanopartículas de dióxido de titânio (SELVAM et al., 2012) têm sido reportadas como agentes antimicrobianos, enquanto nanopartículas magnéticas têm sido empregadas no tratamento do câncer, por meio de hipertermia magnética, onde células tumorais são levadas a morte por meio da elevação da temperatura (DI CORATO et al., 2014).

Outra aplicação da nanotecnologia é a produção de nanomateriais biocompatíveis que apresentem características que sejam ideais para uso em transplante médicos, como materiais para uso dentário ou substitutos ósseos. O recobrimento de materiais para transplantes com nanoestruturas tem sido estudado para melhorar a biocompatibilidade, a adesão e/ou a diminuição de infecções (SHI et al., 2010).

Os nanomateriais também vêm sendo bastante utilizados como sistemas de liberação de fármacos. Assim, eles são concebidos de forma a se obter partículas com tamanho, propriedades superficiais e liberação dos agentes farmacologicamente ativos de maneira controlável, para que o medicamento atinja seu alvo específico na dose e na taxa terapêutica ideal. Desta forma, alguns requisitos como a biocompatibilidade, compatibilidade da matriz com as substâncias a serem veiculada, cinética de biodegradação e propriedades mecânicas são observados na preparação desses sistemas (MIRAKABAD et al., 2014).

Esses sistemas de liberação nanoestruturados podem ser desenvolvidos pensando-se na entrega direcionada do fármaco, onde neste caso usam-se ligantes específicos que visam levar o fármaco ao local desejado. Outra abordagem terapêutica consiste na utilização de mais de um fármaco que pode ser transportado por esse sistema, permitindo a combinação de medicamentos com efeitos sinérgicos, o que pode potencializar a ação terapêutica (SHI et al., 2010). Um dos sistemas baseados na nanotecnologia que tem ganhado destaque como um sistema de liberação de fármaco promissor são as nanopartículas/micropartículas de PLGA

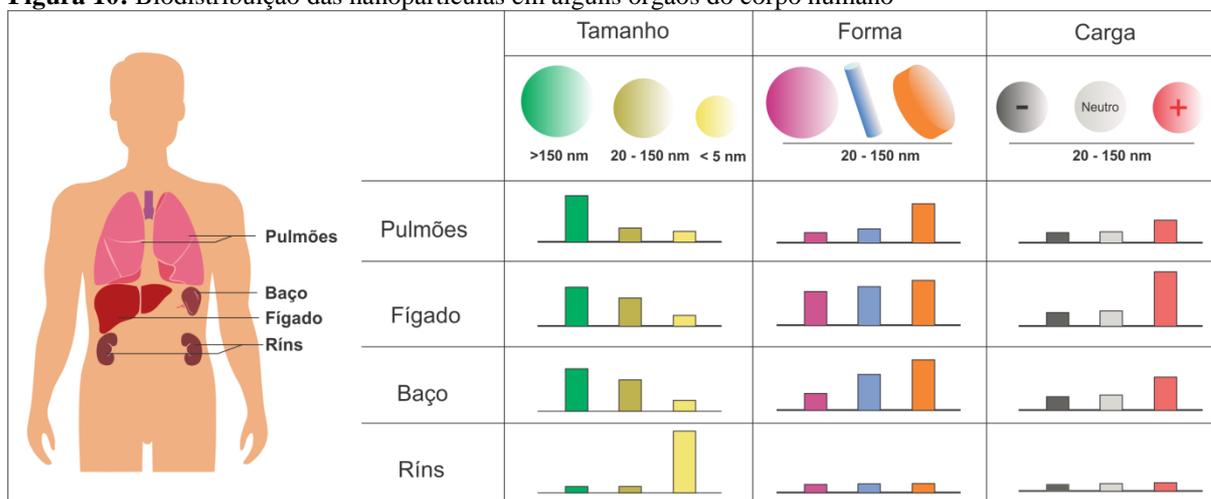
(CHENG et al., 2007; LOCATELLI e FRANCHINI, 2012; NICOLAS et al., 2013; MIRAKABAD et al., 2014).

2.4 Nanopartículas de PLGA como Sistema de Liberação de Fármaco

Um sistema de liberação de fármaco consiste em um método ou processo de administração de um princípio ativo para alcançar um efeito terapêutico em humanos ou animais, onde normalmente é desejável que esse sistema apresente uma liberação numa taxa controlada e direcionada (TIWARI et al., 2012).

Para sistemas de liberação de fármaco baseados na nanotecnologia entre os parâmetros a serem considerados tem-se o tamanho, distribuição de tamanho, morfologia da superfície, carga superficial, eficiência de encapsulamento, estabilidade e cinética de liberação do fármaco (MIRAKABAD et al., 2014). Esses parâmetros são responsáveis por influenciar na biodistribuição, no tempo de meia-vida na circulação sanguínea, na biodisponibilidade e na absorção celular. Como exemplo, nanopartículas com tamanho próximo a 100 nm e com carga superficial negativa apresentam um tempo de meia-vida de eliminação mais longo quando comparadas a nanopartículas com carga superficial positiva, e nanopartículas discoides são mais bem absorvidas quando comparadas as esféricas. A Figura 10 a seguir ilustra a biodistribuição das nanopartículas nos órgãos como pulmões, fígado, baço e rins; nota-se que a biodistribuição das mesmas nesses órgãos é dependente do tamanho, da forma e da carga superficial (BLANCO et al., 2015).

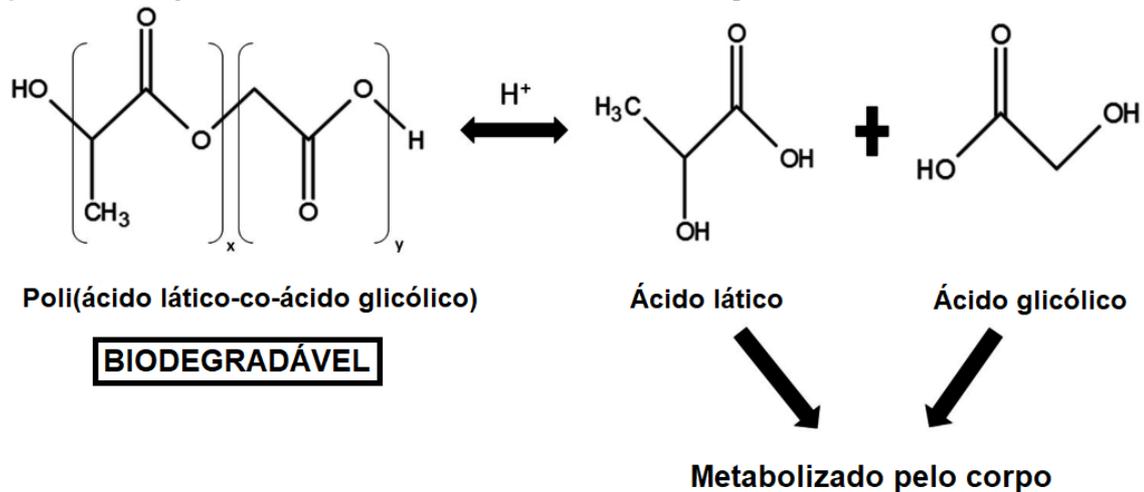
Figura 10: Biodistribuição das nanopartículas em alguns órgãos do corpo humano



O tamanho, a forma e a carga superficial das nanopartículas determinam a biodistribuição. Adaptado de Blanco e colaboradores (BLANCO et al., 2015).

No contexto de sistemas de liberação de fármaco baseados na nanotecnologia o ácido poli (lático-co-glicólico) - PLGA se apresenta como um polímero promissor, uma vez que o seu uso é aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*, uma agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos), bem como vem sendo bastante estudado para o desenvolvimento de dispositivos para administração controlada de medicamentos, pequenas moléculas, proteínas e outras macromoléculas em uso comercial e demais em investigação. O PLGA (Figura 11), que é um copolímero sintético composto por monômeros de ácido glicólico e ácido lático (MIR et al., 2017), além de apresentar características como biocompatibilidade e biodegradabilidade, também exibe propriedades mecânicas ajustáveis, como exemplo, diferentes faixas de tempos de liberação do fármaco podem ser obtidas por nanopartículas de PLGA que apresentam diferentes razões para o ácido lático/ácido glicólico (MAKADIA e SIEGEL, 2011).

Figura 11: Biodegradabilidade do PLGA com base na hidrólise do copolímero.



O PLGA é um copolímero sintético composto por monômeros de ácido lático e ácido glicólico. Ele é degradado por meio de hidrólise produzindo os monômeros de metabólitos biodegradáveis que são metabolizados no corpo através do ciclo do ácido cítrico. Adaptado de (NANOVEXBIOTECHNOLOGIES, 2019)

Quando se diz que o PLGA é biodegradável, significa dizer que o mesmo é degradado *in vivo*, e que essa degradação produz produtos biocompatíveis e toxicologicamente seguros que são eliminados pelas vias metabólicas normais (MAKADIA e SIEGEL, 2011). Assim, o PLGA é degradado por meio de hidrólise no organismo produzindo os monômeros de ácido lático e ácido glicólico. Estes monômeros por sua vez, são metabolizados no corpo através do ciclo do ácido cítrico e removidos como dióxido de carbono e água (MIRAKABAD et al., 2014).

Quando nos referimos a biocompatibilidade, nos referimos a capacidade de um material em executar uma resposta adequada do organismo em uma aplicação específica, sendo que esta resposta adequada resulte no menor dano possível ao organismo ao mesmo tempo em que resolva o problema visado desta aplicação específica (BALA et al., 2004).

Outro aspecto importante do PLGA é a possibilidade de modificação superficial de suas partículas. Diversos materiais têm sido utilizados para modificação superficial das partículas de PLGA, visando que as mesmas escapem dos sistemas de defesa natural do corpo, como o sistema mononuclear fagocitário, também chamado de Sistema Retículo-endotelial. Entre a diversidade de materiais, podemos destacar o polietileno glicol (PEG), os polissorbatos (polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60 e polissorbato 80) e a vitamina E-TPGS (MIRAKABAD et al., 2014).

O PLGA também permite a obtenção de nano e micropartículas por diferentes técnicas, como: emulsificação simples e evaporação do solvente; dupla emulsificação e evaporação do solvente; deslocamento do solvente e salting-out (BALA et al., 2004; MAKADIA e SIEGEL, 2011; SOUTO et al., 2012; MIRAKABAD et al., 2014).

Outra característica do PLGA é a possibilidade do desenvolvimento de NPs para a liberação sustentada de fármacos (MIR et al., 2017). Esses sistemas de liberação controlada são desenvolvidos para melhorar a cinética de liberação do fármaco, e por consequência, a eficácia da terapia medicamentosa; de forma que o nível do fármaco na corrente sanguínea aumente e permaneça constante na faixa efetiva, entre os níveis mínimos efetivos e máximos desejados, de maneira sustentada (HUYNH e LEE, 2015), conforme ilustrado na Figura 12.

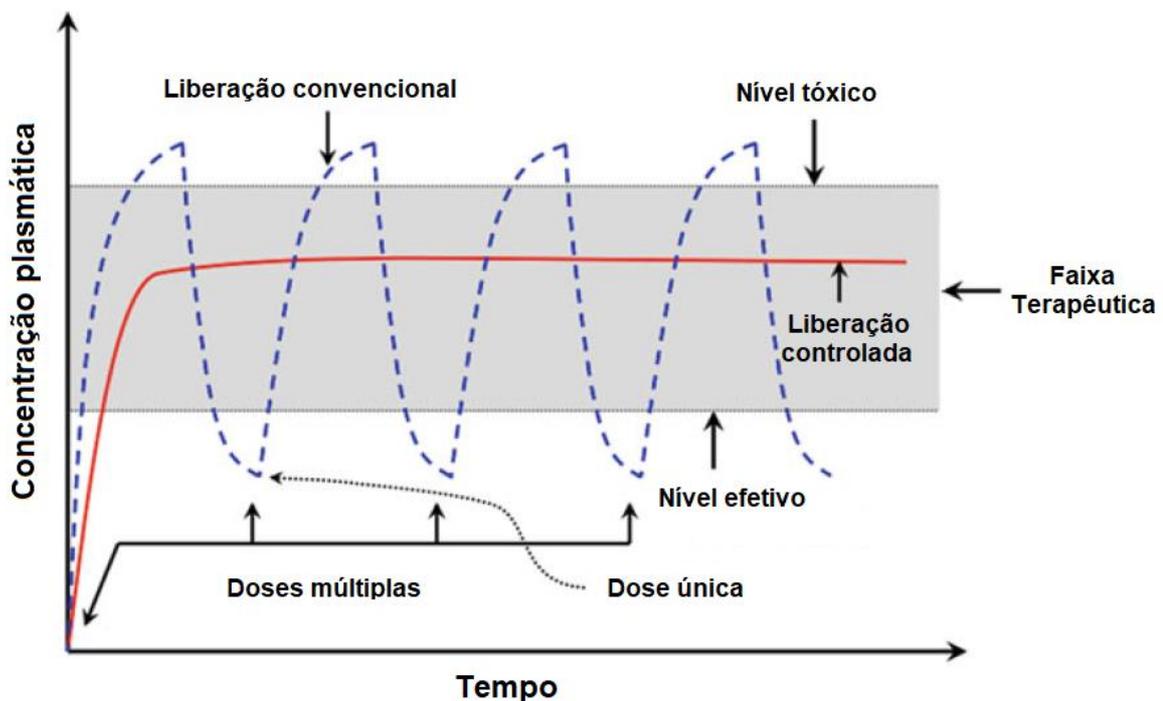
Assim essa liberação controlada pode apresentar algumas vantagens em relação a sistemas de liberação convencional (LYRA et al., 2007), dos quais podemos listar:

- Manter o nível terapêutico com baixa oscilação;
- Impedir níveis tóxicos e efeitos colaterais locais e sistêmicos;
- Evitar subníveis terapêuticos;
- Aumentar as concentrações plasmáticas de princípios ativos de meia-vida relativamente curta;
- Maior segurança na utilização de alguns fármacos de elevada potência.

A liberação de fármacos a partir de matrizes poliméricas como o PLGA envolve diversos fatores, dentre eles, temperatura, pH do meio, tamanho e forma das partículas, peso molecular do fármaco e da matriz, carga do fármaco, solubilidade do fármaco, interação polímero-fármaco, relaxamento da matriz polimérica, hidrólise da matriz, erosão do polímero,

entre outros fatores. Porém, de maneira geral, para uma matriz polimérica composta por PLGA pode-se considerar a liberação do fármaco ocorrendo de três maneiras possíveis: (i) transporte através de poros preenchidos por água; (ii) transporte através do polímero; (iii) dissolução do polímero. Assim, embora o perfil de liberação para as nanopartículas de PLGA seja dependente dos fatores acima citado, no geral, para sistemas de liberação de fármaco baseado no PLGA, tem-se observado um comportamento de liberação bifásica, e em alguns casos um comportamento de liberação trifásica (LUCERO-ACUNA e GUZMÁN, 2015; GUTIÉRREZ-VALENZUELA et al., 2018).

Figura 12: Sistema de Liberação Controlada.



Níveis do fármaco no plasma liberados pelo sistema de liberação convencional em dose única e doses múltiplas (curva tracejada azul) e por um sistema de liberação controlada (curva contínua vermelha). Adaptado de Huynh e Lee, 2015.

Devido às características apresentadas acima, bem como a capacidade que o PLGA tem de encapsular moléculas hidrofílicas ou hidrofóbicas, protegendo-as da degradação e promovendo uma liberação sustentada, as nanopartículas de PLGA vêm sendo estudadas como uma alternativa farmacológica, tendo aplicações como o melhoramento da biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água, terapia do câncer, adjuvantes de vacina, entrega de proteínas e peptídeos, imunoterapia, terapia anti-AIDS, entrega de genes, entre outras aplicações (BALA et al., 2004).

Na terapia do câncer, por exemplo, diversas substâncias antitumorais como paclitaxel, sulfato de vincristina, cisplatina, etopósido, 9-nitrocampotecina, doxorubicina, curcumina, xantonas, triptorrelina e rapamicina foram encapsuladas tendo-se o PLGA como matriz polimérica (MIRAKABAD et al., 2014).

Neste trabalho, o PLGA é utilizado como matriz polimérica para encapsular o fármaco antitumoral clorambucil, como uma forma de melhorar sua eficácia e diminuir sua toxicidade. O uso das nanopartículas de PLGA para o direcionamento do fármaco a células tumorais é baseado na capacidade das nanopartículas em fornecer quantidades adequadas do fármaco para a área do tumor devido ao efeito de permeabilidade e retenção aumentada (efeito EPR; do inglês *enhanced permeability and retention effect*) (IYER et al., 2006), ou por meio de ligantes direcionadores presentes na superfície das nanopartículas obtidos por meio de funcionalização (CHITTASUPHO et al., 2009), bem como na capacidade das nanopartículas diminuir a exposição do fármaco a tecidos saudáveis, limitando a distribuição do fármaco ao sítio específico (MAHAPATRO e SINGH, 2011).

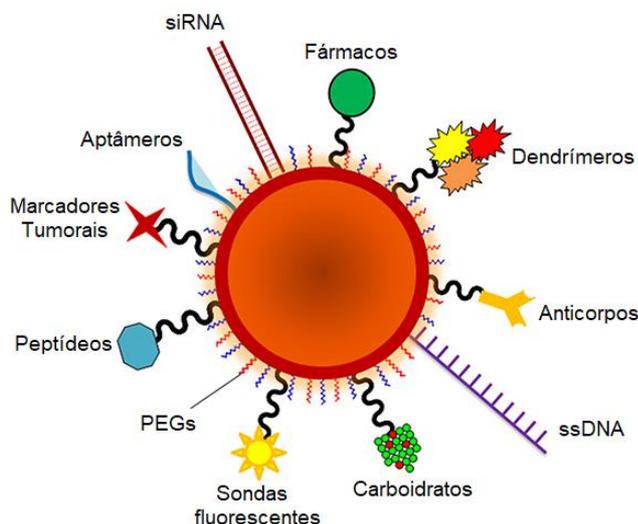
2.5 Funcionalização de Nanopartículas

A funcionalização, especificamente a funcionalização de polímeros é definida como a introdução de grupos químicos desejados por meio de ligação covalente ou adsorção física em moléculas de polímero para criar propriedades químicas, físicas, biológicas, farmacológicas ou outras específicas (HORIE et al., 2004). A escolha da funcionalização de nanopartículas, ou seja, da modificação superficial das nanopartículas, se dar por diversos motivos, do quais podemos destacar a intenção de torná-las biocompatíveis e não imunogênicas para aplicações biomédicas, funcionalização para torná-las dispersáveis em meios aquosos na maioria das aplicações biomédicas, para estabilizar as nanopartículas em meio aquoso por um longo período de tempo, para impedir a aglomeração das nanopartículas, para dar especificidade em relação à célula ou tecido alvo e para tornar grupos funcionais estericamente acessíveis para bioconjugação (KUNUGI e YAMAOKA, 2012). Na Figura 13 são mostradas a diversas possibilidades de funcionalização que podem ser realizadas em nanopartículas (CONDE et al., 2014).

Várias estratégias têm sido adotadas para funcionalizar nanopartículas poliméricas, por exemplo, as nanopartículas de PLGA que vêm sendo formuladas visando escapar do Sistema Retículo-endotelial tem adotado a estratégia de funcionalização com diferentes

compostos como polietileno glicol (PEG), polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60, polissorbato 80 e vitamina E-TPGS (MIRAKABAD et al., 2014).

Figura 13: Funcionalização de nanopartículas.



Funcionalização de nanopartículas. A funcionalização de nanopartículas se dar por diversos motivos, existindo diversos materiais para esse fim, como anticorpos, peptídeos, sondas fluorescentes, carboidratos entre outros. Adaptado de Conde et al., 2014.

A funcionalização das nanopartículas de PLGA é sempre baseada em sua finalidade, como exemplo, nanopartículas de PLGA formuladas como carreadoras de fármacos visando aplicação em tumores HER-2 positivos foram funcionalizadas covalentemente com fragmentos de anticorpos anti-HER-2 por meio da ativação dos grupos carboxílicos na superfície com EDC e NHS (BYRNE et al., 2008). Semelhantemente, nanopartículas de PLGA foram funcionalizadas com aptâmeros por meio da ligação covalente entre o grupo amina do aptâmero e o grupo carboxila do polímero mediada por EDC e NHS visando o direcionamento para células de adenocarcinoma colorretal (LI et al., 2014).

Em outro exemplo, as nanopartículas de PLGA foram funcionalizadas com ácido fólico, visando uma melhor absorção do fármaco paclitaxel contido nas mesmas. A estratégia adotada foi a de uma melhor absorção das nanopartículas pelas células epiteliais do intestino devido aos receptores de folato que elas expressam (ROGER et al., 2012).

Como exemplo de funcionalização por meio de adsorção física, podemos citar a funcionalização de nanopartículas de PLGA com a molécula *O*-estearoil manose, visando o direcionamento destas nanopartículas para as células que expressam receptores de manose, como os macrófagos. Assim, essas nanopartículas funcionalizadas e direcionadas aos macrófagos foram sugeridas como uma estratégia para o tratamento da leishmaniose

(GHOSH et al., 2017). Outra funcionalização de nanopartículas de PLGA com a molécula *O*-estearoil manose foi realizada visando o tratamento do câncer por meio do direcionamento das nanopartículas para os macrófagos associados ao tumor - TAMs (do inglês *tumor-associated macrophages*), uma vez que os TAMs desempenham um papel importante na invasão, proliferação e metástase de tumores (ZHU et al., 2013a).

2.6 Receptores de Manose

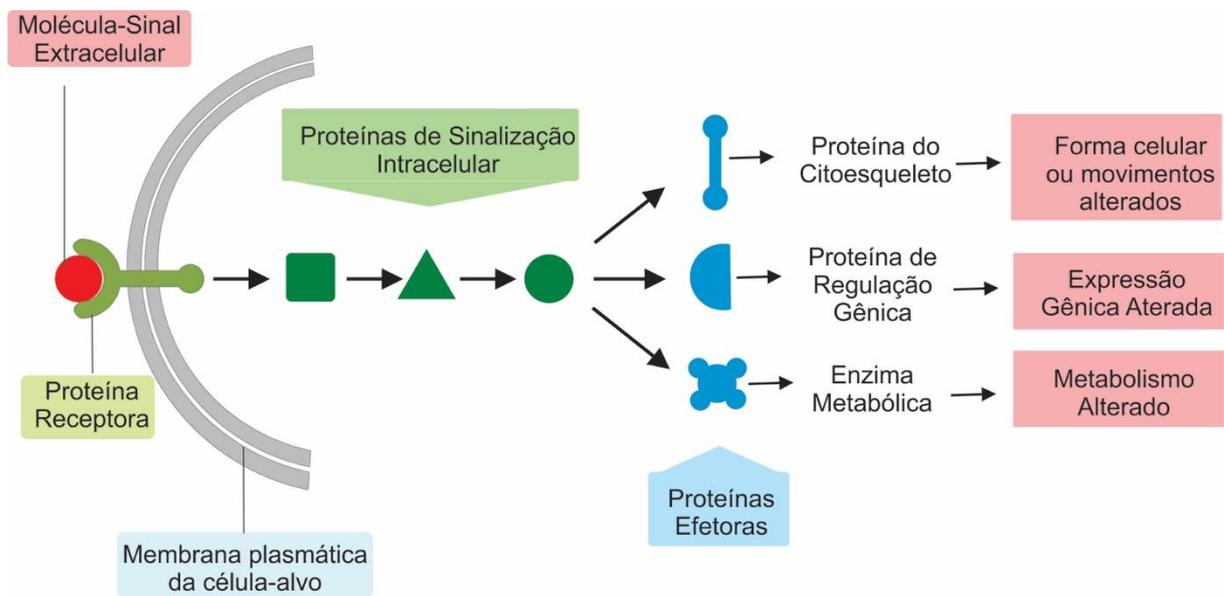
Para o bom funcionamento, formação e manutenção de um organismo multicelular é exigido que as células que formam esse organismo tenham uma boa comunicação entre si, onde essa comunicação envolva mais do que a transmissão de sinais químicos pelo espaço entre uma célula e outra, mas que haja mecanismos intracelulares complexos que controlem os tipos de sinais emitidos, bem como o tempo, e permitam que a célula que recebe este sinal os interprete e os use para conduzir seu comportamento. Esta comunicação é mediada principalmente por moléculas-sinal extracelulares que podem atuar a longas distâncias ou apenas em células vizinhas. Assim, a maioria das células em um organismo emite e recebe sinais, onde essa recepção depende das proteínas receptoras que geralmente estão localizadas na superfície celular, as quais as moléculas-sinal se ligam, de forma que diferentes tipos celulares de um organismo expressam os seus receptores e moléculas-sinal específicos, podendo um mesmo receptor ser expresso por células de diferentes tipos. (ALBERTS et al., 2010).

Quando a molécula sinal se liga ao receptor há a ativação de uma ou mais vias intracelulares de sinalização que transmitem cadeias de moléculas, principalmente proteínas sinalizadoras intracelulares, que processam o sinal e o distribuem para os alvos intracelulares apropriados. Uma representação esquemática dos processos envolvidos na comunicação celular é mostrada na Figura 14 (ALBERTS et al., 2010).

Dentro de uma diversidade de receptores de membrana, que são estudados para serem utilizados no direcionamento sítio específico de fármacos, temos os receptores de manose (BREVET et al., 2009; GARY - BOBO et al., 2011; AHIRE et al., 2013; ZHU et al., 2013a; YE et al., 2016). Os receptores de manose, ou seja, a família de receptores de manose é composta pelas seguintes proteínas: receptor de fosfolipase A₂ do tipo M (PLA2R), DEC-205, receptor de manose (MR) do inglês *mannose receptor*, e o receptor Endo180/uPARAP. Essas quatro glicoproteínas apresentam a mesma composição geral de domínios, com um peptídeo

sinal N-terminal, seguido de um domínio rico em cisteína, um domínio de fibronectina tipo II, dez ou oito domínios tipo lecitina do tipo C, uma região de transmissão transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática, onde a uPARAP/Endo180 e o MR são os únicos membros da família que demonstraram mediar a endocitose de colágeno (EAST e ISACKE, 2002; ZELENSKY e GREASY, 2005; MELANDER et al., 2015). Uma representação esquemática da família de receptores de manose é apresentada na Figura 15.

Figura 14: Via de sinalização intracelular simples ativada por uma molécula-sinal extracelular.

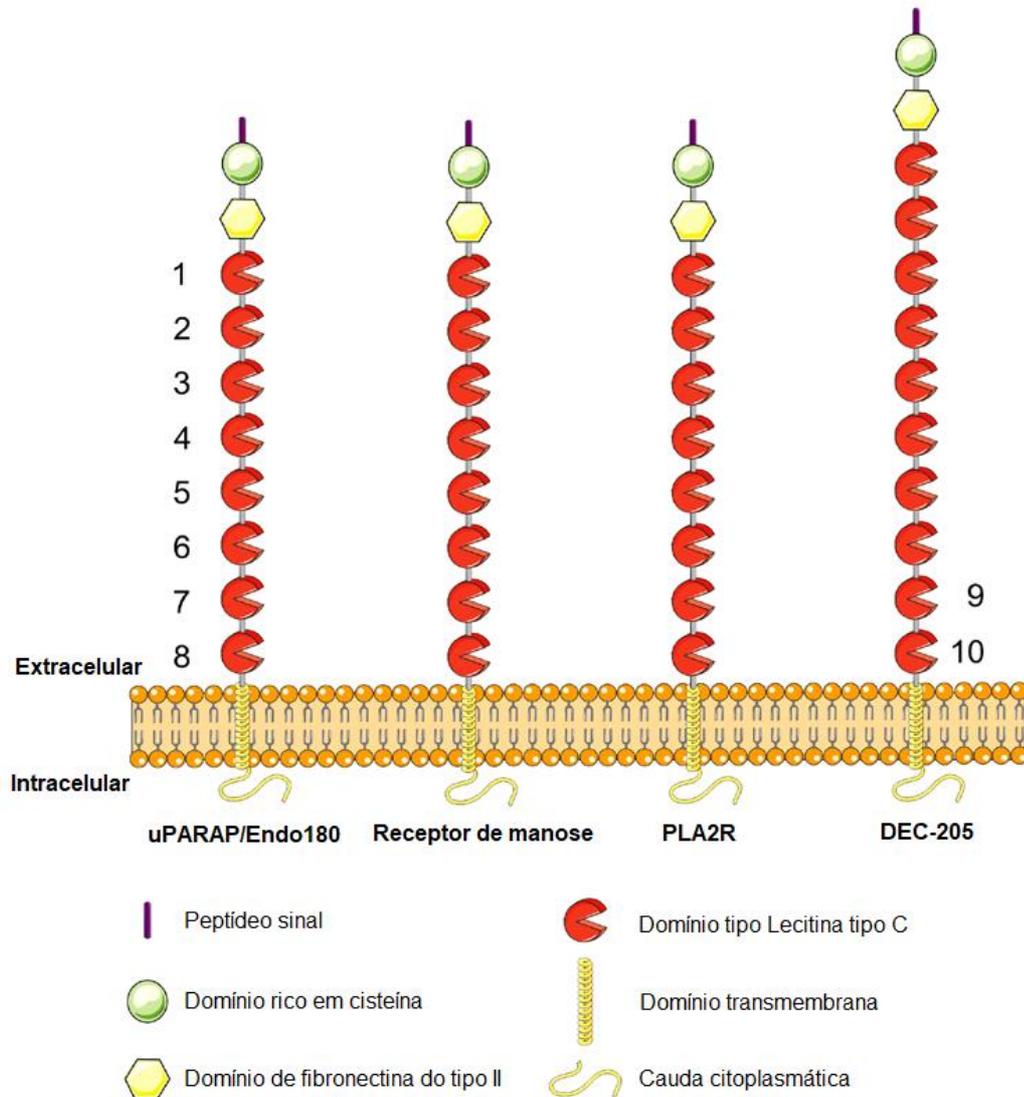


Comunicação celular. A molécula-sinal geralmente se liga a uma proteína receptora inserida na membrana plasmática da célula-alvo e ativa uma ou mais vias intracelulares mediadas por uma série de proteínas sinalizadoras. Finalmente, uma ou mais dessas proteínas alteram a atividade de proteínas efetoras, alterando, assim, o comportamento da célula. Adaptado de Alberts et al., 2010.

