

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Co-encapsulação de alfa-bisabolol e doxorrubicina em nanocápsulas multiparede funcionalizadas com RGD: avaliação das atividades antitumoral e antiangiogênica

DANIELI ROSANE DALLEMOLE

PORTO ALEGRE, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Co-encapsulação de alfa-bisabolol e doxorubicina em nanocápsulas multiparede funcionalizadas com RGD: avaliação das atividades antitumoral e antiangiogênica

Dissertação apresentada por **Danieli Rosane Dallemole** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador (a): Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann
Co-Orientador (a): Profa. Dra. Karina Paese

Porto Alegre, 2019

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em Nível Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 21 de março de 2019, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Letícia Scherer Koester

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Profa. Dra. Márcia Rosângela Wink

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Profa. Dra. Renata Vidor Contri

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Dallemole, Danieli Rosane

Co-encapsulação de alfa-bisabolol e doxorubicina em nanocápsulas multiparede funcionalizadas com RGD: avaliação das atividades antitumoral e antiangiogênica / Danieli Rosane Dallemole. -- 2019.

139 f.

Orientadora: Adriana Raffin Pohlmann.

Coorientadora: Karina Paese.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Nanotecnologia. 2. Atividade antitumoral. 3. Atividade antiangiogênica. 4. Nanocápsulas poliméricas. I. Raffin Pohlmann, Adriana, orient. II. Paese, Karina, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Micro e Nanopartículas com Aplicação na Terapêutica, Lab. K208, Instituto de Química, UFRGS; Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos, Lab. 405, Faculdade de Farmácia, UFRGS; e Laboratório 22, Departamento de Bioquímica, UFRGS. O projeto foi desenvolvido com financiamento do CNPq e FAPERGS e o autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Dedico este trabalho àqueles que sempre estiveram ao meu lado, meus pais Ari e Natalina. Eu amo vocês!

E aos meus queridos avós (*in memoriam*): Afonsina, João, Delina e Vítório.

AGRADECIMENTO

À professora Adriana Raffin Pohlmann por me acolher em seu laboratório, pela oportunidade, pela compreensão, paciência e pelos ensinamentos.

À professora Karina Paese pelo apoio, incentivo, compreensão, pelas discussões que contribuíram para o meu amadurecimento durante esse período.

Obrigada professora Silvia Guterres pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelo apoio e ensinamentos.

Ao professor Fabrício Figueiró, professora Ana Battastini e à mestranda Juliete Scholl por disponibilizarem o laboratório para que eu pudesse executar os experimentos e pelo apoio durante o desenvolvimento do projeto.

Ao professor Vladimir Lavayen e ao professor Marco Antonio Ceschi pela paciência e pelas contribuições para o desenvolvimento do trabalho.

À professora Irene Guerreiro por me acolher durante o estágio docente e a todos os professores que me acompanharam nessa jornada.

Agradeço aos colegas de laboratório pela troca de experiências, pelo companheirismo e incentivo. Em especial a Aline e o Rodrigo que auxiliaram nos experimentos. Também agradeço imensamente a Isabela por me ensinar as técnicas do laboratório e a Michelli Antonow pelo auxílio durante a execução do trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Química e da Faculdade de Farmácia, que sempre estiveram dispostos a ajudar e esclarecer dúvidas.

Às colegas Manoelly, Jonhataline, Letícia e Carol pelo carinho, incentivo, pela palavra amiga nas horas difíceis.

Aos amigos conquistados durante o período de desenvolvimento desse trabalho e também àqueles de longa data, que entenderam a ausência, que apoiaram nos momentos difíceis e sorriram a cada vitória. Muito obrigada!

Agradeço aos meus companheiros de apartamento, Kássia e Augusto, pelos dias de estudo e discussões que compartilhamos, pelo apoio e incentivo.

Agradeço imensamente aos meus pais, Ari e Natalina, pelo amor incondicional, pelo incentivo, pela compreensão pelos momentos em que estive ausente. Não existem palavras para expressar o que sinto por vocês.

Aos meus irmãos, Jéferson e Jéderson, pelo carinho, apoio e incentivo.

Aos meus sobrinhos Nathaly e Victor, por compreenderem a minha ausência, pelo amor, por me proporcionarem dias felizes, leves e cheios de abraços apertados que me incentivaram a chegar ao final dessa jornada.

Agradeço ao meu melhor amigo e namorado Fernando, pelo carinho, apoio e por estar sempre presente.

À Claudete, minha querida amiga, pelo carinho, incentivo e por estar sempre ao meu lado.

Agradeço à UFRGS, CAPES, FAPERGS e CNPq pela infraestrutura e recursos financeiros.

Ao professor Sergio Luiz Vieira e Thiago Luiz Netzold (Aviário de Ensino e Pesquisa, do departamento de zoologia da UFRGS) pelo fornecimento dos ovos.

Para encerrar cito as sábias palavras de Carl Sagan: “diante da vastidão do espaço e na imensidão do tempo, é uma alegria poder compartilhar um planeta e uma época com vocês”.

“É um exagero dizer que a guerra contra o câncer está perdida, mas também não é realista dizer que ela pode ser completamente vencida.”