As fosfolipases A_2 (PLA_2) são uma família de enzimas lipolíticas envolvidas na digestão fosfolipídica, remodelação das membranas celulares e defesa do hospedeiro. No entanto, além da atividade catalítica, algumas dessas enzimas (as $sPLA_2$) exercem seus efeitos através de receptores de membrana, onde nos mamíferos, foram identificados dois tipos principais de receptores, o PLA_2R do tipo M e o PLA_2R do tipo N. Uma comparação das propriedades de ligação das $sPLA_2$ e das massas moleculares desses dois receptores demonstrou que eles são estrutural e bioquimicamente distintos. O receptor do tipo M é um membro da família de receptores de manose e é amplamente distribuído por todo o corpo em diferentes tecidos, sendo sugerido que ele desempenha um papel importante no desenvolvimento de choque endotóxico, onde este último é um processo inflamatório sistêmico que resulta em dano celular, necrose tecidual e ruptura vascular. Também foi

sugerido que o PLA2R está envolvido em vários processos biológicos, incluindo proliferação celular, migração celular e liberação de hormônios (EAST e ISACKE, 2002).

Figura 15: A família de receptores de manose.



A família de receptores de manose. Representação esquemática dos quatro membros da família das proteínas. Todas as proteínas têm a mesma composição geral de domínios, com um peptídeo sinal N-terminal, seguido de um domínio rico em cisteína, um domínio de fibronectina tipo II, dez ou oito domínios tipo lecitina do tipo C, uma região de transmissão transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática. Adaptado de Melander et al., 2015.

A proteína DEC-205 foi primeiramente identificada em células dendríticas. As células dendríticas, em seu estado imaturo, residem na zona marginal do timo, e após a ativação e internalização do antígeno movem-se para os compartimentos das células T do timo, onde sensibilizam as células T para o antígeno. Essa sequência de eventos é conhecida como maturação, durante esse processo, a expressão de DEC-205 pelas células dendríticas aumenta.

Assim, tem-se sugerido que o DEC-205 funcione nas células dendríticas como um receptor de captação de antígeno, direcionando sua carga para os compartimentos intracelulares, onde é processado para apresentação às células T. Além disso, também foi demonstrado que o DEC-205 apresenta propriedades endocíticas (EAST e ISACKE, 2002).

Foi demonstrado, que além de ser expresso por células dendríticas, o DEC-205 também é expresso em células do epitélio tímico, pulmonar e intestinal, estroma da medula óssea e células endoteliais, bem como nas células B. Igualmente aos outros membros da família de receptores de manose, o DEC-205 é internalizado da superfície celular por endocitose mediada por clatrina, porém, diferentemente dos outros receptores, ele está localizado intracelularmente no endossoma/lisossomo tardio contendo receptores MHC de classe II (EAST e ISACKE, 2002).

Tem sido relatado ainda, que a expressão de DEC-205 está associada à diferenciação e inibição do crescimento celular, onde linhagens celulares do tecido colorretal altamente diferenciadas expressam altos níveis de DEC-205, enquanto em linhas celulares moderadamente diferenciadas, a expressão é fraca. Ainda, a perda de DEC-205 está associada à malignidade do tumor em alguns, mas não em todos os tumores. Por isso, tem-se sugerido que, em alguns tecidos, o DEC-205 pode ter um papel de supressor de tumor, inibindo a divisão celular epitelial e melhorando a diferenciação (EAST e ISACKE, 2002).

O receptor de manose (MR) foi inicialmente identificado em macrófagos alveolares de coelho como um receptor transmembrana que reconhecia enzimas lisossômicas glicosiladas e cadeias sacarídicas que terminam em manose, fucose ou N-acetilglucosamina. Posteriormente, esta proteína foi identificada em células placentária humana que reconhecia glicoproteínas nas membranas placentárias contendo resíduos terminais de manose (EAST e ISACKE, 2002).

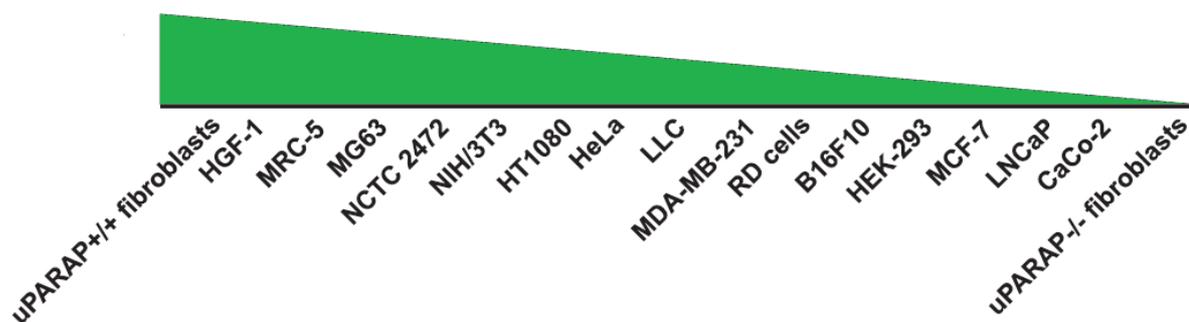
A MR possui um domínio de fibronectina tipo II, que provavelmente é crucial para a atividade de ligação ao colágeno. A MR é amplamente expressa em macrófagos, ocorrendo também em células endoteliais hepáticas e linfáticas e em alguns outros tipos de células (PARKS e MECHAM, 2011). As funções atribuídas a este receptor são numerosas, incluindo a exclusão de moléculas endógenas, promoção da apresentação de antígenos e modulação da ativação e tráfego celular, bem como seu papel fundamental na internalização do colágeno por macrófagos. Tem sido relatada a presença de MR em macrófagos associados a tumores (TAMs) e macrófagos recrutados para granulomas de *Schistosoma mansoni*, onde no caso dos TAMs a MR tem sido sugerida como um marcador da ativação de macrófagos e também

contribui para sua atividade imunossupressora. Ainda, a MR expressa por células endoteliais linfáticas esteve envolvida na promoção de metástases do câncer (MARTINEZ - POMARES, 2012).

Igualmente ao que acontece com a MR, a uPARAP/Endo180 contém dez domínios extracelulares, dos quais apenas dois têm uma função identificada, onde o domínio da fibronectina tipo II participa do reconhecimento de colágeno e o domínio ativo do tipo lecitina do tipo C reconhece os resíduos de N-acetilglucosamina, fucose e manose (PARKS e MECHAM, 2011). A uPARAP/Endo180 é um componente central no processo de renovação de colágeno, governado por várias células mesenquimais, onde por meio da endocitose de colágeno, ou grandes fragmentos de colágeno, esse receptor de reciclagem serve para direcionar o colágeno da membrana basal, bem como o colágeno intersticial para a degradação lisossômica (MELANDER et al., 2015).

A uPARAP/Endo180 também tem despertado interesse por está *superexpressa* em células tumorais (ENGELHOLM et al., 2009), como exemplo, estudos mostraram uma alta expressão da uPARAP/Endo180 em pacientes com câncer de mama metastático (PALMIERI et al., 2013) e em linhagens de células tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231 (BREVET et al., 2009; GARY-BOBO et al., 2011; PALMIERI et al., 2013; YE et al., 2016). Também tem sido relatado que a uPARAP/Endo180 é expressa por uma diversidade de linhagens celulares tumorais e não tumorais em níveis diferentes (MADSEN et al., 2011). Na Figura 16 são mostradas as linhagens celulares que expressam a uPARAP/Endo180 com seus respectivos níveis de expressão relativo.

Figura 16: Nível de expressão de uPARAP/Endo180 em linhagens celulares.



Nível de expressão de uPARAP/Endo180 em linhagens celulares. As linhagens celulares foram classificadas no diagrama de acordo com seu nível de expressão uPARAP/Endo180, onde as células com expressão mais altas estão à esquerda. As células MG63 foram usadas como uma linhagem celular de referência. Adaptado de Madsen et al., 2011.

Em organismos saudáveis, a uPARAP/Endo180 é primariamente expressa por células mesenquimais, como fibroblastos e células osteogênicas, e está presente em sítios que apresentam remodelação tecidual ativa, incluindo o desenvolvimento ósseo. Funções patológicas importantes da uPARAP/Endo180 foram identificadas em vários cânceres e em várias condições fibróticas, sendo hipotetizado que em alguns tumores, as células tumorais poderiam adquirir a expressão de uPARAP/Endo180, e que isto poderia desempenhar um papel no crescimento tumoral invasivo (MELANDER et al., 2015).

2.7 A O-Estearoil Manose como agente direcionador

O fato de alguns receptores só serem expressos por um determinado tipo celular (ALBERTS et al., 2010) ou estarem *superexpressos* em uma diversidade de cânceres (WEINBERG, 2018) tem levado vários pesquisadores a desenvolver sistemas de liberação de fármaco baseado na nanotecnologia, onde esses materiais são funcionalizados com moléculas direcionadas a esses receptores, e assim, obtém-se o direcionamento do fármaco para o sítio específico (COUVREUR e VAUTHIER, 2006; SINHA et al., 2006; SUBBIAH et al., 2010; MOUT et al., 2012; TIWARI et al., 2012).

Um dos métodos de direcionamento de fármacos que vem sendo investigado para aplicações oncológicas é a funcionalização da superfície de nanopartículas com ligantes específicos, onde esses ligantes se ligam a receptores *superexpressos* na superfície das células cancerosas. Como exemplo, devido às altas demandas metabólicas geradas pela rápida proliferação das células tumorais, muitos tipos de células cancerosas *superexpressam* os receptores de transferrina e folato, o que torna a conjugação de transferrina, ácido fólico ou anticorpos contra esses receptores uma abordagem de direcionamento bem-sucedida para as nanopartículas contendo fármacos (PETROS e DESIMONE, 2010).

Pelo fato de uma diversidade de tumores malignos humanos *superexpressarem* o receptores de manose, muitos pesquisadores tem focado em desenvolver medicamentos e vacinas direcionados para estes receptores, e assim, têm formulado *nanocarreadores* funcionalizados com manose para aumentar a intensidade e a especificidade de ligação entre os *nanocarreadores* e os receptores de manose *superexpressos* em células tumorais (YE et al., 2016). Assim, tem sido reportada a captação de nanopartículas funcionalizadas com manose por células tumorais de maneira mais rápida em comparação com nanopartículas não funcionalizadas (AHIRE et al., 2013).

Nanopartículas poliméricas contendo antígenos associados ao melanoma e ligantes de TLR foram funcionalizadas com manose e direcionadas a receptores de manose em células apresentadoras de antígeno. Este sistema foi capaz de induzir respostas imunes antitumorais em um modelo de melanoma murino (melanoma B16F10), em condições profiláticas e terapêuticas, demonstrando um alto potencial imunoterapêutico para este câncer (SILVA et al., 2015; MIR et al., 2017).

Moléculas com resíduos de manose também tem sido utilizadas para funcionalização de nanopartículas visando o direcionamento para os macrófagos associados a tumores (TAMs), uma vez que estes desempenham um papel importante na invasão, proliferação, sobrevivência e metástase de células tumorais, onde tendo sido demonstrado que a infiltração de TAMs está correlacionada com o crescimento do câncer, metástase e mau prognóstico em uma variedade de carcinomas humanos, incluindo câncer de mama, próstata, ovário e cervical. Por este motivo, a molécula *O*-estearoil-manose, que apresenta um resíduo de manose, foi utilizada na funcionalização de nanopartículas de PLGA, uma vez que foi relatado que os macrófagos, especialmente os macrófagos do tipo M2 (por exemplo, TAMs), *superexpressam* os receptores de manose (ZHU et al., 2013a). Desta forma, a funcionalização de nanopartículas com moléculas contendo um grupo terminal do açúcar manose vêm sendo desenvolvida visando o direcionamento aos receptores de manose (BREVET et al., 2009; GARY-BOBO et al., 2011; YE et al., 2016). Uma das moléculas desenvolvida para essa finalidade é a *O*-estearoil manose. Essa molécula contém um grupo terminal manose e foi utilizada como funcionalizante em nanopartículas de PLGA, e como resultado essas nanopartículas funcionalizadas se mostraram mais eficientes devido a melhor internalização celular promovida pela presença de receptores de manose nas células testadas (ZHU et al., 2013a; GHOSH et al., 2017), evidenciando a molécula *O*-estearoil manose como um agente direcionador.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar nanopartículas biodegradáveis de PLGA que incorporasse eficientemente o fármaco antitumoral clorambucil, e os direcionasse para um local sítio específico (tumor mamário) através da funcionalização da partícula com *O*-estearoil manose.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir nanopartículas que encapsulem eficientemente o fármaco em estudo;
- Funcionalizar as nanopartículas com *O*-estearoil manose;
- Caracterizar as nanopartículas quanto aos seus parâmetros físico-químicos, como distribuição de tamanho, potencial zeta, composição, estabilidade térmica, temperatura de transição vítrea, capacidade de emissão de fluorescência, e eficiência de encapsulamento;
- Realizar a caracterização espectroscópica das nanopartículas por meio das técnicas de UV-vis, Emissão de fluorescência e Infravermelho.
- Caracterizar as nanopartículas quanto a sua morfologia por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Otimizar as características físico-químicas e morfológicas das nanopartículas;
- Avaliar o perfil de liberação do clorambucil encapsulado nas nanopartículas;
- Avaliar modelos matemáticos que representem a cinética de liberação do fármaco;
- Avaliar o potencial citotóxico das nanopartículas em e células tumorais MCF-7 e não-tumorais NIH-3T3.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho encontram-se listados a seguir:

- Ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico), PLGA $[C_3H_4O_2]_x[C_2H_2O_2]_y$, 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 etílico P. A., CH_3CH_2OH , massa molar de 46,07 g/mol, grau de pureza de 99,8%, marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda[®];
- Álcool metílico P. A., CH_3OH , massa molar de 32,04 g/mol, grau de pureza de 99,8%, marca Synth[®];
- Álcool polivinílico, PVA, $[-CH_2CHOH-]_n$, 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[®];
- Clorambucil, $C_{14}H_{19}Cl_2NO_2$, massa molar de 304,2 g/mol, grau de pureza acima de 98,0%, marca Sigma-Aldrich[®];
- Cloreto de estearoil, $CH_3(CH_2)_{16}COCl$, massa molar de 302,92 g/mol, grau de pureza de 97,0%, 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-manose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, massa molar de 180,16 g/mol, grau de pureza acima de 99,0% marca Sigma-Aldrich[®];
- D-MEM, do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, com alta concentração de glicose, líquido, marca Sigma-Aldrich[®];

- Fosfato de sódio bibásico dihidratado P.A., $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 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., $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 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[®];
- Piridina anidra P.A., $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, massa molar de 79,1 g/mol, grau de pureza acima de 99,0%, marca J.T.Baker[®];
- 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[®];
- Sulfato de sódio anidro P. A., Na_2SO_4 , massa molar de 142,04 g/mol, grau de pureza acima de 99,0%, marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda[®];
- 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 reagentes utilizados durante a execução deste projeto apresentaram grau analítico de pureza, não sendo necessários processos extras de purificação.

4.1.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho encontram-se listados a seguir:

- 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[®], modelo CFLV 12;
- Centrífuga de bancada para microtubos, marca Eppendorf[®], modelo MiniSpin;
- Dispersador de alto desempenho Ultraturrax[®], marca IKA[®], modelo T25, equipado com o elemento de dispersão S25N-25F;
- Dispersador de alto desempenho Ultraturrax[®], marca IKA[®], modelo 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 PerkinElmer[®], modelo Lambda 25;
- 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 diâmetro hidroninâmico 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.

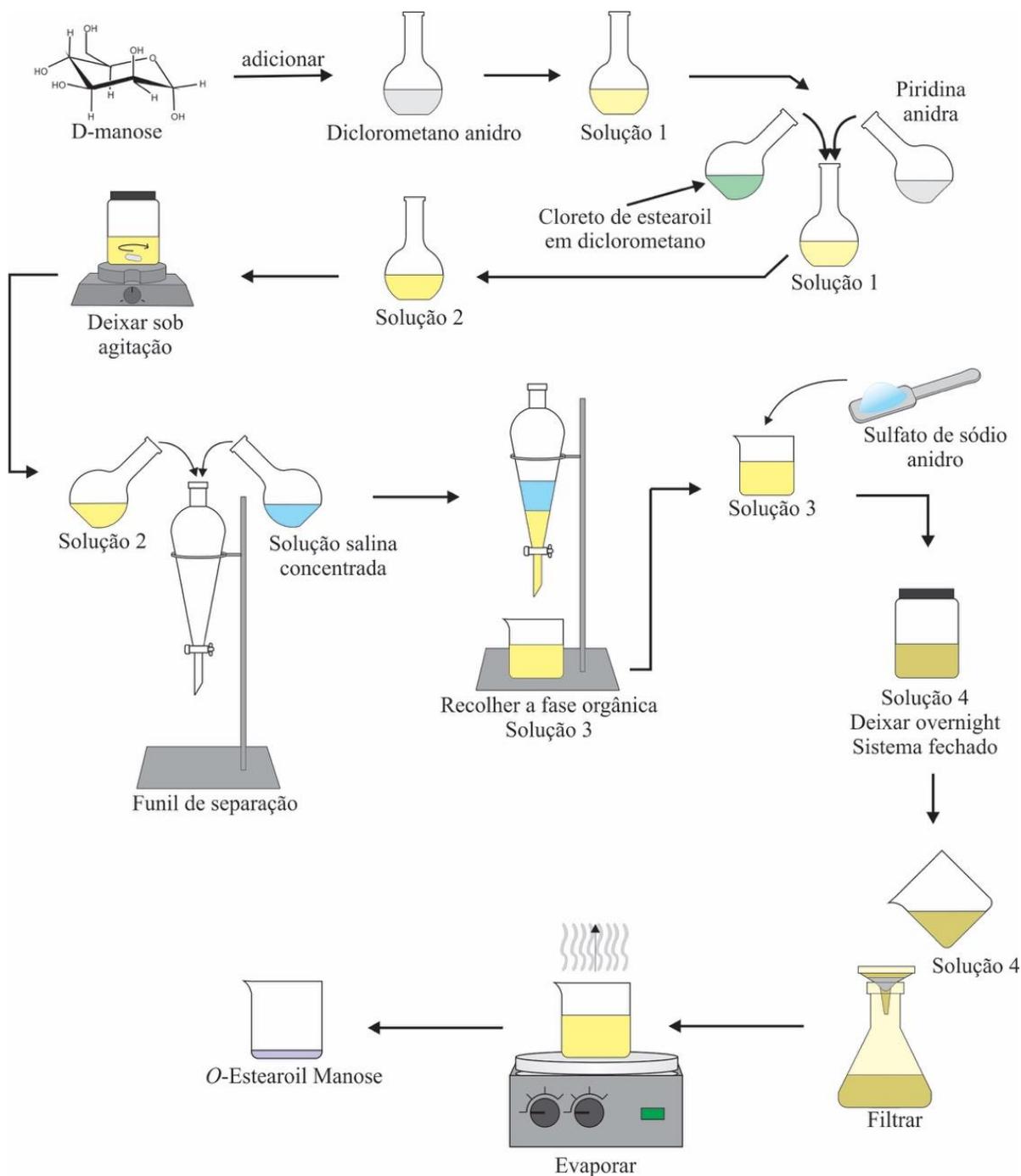
4.2 Metodologia

4.2.1 Síntese da *O*-Estearoil Manose

A síntese da molécula *O*-estearoil manose foi realizada segundo a metodologia descrita por Ghosh e colaboradores (GHOSH et al., 2017). Assim, foram dissolvidos 600 mg de D-manose em 15 mL de diclorometano anidro, formando a solução 1. Na solução 1, foram adicionados 2,1 mL de piridina anidra e 1,5 mL de diclorometano anidro contendo 165 mg de cloreto de estearoil, formando a solução 2. A solução 2 foi mantida sob agitação por 16 horas, e após a reação foi então dispersa em 10 mL de solução salina concentrada em um funil de separação. Ocorrida à separação em duas fases, a fase orgânica (solução 3) foi recolhida e adicionou-se sulfato de sódio anidro para eliminar a água remanescente do sistema (solução 4). A solução 4 foi mantida em um recipiente fechado durante a noite. Em seguida, a solução 4 foi filtrada para a retirada do sulfato de sódio e o diclorometano foi evaporado. A caracterização do produto da síntese foi realizada por meio de espectroscopia de

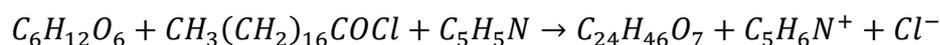
infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Na Figura 17 é mostrado o esquema ilustrativo da conjugação.

Figura 17: Ilustração esquemática da síntese da *O*-estearoil manose a partir da *D*-manose e do cloreto de estearoil.



Para a obtenção da *O*-estearoil manose, a *D*-manose e o cloreto de estearoil foram postos a reagir em uma solução de diclorometano. A piridina foi adicionada ao sistema para evitar a obtenção de HCl como um dos produtos da reação. O sulfato de sódio foi adicionado na fase orgânica para eliminar a água remanescente. O solvente da fase orgânica por final foi evaporado, resultando como produto final a *O*-estearoil manose.

Da reação entre a D-manose ($C_6H_{12}O_6$) e o cloreto de estearoil ($CH_3(CH_2)_{16}COCl$), podemos obter como produtos a *O*-estearoil manose ($C_{24}H_{46}O_7$) e o ácido clorídrico (HCl), este último, porém, é um produto indesejado. Para evitar a formação do HCl como um dos produtos finais da reação, a piridina (C_5H_5N) foi adicionada ao sistema. Assim, a reação entre a D-manose, o cloreto de estearoil e a piridina, resultam como produtos a *O*-estearoil manose, o íon piridina e o íon cloreto. A equação química da reação é mostrada abaixo:



4.2.2 Preparo das Nanopartículas

As nanopartículas foram produzidas por meio do método de simples emulsificação e evaporação do solvente, descrito por Dias e colaboradores e com modificação (DIAS et al., 2015). Neste método, o PLGA e o fármaco pré-formados são dissolvidos em um solvente orgânico imiscível em água, sendo posteriormente emulsionado em uma solução aquosa contendo um estabilizador. A emulsificação é causada pela exposição subsequente a uma fonte de alta energia, como exemplo, um homogeneizador. A fase orgânica é então evaporada, resultando na formação de finas dispersões aquosas de nanopartículas. As nanopartículas são coletadas por centrifugação e lavadas com água destilada para remover os resíduos de estabilizadores ou o fármaco livre. Este método tem sido descrito como o mais utilizado para a obtenção de nanopartículas de PLGA (BALA et al., 2004).

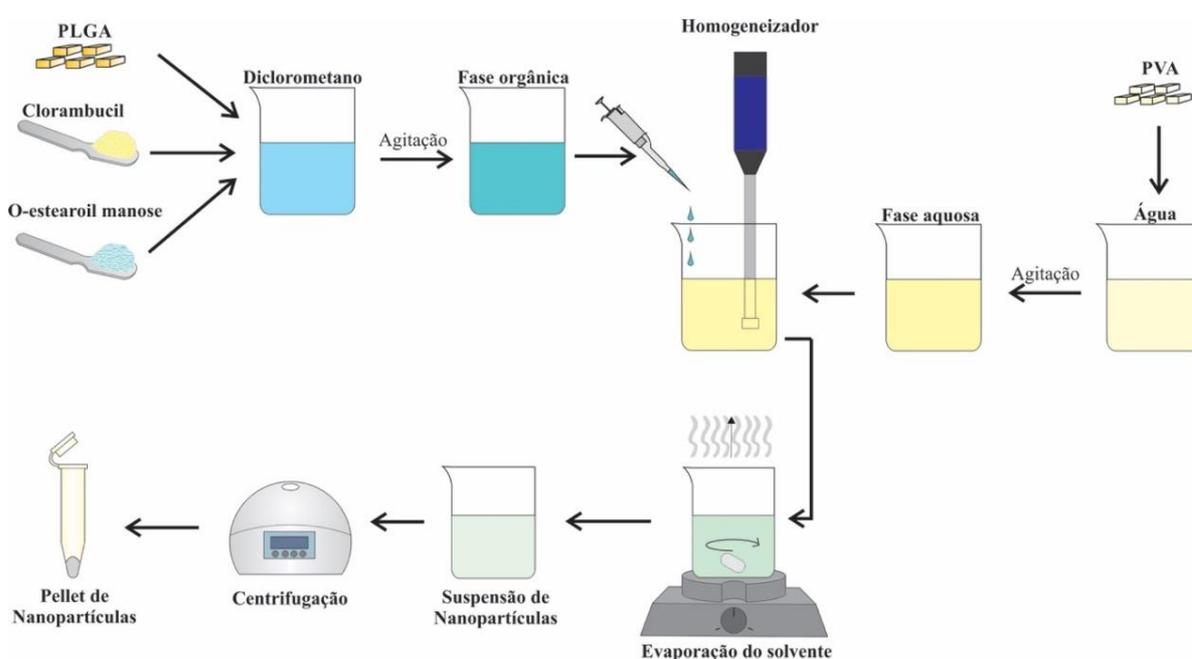
Para a produção de nanopartículas de PLGA-clorambucil-*O*-esteroil manose, denominadas de agora em diante por NP-CLB-OEM, 50 mg de PLGA foram dissolvidos em 10 mL de diclorometano, sendo adicionado em seguida 10 mg de clorambucil juntamente com 15 mg de *O*-estearoil manose. A solução orgânica resultante foi então gotejada lentamente em 10 mL de uma solução aquosa de PVA a 2,0% (m/v) sob agitação a 20.000 rpm, utilizando-se um homogenizador Ultraturrax[®]. O processo de homogeneização foi realizado em banho de gelo durante um tempo de 5 min. O diclorometano foi eliminado da solução através de agitação magnética à temperatura ambiente, por um período aproximado de 4 horas. Para a coleta das nanopartículas obtidas, as mesmas foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 min e lavadas com água ultrapura por pelo menos duas vezes. Uma ilustração esquemática para a obtenção das nanopartículas é mostrada na Figura 18.

Pelo mesmo processo descrito acima foram produzidas nanopartículas de PLGA

vazias denominadas NP-VAZ, ou seja, sem a presença do fármaco CLB, onde neste caso deixou-se de adicionar o CLB e a OEM no processo da formulação. Ainda foram produzidas nanopartículas de PLGA-*O*-estearoil manose denominadas NP-OEM, onde não se adicionou o CLB no processo; e por último também foram formuladas nanopartículas de PLGA-Clorambucil denominadas NP-CLB, onde não foi adicionado o funcionalizante OEM.

Para todas as formulações, as NPs e os sobrenadantes obtidos após o processo de centrifugação e lavagem foram recolhidos, quantificados e armazenados sobre refrigeração para análises posteriores.

Figura 18: Ilustração esquemática para a síntese das nanopartículas de PLGA.



Para a formulação das nanopartículas, os reagentes PLGA, clorambucil e *O*-estearoil manose são dissolvidos em diclorometano, formando a fase orgânica. A fase orgânica é então gotejada lentamente sobre a fase aquosa (PVA a 2%) submetida à agitação vigorosa. O solvente orgânico é evaporado e a suspensão resultante é centrifugada obtendo-se um pellet de nanopartículas.

4.2.3 Medida do Diâmetro Hidrodinâmico e Índice de Polidispersão

As nanopartículas em suspensão foram avaliadas quanto ao seu diâmetro hidrodinâmico médio, sendo esta grandeza expressa em nanômetros (nm). Também foi avaliada a distribuição de tamanho, que é uma grandeza que pode ser caracterizada pelo valor do índice de polidispersão (PdI) e apresenta unidade adimensional. Essas avaliações foram realizadas por meio do equipamento Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern Instruments, UK). Assim,

a partir de 1,0 mL das nanopartículas dispersas em água retirou-se 5 μL , que posteriormente foram dispersas em um volume final 1,0 mL de água destilada e levadas para análise em uma cubeta de poliestireno com 1,0 cm de caminho óptico. As medidas do diâmetro hidrodinâmico médio e do PDI foram realizadas no modo *size* a uma temperatura de 25 °C, com o detector posicionado no ângulo fixo de 173° em relação ao ângulo de incidência de luz. A fonte de luz era composta por um laser vermelho de 4 mW, He-Ne e comprimento de onda de 633 nm. As medidas para cada amostra foram realizadas em triplicata, onde para cada medida foram executadas 11 leituras (DIAS et al., 2015).

4.2.4 Medida do Potencial Zeta

O potencial zeta (expresso em milivolts (mV)) das nanopartículas suspensas em água foram avaliados por meio do equipamento Zetasizer Nano ZS[®] (Malvern Instruments, UK). A partir de 1,0 mL das nanopartículas dispersas em água retirou-se 5,0 μL que foram dispersas em um volume final 1,0 mL de água destilada e levadas para análise em uma célula eletroforética. As medidas foram realizadas no modo *zeta* a uma temperatura de 25 °C e em triplicata, onde para a obtenção de cada medida foram executadas no mínimo 13 leituras (DIAS et al., 2015).

4.2.5 Análises Espectroscópicas

4.2.5.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho das nanopartículas e das demais substâncias utilizadas nas formulações das nanopartículas foram avaliados por meio de um espectrofotômetro da marca Shimadzu[®], modelo IRPrestige-21. As pastilhas utilizadas nas análises foram preparadas a partir da maceração da mistura de 70,0 mg do brometo de potássio e 2,0 mg das amostras, posteriormente foram prensadas a 80,0 kN pelo período de 3,0 minutos e em seguida foram analisadas no espectrofotômetro. Para cada leitura, foram obtidos 40 registros, com resolução de 4,0 cm^{-1} na região compreendida entre 400 e 4.000 cm^{-1} no modo de porcentagem de transmitância (DIAS et al., 2015). Os dados foram tratados com o *software* IRsolution[®] versão 1.50 e transferidos para o programa de construção gráfica GraphPad Prism[®] versão 6.01 (DIAS et al., 2015).

4.2.5.2 Espectroscopia de Absorção Molecular – UV-Vis

Os espectros de absorção no ultravioleta-visível para as amostras analisadas foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis da marca PerkinElmer[®], modelo Lambda 25. As medidas foram obtidas através do modo de varredura compreendida na faixa do espectro eletromagnético de 200 a 800 nm. As amostras, CLB e NPs, foram solubilizadas em solventes adequados (água: metanol 1:1 ou 9:1), os quais serviram como referências para a obtenção da linha de base. Os dados dos espectros obtidos foram exportados para serem tratados no software GraphPad Prism[®] versão 6.01 (DIAS et al., 2015).

Para aquelas substâncias que houve a necessidade de se conhecer sua concentração no meio analisado, foram obtidas curvas de calibração para as mesmas. Para isso, foi realizada a solubilização dessas substâncias no meio de interesse e em concentrações conhecidas que foram lidas no espectrofotômetro UV-Vis, onde foram anotados os valores da absorbância máxima do pico característico da substância e suas respectivas concentrações. Os dados da concentração e da absorbância foram tratados por meio dos softwares Excel[®] versão 2010 e GraphPad Prism[®] versão 6.01 fazendo-se a regressão linear para se obter uma equação do tipo $Y = a \cdot X + b$, onde Y é a absorbância e X é a concentração. Para a obtenção dos dados, o processo foi realizado em triplicata.

4.2.5.3 Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência dos compostos analisados foram obtidos por meio de um espectrofluorímetro modelo F-7000 da marca Hitachi[®]. Com intuito de estudar o CLB nas nanopartículas, as amostras foram excitadas no comprimento de onda de 258 nm, um pico característico no espectro de absorção no ultravioleta-visível para o CLB em solução água-metanol (1:1). Os espectros foram registrados na faixa espectral de 270 a 450 nm, a velocidade de escaneamento foi de 1.200 nm/min e janelas de emissão e excitação com 5,0 nm de abertura. Os dados foram tratados por meio do *software* FL Solutions[®] versão 2.1 e posteriormente por meio do GraphPad Prism[®] versão 6.01 (DIAS, 2017).

4.2.6 Eficiência de Encapsulamento

A porcentagem de CLB incorporado nas nanopartículas, ou seja, a eficiência de encapsulamento (%EE) foi medida de maneira indireta. Para isso, por meio de um

espectrofotômetro UV-Vis foi determinada a quantidade de fármaco presente no sobrenadante resultante do processo de obtenção das nanopartículas (descrito na **seção 4.2.2**). A quantidade de fármaco encontrada no sobrenadante foi considerada como sendo a quantidade não encapsulada. Assim, a porcentagem de CLB incorporado nas NPs pode ser obtida por meio de uma relação entre a quantidade inicial de CLB inserido em cada formulação e a quantidade de CLB não incorporados nas respectivas NPs, ou seja, a quantidade encontrada em cada sobrenadante (DIAS et al., 2015). Esta relação é descrita pela Equação (1) a seguir:

$$\%EE = \frac{\text{Quant. de CLB Inicial} - \text{Quant. de CLB no Sobrenadante}}{\text{Quant. de CLB Inicial}} \times 100\% \quad (1)$$

Para a obtenção da concentração do CLB em cada sobrenadante que resultou do processo de produção das NPs foi elaborada uma curva de calibração, como descrito anteriormente na **seção 4.2.5.2**.

4.2.7 Estudo do Perfil de Liberação

O estudo do perfil de liberação do CLB a partir das nanopartículas em meio tamponado foi realizado em condições *sink*, isto é, foi mantido um volume 5 vezes maior do que o volume necessário para se obter a saturação com o fármaco, para que desta forma o gradiente de concentração seja mantido e não interfira na velocidade de dissolução (PETRALITO et al., 2012). Assim, quantidades predefinidas de NPs foram adicionadas em volumes predefinidos de solução tampão fosfato salino (pH = 7,4) e foram mantidas sob agitação magnética e a temperatura de 37 °C. Em tempos pré-determinados foram realizadas leituras por meio de um espectrofotômetro UV-vis das alíquotas das NPs em meio tamponado. As leituras foram realizadas no modo varredura compreendendo a faixa do espectro eletromagnético de 200 a 700 nm. As medidas da absorbância dessas alíquotas para o comprimento de onda de 258 nm foram tomadas para a quantificação do fármaco liberado. Os valores encontrados para a absorbância em 258 nm ao longo do tempo foram convertidos em quantidade de fármaco liberado e posteriormente em fração de fármaco liberado, onde para isso foi utilizada a Equação (2) a seguir:

$$\text{Fração de CLB Liberado} = \frac{\text{Quantidade de CLB Liberado}}{\text{Quantidade de CLB Encapsulado}} \quad (2)$$

Os resultados foram apresentados como a fração de liberação cumulativa do fármaco ao longo do tempo.

4.2.8 Análise Matemática da Cinética de Liberação

Com o propósito de estabelecer os mecanismos que governam o transporte de fármacos a partir de diversos tipos de matrizes, muitos modelos matemáticos (que podem ser semi-empíricos ou difusionais) (MANADAS et al., 2002) tem sido utilizados para descrever a liberação cumulativa ao longo tempo. Assim, neste trabalho, a liberação do CLB a partir das NPs em PBS (pH 7,4) foi avaliado a partir de quatro modelos matemáticos, que estão descritos abaixo.

4.2.8.1 Modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas

Quando o mecanismo de liberação de uma molécula ou fármaco a partir de matrizes poliméricas não é bem conhecido ou ainda quando possam estar envolvidos mais do que um tipo de mecanismo de liberação, o modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas tem sido utilizado como uma alternativa para descrever a cinética de liberação. Esse modelo apresenta a seguinte equação genérica (MANADAS et al., 2002; LOPES et al., 2005; DASH et al., 2010):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{kp} t^n \quad (3)$$

onde M_t representa a quantidade de fármaco liberada no tempo t , M_∞ é a quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito, k_{kp} é a constante de taxa de liberação de Korsmeyer-Peppas que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo de liberação; n é o expoente de liberação.

Neste modelo, quando a matriz de liberação é esférica e $n = 0,43$ diz-se que o mecanismo que controla a liberação é a difusão Fickiana. Para $n = 0,83$, diz-se que a liberação é controlada pelo mecanismo de transporte de Caso II, ou seja, pelo fenômeno de relaxamento da matriz. Já para $0,43 < n < 0,83$ indicam cinética de transporte anômalo, ou seja, a combinação dos mecanismos de difusão Fickiana e de transporte de Caso II (RITGER e PEPPAS, 1987).

4.2.8.2 Modelo de Primeira Ordem

O modelo de primeira ordem é um modelo relevante, pois considera a liberação acentuada do fármaco nos instantes iniciais, que é atribuído à difusão interfacial entre a superfície da matriz e o meio líquido (LUCERO-ACUNA e GUZMÁN, 2015; GUTIÉRREZ-VALENZUELA et al., 2018). Assim, neste modelo é assumido que a taxa de dissolução do fármaco a partir da matriz é proporcional à concentração C do fármaco na superfície da matriz, esta relação pode ser representada por uma equação diferencial de primeira ordem como segue:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{po}C \quad (4)$$

onde k_{po} é a constante que incorpora propriedades de interfase, solubilidade do fármaco e interações eletrostáticas entre o fármaco e o transportador. Considerando que todo o CLB foi incorporado na matriz, ou seja, que a concentração de CLB nas NPs é igual à massa total de CLB por volume das nanopartículas como uma condição de contorno, a solução da Eq. (4) fica:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-k_{po}t) \quad (5)$$

4.2.8.3 Modelo de Difusão de Fick

Ainda, outro modelo a ser considerado é o transporte mediado pela difusão Fickiana. Neste modelo, assumindo que nas nanopartículas a difusão é radial e que o CLB não sofre reação química ou degradação, a equação de difusão para um coeficiente de difusão constante assume a seguinte forma (CRANK, 1975):

$$\frac{\partial C(r, t)}{\partial t} = D_e \left(\frac{\partial^2 C(r, t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C(r, t)}{\partial r} \right) \quad (6)$$

onde D_e é o coeficiente de difusão e r é o raio.

Considerando as seguintes condições de contorno: simetria no centro da partícula (Eq. 7); concentração do CLB insignificante sobre ou próximo à superfície das NPs para tempos maiores que zero (Eq. 8); todo o CLB inicialmente encapsulado está distribuído homogeneamente sobre o volume das partículas (Eq. 9), a solução da Eq. 6 é dada na Eq. 10.

$$\frac{\partial C(0, t)}{\partial r} = 0 \quad t > 0 \quad (7)$$

$$C(r_1, t) = 0 \quad t > 0 \quad (8)$$

$$C(r, 0) = \frac{M_0}{v_s} \quad 0 < r < r_1 \quad (9)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 n^2 D_e t}{r_1^2}\right) \quad (10)$$

onde r_1 é o raio das NPs, M_0 é a massa do CLB encapsulado e v_s é o volume das NPs.

4.2.8.3 Modelo Combinado Primeira Ordem e Difusão de Fick

Podemos considerar ainda, que a liberação do fármaco pode ser descrita pela combinação de diferentes mecanismos. Assim, a combinação linear do modelo de primeira ordem e a difusão Fickiana, onde é considerada a parcela de contribuição de cada modelo na cinética de liberação, é descrita na equação abaixo:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \theta_{po} \{1 - \exp(-k_{po} t)\} + (1 - \theta_{po}) \left\{1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 n^2 D_e t}{r_1^2}\right)\right\} \quad (11)$$

Para que haja consistência matemática, faz-se necessário considerar que a soma das parcelas seja igual a 1, conforme equação adicional:

$$\theta_{po} + \theta_d = 1 \quad (12)$$

onde θ_{po} é a fração de contribuição descrita pela equação de primeira ordem sobre a liberação total do fármaco e θ_d é a fração da equação de difusão de Fick sobre a liberação total do fármaco.

As previsões dos modelos foram comparadas calculando-se o coeficiente de determinação R^2 e o coeficiente de determinação ajustado $R^2_{ajustado}$.

Os parâmetros desconhecidos para cada modelo (Eq. 3), (Eq. 5), (Eq. 10), (Eq. 11) e (Eq. 12) foram determinados ajustando-se as equações aos dados experimentais de liberação do CLB usando algoritmo não-linear de mínimos quadrados no MATLAB[®]. Por haver diferenças no número de parâmetros entre os quatro modelos, um coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{ajustado}$) foi incorporado na análise. O $R^2_{ajustado}$ é dado por:

$$R^2_{ajustado} = 1 - \frac{(n_{dp} - 1)}{(n_{dp} - p)} (1 - R^2) \quad (13)$$

onde n_{dp} é o número de pontos obtidos para a geração da curva experimental do perfil de liberação e p é o número de parâmetros no modelo.

4.2.9 Análises Térmicas

As nanopartículas quando submetidas à variação de temperatura podem sofrer transformações que podem ocasionar mudanças em suas propriedades físico-químicas. Desta forma, a fim de analisar a estabilidade térmica, decomposição térmica e transição vítrea das nanopartículas e das substâncias envolvidas no processo de síntese, foram realizadas análises térmicas como a análise termogravimétrica e calorimetria exploratória diferencial, conforme descrito abaixo.

4.2.9.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

Para a obtenção das curvas de TGA das amostras analisadas, foram utilizadas massas entre 3,0 e 7,0 mg das amostras já maceradas, que foram pesadas 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 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 5,0 °C.min⁻¹, no intervalo de temperatura

compreendido entre 30 °C e 400 °C. As curvas obtidas foram tratadas usando o *software* TA-60WS[®] e posteriormente o GraphPad Prism[®] versão 6.01 (DIAS, 2017).

4.2.9.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para obtenção das curvas de DSC, quantidades de 3,0 mg das amostras já maceradas foram pesadas e transferidas para um cadinho de alumínio. Posteriormente, o material foi selado por meio de uma prensa apropriada. Os ensaios foram realizados em um aparelho da marca Shimadzu[®], modelo DSC-60A, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 5,0 °C.min⁻¹, no intervalo de temperatura compreendido entre 30°C e 150 °C. A caracterização dos eventos térmicos das amostras foram identificadas nas curvas obtidas que foram tratadas por meio do *software* TA-60WS[®] e posteriormente pelo GraphPad Prism[®] versão 6.01 (DIAS, 2017).

4.2.10 Análise da Morfologia das Nanopartículas

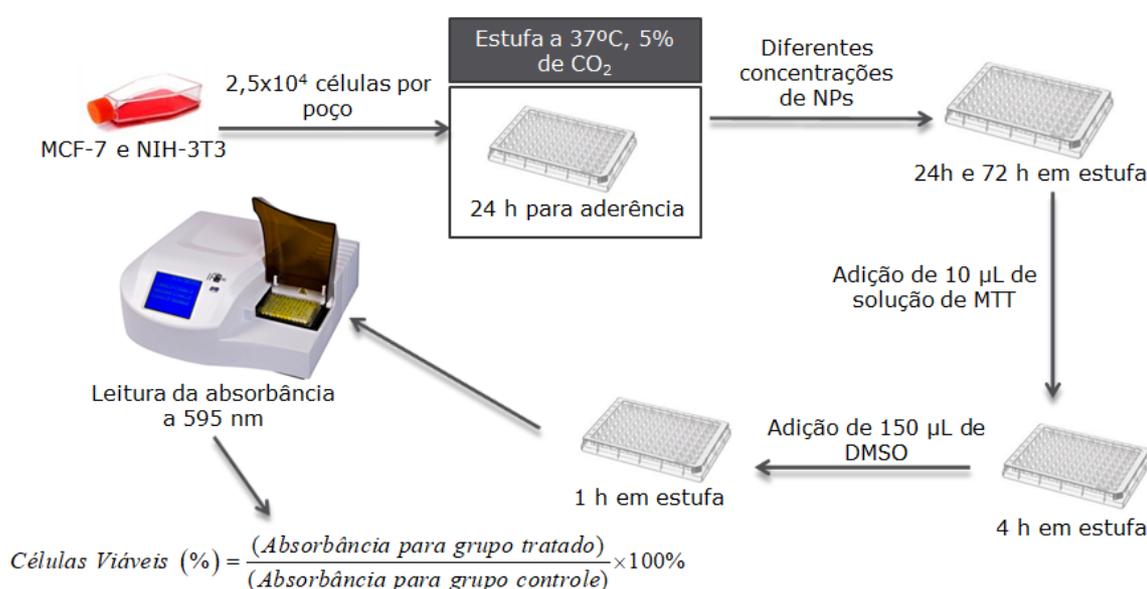
A avaliação da forma e do tamanho das nanopartículas foram realizadas por meio de um microscópio eletrônico de varredura. Para a avaliação, as amostras das nanopartículas foram depositadas em lamínulas circulares limpas e esterilizadas. Logo após, as NPs sobre as lamínulas foram secas em um dessecador a temperatura ambiente e pressão reduzida. Em seguida, as lamínulas foram fixadas em um suporte de alumínio (*stub*) e posteriormente, foram revestidas por uma fina camada de ouro, por meio de um processo de metalização em atmosfera de argônio. As amostras foram examinadas e fotografadas com o microscópio operado em tensão de aceleração de 10-20 kV, no modo de detecção de elétrons retroespalhados (BSED). O tamanho e a distribuição de tamanho das nanopartículas foram analisados por meio do *software* ImageJ[®].

4.2.11 Avaliação da Citotoxicidade das Nanopartículas

Para a avaliação da citotoxicidade das nanopartículas, foram utilizadas a linhagem celular de câncer de mama humano MCF-7 e a linhagem celular de fibroblastos murino NIH-3T3 de culturas confluentes de 90% - 95% em crescimento exponencial, que foram semeadas numa densidade de $2,5 \times 10^4$ células/poço, em placas de 96 poços. As células foram mantidas

em 100 μL de meio DMEM fresco (suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, penicilina (50 mg/mL) e estreptomicina (50 mg/mL)), incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$ em ambiente umidificado contendo 5% de CO_2 por 24 h para permitir a adesão celular e adaptação ao ambiente. Em seguida, o meio de cultura foi descartado e em seu lugar foram adicionados 100 μL de meio contendo diferentes concentrações da amostra em estudo, iniciando-se a fase de tratamento por 24 e 72 horas. Uma representação esquemática para os testes de viabilidade celular realizados nas linhagens MCF-7 e NIH-3T3 é mostrada na Figura 19.

Figura 19: Ensaio da viabilidade celular em células MCF-7 e NIH-3T3 submetidas ao tratamento com NPs.



A viabilidade celular das linhagens MCF-7 e NIH-3T3 quando submetidas às diferentes concentrações das NPs foram avaliadas pelo método de MTT.

Após a incubação por tempo pré-determinado, as células foram lavadas com 100 μL de tampão de fosfato. Logo em seguida, a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazolil)-2,5 difeniltetrazólio, onde foram adicionados 10 μL de MTT (5mg/mL em tampão fosfato) a 100 μL do meio contendo as células. Após 4 h de incubação, o meio de cultura contendo a solução de MTT foi eliminado e as células foram ressuspendidas em 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os testes foram realizados em três experimentos independentes e em triplicata. As placas foram lidas em um espectrofotômetro para microplacas, marca SpectraMax[®], a um comprimento de onda de 595 nm (DIAS et al., 2015; TURINO et al., 2017). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada em relação às células controle que foram incubadas sem o fármaco e sem as nanopartículas. O efeito do tratamento foi calculado conforme Equação (14) a seguir.

$$\text{Células Viáveis (\%)} = \frac{(\text{Absorbância para o grupo tratado})}{(\text{Absorbância para o grupo controle})} \times 100\% \quad (14)$$

4.2.12 Análises Estatísticas e Gráficas

Visando as análises estatísticas, os experimentos descritos neste trabalho foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão. Quando se fez necessário, a avaliação da diferença estatística entre grupos foi determinada por ANOVA e pelo teste de Tukey, onde o resultado foi considerado estatisticamente significativo quando $P < 0,05$. Para o tratamento dos dados, análises estatísticas e construção gráfica, foram utilizados os *softwares* GraphPad Prism[®], versão 6.01; Excel[®], versão 2010, MATLAB[®], versão R2015a e ASSISTAT[®], versão 7.6 beta

4.3 Estrutura de Apresentação do Trabalho Acadêmico

Para a apresentação escrita deste trabalho acadêmico foram adotadas as recomendações da norma técnica da ABNT NBR 14724:2011 (ABNT, 2011), tanto na sua estruturação, bem como no formato, espaçamento, indicativos de seção, paginação, siglas, equações e fórmulas, ilustrações e tabelas.

Para a numeração progressiva das seções procedeu-se conforme a ABNT NBR 6024:2012 (ABNT, 2012a), para a elaboração do sumário, conforme a ABNT NBR 6027:2012 (ABNT, 2012b), para o resumo conforme a ABNT NBR 6028:2003 (ABNT, 2003), para as citações conforme ABNT NBR 10520:2002 (ABNT, 2002b) e para as referências bibliográficas conforme a ABNT NBR 6023:2002 (ABNT, 2002a). As referências bibliográficas foram geradas por meio do *software* EndNote[®], versão X7.

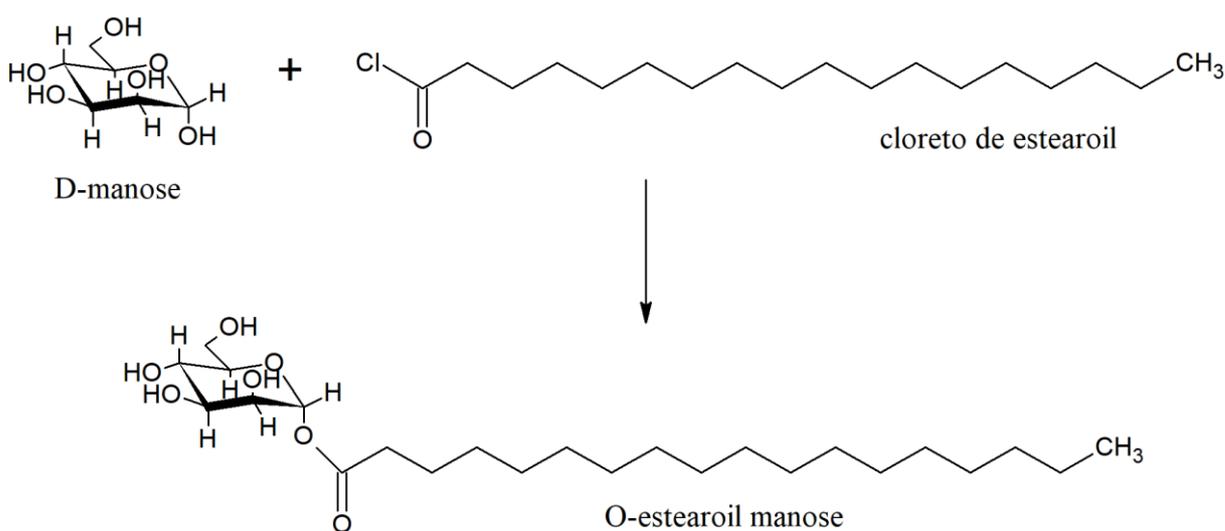
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese da *O*-Estearoil Manose

A obtenção da molécula *O*-estearoil manose por meio de reação de esterificação da D-manose e usando-se cloreto de estearoil (podendo ser chamada também de *O*-glicosilação (DAS e MUKHOPADHYAY, 2016)) foi confirmada por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, conforme descrito adiante na seção **5.3.3.1**. Representações das fórmulas estruturais da D-manose, cloreto de estearoil e *O*-estearoil manose são mostradas na Figura 20.

A massa total da *O*-estearoil manose obtida após a reação foi de $109 \pm 5,0$ mg. Considerando que na formulação a massa inicial de D-manose foi de 600 mg, que a massa inicial de cloreto de estearoil (que é o reagente limitante) foi de 165 mg e que para um rendimento de 100% a massa final de *O*-estearoil manose deveria ser de 242 mg, o rendimento final da reação foi de $45,0 \pm 1,4\%$, valor um pouco acima do relatado em um trabalho que seguiu metodologia similar para a síntese da OEM (rendimento de 38,6%) (ZHU et al., 2013b).

Figura 20: Fórmula estrutural da D-manose, cloreto de estearoil e *O*-estearoil manose.

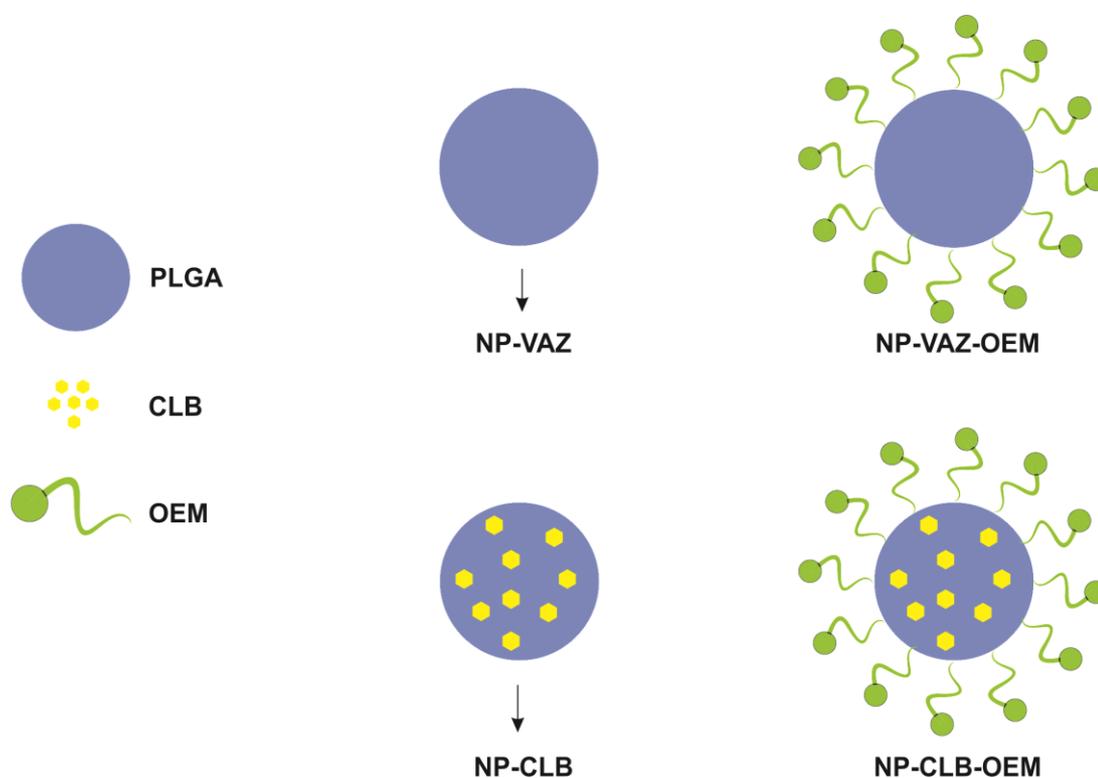


Representação da fórmula estrutural. A *O*-estearoil manose é obtida após a reação entre a D-manose e o cloreto de estearoil. Imagem gerada pelo software ChemSketch do pacote ACDLabs Freeware 2018.

5.2 Obtenção das Nanopartículas

Por meio da técnica de simples emulsificação e evaporação do solvente foi possível obter quatro formulações diferentes de NPs de PLGA, sendo elas NPs de PLGA vazias (NP-VAZ), NPs de PLGA contendo CLB (NP-CLB), NPs de PLGA vazias funcionalizada com OEM (NP-OEM) e NPs de PLGA contendo CLB e funcionalizada com OEM (NP-CLB-OEM). Uma ilustração esquemática das NPs obtidas é mostrada na Figura 21. Após a obtenção das NPs, as mesmas foram armazenadas sobre refrigeração e ao abrigo da luz para evitar a degradação do polímero e do fármaco, para posteriormente serem analisadas.

Figura 21: Representação esquemática das nanopartículas produzidas.



Representação esquemática das NPs produzidas. Na sequência: NP-VAZ, NP-OEM, NP-CLB e NP-CLB-OEM.

Os resultados e as discussões das análises realizadas sobre as NPs, ou seja, a caracterização das NPs quanto ao tamanho, distribuição de tamanho, carga superficial (potencial zeta), morfologia, confirmação da incorporação do CLB nas NPs, confirmação da incorporação da OEM nas NPs, confirmação da integridade do fármaco, análise da eficiência de encapsulamento do fármaco, estudos térmicos, análises do perfil de liberação e cinética de liberação do CLB a partir da NPs estão descritos logo em seguida.

5.3 Caracterização das Nanopartículas

5.3.1 Tamanho do Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta

O tamanho e a distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas obtidas foram avaliados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz, enquanto o potencial zeta foi medido por meio da técnica de espalhamento de luz eletroforético. Os resultados obtidos para o diâmetro, o índice de polidispersão e o potencial zeta são mostrados na Tabela 1 e na Figura 22.

As nanopartículas obtidas tiveram um tamanho médio do diâmetro hidrodinâmico variando entre 185 a 220 nm. A partir dos dados obtidos, vemos que as nanopartículas apresentaram uma distribuição de tamanho moderadamente polidisperso por apresentarem valores do PdI variando entre 0,169 a 0,288 (BHATTACHARJEE, 2016) e com tamanho adequado para aplicação intravenosa, uma vez que elas se apresentam menores que os vasos sanguíneos (BETTS et al., 2013). Desta forma, considerando o diâmetro médio obtido para as NPs, pode-se dizer que elas têm a capacidade de atingir o tumor e extravasar através de fenestrações na vasculatura do tumor, uma vez que essas fenestrações tumorais variam entre 380-780 nm de diâmetro e promovem uma maior permeabilidade e retenção no sítio tumoral (ACHARYA e SAHOO, 2011; BLANCO et al., 2015).

Ao se observar os valores encontrados para o diâmetro hidrodinâmico médio e para o PdI das NPs, percebe-se que o acréscimo do fármaco, assim como da OEM, não causaram grandes mudanças nos valores dessas grandezas, quando se comparam os valores obtidos para as NP-VAZ com os obtidos para as NP-CLB-OEM.

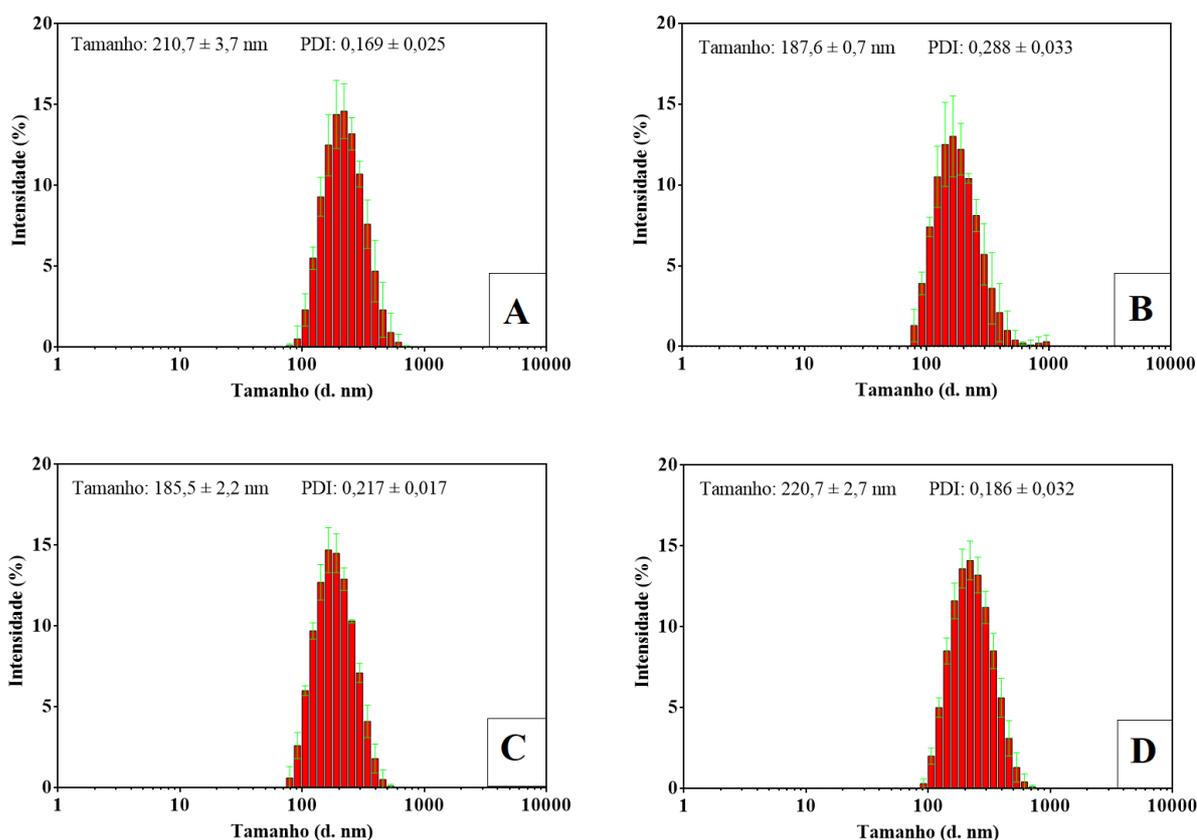
Tabela 1: Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta das amostras produzidas.

Amostra	Tamanho (d. nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
NP-VAZ	210,7 ± 3,7	0,169 ± 0,025	-16,7 ± 1,0
NP-OEM	187,6 ± 0,7	0,288 ± 0,033	-17,5 ± 0,4
NP-CLB	185,5 ± 2,2	0,217 ± 0,017	-17,7 ± 1,1
NP-CLB-OEM	220,7 ± 2,7	0,186 ± 0,032	-14,2 ± 0,8

Outra característica importante para as nanopartículas é o valor do potencial zeta, uma vez que o mesmo influencia em sua estabilidade coloidal. Quanto maior o módulo do

potencial zeta, maior tende a ser a estabilidade das partículas em suspensão. Isso se deve a repulsão eletrostática entre as partículas, causada pelas suas cargas de superfície, que por consequência impede a agregação/aglomeração (KUMAR et al., 2004).

Figura 22: Diâmetro médio e distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas produzidas.



Diâmetro hidrodinâmico médio e distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas produzidas. Os resultados foram obtidos por meio da técnica de espalhamento dinâmico da luz. (A) NP-VAZ com diâmetro médio de 210 nm. (B) NP-OEM com diâmetro médio de 187 nm. (C) NP-CLB com diâmetro médio de 185 nm. (D) NP-CLB-OEM com diâmetro médio de 220 nm.

As nanopartículas aqui formuladas apresentaram um valor para o potencial zeta variando entre -17,7 a -14,2 mV, onde o sinal negativo evidencia a carga superficial negativa, que pode ser atribuída à presença de grupos carboxílicos terminais do polímero sobre a superfície (DIAS, 2017). A carga superficial negativa é uma característica desejável para sistemas de entrega de fármaco administrado por via intravenosa, uma vez que as nanopartículas com carga superficial negativa tem tempo de meia-vida mais prolongado em relação às carregadas positivamente ou neutras (BLANCO et al., 2015).

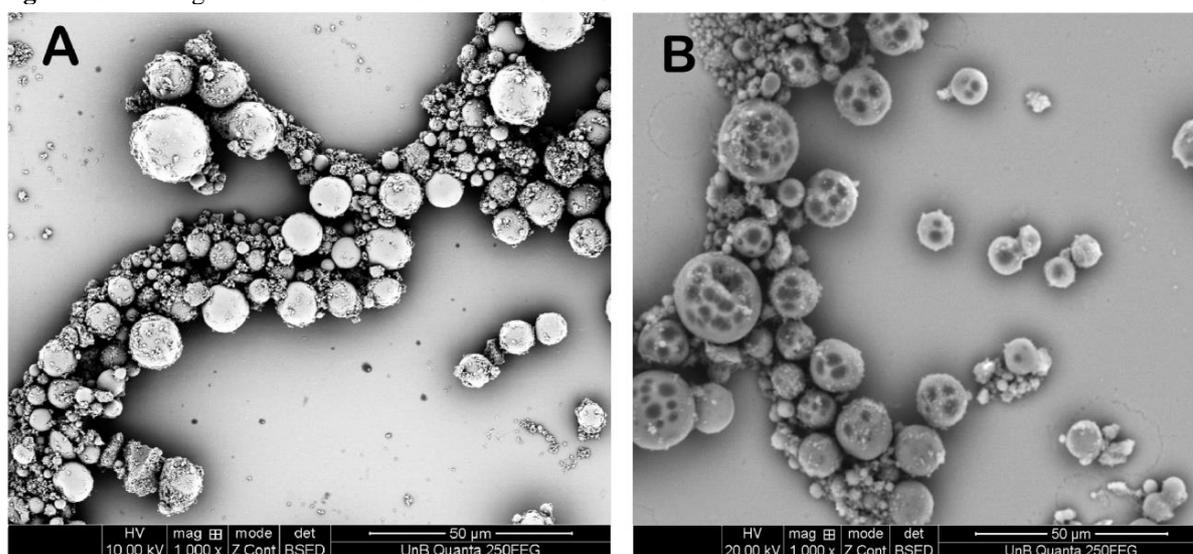
De maneira geral, valores para o módulo do potencial zeta acima de 60 mV para partículas em suspensão representa uma excelente estabilidade do sistema, enquanto para

módulos acima de 30 mV a estabilidade é considerada boa. Para módulos do potencial zeta próximo de 20 mV a estabilidade é considerada razoável, pois propicia apenas uma estabilidade de curto prazo (HONARY e ZAHIR, 2013). Desta forma, os valores do potencial zeta encontrados mostram que as NPs obtidas quando em suspensão podem permanecer estáveis por um curto intervalo de tempo, evitando a agregação/aglomeração das mesmas. Contudo o efeito da agregação/aglomeração das nanopartículas que apresentam baixo valor para módulo do potencial zeta pode ser contornado por meio de usos de estabilizantes (HONARY e ZAHIR, 2013).

5.3.2 Morfologia das Nanopartículas

A morfologia da superfície das nanopartículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura, utilizando um microscópio Fanta Quanta 250[®] operando no modo detector de elétrons retroespalhados (BSED). Através deste experimento se buscou avaliar a superfície das NPs, por isto, foi escolhido propositalmente um campo onde estavam presentes as maiores partículas, onde podemos observar que a micrografia obtida para as NP-CLB (Figura 23A) apresentou como características NPs com um formato esférico, distribuição polidispersa e uma superfície lisa, enquanto que para a micrografia obtida para as NP-CLB-OEM (Figura 23B), também foram encontradas NPs esféricas e polidispersas, porém rugosas/porosas, fato que foi atribuído à adição do funcionalizante OEM.

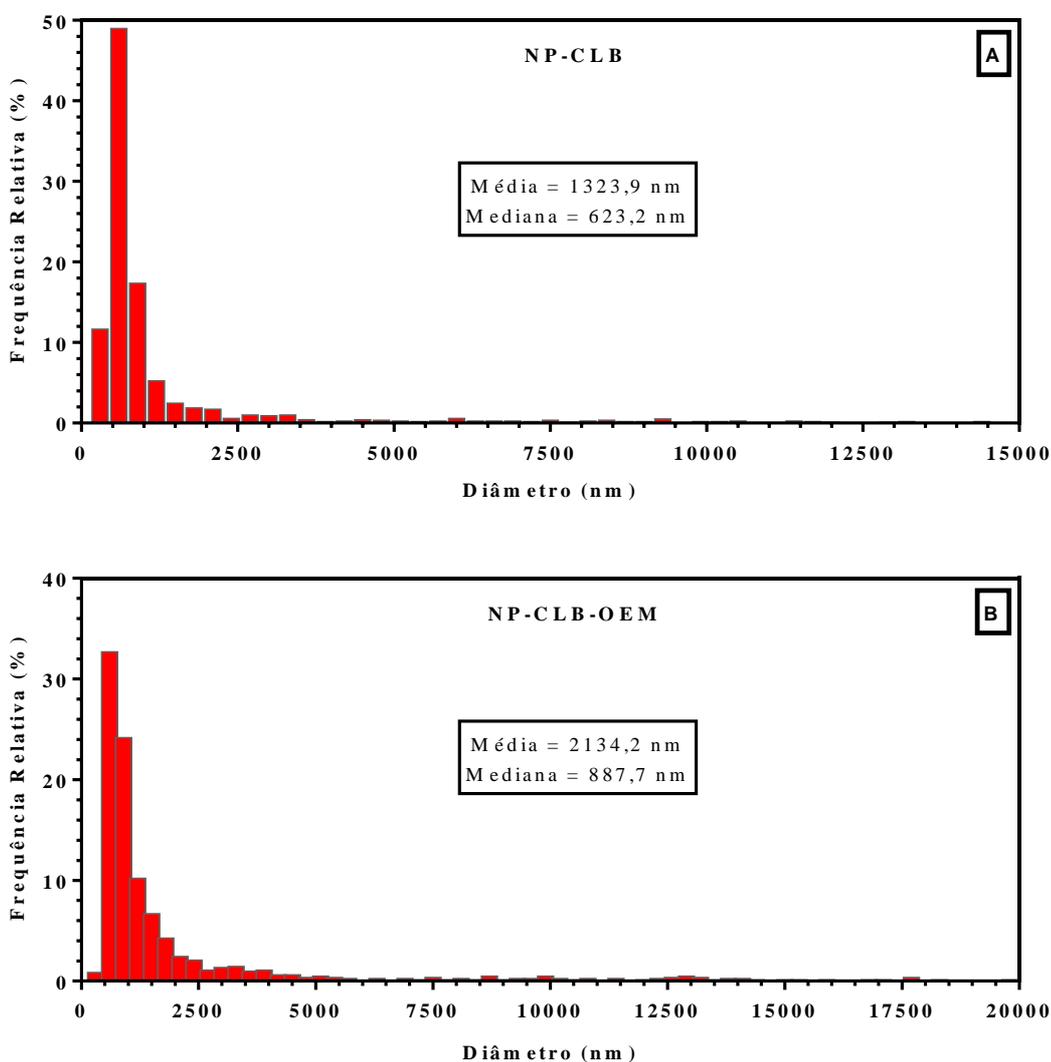
Figura 23: Micrografia MEV das NP-CLB e NP-CLB-OEM.



Micrografia MEV das NP-CLB e NP-CLB-OEM. A) Micrografia das NP-CLB com partículas esféricas e lisas. B) Micrografia das NP-CLB-OEM com partículas esféricas e rugosas.

O campo com as maiores partículas também foi escolhido porque, ao examinarmos as menores partículas, as mesmas eram destruídas pelo feixe de elétrons do aparelho. Assim, a partir das micrografias, foram obtidas as distribuições de tamanho das NP-CLB e NP-CLB-OEM (Figura 24), onde devido à limitação da resolução das imagens foram contadas apenas as NPs com diâmetros variando de 300 nm a 20.000 nm, embora houvesse partículas menores (100 – 200 nm, conforme dados obtidos pela técnica de espalhamento dinâmico da luz).

Figura 24: Histograma com a distribuição de tamanho das NPs.



Histograma com a distribuição de tamanho das NPs avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. A) Histograma com a distribuição de tamanho obtido para as NP-CLB. B) Histograma com a distribuição de tamanho obtido para as NP-CLB-OEM.

Pela contagem realizada por meio do *software* ImageJ[®], as NP-CLB apresentaram tamanho variando entre 300 nm a 15.000 nm, com uma média de tamanho de 1323,9 nm,

onde aproximadamente 78% das NPs estavam abaixo dos 1000 nm, enquanto as NP-CLB-OEM apresentaram tamanho variando entre 300 nm a 20.000 nm, com uma média de tamanho de 2134,2 nm, onde aproximadamente 58% das NPs estavam abaixo dos 1000 nm.

Os achados obtidos por espalhamento dinâmico da luz e por microscopia eletrônica de varredura diferem entre si. No entanto, cada técnica apresentam vantagens e limitações, de forma que ao mesmo tempo em que as análises por MEV podem fornecer informações de alta resolução sobre o tamanho e a forma das partículas, a mesma sofre com a possibilidade de introdução de artefatos durante a preparação da amostra e com estatísticas ruins de contagem, uma vez que cada partícula precisa ser medida individualmente a partir de uma ou mais imagens que podem não ser estatisticamente representativas (SCHÖPE et al., 2007). Por outro lado, a técnica por espalhamento dinâmico da luz têm excelentes estatísticas de contagem, mas também têm desvantagens, como o chamado problema de inversão, onde a distribuição do tamanho das partículas é obtida pela inversão numérica de uma transformada de Laplace, para a qual não há solução única (SCHÖPE et al., 2007), e ainda pelo limite superior do tamanho que pode ser medido, que vai até 6000 nm, e que depende do início da sedimentação e do número de flutuação da amostra (MALVERN, 2004). Desta maneira, enquanto o resultado obtido por meio da técnica de espalhamento dinâmico da luz suprimiu as partículas maiores que 6000 nm, o resultado obtido por imagens de MEV suprimiu as partículas menores que 300 nm.

5.3.3 Avaliação Espectroscópica

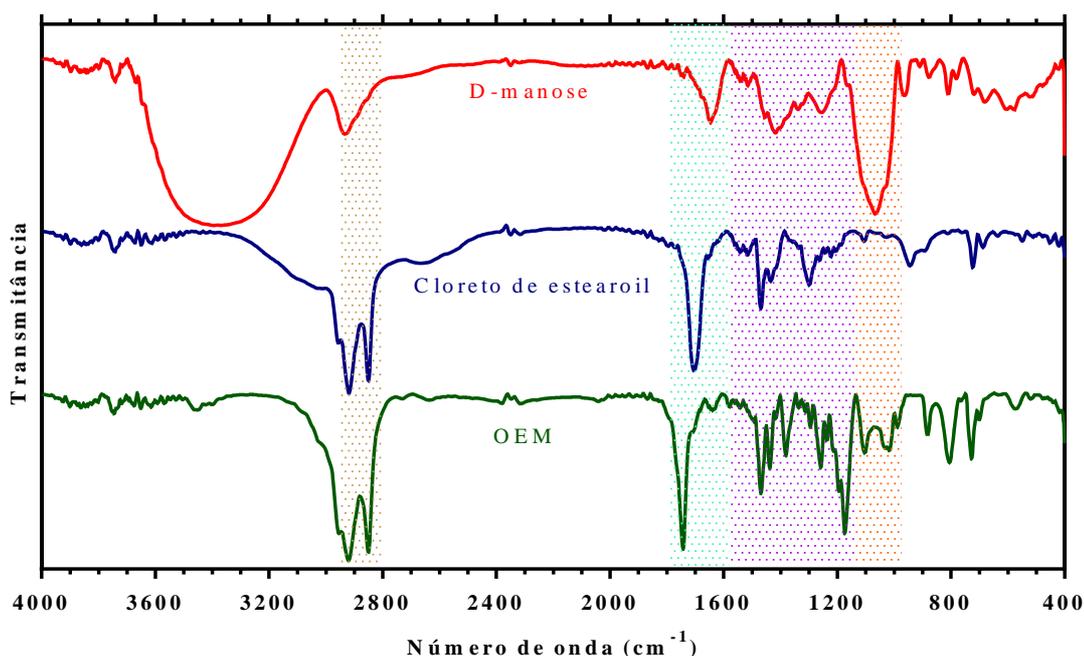
5.3.3.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Com o intuito de avaliar a síntese da *O*-estearoil manose, a incorporação do clorambucil nas nanopartículas e a funcionalização das nanopartículas com a *O*-estearoil manose, realizou-se as medidas dos espectros no infravermelho com transformada de Fourier das nanopartículas e das substâncias utilizadas na síntese, onde por meio dos espectros obtidos avaliou-se a faixa de absorção e intensidade de cada espectro para atribuição do tipo específico de ligação, e assim identificar os compostos e mudanças no caráter ou na quantidade de uma ligação em particular.

A conjugação do cloreto de estearoil a D-manose, formando a OEM, pôde ser confirmada ao se comparar os espectros de FTIR obtidos para a D-manose, cloreto de

estearoil e OEM, que se encontram na Figura 25. No caso da D-manose, é observada uma banda larga entre $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, atribuída ao estiramento O-H intermolecular, que ocorre devido à ligação de hidrogênio entre as moléculas de D-manose. Nota-se que esta banda está quase ausente no caso da OEM, o que pode ser explicado pelo impedimento estérico causado pela longa cadeia alifática desta molécula.

Figura 25: Espectros FTIR da D-manose, cloreto de estearoil e O-estearoil manose.



Espectros normalizados de FTIR da D-manose, cloreto de estearoil e *O*-estearoil manose. Acima (em vermelho) é mostrado o espectro no FTIR para a **D-manose**. No meio (em azul) é mostrado o espectro no FTIR para o **cloreto de estearoil** e abaixo (em verde) é mostrado o espectro para a ***O*-estearoil manose**. Todos os espectros foram obtidos em um intervalo de número de onda entre $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

Para as três moléculas em análise (D-manose, cloreto de estearoil e OEM), os picos atribuídos à deformação axial simétrica ($\nu_a\text{ CH}_2$) e axial assimétrica ($\nu_{\text{ass}}\text{ CH}_2$) do grupo metileno são encontrados em 2849 e 2918 cm^{-1} respectivamente, onde estes picos são mais intensos para o cloreto de estearoil e OEM devido à presença de uma longa cadeia alifática. As três moléculas também apresentaram picos referentes à deformação axial da ligação C=O da carbonila ($\nu\text{ C=O}$) que foram encontradas em 1643 cm^{-1} , 1705 cm^{-1} e 1742 cm^{-1} para D-manose, cloreto de estearoil e OEM, respectivamente. Para a D-manose a ligação de hidrogênio intramolecular desloca o número de onda da deformação axial da ligação C=O para valores mais baixos. No entanto, o valor de 1742 cm^{-1} encontrado para a OEM é característico de grupamentos ésteres (SILVERSTEIN et al., 2005), o que confirma a conjugação da D-manose ao cloreto de estearoil. Além disso, os picos típicos de deformação

O-H de álcoois secundários compreendidos entre 1320 cm^{-1} e 1490 cm^{-1} estão presentes nos espectros da D-manose e da OEM, enquanto a banda forte entre 980 cm^{-1} a 1130 cm^{-1} atribuída à deformação axial C-O dos álcoois primários tem sua intensidade diminuída na OEM, quando comparado à D-manose.

Os picos na região entre $1320\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídos à deformação angular da ligação O-H das hidroxilas ligadas aos carbonos C2, C3, C4 e C6, presentes na D-manose (Figura 20). Conforme comparações entre os espectros obtidos para o cloreto de estearoil e para a OEM, podemos ver que esses picos estão presentes em ambos os espectros. Os picos entre $980\text{-}1130\text{ cm}^{-1}$ são atribuídos à deformação axial da ligação C-O-H das hidroxilas ligadas ao carbono C1, onde o espectro obtido para a D-manose apresenta picos bem intensos nesta região, diferente do que acontece com o espectro obtido para a OEM.

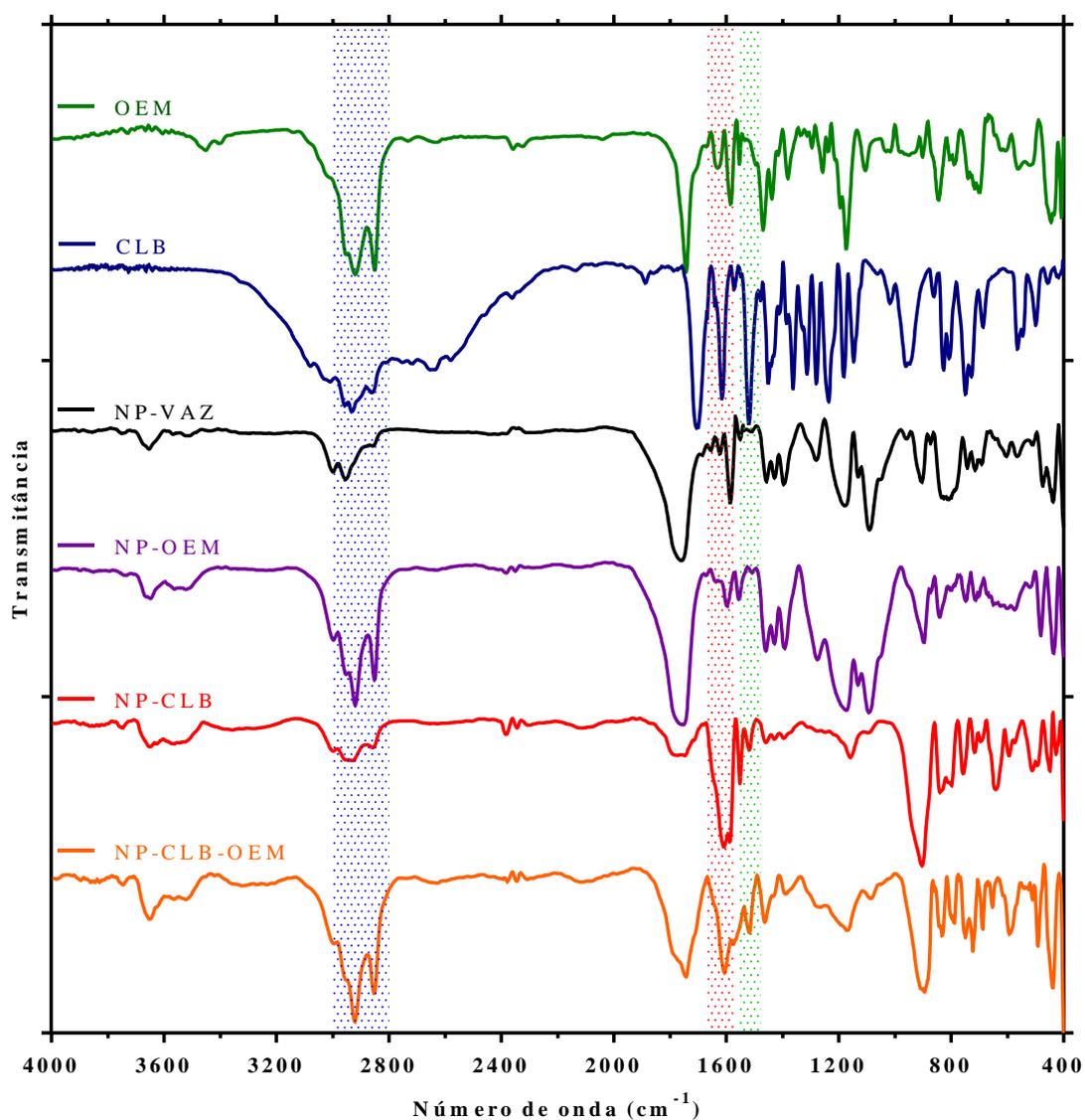
A diminuição da intensidade dos picos na região entre $980\text{-}1130\text{ cm}^{-1}$ para o espectro da OEM indica a ocorrência da ligação do cloreto de estearoil a D-manose, estando esta diminuição associada à diminuição de hidroxilas ligada ao carbono C1. São nestas hidroxilas onde ocorre o ponto de ligação entre a D-manose e o cloreto de estearoil, onde a ligação se dá pela substituição do cloro do cloreto de estearoil pelo oxigênio da hidroxila ligada ao carbono C1 (DAS e MUKHOPADHYAY, 2016).

O espectro obtido para o CLB (Figura 26) apresentou picos típicos já reportados na literatura (TARIQ e AL-BADR, 1987; GUNASEKARAN et al., 2008; DIAS et al., 2015). Assim, entre os principais picos encontrados estão os picos em $1701,2\text{ cm}^{-1}$ atribuído à deformação axial C=O, em $1614,4\text{ cm}^{-1}$ atribuído à deformação axial C=C do anel aromático, em $1519,9\text{ cm}^{-1}$ atribuído à deformação angular assimétrica H-C-H, em $1448,5\text{ cm}^{-1}$ atribuído à deformação C-H, em $1276,9\text{ cm}^{-1}$ atribuído à deformação axial C-N, em $958,6\text{ cm}^{-1}$ atribuído à deformação angular simétrica de C-N-C, em $748,4\text{ cm}^{-1}$ atribuído à deformação C-Cl e em $563,2\text{ cm}^{-1}$ atribuído à deformação axial do C-Cl.

Igualmente ao CLB, o espectro obtido para as NP-VAZ (Figura 26) apresentou picos típicos do PLGA já reportados na literatura (DIAS et al., 2015; GASPAR et al., 2018), os quais também estão presentes para as demais NPs (NP-CLB, NP-OEM e NP-CLB-OEM). Os principais picos encontrados foram em $1456,3\text{ cm}^{-1}$ atribuído à deformação angular assimétrica do CH_3 , em $1427,3\text{ cm}^{-1}$ atribuído à deformação angular O-H no plano, em $1394,5\text{ cm}^{-1}$ atribuído à deformação angular simétrica do CH_3 , em $1176,6\text{ cm}^{-1}$ atribuído à deformação axial C-O e em $1089,8\text{ cm}^{-1}$ atribuído à deformação axial assimétrica de C-O-C.

A confirmação da incorporação do clorambucil nas NPs foi realizada por meio de comparação entre os espectros de FTIR individuais obtidos para o CLB, OEM, NP-VAZ, NP-CLB e NP-CLB-OEM (Figura 26). A comparação entre esses espectros mostra que os picos característicos do CLB como em $1614,4\text{ cm}^{-1}$, atribuído à deformação axial C=C do anel aromático e em $1519,9\text{ cm}^{-1}$, atribuído à deformação angular assimétrica C-H, estão presentes nos espectros obtidos para as NP-CLB e NP-CLB-OEM e ausentes para NP-VAZ, evidenciando a incorporação do CLB nas NPs.

Figura 26: Comparação entre os espectros de FTIR das NPs, CLB e OEM.



Comparação entre os espectros normalizados de FTIR das NPs, CLB e OEM. São mostrados os espectros no FTIR para: OEM (em verde), CLB (em azul), NP-VAZ (em preto), NP-OEM (em roxo), NP-CLB (em vermelho) e NP-CLB-OEM (em laranja). Todos os espectros foram obtidos para um intervalo de número de onda entre $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

Para confirmação da funcionalização das NPs com OEM realizou-se a comparação entre os espectros mostrados na Figura 26. Nesta comparação, podemos ver que os picos entre 2760-2990 cm^{-1} , atribuídos ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C–H do grupo CH_2 (área hachurada em azul) é pouco intenso para as NP-VAZ e apresenta uma maior intensidade para as NP-OEM e NP-CLB-OEM. Essa banda também é intensa para a OEM, uma vez que a mesma apresenta uma longa cadeia alifática. Assim, o aumento na intensidade dessa banda para as NP-OEM e NP-CLB-OEM, quando comparados com os espectros das NP-VAZ e NP-CLB, evidencia a funcionalização das NPs com a OEM.

5.3.3.2 Espectroscopia de Absorção Molecular – UV-Vis

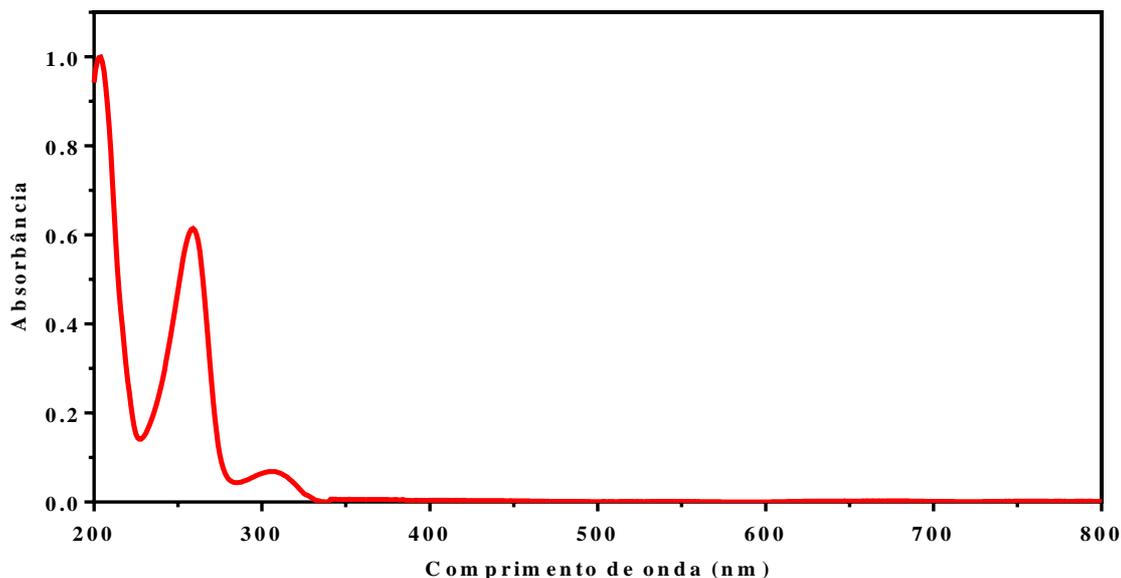
Foram realizadas medidas de absorção molecular na região do ultravioleta-visível para as nanopartículas e demais substâncias, onde por meio dos espectros obtidos visou-se avaliar a ocorrência do encapsulamento do clorambucil nas nanopartículas, a quantificação do clorambucil não encapsulado para o cálculo da eficiência de encapsulamento, e a quantificação do clorambucil liberado pelas nanopartículas ao longo do tempo.

Por meio da espectroscopia UV-Vis foram obtidos os espectros para o CLB livre (Figura 27) e para as NPs formuladas (Figura 28). O espectro obtido para o CLB diluído em água: metanol (1:1) apresentou dois picos característicos, um em 258 nm atribuído às transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, uma vez que o CLB apresenta um anel aromático ligado a uma amina terciária e cadeia contendo carbonila de ácido carboxílico, o outro pico foi encontrado em 303 nm.

Para os espectros obtidos para as NPs nota-se o efeito do espalhamento de luz, que é um tipo de interferência que ocorre quando na amostra há presença de partículas menores do que o comprimento de onda da luz que varre a amostra, tais como agregados, precipitados e coloides. Assim, quando a luz incide sobre este tipo de amostras, ela será espalhada elasticamente na solução e essa dispersão influenciará o espectro de absorção medido, uma vez que a luz dispersa não atingirá o detector do espectrômetro de absorção e, portanto, será interpretada como luz absorvida (OWEN, 1996).

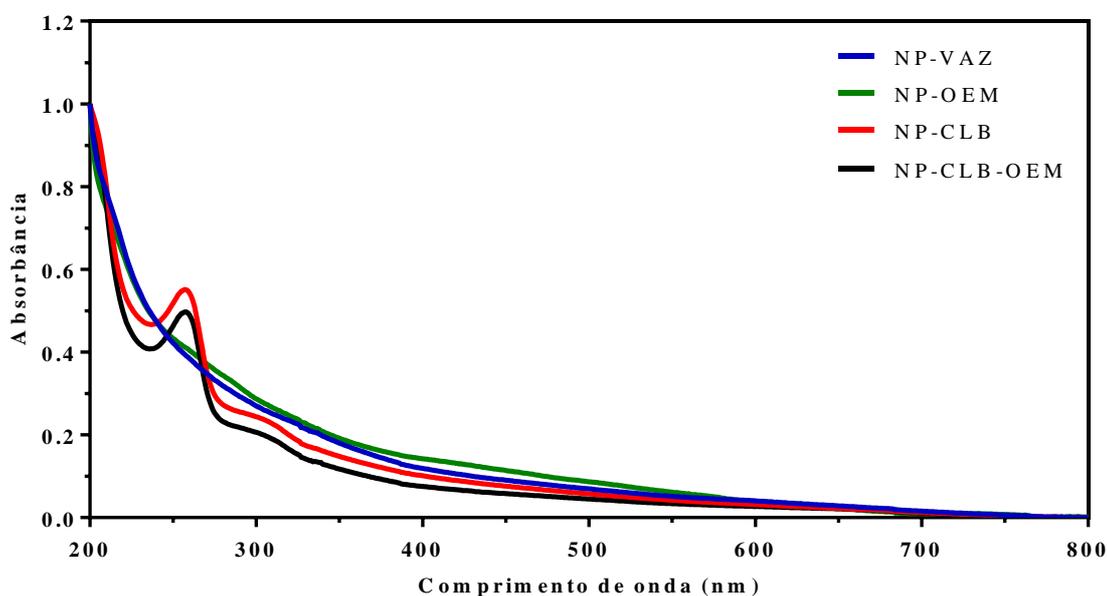
Nota-se também nos espectros obtidos para as NP-CLB e NP-CLB-OEM um pico em 258 nm, que é igualmente encontrado para o CLB livre. Isso evidencia a presença de CLB incorporado nas NPs e que o mesmo não sofreu alterações em sua estrutura, já que não houve deslocamento do pico.

Figura 27: Espectro de absorção normalizado na região UV-Vis do CLB livre.



Espectro de absorção normalizado na região UV-Vis do CLB livre em solução água/metanol 1:1. Observa-se dois picos característicos, um em 258 nm e o outro em 303 nm.

Figura 28: Espectros de absorção normalizados na região UV-Vis das nanopartículas de PLGA.

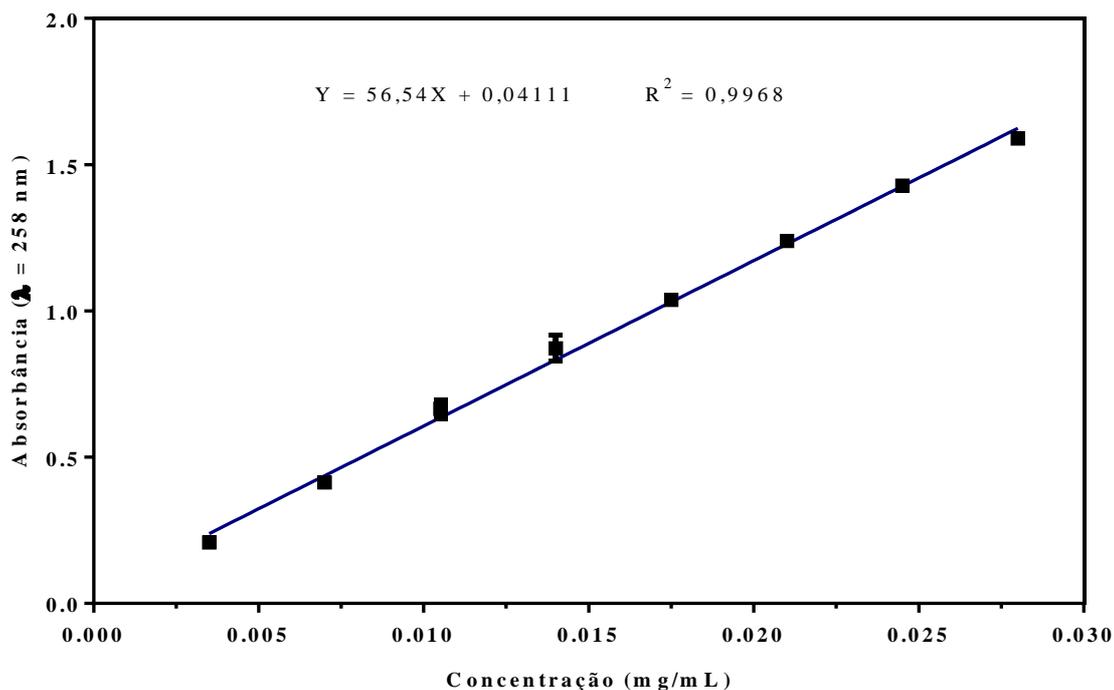


Espectros de absorção normalizados na região UV-Vis das nanopartículas de PLGA dispersas em água/metanol 1:1. Nos quatro espectros obtidos nota-se o efeito do espalhamento de luz. **Em vermelho** temos o espectro obtido para as **NP-CLB** e **em preto** para as **NP-CLB-OEM** ambas apresentando um pico em 258 nm. O espectro das **NP-VAZ** está representado **em azul** e o espectro das **NP-OEM** em **verde**.

Por meio de concentrações conhecidas do CLB, foi obtida uma curva de calibração deste fármaco em meio aquoso (Figura 29). A partir da curva obtida e por meio de regressão linear, foi encontrada a equação $Y = 56,54X + 0,04111$, onde Y é a absorbância e X é a

concentração em mg/mL. O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,9968, mostrando um bom ajuste da curva aos dados experimentais. A equação encontrada foi utilizada quando houve a necessidade de quantificação do CLB em solução aquosa, como por exemplo, no cálculo da eficiência de encapsulamento.

Figura 29: Curva de calibração obtida para determinar a concentração do CLB.



Curva de calibração obtida para determinar a concentração do CLB. Oito soluções padrões de CLB com concentrações conhecidas variando 0,0035 – 0,028 mg/mL foram preparadas em água/metanol 9:1. O valor da absorbância obtido para o comprimento de onda de 258,0 nm foi utilizado para a obtenção da reta.

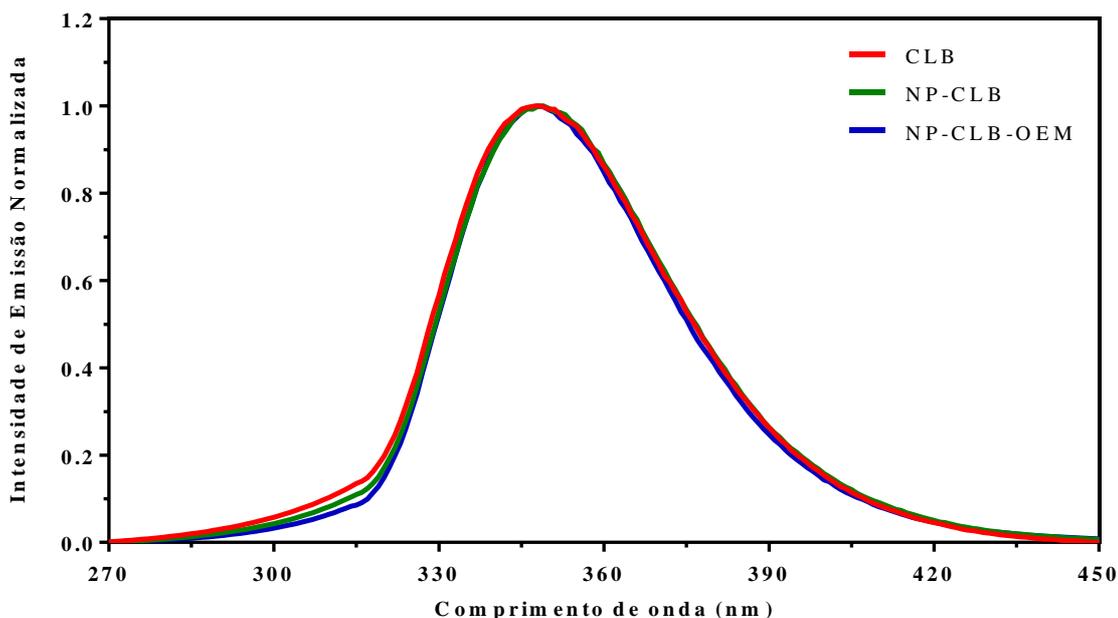
5.3.3.3 Espectroscopia de Fluorescência

As análises em espectroscopia de fluorescência visaram avaliar a emissão de fluorescência das nanopartículas e do fármaco clorambucil quando submetidos à excitação no comprimento de onda de 258 nm. Por meio dos espectros obtidos avaliou-se a ocorrência do encapsulamento do clorambucil nas nanopartículas.

Foram obtidos os espectros de emissão na região compreendidos entre 270-450 nm para o CLB livre, NP-CLB e NP-CLB-OEM, quando excitadas em um comprimento de onda de 258 nm, esses espectros são mostrados na Figura 30. Para o espectro do CLB, nota-se uma banda de emissão compreendida entre 315 a 390 nm e com emissão máxima em 348 nm, estando de acordo com os valores encontrado na literatura (DIAS et al., 2015).

Para o espectro obtido para as NP-CLB e NP-CLB-OEM, percebe-se também a presença de uma banda de emissão compreendida entre 315 a 390 nm e com pico em 348 nm. Esses dados, assim como os obtidos por espectroscopia UV-Vis, sugerem a integridade do fármaco, bem como seu encapsulamento nas nanopartículas.

Figura 30: Espectros de fluorescência do CLB e NPs de PLGA



Espectros de fluorescência normalizado do CLB e NPs de PLGA. O CLB (em vermelho) apresentou um pico de emissão máxima em 348 nm quando excitado em 258 nm; o mesmo acontecendo para as NP-CLB (em verde) e NP-CLB-OEM (em azul). Todas as leituras foram realizadas em água/metanol 1:1

5.3.4 Eficiência de Encapsulamento

O cálculo da eficiência de encapsulamento foi realizado de maneira indireta. A partir da leitura do espectro de absorção no UV-Vis obtido dos sobrenadantes das NPs contendo CLB e com a equação da curva de calibração obtida previamente (Figura 29), foi encontrada a quantidade de massa de CLB não encapsulado para as NP-CLB e NP-CLB-OEM (Tabela 2). Assim, utilizando-se a Equação 1 descrita anteriormente, foi encontrado uma eficiência de encapsulamento de $70,5 \pm 1,22$ % para as NP-CLB e $61,3 \pm 1,65$ % para as NP-CLB-OEM.

Tabela 2: Eficiência de Encapsulamento das NPs.

Amostra	Massa inicial de CLB (mg)	Massa de CLB não encapsulada (mg)	Eficiência de encapsulamento (%)
NP-CLB	10,0	$2,95 \pm 0,12$	$70,5 \pm 1,22$
NP-CLB-OEM	10,0	$3,86 \pm 0,16$	$61,3 \pm 1,65$

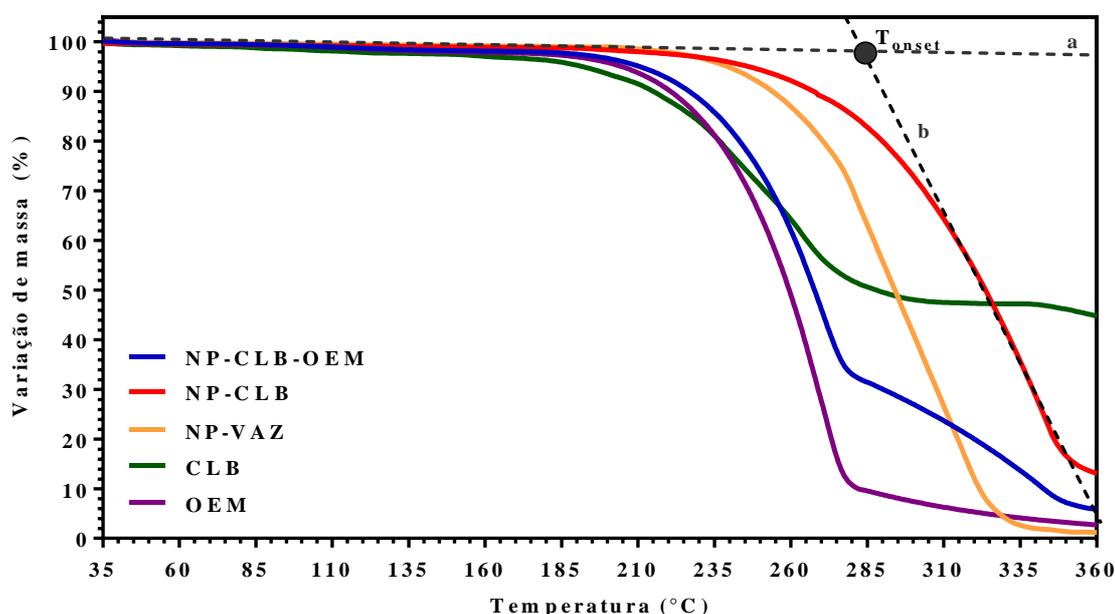
Comparando os valores encontrados neste trabalho com os encontrados por Dias e colaboradores, que também formulou NPs de PLGA com CLB (DIAS, 2012; DIAS et al., 2015; DIAS, 2017), as NP-CLB obtidas neste trabalho apresentaram uma razão fármaco/polímero maior (141 $\mu\text{g}/\text{mg}$ versus 93 $\mu\text{g}/\text{mg}$), o mesmo acontecendo para as nanopartículas com a presença de um funcionalizante, NP-CLB-OEM (122,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ versus 88,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Desta forma, as nanopartículas produzidas apresentam uma boa carga de fármaco por matriz polimérica, fato que pode melhorar a biodisponibilidade do clorambucil para o tecido alvo.

5.3.5 Análises Térmicas

A fim de avaliar a estabilidade térmica das NPs e dos compostos utilizados na síntese das NPs, como o fármaco CLB e o funcionalizante OEM, foram obtidas as curvas de TGA para as NP-VAZ, NP-CLB e NP-CLB-OEM, CLB e OEM. As curvas de TGA são mostradas na Figura 31. Como podemos observar, cada amostra apresentou um perfil termogravimétrico diferente e com temperaturas iniciais do evento de decomposição térmica distintos. Por motivos práticos, utilizou-se a temperatura *onset* (T_{onset}) como a temperatura extrapolada para o início do evento de decomposição térmica. A T_{onset} é definida pelo ponto de interseção da linha de base extrapolada (reta a, Figura 31) com a tangente que passa pelo ponto de inflexão da curva (reta b, Figura 31) (STORPIRTIS et al., 2009). As temperaturas extrapoladas para o início do evento de decomposição térmica de cada amostra é mostrada na Tabela 3.

Os resultados obtidos pelas análises termogravimétricas nos mostram que todas as amostras são termicamente estáveis até os 200 °C. Para o CLB foi encontrado que a decomposição térmica começa a ocorrer na temperatura de 213,54 °C, já para o OEM o evento começa a 234,02 °C, enquanto as NP-VAZ tem o início extrapolado em 261,24 °C. Percebemos que a combinação do CLB com a matriz polimérica para o caso das NP-CLB causou uma maior estabilidade térmica para essa amostra, pois o início extrapolado para a decomposição térmica foi em 286,15 °C, uma temperatura maior do que para seus componentes isolados. Para as NP-CLB-OEM foi observado um perfil termogravimétrico semelhante ao da OEM, onde a T_{onset} foi de 235,27 °C.

Destaca-se ainda que todas as amostras apresentaram decomposição térmica em duas etapas, onde o CLB, a OEM e as NP-CLB-OEM tem a primeira etapa compreendida entre 210 °C e 285 °C e a segunda após 285 °C.

Figura 31: Curvas TGA das NP-VAZ, NP-CLB, NP-CLB-OEM, CLB e OEM.

Curvas TGA das NP-VAZ, NP-CLB, NP-CLB-OEM, CLB e OEM. Em azul: NP-CLB-OEM; em vermelho: NP-CLB; em laranja: NP-VAZ; em verde: CLB e em roxo: OEM. A T_{onset} foi determinada pelo ponto de interseção da linha de base extrapolada (reta a) com a tangente que passa pelo ponto de inflexão da curva (reta b).

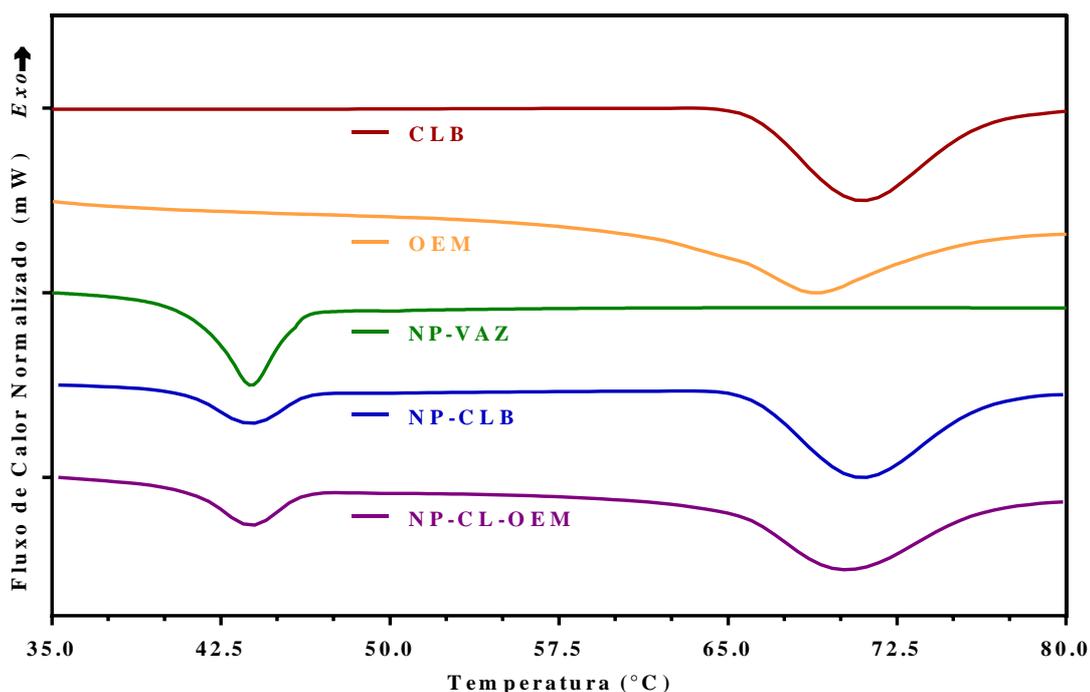
Tabela 3: Eventos térmicos observados durante as análises TGA para as amostras de NP-VAZ; NP-CLB, NP-CLB-OEM, CLB e OEM.

Amostra	T_{onset} (°C)	Evento
NP-CLB	286,15	Decomposição térmica
NP-VAZ	261,24	Decomposição térmica
NP-CLB-OEM	235,27	Decomposição térmica
OEM	234,02	Decomposição térmica
CLB	213,54	Decomposição térmica

As amostras analisadas por TGA também foram analisadas por DSC. Esta técnica permite detectar variações de temperatura em um dado material e, ainda, medir a variação da entalpia envolvida em eventos térmicos que ocorrem com um determinado material, quando este é submetido a uma programação controlada de temperatura (STORPIRTIS et al., 2009). Assim, entre as aplicações do DSC pode-se destacar a determinação fácil e rápida da temperatura de transição vítrea, as temperaturas de fusão e cristalização (MENCZEL e PRIME, 2009). No campo farmacêutico, essa técnica permite ainda analisar a compatibilidade entre fármaco e o excipiente (STORPIRTIS et al., 2009). Neste trabalho, quando os eventos forem endotérmicos ($\Delta H > 0$) a curva obtida apresentará picos descendentes e no caso de eventos exotérmicos os picos serão ascendentes.

As curvas DSC obtidas para as NP-VAZ, NP-CLB, NP-CLB-OEM, CLB e OEM no intervalo de 35 °C a 80 °C são mostradas na Figura 32. Os eventos térmicos para cada amostra analisada e as respectivas temperaturas em que eles ocorreram estão listados na Tabela 4

Figura 32: Curvas DSC das NP-VAZ, NP-CLB, NP-CLB-MAN, CLB e OEM.



Curvas DSC das NP-VAZ, NP-CLB, NP-CLB-OEM, CLB e OEM. Em vermelho: CLB; em laranja: OEM; em verde: NP-VAZ; em azul: NP-CLB e em roxo: NP-CLB-OEM.

Tabela 4: Eventos térmicos observados durante as análises DSC para as amostras de NP-VAZ; NP-CLB, NP-CLB-OEM, CLB e OEM.

Amostra	Pico/Inflexão (°C)	Evento
CLB	71,15	Fusão do fármaco
OEM	68,69	Fusão do funcionalizante
NP-VAZ	43,75	Transição vítrea do polímero
NP-CLB	44,00	Transição vítrea do polímero
	71,15	Fusão do fármaco
NP-CLB-OEM	44,00	Transição vítrea do polímero
	70,13	Fusão do fármaco e do funcionalizante

A curva DSC obtida para o CLB apresentou um pico endotérmico em 71,15 °C, atribuído à fusão do fármaco, sendo um valor próximo aos reportados na literatura (GREEN

et al., 1991; LIU et al., 2004; DIAS, 2012). Para a OEM também foi encontrado um pico endotérmico referente à fusão dessa molécula em 68, 69 °C, valor similar ao reportado por Ghosh e colaboradores (GHOSH et al., 2017).

Todas as NPs analisadas (NP-VAZ, NP-CLB e NP-CLB-OEM) apresentaram um pico endotérmico referente à transição vítrea da matriz polimérica, que ocorreu em 43,75 °C para as NP-VAZ e em 44,00 °C para as NP-CLB e NP-CLB-OEM, o que mostra que o acréscimo do CLB e da OEM não interferiu no ponto de transição vítrea das NPs.

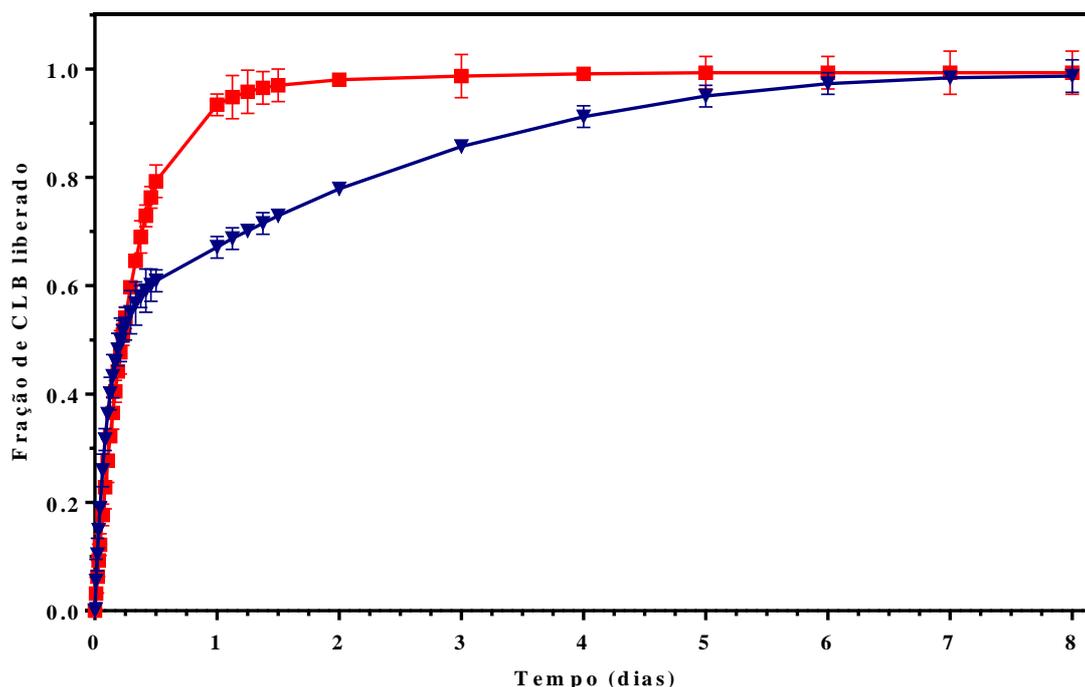
A temperatura de transição vítrea é um dado que nos mostra até que faixa de temperatura a matriz polimérica se apresenta mecanicamente sólida (estado vítreo), onde acima desta temperatura a matriz se apresentará mecanicamente mole, “borrachosa”. A temperatura de transição vítrea pode nos mostrar ainda a temperatura mais alta de uso da matriz polimérica com as suas propriedades vítreas, bem como a menor temperatura de processamento possível (MENCZEL e PRIME, 2009).

Na curva obtida para as NP-CLB foi encontrado um pico endotérmico em 71,15 °C, relativo à fusão do CLB, enquanto para as NP-CLB-OEM foi encontrado um pico endotérmico em 70,13 °C, relativo à sobreposição da fusão do CLB e da OEM. Assim, esses valores encontrados evidencia que a matriz, o fármaco e o funcionalizante se mostram compatíveis, uma vez que essa associação não causou diminuição significativa no ponto de fusão do CLB e da OEM (STORPIRTIS et al., 2009).

5.3.6 Perfil de Liberação e Cinética de Liberação

Foram analisados os perfis de liberação *in vitro* do clorambucil a partir das NP-CLB e NP-CLB-OEM em meio tamponado (PBS, pH = 7,4), sob agitação e em temperatura controlada (37 °C). O gráfico obtido é mostrado na Figura 33, onde a fração cumulativa do clorambucil liberado pelas NPs é apresentada ao longo do tempo (em dias). Podemos observar que ambas as NPs apresentaram uma liberação intensa nas primeiras 12 horas, sendo que para as NP-CLB, aproximadamente 60% do fármaco foi liberado, e para as NP-CLB-OEM, aproximadamente 80%. Este padrão de uma intensa liberação inicial associado a amostras com grande quantidade de fármaco tem sido associado a uma ruptura inicial devido à alta razão fármaco/polímero, onde o fármaco adsorvido ou fracamente ligado à superfície é liberado por meio de difusão (MESSARITAKI et al., 2005; MAKADIA e SIEGEL, 2011; DIAS et al., 2015; LUNARDI et al., 2017).

Figura 33: Perfil de liberação do CLB a partir das nanopartículas.

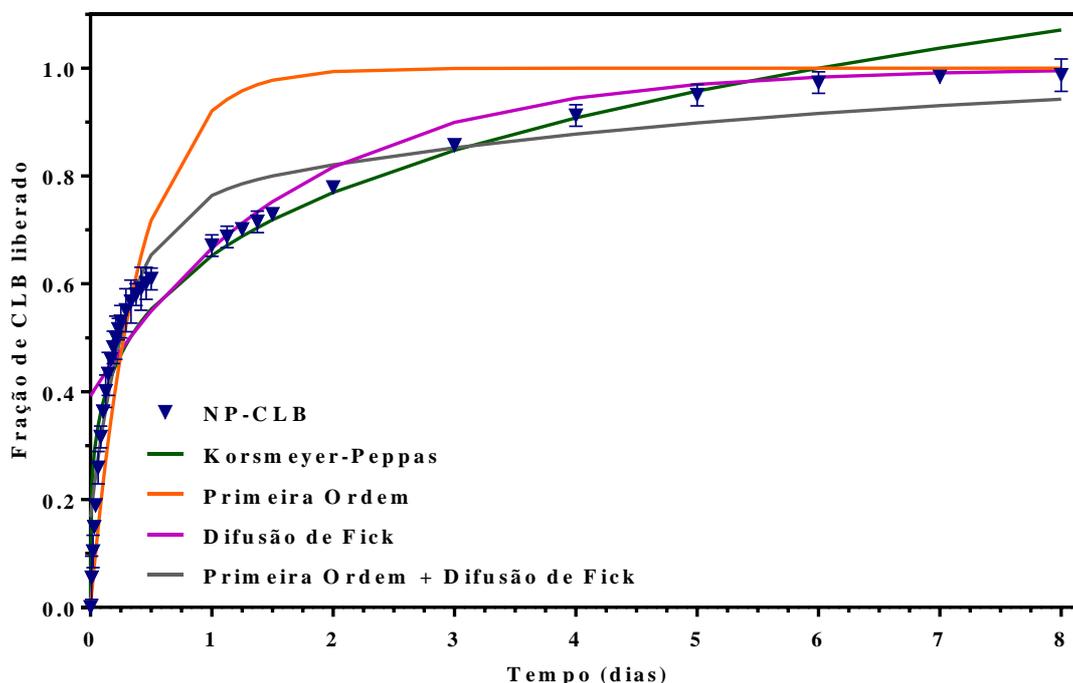


Perfil de liberação do CLB a partir das nanopartículas. Em azul está representado o perfil de liberação do CLB a partir das NP-CLB e em vermelho a partir das NP-CLB-OEM.

O perfil de liberação do fármaco para as NP-CLB e NP-CLB-OEM pode ser interpretado como sendo bifásico, pois, há uma fase de rápida liberação associada à difusão do fármaco adsorvido ou fracamente ligado a matriz polimérica, seguida de uma fase de liberação lenta associada à difusão do fármaco no interior da matriz e a degradação da matriz. Resultados semelhantes foram reportados em outros trabalhos com nanopartículas de PLGA (DIAS et al., 2015; LUNARDI et al., 2017). Para as NP-CLB, a fase de liberação rápida ficou compreendida nas primeiras 12 horas, onde ocorreu a liberação de aproximadamente 60% do fármaco, posteriormente, seguida por uma liberação lenta do fármaco restante, que atingiu 98,7% no 8º dia. Para as NP-CLB-OEM, a fase de liberação rápida ficou compreendida nas primeiras 24 horas, ocorrendo uma liberação de aproximadamente 93% do fármaco neste período, e depois uma liberação lenta do fármaco restante, que atingiu 99,3% no 5º dia, permanecendo praticamente constante nos demais dias.

Os dados experimentais da liberação do CLB foram analisados por quatro modelos matemáticos diferentes: Korsmeyer-Peppas, modelo de primeira ordem, difusão Fickiana, e a combinação linear da difusão Fickiana e o modelo de primeira ordem. Os parâmetros obtidos para cada modelo são apresentados na Tabela 5. A plotagem dos gráficos obtidos encontra-se nas Figuras 34 e 35.

Figura 34: Plotagem dos resultados obtidos pelos modelos de cinética de liberação para a liberação do CLB a partir das NP-CLB.



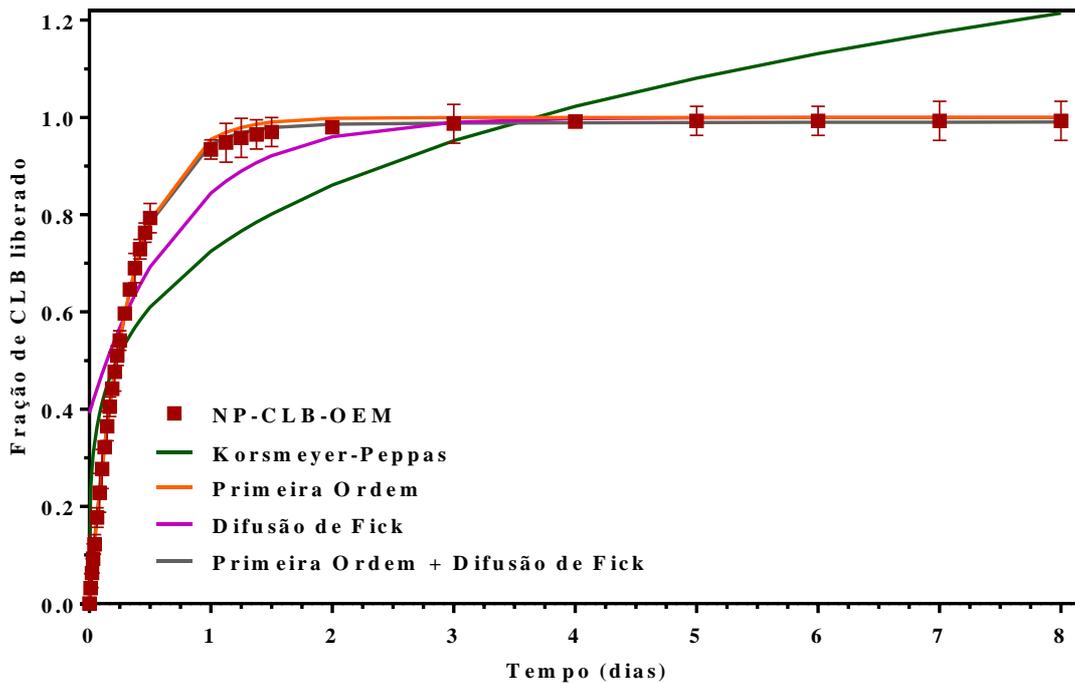
Liberação do CLB a partir das NP-CLB considerando os modelos cinéticos: Korsmeyer-Peppas (em verde), primeira ordem (em laranja), difusão de Fick (em roxo) e primeira ordem + difusão de Fick (em cinza). Em azul (triângulos azuis) são mostrados os pontos experimentais obtidos para a liberação do clorambucil a partir das NP-CLB.

Para o modelo de Korsmeyer-Peppas foram encontrados valores de R^2_{ajustado} de 0,9412 e 0,8207 para as NP-CLB e NP-CLB-OEM, respectivamente. A partir dos resultados do perfil de liberação obtidos para cada sistema (NP-CLB e NP-CLB-OEM) e mostrado na Figura 33, podemos perceber que a presença do funcionalizante influencia no perfil de liberação do fármaco. Desta forma, o modelo Korsmeyer-Peppas apresentou um bom ajuste para as NP-CLB, mas não para as NP-CLB-OEM. O valor n encontrado para ambas as NPs, 0,2383 para as NP-CLB e 0,2485 para as NP-CLB-OEM, foram menores que 0,43, sugerindo que a liberação do fármaco foi mediada por difusão Fickiana.

Para o modelo de primeira ordem foi obtido um R^2 de 0,9084 para as NP-CLB e 0,9996 para as NP-CLB-OEM. Para as NP-CLB, esse modelo foi bom apenas para descrever os instantes iniciais da liberação, mas não foi capaz de descrever com boa precisão os momentos posteriores. No entanto, para as NP-CLB-OEM, o modelo mostrou um ótimo ajuste, sugerindo que com o acréscimo da *O*-estearoil manose na formulação das NPs o fármaco foi encapsulado mais próximo da superfície. Essa sugestão da encapsulação do CLB mais próximo da superfície nas NP-CLB-OEM também pode ser observada ao se comparar as

constantes K_{po} obtidas para cada sistema de liberação, onde vemos que ela foi mais acentuada para as NP-CLB-OEM, tendo um com valor de $3,1023 \text{ dias}^{-1}$ versus $2,5314 \text{ dias}^{-1}$ para as NP-CLB.

Figura 35: Plotagem dos resultados obtidos pelos modelos de cinética de liberação para a liberação do CLB a partir das NP-CLB-OEM.



Liberação do CLB a partir das NP-CLB-OEM considerando os modelos cinéticos: Korsmeyer-Peppas (em verde), primeira ordem (em laranja), difusão de Fick (em roxo) e primeira ordem + difusão de Fick (em cinza). Em vermelho (quadrados vermelhos) são mostrados os pontos experimentais obtidos para a liberação do clorambucil a partir das NP-CLB-OEM.

O modelo de difusão Fickiana apresentou valores de $R^2_{ajustado}$ de 0,8199 para as NP-CLB e 0,9130 para as NP-CLB-OEM, mostrando um melhor ajuste nos intervalos finais da liberação em ambos os sistemas. Uma comparação entre os coeficientes de difusão (De) para os dois sistemas nos dá um indicativo de que a liberação do CLB é mais acentuada para as NP-CLB-OEM, onde foi encontrado um valor para De igual a $4,6722 \times 10^{-15} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ versus $1,4427 \times 10^{-15} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para as NP-CLB. Esse fato também aconteceu quando se comparou as constantes de liberação K_{kp} e K_{po} nos modelos de Korsmeyer-Peppas e de primeira ordem, respectivamente, para cada sistema.

O modelo combinado primeira ordem + difusão Fickiana foi o que apresentou melhores valores de $R^2_{ajustado}$ para ambos os sistemas, 0,9515 para as NP-CLB e 0,9997 para as NP-CLB-OEM. Ao se comparar os valores do coeficiente de difusão (De) obtido para o

modelo combinado (primeira ordem + difusão Fickiana), que leva em consideração a contribuição de ambos os modelos, há um contraste com os valores encontrados considerando-se unicamente a difusão Fickiana ($1,4427 \times 10^{-15} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para as NP-CLB e $4,6722 \times 10^{-15} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para as NP-CLB-OEM). Assim, diferente do que ocorreu para o modelo de primeira ordem, o coeficiente de difusão de $4,5225 \times 10^{-16} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para as NP-CLB foi maior do que o encontrado para as NP-CLB-OEM, que foi de $1,3147 \times 10^{-16} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Tabela 5: Parâmetros da liberação do CLB a partir das NP-CLB e NP-CLB-OEM.

Parâmetros	Descrição	Unidade	NP-CLB	NP-CLB-OEM
Modelo Korsmeyer-Peppas				
K_{kp}	Constante de liberação de Korsmeyer-Peppas	dias ⁻ⁿ	0,6524	0,7246
n	Expoente de liberação	—	0,2383	0,2485
R^2	Coeficiente de determinação	—	0,943	0,8263
$R^2_{ajustado}$	Coeficiente de determinação ajustado	—	0,9412	0,8207
Modelo de Primeira ordem				
K_{po}	Constante de liberação de primeira ordem	dias ⁻¹	2,5314	3,1023
R^2	Coeficiente de determinação	—	0,9084	0,9996
Modelo de Difusão de Fick				
D	Coeficiente de difusão	$\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$	$1,4427 \times 10^{-15}$	$4,6722 \times 10^{-15}$
R^2	Coeficiente de determinação	—	0,8199	0,913
Modelo de Primeira ordem + Difusão de Fick				
θ_{po}	Fração da contribuição do modelo de primeira ordem	—	0,5728	0,979
θ_d	Fração da contribuição do modelo de difusão de Fick	—	0,4272	0,021
K_{po}	Constante de liberação de primeira ordem	dias ⁻¹	3,299	3,1344
De	Coeficiente de difusão	$\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$	$4,5225 \times 10^{-16}$	$1,3147 \times 10^{-16}$
R^2	Coeficiente de determinação	—	0,9545	0,9998
$R^2_{ajustado}$	Coeficiente de determinação ajustado	—	0,9515	0,9997

Os parâmetros foram determinados e utilizados no desenvolvimento matemático do modelo de liberação

Para uma melhor avaliação dos valores de De obtidos a partir do modelo combinado, temos que levar em conta as contribuições de θ_{po} e θ_d em cada sistema. Assim, levando isto em consideração neste modelo, podemos perceber que a liberação mais acentuada do CLB para as NP-CLB-OEM não é devido a um maior valor do coeficiente de difusão como sugerido pelo modelo de difusão Fickiana, mas a uma grande quantidade de CLB encapsulada

na superfície das NPs, uma vez que para esse sistema o modelo de primeira ordem é predominante, como indica o valor de θ_{po} de 0,9790, tendo apenas uma pequena parcela de contribuição difusional θ_d de 0,0210.

Para as NP-CLB as contribuições θ_{po} e θ_d foram 0,5728 e 0,4272, respectivamente; mostrando que ambos os modelos, primeira ordem e difusão Fickiana contribuem significativamente na liberação do CLB a partir das NP-CLB. Logo, esses resultados mostram a necessidade de se considerar mais de um mecanismo de liberação ocorrendo simultaneamente para explicar o perfil de liberação do CLB a partir de nanopartículas de PLGA.

5.4 Citotoxicidade das Nanopartículas

O ensaio de citotoxicidade teve como principal objetivo avaliar o efeito citotóxico das NPs em diferentes concentrações nas células MCF-7 e NIH-3T3. Os dados coletados foram obtidos de experimentos realizados em triplicatas e em pelo menos dois testes independentes. Os tratamentos foram realizados com quatro concentrações diferentes (16; 32; 64 e 128 $\mu\text{g}(\text{partículas})/\text{mL}$) de cada tipo de formulações de NPs (NP-VAZ, NP-OEM, NP-CLB e NP-CLB-OEM) e por dois períodos de tempos diferentes, 24h e 72h.

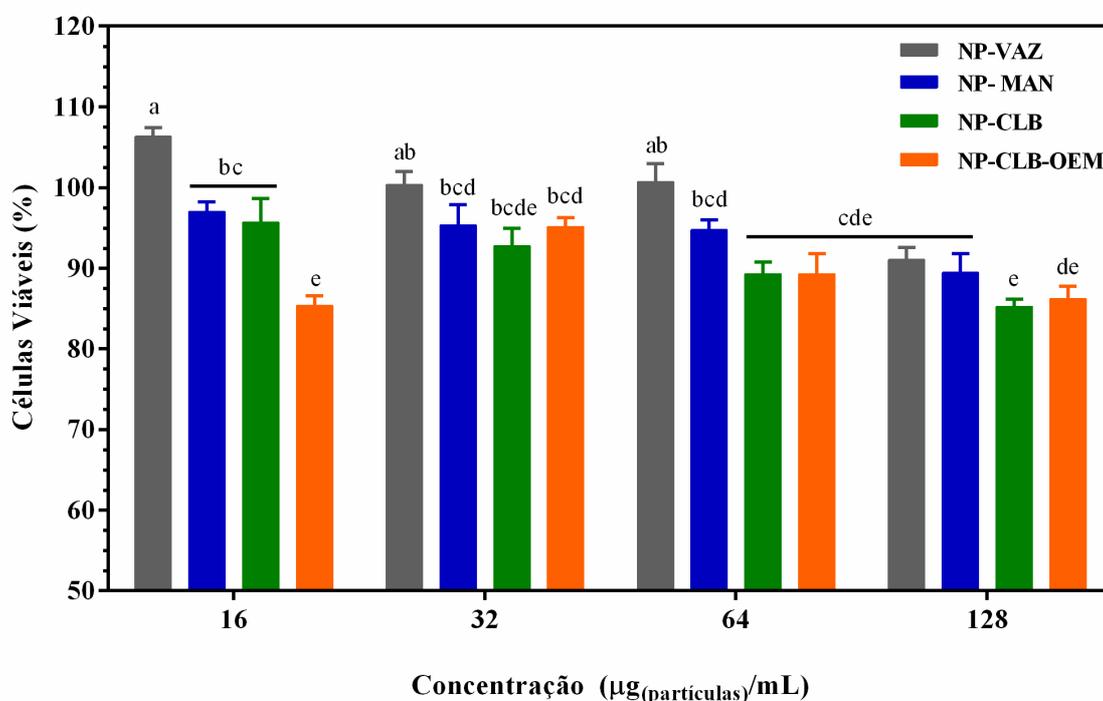
Na Figura 36 é mostrado o gráfico obtido com os resultados dos tratamentos realizados na linhagem NIH-3T3 de fibroblastos murino para o período de 24 horas, enquanto na Figura 37 é mostrado o gráfico obtido com os resultados para o período de 72 horas. Os resultados da análise de variância para os tratamentos de 24h e 72h realizados na linhagem NIH-3T3 é mostrada na Tabela 6. Na Tabela 7 são mostrados os resultados obtidos com o Teste de Tukey para os tratamentos de 24h e 72h realizados na linhagem NIH-3T3, onde também são mostradas as médias obtidas para cada tratamento.

Para os tratamentos realizados na linhagem NIH-3T3 no período de 24 horas os resultados da análise de variância apresentam diferença significativa entre os tratamentos, por esse motivo foi realizado um Teste de Tukey para discriminar os tratamentos significativamente diferentes. Assim, cada média recebeu um ou mais índices, sendo que as médias seguidas pelo(s) mesmo(s) índice(s) não diferem estatisticamente entre si.

No ensaio realizado com a linhagem NIH-3T3 no período de 24 horas não foi observado uma redução considerável da viabilidade para as NPs sem o CLB (NP-VAZ e NP-OEM), onde o menor número de células viáveis encontrado foi de 89,5% para o tratamento

com as NP-OEM na concentração máxima testada ($128 \mu\text{g}_{(\text{partículas})}/\text{mL}$). Para as NPs contendo CLB (NP-CLB e NP-CLB-OEM) houve uma pequena redução da viabilidade quando em comparação com as NPs sem CLB. Ainda, uma comparação entre as médias obtidas para cada tratamento sugere que a redução da viabilidade é dose dependente. Essa sugestão, no entanto, de acordo as análises estatísticas só se confirmam para as NP-VAZ e NP-CLB, uma vez que estas apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com a concentração mínima e a concentração máxima testada, sendo que as maiores concentrações promoveram uma maior redução na viabilidade celular.

Figura 36: Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células NIH-3T3 submetidas às nanopartículas no tempo de 24h.

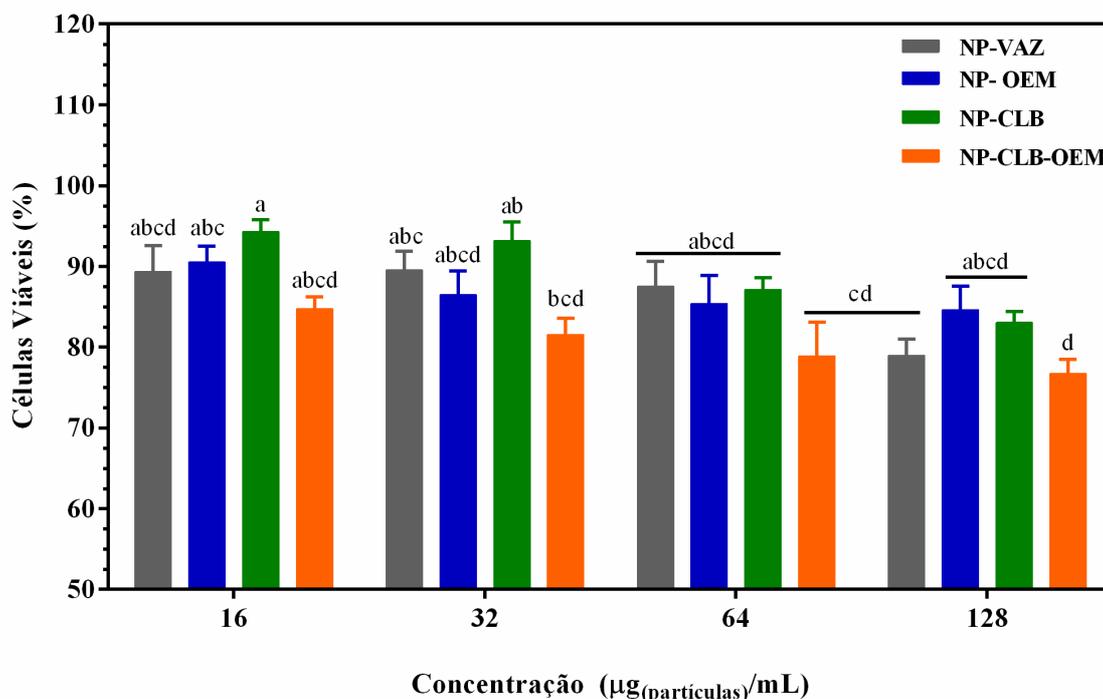


Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células NIH-3T3 submetidas a diferentes nanopartículas em diferentes concentrações no tempo de 24h. As células foram tratadas com nanopartículas de PLGA vazias e contendo o fármaco CLB com ou sem funcionalização. A concentração zero foi definida como controle. Foi aplicado o teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Embora os tratamentos com as NP-OEM e NP-CLB-OEM em suas diferentes concentrações apresentem valores com médias que decrescem com a concentração, com exceção das NP-CLB-OEM na concentração de $16 \mu\text{g}_{(\text{partículas})}/\text{mL}$, essas médias são consideradas estatisticamente iguais. A título de comparação, no trabalho desenvolvido por Dias, as nanopartículas contendo CLB e funcionalizadas com o ciclo RGD apresentaram valores para a viabilidade celular das células NIH-3T3 de 91,1% e 98,9% para as NPs funcionalizadas via

EDC/NHS e via DOPA, respectivamente (DIAS, 2017), enquanto as NP-CLB-OEM apresentaram um valor de 89,3% nas mesmas condições testadas (concentração de 64 $\mu\text{g}_{(\text{partículas})}/\text{mL}$ e tempo de 24 h).

Figura 37: Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células NIH-3T3 submetidas às nanopartículas no tempo de 72h.



Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células NIH-3T3 submetidas a diferentes nanopartículas em diferentes concentrações no tempo de 72h. As células foram tratadas com nanopartículas de PLGA vazias e contendo o fármaco CLB com ou sem funcionalização. A concentração zero foi definida como controle. Foi aplicado o teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 6: Análise de variância entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPS frente às células NIH-3T3 no tempo de 24h e 72h.

Linhagem/Tempo	Fonte de Variação	gl	SQ	MQ	F-crítico	F	valor-P
NIH-3T3 24h	Entre grupos	15	3203,51	213,57	2,2719	10,5001	< 0,001
	Dentro dos grupos	80	1627,16	20,34			
	Total	95	4830,67				
NIH-3T3 72h	Entre grupos	15	2313,71	154,24	2,2719	3,9902	< 0,001
	Dentro dos grupos	80	3092,56	38,65			
	Total	95	5406,27				

Análise de variância entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células NIH-3T3 no tempo de 24h e 72h. Onde *gl* é o grau de liberdade, *SQ* é a soma dos quadrados, *MQ* é a média quadrada, *F* é o valor obtido pelo teste F e *valor-P* é o nível descritivo ou probabilidade de significância.

Para os tratamentos realizados na linhagem NIH-3T3 no período de 72 horas os resultados da análise de variância também mostraram haver diferença significativa entre os

tratamentos, e por isto foi realizado o Teste de Tukey. Como pode ser visto na Tabela 7, os tratamentos por um período mais longo de tempo causaram uma maior redução da viabilidade celular, quando se comparam os mesmos tratamentos em tempos diferentes. Ainda, igualmente ao que aconteceu para os tratamentos no período de 24h, uma comparação entre as médias sugere que a redução da viabilidade é dose dependente, embora os resultados estatísticos não confirmem essa sugestão, pois no geral não houve diferença significativa entre um mesmo tratamento com doses diferentes. Numa comparação entre as NPs contendo CLB e funcionalizadas com o ciclo RGD via EDC/NHS ou via DOPA desenvolvidas por Dias com as NP-CLB-OEM nas mesmas condições testadas (concentração de 64 μg (partículas)/mL e tempo de 72 h), temos valores para a viabilidade celular das células NIH-3T3 de 80,4%, 69,5% (DIAS, 2017) e 78,9%, respectivamente.

Tabela 7: Teste de Tukey realizado entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células NIH-3T3 no tempo de 24h e 72h.

Amostras	NIH-3T3 (24h)		NIH-3T3 (72h)	
	Média (%)	Índice	Média (%)	Índice
NP-VAZ (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	106,3 \pm 2,8	<i>a</i>	89,3 \pm 7,9	<i>bcdefg</i>
NP-VAZ (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	100,3 \pm 4,1	<i>ab</i>	89,5 \pm 5,7	<i>bcdefg</i>
NP-VAZ (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	100,7 \pm 5,4	<i>ab</i>	87,5 \pm 7,7	<i>cdefgh</i>
NP-VAZ (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	91,1 \pm 3,7	<i>bcdef</i>	79,0 \pm 5,1	<i>gh</i>
NP-OEM (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	97,0 \pm 3,0	<i>abc</i>	90,5 \pm 4,8	<i>bcdefg</i>
NP-OEM (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	95,4 \pm 6,1	<i>abcd</i>	86,5 \pm 7,3	<i>cdefgh</i>
NP-OEM (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	94,8 \pm 3,0	<i>abcde</i>	85,4 \pm 8,5	<i>cdefgh</i>
NP-OEM (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	89,5 \pm 5,8	<i>bcdefg</i>	84,6 \pm 7,2	<i>defgh</i>
NP-CLB (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	95,7 \pm 7,2	<i>abcd</i>	94,3 \pm 3,6	<i>abcde</i>
NP-CLB (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	92,8 \pm 5,5	<i>bcdef</i>	93,2 \pm 5,7	<i>bcdef</i>
NP-CLB (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	89,3 \pm 3,5	<i>bcdefg</i>	87,1 \pm 3,7	<i>cdefgh</i>
NP-CLB (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	85,2 \pm 2,3	<i>cdefgh</i>	83,0 \pm 3,4	<i>efgh</i>
NP-CLB-OEM (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	85,4 \pm 3,0	<i>cdefgh</i>	84,7 \pm 3,8	<i>defgh</i>
NP-CLB-OEM (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	95,1 \pm 2,8	<i>abcd</i>	81,5 \pm 5,1	<i>fgh</i>
NP-CLB-OEM (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	89,3 \pm 6,2	<i>bcdefg</i>	78,9 \pm 10,4	<i>gh</i>
NP-CLB-OEM (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	86,2 \pm 3,7	<i>cdefgh</i>	76,7 \pm 4,3	<i>h</i>
DMS	12,1		CV	6,1

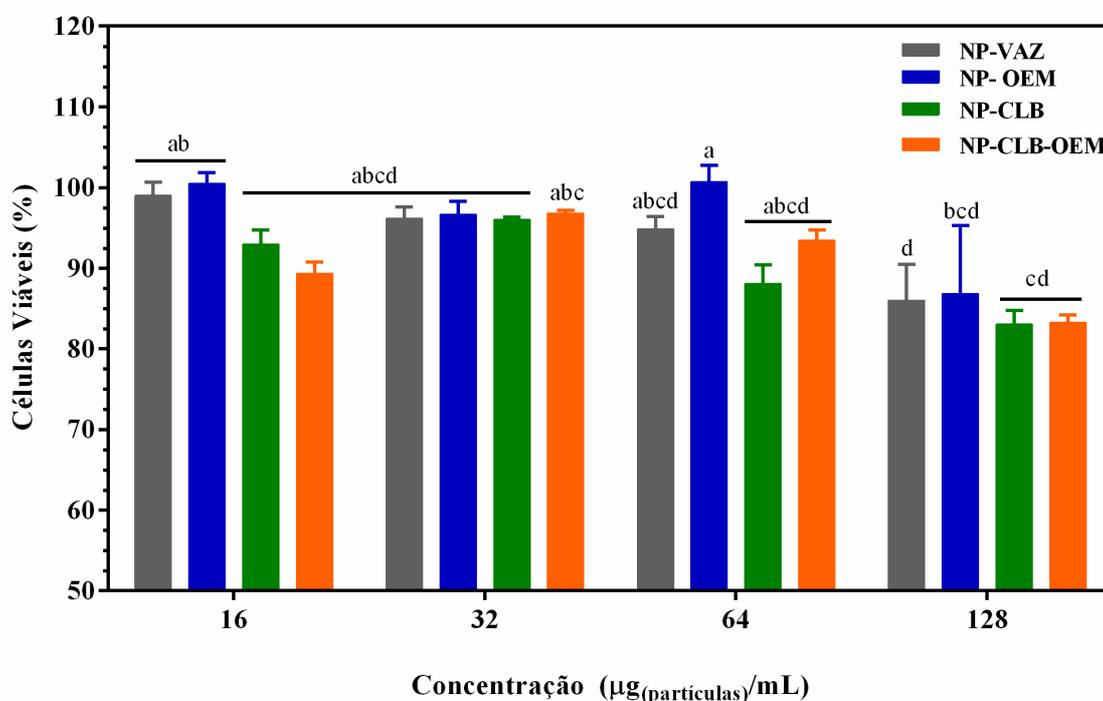
Teste de Tukey realizado entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células NIH-3T3 no tempo de 24h e 72h. Onde **DMS** é a diferença mínima significativa e o **CV** é o coeficiente de variação. As letras **a, b, c, d, e, f, g** e **h** que aparecem após as médias são índices. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

No geral, tanto para os tratamentos realizados no período de 24h ou de 72h, as NP-CLB-OEM foram as que apresentaram menor média para a viabilidade das células NIH-3T3

em qualquer concentração. Esse comportamento pode ser atribuído a um possível aumento da endocitose das NP-CLB-OEM mediada pela uPARAP/Endo180, uma vez que as células NIH-3T3 tem alto nível de expressão desta proteína de membrana; proteína essa que se apresenta como componente central no processo de renovação do colágeno e atua semelhantemente a um receptor de manose (MADSEN et al., 2011; MELANDER et al., 2015). Assim, essas proteínas de membranas podem se ligar a terminação de manose presente nas NPs e facilitar a sua interiorização.

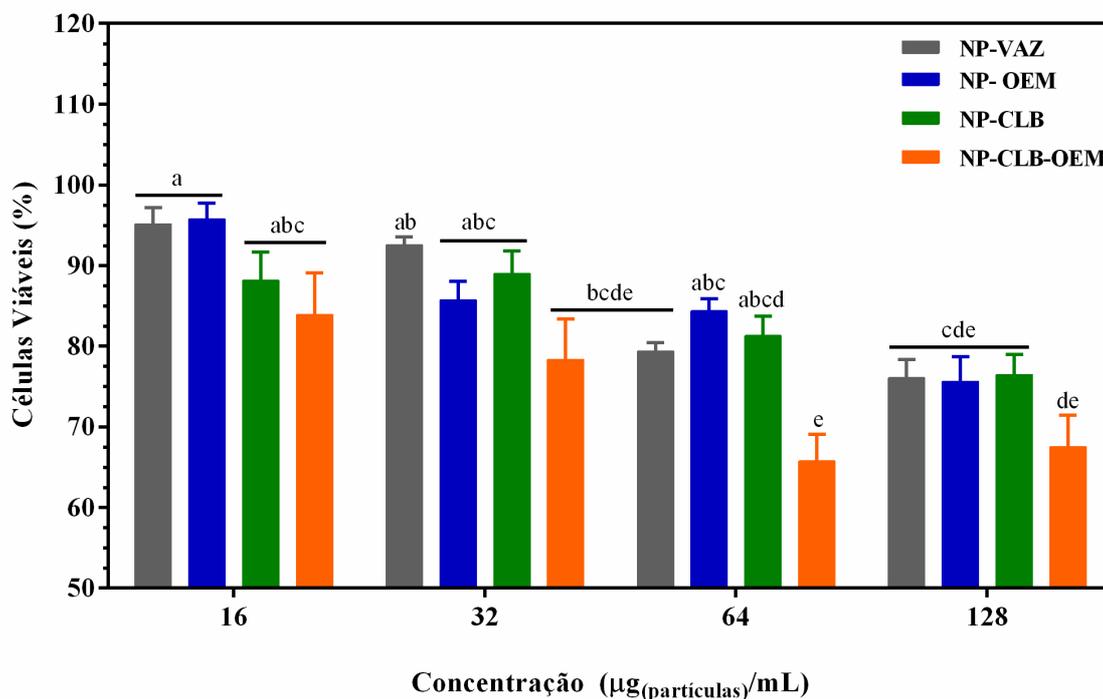
Na Figura 38 é mostrado o gráfico obtido com os resultados dos tratamentos realizados na linhagem tumoral humana MCF-7 para o período de 24 horas, enquanto na Figura 39 é mostrado o gráfico obtido com os resultados dos tratamentos realizados na linhagem MCF-7 para o período de 72 horas. Os resultados da análise de variância para os tratamentos de 24h e 72h realizados na linhagem MCF-7 são mostrados na Tabela 8. Na Tabela 9 são mostrados os resultados obtidos com o Teste de Tukey para os tratamentos de 24h e 72h realizados na linhagem MCF-7, onde são mostradas as médias obtidas para cada tratamento.

Figura 38: Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células MCF-7 submetidas às nanopartículas no tempo de 24h.



Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células MCF-7 submetidas a diferentes nanopartículas em diferentes concentrações no tempo de 24h. As células foram tratadas com nanopartículas de PLGA vazias e contendo o fármaco CLB com ou sem funcionalização. A concentração zero foi definida como controle. Foi aplicado o teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Figura 39: Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células MCF-7 submetidas às nanopartículas no tempo de 72h.



Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT em células MCF-7 submetidas a diferentes nanopartículas em diferentes concentrações no tempo de 72h. As células foram tratadas com nanopartículas de PLGA vazias e contendo o fármaco CLB com ou sem funcionalização. A concentração zero foi definida como controle. Foi aplicado o teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 8: Análise de variância entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células MCF-7 no tempo de 24h e 72h.

Linhagem/Tempo	Fonte de Variação	gl	SQ	MQ	F-crítico	F	valor-P
MCF-7 24h	Entre grupos	15	2175,23	145,02	2,4370	4,9377	< 0,001
	Dentro dos grupos	48	1409,72	29,36			
	Total	63	3584,94				
MCF-7 72h	Entre grupos	15	4732,52	315,50	2,4370	8,7723	< 0,001
	Dentro dos grupos	48	1726,36	35,97			
	Total	63	6458,87				

Análise de variância entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células MCF-7 no tempo de 24h e 72h. Onde *gl* é o grau de liberdade, *SQ* é a soma dos quadrados, *MQ* é a média quadrada, *F* é o valor obtido pelo teste F e o *valor-P* é o nível descritivo ou probabilidade de significância.

Os tratamentos realizados na linhagem MCF-7 tanto para o período de 24 horas, quanto para 72 horas, apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, como podemos ver pelos resultados da análise de variância mostrados na Tabela 8. Para ambos os períodos de tempo (24h e 72h) o valor-P encontrado foi menor que 0,001, bem como os valores de *F* foram maiores que os valores de *F-crítico*. Devido a isto, também foi realizado o

Teste de Tukey entre os tratamentos em cada período de tempo testado.

No ensaio realizado com linhagem MCF-7 no período de 24 horas não foi observado uma redução considerável da viabilidade nos teste com as NPs sem CLB (NP-VAZ e NP-OEM) nas concentrações de 16, 32 e 64 $\mu\text{g}_{(\text{partículas})}/\text{mL}$. No entanto, para a concentração de 128 $\mu\text{g}_{(\text{partículas})}/\text{mL}$ foi encontrado uma média de 82,8% de células viáveis para as NP-VAZ e de 86,9% para as NP-OEM.

Tabela 9: Teste de Tukey realizado entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células MCF-7 no tempo de 24h e 72h.

Amostras	MCF-7 (24h)		MCF-7 (72h)	
	Média (%)	Índice	Média (%)	Índice
NP-VAZ (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	99,8 \pm 3,9	ab	95,2 \pm 4,1	abcd
NP-VAZ (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	97,0 \pm 3,1	abc	92,5 \pm 2,1	abcde
NP-VAZ (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	96,3 \pm 1,1	abc	79,3 \pm 2,2	defgh
NP-VAZ (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	88,7 \pm 9,4	abcdef	76,0 \pm 4,6	fgh
NP-OEM (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	100,5 \pm 2,8	a	95,7 \pm 4,0	abc
NP-OEM (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	96,7 \pm 3,3	abc	85,7 \pm 4,7	abcdef
NP-OEM (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	100,7 \pm 4,1	a	84,4 \pm 3,0	bcdef
NP-OEM (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	86,9 \pm 16,8	abcdef	75,6 \pm 6,2	fgh
NP-CLB (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	93,0 \pm 3,5	abcde	88,1 \pm 7,0	abcdef
NP-CLB (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	96,1 \pm 0,6	abc	89,0 \pm 5,7	abcdef
NP-CLB (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	88,1 \pm 4,6	abcdef	81,3 \pm 4,9	cdefgh
NP-CLB (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	83,1 \pm 3,4	cdefg	76,4 \pm 5,0	fgh
NP-CLB-OEM (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	89,3 \pm 2,9	abcdef	83,9 \pm 10,4	bcdef
NP-CLB-OEM (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	96,8 \pm 0,8	abc	78,3 \pm 10,1	efgh
NP-CLB-OEM (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	93,5 \pm 2,6	abcde	65,7 \pm 6,6	h
NP-CLB-OEM (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	83,2 \pm 1,9	cdefg	67,5 \pm 7,8	gh
DMS	16,0		CV	6,6

Teste de Tukey realizado entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células MCF-7 no tempo de 24h e 72h. Onde **DMS** é a diferença mínima significativa e o **CV** é o coeficiente de variação. As letras **a, b, c, d, e, f, g** e **h** que aparecem após as médias são índices. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Nos tratamentos realizados na linhagem MCF-7 no tempo de 24 h, quando comparamos as NPs contendo CLB (NP-CLB e NP-CLB-OEM) com as que não contêm o fármaco (NP-VAZ e NP-VAZ-OEM) percebemos que não há diferenças estatísticas entre as médias dos tratamentos para as mesmas concentrações testadas. Também, ao se comparar a média geral da viabilidade celular obtida para os tratamentos realizados na linhagem NIH-3T3 (93,4%) no período de 24h com os tratamentos realizados na linhagem MCF-7 para o mesmo período (92,3%) (Tabela 10), percebe-se que os tratamentos apresentaram efeitos semelhantes

para as duas linhagens celulares. Numa comparação entre as NPs contendo CLB e funcionalizadas com o ciclo RGD via EDC/NHS ou via DOPA desenvolvidas por Dias com as NP-CLB-OEM nas mesmas condições testadas (concentração de 64 μg (partículas)/mL e tempo de 24 h), temos valores para a viabilidade celular das células MCF-7 de 77,3%, 83,3% (DIAS, 2017) e 93,5%, respectivamente.

Tabela 10: Teste de Tukey realizado entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células NIH-3T3 e MCF-7 no tempo de 24h.

Amostras	NIH-3T3 (24h)		MCF-7 (24h)	
	Média (%)	Índice	Média (%)	Índice
NP-VAZ (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	106,3 \pm 2,8	<i>a</i>	99,8 \pm 3,9	<i>abc</i>
NP-VAZ (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	100,3 \pm 4,1	<i>ab</i>	97,0 \pm 3,1	<i>bcde</i>
NP-VAZ (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	100,7 \pm 5,4	<i>ab</i>	96,3 \pm 1,1	<i>bcdef</i>
NP-VAZ (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	91,1 \pm 3,7	<i>bcdefg</i>	88,7 \pm 9,4	<i>efg</i>
NP-OEM (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	97,0 \pm 3,0	<i>abcd</i>	100,5 \pm 2,8	<i>ab</i>
NP-OEM (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	95,4 \pm 6,1	<i>bcdef</i>	96,7 \pm 3,3	<i>abcd</i>
NP-OEM (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	94,8 \pm 3,0	<i>bcdef</i>	100,7 \pm 4,1	<i>ab</i>
NP-OEM (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	89,5 \pm 5,8	<i>cdefg</i>	86,9 \pm 16,8	<i>defg</i>
NP-CLB (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	95,7 \pm 7,2	<i>bcde</i>	93,0 \pm 3,5	<i>bcdefg</i>
NP-CLB (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	92,8 \pm 5,5	<i>bcdefg</i>	96,1 \pm 0,6	<i>bcde</i>
NP-CLB (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	89,3 \pm 3,5	<i>cdefg</i>	88,1 \pm 4,6	<i>defg</i>
NP-CLB (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	85,2 \pm 2,3	<i>fg</i>	83,1 \pm 3,4	<i>g</i>
NP-CLB-OEM (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	85,4 \pm 3,0	<i>fg</i>	89,3 \pm 2,9	<i>cdefg</i>
NP-CLB-OEM (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	95,1 \pm 2,8	<i>bcdef</i>	96,8 \pm 0,8	<i>abcd</i>
NP-CLB-OEM (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	89,3 \pm 6,2	<i>cdefg</i>	93,5 \pm 2,6	<i>bcdef</i>
NP-CLB-OEM (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	86,2 \pm 3,7	<i>efg</i>	83,2 \pm 1,9	<i>g</i>
Média Geral (%)	93,4		92,3	
DMS	10,1	CV	4,9	

Teste de Tukey realizado entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células NIH-3T3 e MCF-7 no tempo de 24h. Onde **DMS** é a diferença mínima significativa e o **CV** é o coeficiente de variação. As letras *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* e *g* que aparecem após as médias são índices. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Os tratamentos realizados com a linhagem MCF-7 no período de 72h causaram uma maior redução da viabilidade celular quando comparado aos tratamentos realizados no tempo de 24 h, como podemos observar na Tabela 9. Ainda, igualmente ao que aconteceu para os tratamentos no período de 24h, uma comparação entre as médias sugere que a redução da viabilidade é dose dependente, o que se confirma estatisticamente para as NP-VAZ, NP-OEM e NP-CLB-OEM, mas não para as NP-CLB, ou seja, para esses três sistemas, houve uma diferença entre a dose mínima testada (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a dose máxima testada (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Podemos observar que as NP-CLB-OEM apresentaram medias menores para viabilidade das células MCF-7 no período de 72h quando comparado aos demais tratamentos com a mesma concentração (Tabela 9 e 11). Assim, como já descrito anteriormente para a linhagem NIH-3T3, esse comportamento pode ser atribuído ao um possível aumento da endocitose das NP-CLB-OEM mediada pela uPARAP/Endo180, já que a linhagem MCF-7 também expressa essa proteína (MADSEN et al., 2011; MELANDER et al., 2015).

Tabela 11: Teste de Tukey realizado entre os grupos testados para a citotoxicidade das NPs frente às células NIH-3T3 e MCF-7 no tempo de 72h.

Amostras	NIH-3T3 (72h)		MCF-7 (72h)	
	Média (%)	Índice	Média (%)	Índice
NP-VAZ (16 µg/mL)	89,3 ± 7,9	<i>abcd</i>	95,2 ± 4,1	<i>ab</i>
NP-VAZ (32 µg/mL)	89,5 ± 5,7	<i>abcd</i>	92,5 ± 2,1	<i>abc</i>
NP-VAZ (64 µg/mL)	87,5 ± 7,7	<i>abcdef</i>	79,3 ± 2,2	<i>defg</i>
NP-VAZ (128 µg/mL)	79,0 ± 5,1	<i>defg</i>	76,0 ± 4,6	<i>efgh</i>
NP-OEM (16 µg/mL)	90,5 ± 4,8	<i>abcd</i>	95,7 ± 4,0	<i>a</i>
NP-OEM (32 µg/mL)	86,5 ± 7,3	<i>abcdef</i>	85,7 ± 4,7	<i>abcdef</i>
NP-OEM (64 µg/mL)	85,4 ± 8,5	<i>abcdef</i>	84,4 ± 3,0	<i>abcdef</i>
NP-OEM (128 µg/mL)	84,6 ± 7,2	<i>abcdef</i>	75,6 ± 6,2	<i>fgh</i>
NP-CLB (16 µg/mL)	94,3 ± 3,6	<i>ab</i>	88,1 ± 7,0	<i>abcde</i>
NP-CLB (32 µg/mL)	93,2 ± 5,7	<i>abc</i>	89,0 ± 5,7	<i>abcd</i>
NP-CLB (64 µg/mL)	87,1 ± 3,7	<i>abcdef</i>	81,3 ± 4,9	<i>cdef</i>
NP-CLB (128 µg/mL)	83,0 ± 3,4	<i>bcdef</i>	76,4 ± 5,0	<i>efgh</i>
NP-CLB-OEM (16 µg/mL)	84,7 ± 3,8	<i>abcdef</i>	83,9 ± 10,4	<i>abcdef</i>
NP-CLB-OEM (32 µg/mL)	81,5 ± 5,1	<i>cdef</i>	78,3 ± 10,1	<i>defg</i>
NP-CLB-OEM (64 µg/mL)	78,9 ± 10,4	<i>defg</i>	65,7 ± 6,6	<i>h</i>
NP-CLB-OEM (128 µg/mL)	76,7 ± 4,3	<i>efgh</i>	67,5 ± 7,8	<i>gh</i>
Média Geral (%)	85,7		82,2	
DMS	12,2	CV	6,5	

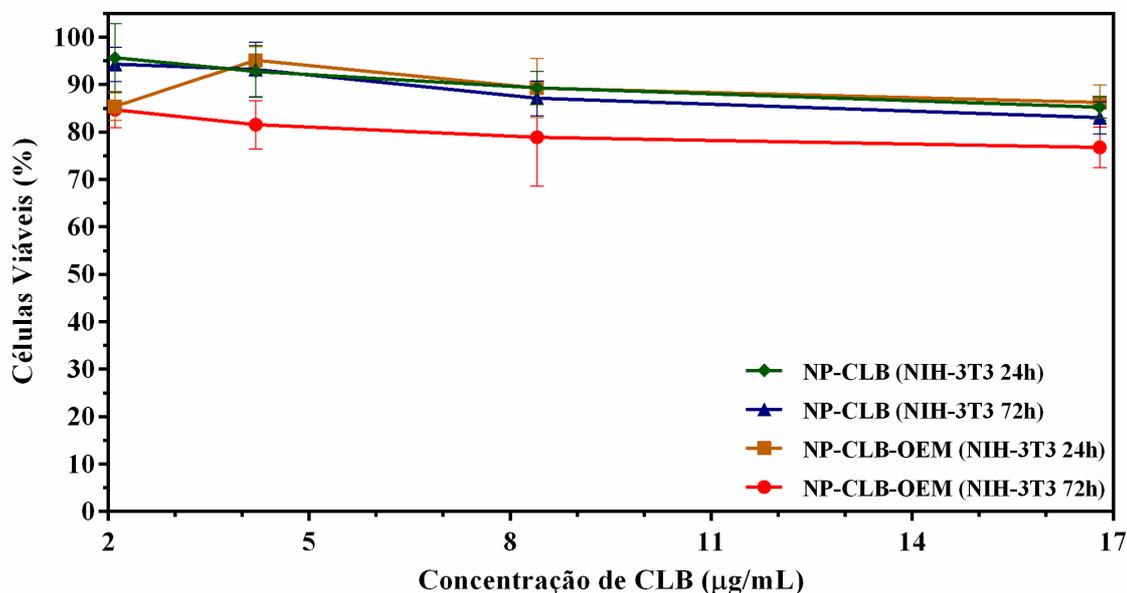
Uma comparação entre os tratamentos realizados nas linhagens NIH-3T3 e MCF-7 no período de 72h na concentração de 64 µg_(partículas)/mL (Tabela 11), nos revela que as NP-CLB-OEM nesta concentração foram mais eficientes em reduzir a viabilidade celular das células MCF-7, onde para as NP-CLB foram encontradas médias de viabilidade celular de 87,1% para as células NIH-3T3 e 81,3% para MCF-7, com valores similares para as NPs sem o fármaco (NP-VAZ e NP-OEM), enquanto que para as NP-CLB-OEM a média foi de 65,7%.

A título de comparação, no trabalho desenvolvido por Dias as nanopartículas contendo CLB e funcionalizadas com o ciclo RGD apresentaram valores para a viabilidade celular das

células MCF-7 de 58,3% e 68,6% para as NPs funcionalizadas via EDC/NHS e via DOPA, respectivamente (DIAS, 2017), enquanto as NP-CLB-OEM, como já mencionado acima, apresentaram um valor de 65,7% nas mesmas condições testadas (concentração de 64 $\mu\text{g}(\text{partículas})/\text{mL}$ e tempo de 72 h).

Para uma visualização da viabilidade celular dependente da concentração do CLB, foram elaborados os gráficos mostrados na Figura 40 e na Figura 41. Na Figura 40 são mostradas as médias obtidas com os tratamentos realizados na linhagem NIH-3T3 em 24 horas e 72 horas com as NP-CLB e NP-CLB-OEM, na Figura 41 são mostradas as médias obtidas com os tratamentos realizados na linhagem MCF-7. Como já mencionado anteriormente, uma comparação simples entre as médias obtidas para cada tratamento sugerem que a viabilidade celular de ambas as linhagens apresenta um comportamento dose dependente, o que se confirma apenas em alguns casos particulares já relatados no texto e levando-se em consideração o teste de Tukey realizado entre os tratamentos em uma mesma linhagem e em um único período (Figura 36, 37, 38 e 39).

Figura 40: Viabilidade celular de células NIH-3T3 submetidas às nanopartículas no tempo de 24h e 72h versus concentração de CLB.



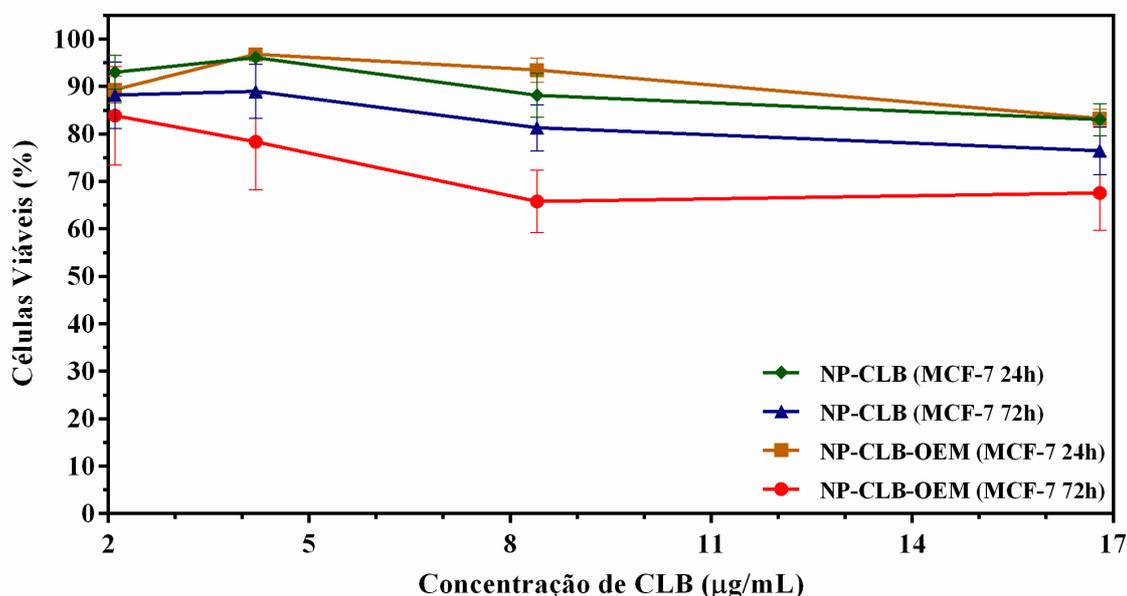
Viabilidade celular em células NIH-3T3 submetidas às NP-CLB e NP-CLB-OEM em diferentes concentrações no tempo de 24h e 72h. No gráfico é mostrada a viabilidade celular versus a concentração de CLB. (Em verde): tratamento realizado com as NP-CLB para um tempo de 24h. (Em azul): tratamento realizado com as NP-CLB para um tempo de 72h. (Em laranja): tratamento realizado com as NP-CLB-OEM para um tempo de 24h. (Em vermelho): tratamento realizado com as NP-CLB-OEM para um tempo de 72h.

Os resultados encontrados sugerem que a funcionalização das NPs com OEM pode promover uma maior interiorização das mesmas, mediadas pela uPARAP/Endo180, uma vez

que as NP-CLB-OEM apresentaram uma maior redução na viabilidade de ambas as linhagens. É importante ressaltar que a linhagem NIH-3T3 é reportada na literatura apresentando um maior nível de expressão de uPARAP/Endo180 comparada com a linhagem MCF-7 (MADSEN et al., 2011; MELANDER et al., 2015), o que poderia melhorar e aumentar a absorção das NPs funcionalizadas contendo o CLB pelas células NIH-3T3 e por consequência, essas células apresentariam números de células viáveis menores do que os valores encontrados para a linhagem MCF-7, o que não aconteceu.

Estudos têm demonstrado que o CLB tem maior eficácia na diminuição da viabilidade de células tumorais quando incorporado em sistemas de liberação de fármacos baseados na nanotecnologia, como exemplo disto, uma maior redução na viabilidade celular das células MCF-7 foi encontrada quando o CLB foi conjugado em dendrímeros PAMAM em comparação com o CLB livre (BIELAWSKI et al., 2011). Da mesma forma, quando o CLB foi incorporado ou conjugado em NPs de PLGA ele mostrou uma maior redução na viabilidade das células MCF-7 (DIAS et al., 2015) e das células Raji (AKBARIAN et al., 2017).

Figura 41: Viabilidade celular de células MCF-7 submetidas às nanopartículas no tempo de 24h e 72h versus concentração de CLB.



Viabilidade celular em células MCF-7 submetidas as NP-CLB e NP-CLB-OEM em diferentes concentrações no tempo de 24h e 72h. No gráfico é mostrada a viabilidade celular versus a concentração de CLB. (Em verde): tratamento realizado com as NP-CLB para um tempo de 24h. (Em azul): tratamento realizado com as NP-CLB para um tempo de 72h. (Em laranja): tratamento realizado com as NP-CLB-OEM para um tempo de 24h. (Em vermelho): tratamento realizado com as NP-CLB-OEM para um tempo de 72h.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram obtidas quatro formulações de nanopartículas de PLGA, uma delas contendo o fármaco CLB e funcionalizadas com OEM. A molécula OEM foi obtida por meio da reação de esterificação entre as moléculas D-manose e cloreto de estearoil e confirmadas por FTIR.

As nanopartículas foram obtidas pelo método de emulsificação e evaporação do solvente, tendo o tamanho do diâmetro hidrodinâmico médio variando de 185,5 a 220,7 nm e morfologia esférica, apresentando tamanho adequado para aplicação intravenosa. O PDI das NPs variou entre 0,186 a 0,288, podendo ser classificada como moderadamente polidispersa. O potencial zeta das NPs ficou entre -14,2 a -17,7 mV, propiciando uma estabilidade de curto prazo, além de ser uma característica desejável para sistemas de entrega de fármaco administrado por via intravenosa.

As nanopartículas contendo CLB apresentaram uma eficiência de encapsulamento de 61% para as NP-CLB-OEM e 70% para as NP-CLB, o que possibilitou uma boa carga do fármaco.

As análises espectroscópicas por UV-VIS, fluorescência e FTIR confirmaram a incorporação e a integridade do CLB nas NPs, bem como a funcionalização das NPs com o OEM.

Os resultados das análises térmicas mostraram que as NPs se mantêm termicamente estáveis sem perda de massa até os 200 °C, que a matriz polimérica tem temperatura de transição vítrea acima dos 43 °C, que o fármaco CLB e o funcionalizante OEM apresentaram temperatura de fusão de 71,15 °C e 68,69 °C, respectivamente.

As NPs contendo CLB apresentaram um perfil de liberação bifásico e liberação sustentada, com uma liberação mais acentuada nas primeiras 12 horas. O estudo da cinética de liberação do CLB a partir das NPs mostrou que a combinação dos modelos matemáticos de primeira ordem e difusão de Fick apresentou um melhor ajuste com os dados experimentais.

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular em células MCF-7 e NIH-3T3 indicaram que a funcionalização das NPs com a OEM pode promover uma maior interiorização das mesmas, mediadas pela uPARAP/Endo180. As NP-CLB-OEM na concentração de 64 µg/mL foram mais eficientes em reduzir a viabilidade celular das células MCF-7 em comparação com as demais NPs na mesma concentração, e em comparação com a linhagem NIH-3T3.

Assim, as NP-CLB-OEM se apresentam como um promissor sistema de liberação de fármaco com liberação sustentada, que pode contribuir para o aumento dos índices de seletividade e eficiência terapêutica e diminuição dos efeitos adversos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. **NBR 6023: Informação e documentação: Referências.** Rio de Janeiro: ABNT, 2002a. 24 p.
- _____. **NBR 10520: Informação e documentação: Citações em documentos.** Rio de Janeiro: ABNT, 2002b. 7 p.
- _____. **NBR 6028: Informação e documentação: Resumo.** Rio de Janeiro: ABNT, 2003. 2 p.
- _____. **NBR 14724: Informação e documentação: Trabalhos acadêmicos.** Rio de Janeiro: ABNT, 2011. 15 p.
- _____. **NBR 6024: Informação e documentação: Numeração progressiva das seções de um documento.** Rio de Janeiro: ABNT, 2012a. 8 p.
- _____. **NBR 6027: Informação e documentação: Sumário.** Rio de Janeiro: ABNT, 2012b. 7 p.
- ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 170-183, 2011.
- AHIRE, J. H.; CHAMBRIER, I.; MUELLER, A.; BAO, Y.; CHAO, Y. Synthesis of D-mannose capped silicon nanoparticles and their interactions with MCF-7 human breast cancerous cells. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 5, n. 15, p. 7384-7391, 2013.
- AHLUWALIA, V.; KUMAR, J.; SISODIA, R.; SHAKIL, N. A.; WALIA, S. Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 202-206, 2014.
- AITKEN, M.; KLEINROCK, M.; SIMORELLIS, A.; NASS, D. **Global Oncology Trends 2018 - Innovation, Expansion and Disruption.** IQVIA Institute for Human Data Science. Parsippany - New Jersey. 2018
- AKBARIAN, S.; SOJODI, J.; MONNAVARI, F.; HEIDARI, H.; KHOSRAVIAN, P.; AJAVAR, H.; ASSADI, A.; RASOULI, R.; SAFFARI, M.; AS SHANDIZ, S. Nano conjugated PLGA-Chlorambucil: Synthesis In vitro anti non-Hodgkin's lymphoma cellular assay. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 14, n. 7, p. 827-836, 2017.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula.** 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1726 p.
- ALMEIDA, V. D.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular

não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMES, B. N.; GOLD, L. S. The causes and prevention of cancer: the role of environment. **Biotherapy**, v. 11, n. 2-3, p. 205-220, 1998.

ANDRÉ, E. M.; PASSIRANI, C.; SEJO, B.; SANCHEZ, A.; MONTERO-MENEI, C. N. Nano and microcarriers to improve stem cell behaviour for neuroregenerative medicine strategies: Application to Huntington's disease. **Biomaterials**, v. 83, p. 347-362, 2016.

BALA, I.; HARIHARAN, S.; KUMAR, M. R. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 21, n. 5, p. 387-422, 2004.

BETTS, J. G.; DESAIX, P.; JOHNSON, E.; JOHNSON, J. E.; KOROL, O.; KRUSE, D.; POE, B.; WISE, J. A.; WOMBLE, M.; YOUNG, K. A. **Anatomy and Physiology**. Texas: OpenStax - Rice University, 2013. 1410 p.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BIELAWSKI, K.; BIELAWSKA, A.; MUSZYŃSKA, A.; POPLAWSKA, B.; CZARNOMYSY, R. Cytotoxic activity of G3 PAMAM-NH₂ dendrimer-chlorambucil conjugate in human breast cancer cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 3, p. 364-372, 2011.

BINDHU, M.; UMADEVI, M. Antibacterial activities of green synthesized gold nanoparticles. **Materials Letters**, v. 120, p. 122-125, 2014.

BINNS, C. **Introduction to Nanoscience and Nanotechnology**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 301 p.

BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 941-951, 2015.

BREVET, D.; GARY-BOBO, M.; RAEHM, L.; RICHETER, S.; HOCINE, O.; AMRO, K.; LOOCK, B.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; MORÈRE, A. Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. **Chemical Communications**, n. 12, p. 1475-1477, 2009.

BYRNE, J. D.; BETANCOURT, T.; BRANNON-PEPPAS, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1615-1626, 2008.

CAO, G. **Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications**. World Scientific, 2004. 433 p.

CAPES. Portal de Periódicos da Capes. 2018. Disponível em: < <http://www.periodicos-capes.gov.br.ez54.periodicos.capes.gov.br> >. Acesso em: 06 de abril de 2018.

CHENG, J.; TEPLY, B. A.; SHERIFI, I.; SUNG, J.; LUTHER, G.; GU, F. X.; LEVY-NISSENBAUM, E.; RADOVIC-MORENO, A. F.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 869-876, 2007.

CHITTASUPHO, C.; XIE, S.-X.; BAOUM, A.; YAKOVLEVA, T.; SIAHAAN, T. J.; BERKLAND, C. J. ICAM-1 targeting of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles to lung epithelial cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 2, p. 141-150, 2009.

CIOFFI, N.; RAI, M. **Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects**. Springer Science & Business Media, 2012. 574 p.

CONDE, J.; DIAS, J. T.; GRAZÚ, V.; MOROS, M.; BAPTISTA, P. V.; DE LA FUENTE, J. M. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, n. 48, p. 1-27, 2014.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 7, p. 1417-1450, 2006.

CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**. 2d Ed. London: Oxford University Press, 1975. 414 p.

DAS, R.; MUKHOPADHYAY, B. Chemical O-Glycosylations: An Overview. **ChemistryOpen**, v. 5, n. 5, p. 401-433, 2016.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217-23, 2010.

DAVIES, I. D.; ALLANSON, J. P.; CAUSON, R. C. Rapid determination of the anti-cancer drug chlorambucil (LeukeranTM) and its phenyl acetic acid mustard metabolite in human serum and plasma by automated solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 732, n. 1, p. 173-184, 1999.

DEVITA JR, V. T.; LAWRENCE, T. S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: Principles and Practice of Oncology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2011. 444 p.

DI CORATO, R.; ESPINOSA, A.; LARTIGUE, L.; THARAUD, M.; CHAT, S.; PELLEGRINO, T.; MÉNAGER, C.; GAZEAU, F.; WILHELM, C. Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6400-6411, 2014.

DIAS, D. J. S. **Síntese, caracterização físico-química, morfológica e avaliação de viabilidade de células tumorais de mama (MCF-7) submetidas à nanoesferas de PLGA contendo clorambucil**. 2012. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília. 2012.

_____. **Nanopartículas poliméricas contendo clorambucil funcionalizadas com peptídeo direcionador: produção, caracterização e ensaios biológicos com células tumorais**. 2017.

128 f. Tese (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, Brasília. 2017.

DIAS, D. J. S.; JOANITTI, G. A.; AZEVEDO, R. B.; SILVA, L. P.; LUNARDI, C. N.; GOMES, A. J. Chlorambucil Encapsulation into PLGA Nanoparticles and Cytotoxic Effects in Breast Cancer Cell. **Journal of Biophysical Chemistry**, v. 6, n. 01, p. 1-6, 2015.

DRUGBANK. Chlorambucil. 2019. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00291>>. Acesso em: 24/09/2019.

EAST, L.; ISACKE, C. M. The mannose receptor family. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 364-386, 2002.

EBCTCG. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. **The Lancet**, v. 365, n. 9472, p. 1687–1717, 2005.

ENGELHOLM, L. H.; INGVARSEN, S.; JURGENSEN, H. J.; HILLIG, T.; MADSEN, D. H.; NIELSEN, B. S.; BEHRENDT, N. The collagen receptor uPARAP/Endo180. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, n. 6, p. 2103-2114, 2009.

ETPN. What is Nanomedicine? , 2019. Acesso em: 24/10/2019.

EVERETT, J. L.; ROBERTS, J. J.; ROSS, W. C. J. 486. Aryl-2-halogenoalkylamines. Part XII. Some carboxylic derivatives of NN-di-2-chloroethylaniline. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 2386-2392, 1953.

FAN, M.; LIANG, X.; LI, Z.; WANG, H.; YANG, D.; SHI, B. Chlorambucil gemcitabine conjugate nanomedicine for cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, p. 20-26, 2015.

FRANCIA, V. **Endocytosis of Nanomedicines: Dissecting the Pathways of Uptake of Nano-sized Drug Carriers by Cells**. 2018. 239 f. (PhD). University of Groningen, Milan. 2018.

GARY-BOBO, M.; MIR, Y.; ROUXEL, C.; BREVET, D.; BASILE, I.; MAYNADIER, M.; VAILLANT, O.; MONGIN, O.; BLANCHARD-DESCE, M.; MORÈRE, A. Mannose-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient two-photon photodynamic therapy of solid tumors. **Angewandte Chemie**, v. 123, n. 48, p. 11627-11631, 2011.

GASPAR, L. M. D. A. C.; DÓREA, A. C. S.; DROPPA-ALMEIDA, D.; DE MÉLO SILVA, I. S.; MONTORO, F. E.; ALVES, L. L.; MACEDO, M. L. H.; PADILHA, F. F. Development and characterization of PLGA nanoparticles containing antibiotics. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 20, n. 11, p. 289, 2018.

GHOSH, S.; DAS, S.; DE, A. K.; KAR, N.; BERA, T. Amphotericin B-loaded mannose modified poly (D, L-lactide-co-glycolide) polymeric nanoparticles for the treatment of visceral leishmaniasis: in vitro and in vivo approaches. **RSC Advances**, v. 7, n. 47, p. 29575-29590, 2017.

GLOWM. Chlorambucil - Leukeran. 2019. Disponível em: <<https://www.glowm.com/resources/glowm/cd/pages/drugs/c045.html>>. Acesso em: 24/09/2019.

GREEN, A. R.; MILLER, E. S.; GUILLORY, J. K. Physical properties of the complexes formed between heptakis (2, 6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin, β -cyclodextrin, and chlorambucil. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 2, p. 186-189, 1991.

GUNASEKARAN, S.; KUMARESAN, S.; BALAJI, R. A.; ANAND, G.; SESHADRI, S. Vibrational spectra and normal coordinate analysis on structure of chlorambucil and thioguanine. **Pramana**, v. 71, n. 6, p. 1291-1300, 2008.

GUTIÉRREZ-VALENZUELA, C. A.; ESQUIVEL, R.; GUERRERO-GERMÁN, P.; ZAVALA-RIVERA, P.; RODRÍGUEZ-FIGUEROA, J. C.; GUZMÁN-Z, R.; LUCERO-ACUNA, A. Evaluation of a combined emulsion process to encapsulate methylene blue into PLGA nanoparticles. **RSC Advances**, v. 8, n. 1, p. 414-422, 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 784 p.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265-273, 2013.

HORIE, K.; BARÓN, M.; FOX, R.; HE, J.; HESS, M.; KAHOVEC, J.; KITAYAMA, T.; KUBISA, P.; MARÉCHAL, E.; MORMANN, W. Definitions of terms relating to reactions of polymers and to functional polymeric materials (IUPAC Recommendations 2003). **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 889-906, 2004.

HULLA, J.; SAHU, S.; HAYES, A. Nanotechnology: History and future. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318-1321, 2015.

HUYNH, C. T.; LEE, D. S. Controlled Release. In: KOBAYASHI, S. e MÜLLEN, K. (Ed.). **Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials**. Berlin: Springer, 2015. p.439-449.

IARC. **IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1981. 411 p.

_____. **Pharmaceuticals. Volume 100 A. A review of human carcinogens**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012. 435 p.

INCA. **O Câncer e seus fatores de risco: o que a educação pode evitar?** Rio de Janeiro: INCA, 2013. 54 p.

_____. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2017. 127 p.

_____. Como surge o câncer? , 2019. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/es/node/482> >. Acesso em: 10/10/2019.

INCA/MS. Câncer de Mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 1, p. 9-19, 2001.

ISO. **TS-27687: Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate**. Geneva: International Organization for Standardization, 2008. 14 p.

_____. **TS-80004-1: Nanotechnologies - Vocabulary - Part 1: Core terms**. Geneva: International Organization for Standardization, 2015. 10 p.

IYER, A. K.; KHALED, G.; FANG, J.; MAEDA, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 17-18, p. 812-818, 2006.

JAIN, K. K. Nanodiagnostics: application of nanotechnology in molecular diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 3, n. 2, p. 153-161, 2003.

JI, X.; SHI, C.; LI, N.; WANG, K.; LI, Z.; LUAN, Y. Cationic drug-derivative nano-objects constructed by chlorambucil and its derivative for efficient leukaemia therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 1081-1088, 2015.

JIN, G.-Z.; YOU, Y.-J.; KIM, Y.; NAM, N.-H.; AHN, B.-Z. Esters of chlorambucil with 2-substituted 1,4-dihydroxy-9,10-anthraquinones as multifunctional anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 361-366, 2001.

KUMAR, M. R.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. **Biomaterials**, v. 25, n. 10, p. 1771-1777, 2004.

KUNUGI, S.; YAMAOKA, T. **Polymers in Nanomedicine**. Berlin: Springer, 2012. 281 p.

LI, L.; XIANG, D.; SHIGDAR, S.; YANG, W.; LI, Q.; LIN, J.; LIU, K.; DUAN, W. Epithelial cell adhesion molecule aptamer functionalized PLGA-lecithin-curcumin-PEG nanoparticles for targeted drug delivery to human colorectal adenocarcinoma cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1083-1096, 2014.

LIU, Y. Y.; FAN, X. D.; HU, H.; TANG, Z. H. Release of chlorambucil from poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels with β -cyclodextrin moieties. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 8, p. 729-736, 2004.

LOCATELLI, E.; FRANCHINI, M. C. Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 12, p. 1316-1332, 2012.

LOOS, U.; MUSCH, E.; MALEK, M.; RIEDEL, E. Comparative pharmacokinetics of chlorambucil and prednimustine after oral administration. **Oncology**, v. 48, n. 4, p. 334-342, 1991.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LUCERO-ACUNA, A.; GUZMÁN, R. Nanoparticle encapsulation and controlled release of a hydrophobic kinase inhibitor: Three stage mathematical modeling and parametric analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, n. 1, p. 249-257, 2015.

LUNARDI, C. N.; GOMES, A. J.; PALEPU, S.; GALWADUGE, P. T.; HILLMAN, E. M. PLGA nano/microparticles loaded with cresyl violet as a tracer for drug delivery: Characterization and in-situ hyperspectral fluorescence and 2-photon localization. **Materials Science and Engineering: C**, v. 70, p. 505-511, 2017.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; ROCA, M. F. D. L.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. D. S.; ROLIM-NETO, P. J. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784-793, 2007.

MADSEN, D. H.; INGVARSEN, S.; JÜRGENSEN, H. J.; MELANDER, M. C.; KJØLLER, L.; MOYER, A.; HONORÉ, C.; MADSEN, C. A.; GARRED, P.; BURGDORF, S. The non-phagocytic route of collagen uptake a distinct degradation pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 30, p. 26996-27010, 2011.

MAHAPATRO, A.; SINGH, D. K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 55, p. 1-11, 2011.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377-1397, 2011.

MALINOVSKAYA, Y.; MELNIKOV, P.; BAKLAUSHEV, V.; GABASHVILI, A.; OSIPOVA, N.; MANTROV, S.; ERMOLENKO, Y.; MAKSIMENKO, O.; GORSHKOVA, M.; BALABANYAN, V. Delivery of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles into U87 human glioblastoma cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 524, n. 1-2, p. 77-90, 2017.

MALVERN. **Zetasizer Nano Series - User Manual**. Malvern: Malvern Instruments, 2004. 270 p.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MARTINEZ-POMARES, L. The mannose receptor. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 6, p. 1177-1186, 2012.

MELANDER, M. C.; JÜRGENSEN, H. J.; MADSEN, D. H.; ENGELHOLM, L. H.; BEHRENDT, N. The collagen receptor uPAR/Endo180 in tissue degradation and cancer. **International Journal of Oncology**, v. 47, n. 4, p. 1177-1188, 2015.

MENCZEL, J. D.; PRIME, R. B. **Thermal analysis of polymers: fundamentals and applications**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. 688 p.

MESSARITAKI, A.; BLACK, S. J.; VAN DER WALLE, C. F.; RIGBY, S. P. NMR and confocal microscopy studies of the mechanisms of burst drug release from PLGA microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 108, n. 2-3, p. 271-281, 2005.

MIR, M.; AHMED, N.; UR REHMAN, A. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 217-231, 2017.

MIRAKABAD, F. S. T.; NEJATI-KOSHKI, K.; AKBARZADEH, A.; YAMCHI, M. R.; MILANI, M.; ZARGHAMI, N.; ZEIGHAMIAN, V.; RAHIMZADEH, A.; ALIMOHAMMADI, S.; HANIFEHPOUR, Y.; JOO, S. W. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 2, p. 517-535, 2014.

MOHANRAJ, V.; CHEN, Y. Nanoparticles - a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MOHS, R. C.; GREIG, N. H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 3, n. 4, p. 651-657, 2017.

MOUT, R.; MOYANO, D. F.; RANA, S.; ROTELLO, V. M. Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2539-2544, 2012.

NANOVEXBIOTECHNOLOGIES. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles for drug delivery. 2019. Disponível em: < <http://www.nanovexbiotech.com/858-2/> >.

NEWELL, D. R.; HART, L. I.; HARRAP, K. R. Estimation of chlorambucil, phenyl acetic mustard and prednimustine in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 164, n. 1, p. 114-119, 1979.

NICOLAS, J.; MURA, S.; BRAMBILLA, D.; MACKIEWICZ, N.; COUVREUR, P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 3, p. 1147-1235, 2013.

OWEN, T. **Fundamentals of UV-visible Spectroscopy: A Primer**. Hewlett Packard, 1996. 142 p.

PALMIERI, C.; CALEY, M.; PURSHOUSE, K.; FONSECA, A.; RODRIGUEZ-TEJA, M.; KOGIANNI, G.; WOODLEY, L.; ODENDAAL, J.; ELLIOTT, K.; WAXMAN, J. Endo180 modulation by bisphosphonates and diagnostic accuracy in metastatic breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 108, n. 1, p. 163, 2013.

PARK, K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 120, n. 1-2, p. 1-3, 2007.

PARKS, W. C.; MECHAM, R. P. **Biology of Extracellular Matrix - Extracellular Matrix Degradation**. Berlin: Springer, 2011. 255 p.

PEARCE, A.; SHARP, L.; HANLY, P.; BARCHUK, A.; BRAY, F.; DE CAMARGO CANCELA, M.; GUPTA, P.; MEHEUS, F.; QIAO, Y.-L.; SITAS, F. Productivity losses due to premature mortality from cancer in Brazil, Russia, India, China, and South Africa (BRICS): a population-based comparison. **Cancer Epidemiology**, v. 53, p. 27-34, 2018.

PEREZ, E. A.; SUMAN, V. J.; DAVIDSON, N. E.; SLEDGE, G. W.; KAUFMAN, P. A.; HUDIS, C. A.; MARTINO, S.; GRALOW, J. R.; DAKHIL, S. R.; INGLE, J. N. Cardiac safety analysis of doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel with or without trastuzumab in the North Central Cancer Treatment Group N9831 adjuvant breast cancer trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 8, p. 1231-1238, 2008.

PETRALITO, S.; ZANARDI, I.; MEMOLI, A.; ANNESINI, M. C.; MILLUCCI, V.; TRAVAGLI, V. Apparent solubility and dissolution profile at non-sink conditions as quality improvement tools. In: BASNET, P. (Ed.). **Promising Pharmaceuticals**. Rijeka: InTech, 2012. p.83-100.

PETROS, R. A.; DESIMONE, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 8, p. 615-627, 2010.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37-42, 1987.

ROGER, E.; KALSCHEUER, S.; KIRTANE, A.; GURU, B. R.; GRILL, A. E.; WHITTUM-HUDSON, J.; PANYAM, J. Folic acid functionalized nanoparticles for enhanced oral drug delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 7, p. 2103-2110, 2012.

SCENIHR. **Scientific Basis for the Definition of the Term “nanomaterial”**. Brussels: European Commission - Directorate-General for Health & Consumers, 2010. 43 p.

SCHÖPE, H.; MARNETTE, O.; VAN MEGEN, W.; BRYANT, G. Preparation and characterization of particles with small differences in polydispersity. **Langmuir**, v. 23, n. 23, p. 11534-11539, 2007.

SCHULZ, P. A. There is plenty of history at the bottom—an invitation to revisit a talk. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 40, n. 4, 2018.

SELVAM, S.; GANDHI, R. R.; SURESH, J.; GOWRI, S.; RAVIKUMAR, S.; SUNDRARAJAN, M. Antibacterial effect of novel synthesized sulfated beta-cyclodextrin crosslinked cotton fabric and its improved antibacterial activities with ZnO, TiO₂ and Ag nanoparticles coating. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1-2, p. 366-374, Sep 2012.

SHI, J.; VOTRUBA, A. R.; FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. **Nano Letters**, v. 10, n. 9, p. 3223-3230, 2010.

SILVA, J. M.; ZUPANCIC, E.; VANDERMEULEN, G.; OLIVEIRA, V. G.; SALGADO, A.; VIDEIRA, M.; GASPAR, M.; GRACA, L.; PRÉAT, V.; FLORINDO, H. F. In vivo delivery of peptides and Toll-like receptor ligands by mannose-functionalized polymeric nanoparticles induces prophylactic and therapeutic anti-tumor immune responses in a melanoma model. **Journal of Controlled Release**, v. 198, p. 91-103, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7th Ed. Hoboken: John Siley & Sons, 2005. 502 p.

SINHA, R.; KIM, G. J.; NIE, S.; SHIN, D. M. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 8, p. 1909-1917, 2006.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados—Parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014. 630 p.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 321 p.

SUBBIAH, R.; VEERAPANDIAN, M.; S YUN, K. Nanoparticles: functionalization and multifunctional applications in biomedical sciences. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 36, p. 4559-4577, 2010.

TARIQ, M.; AL-BADR, A. A. Chlorambucil. **Analytical Profiles of Drug Substances**, v. 16, p. 85-118, 1987.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; SRIWASTAWA, B.; BHATI, L.; PANDEY, S.; PANDEY, P.; BANNERJEE, S. K. Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 1, p. 2-11, 2012.

TURINO, L. N.; RUGGIERO, M. R.; STEFANÌA, R.; CUTRIN, J. C.; AIME, S.; GENINATTI CRICH, S. Ferritin decorated PLGA/paclitaxel loaded nanoparticles endowed with an enhanced toxicity toward MCF-7 breast tumor cells. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 1283-1290, 2017.

VIEIRA, D. S. C.; DUFLOTH, R. M.; SCHMITT, F. C. L.; ZEFERINO, L. C. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 1, p. 42-47, 2008.

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2018. 844 p.

WHO. **Noncommunicable diseases country profiles 2018**. Geneva: World Health Organization, 2018. 224 p.

YE, Z.; ZHANG, Q.; WANG, S.; BHARATE, P.; VARELA-ARAMBURU, S.; LU, M.; SEEBERGER, P. H.; YIN, J. Tumour-Targeted Drug Delivery with Mannose-Functionalized Nanoparticles Self-Assembled from Amphiphilic β -Cyclodextrins. **Chemistry-A European Journal**, v. 22, n. 43, p. 15216-15221, 2016.

ZELENSKY, A. N.; GREASY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. **The FEBS Journal**, v. 272, n. 24, p. 6179-6217, 2005.

ZHU, S.; NIU, M.; O'MARY, H.; CUI, Z. Targeting of tumor-associated macrophages made possible by PEG-sheddable, mannose-modified nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 9, p. 3525-3530, 2013a.

_____. Targeting of tumor-associated macrophages made possible by PEG-sheddable, mannose-modified nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. Supporting Information, 2013b.