Siddhartha Mukherje

RESUMO

O glioblastoma é um tumor cerebral agressivo que apresenta alta proliferação vascular. Terapias que visam à inibição da proliferação celular e da angiogênese estão sob investigação. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a co-encapsulação de alfa-bisabolol (AB) e doxorrubicina (DOX) em nanocápsulas multiparede funcionalizadas com tripeptídeo RGD (ácido arginilglicilaspártico) (AB-DOX-MLNC-RGD) quanto ao seu potencial antitumoral e antiangiogênico. As formulações foram preparadas por deposição interfacial de polímero pré-formado, revestidas com quitosana e funcionalizadas com acetato de zinco e RGD. Foram avaliadas as características físico-químicas das formulações (diâmetro hidrodinâmico médio (d_h)), concentração de partículas, potencial zeta, pH, doseamento e eficiência de encapsulação (EE) do AB e da DOX, eficiência de ligação do RGD, investigação da presença de cristais de fármaco e avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), bem como, atividade antitumoral frente linhagem de células de glioblastoma (U87MG) e a atividade antiangiogênica em ensaio na membrana corioalantoide de ovos embrionados. O d_h da formulação AB-DOX-MLNC-RGD foi de 138 nm, apresentando estreita faixa de distribuição ($PDI < 0,2$). O diâmetro registrado por rastreamento de nanopartículas foi de 170 nm, enquanto que, a concentração de partículas registrada foi de $4,9 \times 10^{12}$ partículas/mL. O potencial zeta da formulação foi de +13,4 mV e o pH observado foi próximo a 4. O teor de AB foi próximo ao teórico e a EE próxima a 100%, já o teor de DOX foi de 30,79 µg/mL e a EE foi de 65,89%. Não foram evidenciados cristais de fármaco na fase contínua da formulação. Modos vibracionais característicos das matérias-primas que constituem a formulação estavam presentes no espectro de FT-IR. Após 24h de exposição das células U87MG à formulação AB-DOX-MLNC-RGD, o IC_{50} registrado foi de 2,78 µmol/L de doxorubicina. A atividade antiangiogênica foi registrada após 48h de exposição à formulação AB-DOX-MLNC-RGD, sem evidências de toxicidade para os embriões.

Palavras chaves: membrana corioalantoide, células U87MG, funcionalização de superfície.

ABSTRACT

Glioblastoma is an aggressive brain tumor that has high vascular proliferation. Therapies aimed at inhibiting cell proliferation and angiogenesis are under investigation. In this context, the aim of this study was to evaluate the co-encapsulation of alpha-bisabolol (AB) and doxorubicin (DOX) in multiwall lipid-core nanocapsule functionalized with tripeptide RGD (arginylglycylaspartic acid) (AB-DOX-MLNC-RGD) as to its antitumoral and antiangiogenic potential. The formulations were prepared by interfacial deposition of preformed polymer, coated with chitosan and functionalized with zinc acetate and RGD. The physicochemical characteristics of the formulations was evaluate (mean hydrodynamic diameter (d_h)), particle concentration, zeta potential, pH, dosage and encapsulation efficiency (EE%) of AB and DOX, RGD binding efficiency, investigation of the presence of drug crystals, and evaluation by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy as well as antitumor activity against U87MG glioblastoma cell line and antiangiogenic activity in a chorioallantoic membrane assay (CAM). The d_h of formulation AB-DOX-MLNC-RGD was 138 nm, presenting a narrow range of distribution (PDI <0.2). The diameters recorded by NTA was 170 nm, while the recorded particle concentrations was 4.9×10^{12} particles/mL. The recorded zeta potential was +13.4 mV and the pH observed was near 4. The AB content was close to the theoretical value and the EE was close to 100%, the DOX content was 30.79 $\mu\text{g/mL}$ and EE was 65.89%. No drug crystals were evident in the continuous phase of the formulation. Vibration modes characteristic of the raw materials constituting the formulation were present in the FT-IR spectrum. After 24h of exposure of U87MG cells to the AB-DOX-MLNC-RGD formulation, the registered IC_{50} was 2.78 $\mu\text{mol/L}$ of doxorubicin. The antiangiogenic activity was recorded after 48 h of exposure to the AB-DOX-MLNC-RGD formulation, with no evidence of toxicity to the embryos.

Keywords: chorioallantoic membrane, U87MG cells, surface functionalization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspectos histológicos do glioblastoma.....	34
Figura 2: Mecanismos de formação de novos vasos no ambiente tumoral.....	36
Figura 3: Estereoisômeros do alfa-bisabolol.....	48
Figura 4: Diferenças entre nanoesfera e nanocápsulas.....	50
Figura 5: Etapas de preparo das LNCs.....	61
Figura 6: Ensaio em membrana corioalantoide de ovo embrionado.....	71
Figura 7: Gráficos radar para as formulações MLNC e AB-MLNC.....	78
Figura 8: Resultados de DLS por intensidade e volume para as formulações (n=3): MLNC- (A e B), MLNC+ (C e D), AB-MLNC- (E e F), AB-MLNC+ (G e H)	80
Figura 9: Resultados de DLS por intensidade e volume para as formulações (n=3): AB-MLNC-RGD (A e B), AB-DOX-MLNC- (C e D), AB-DOX-MLNC+ (E e F), AB-DOX-MLNC-RGD (G e H).....	82
Figura 10: Coeficiente de correlação das formulações MLNC-, MLNC+, AB-MLNC-, AB-MLNC+, AB-MLNC-RGD, AB-DOX-MLNC-, AB-DOX-MLNC+, AB-DOX-MLNC-RGD (n=3).....	83
Figura 11: Potencial zeta (mV) das formulações sem o fármaco doxorrubicina. AB-MLNC- (A); AB-MLNC+ (B); AB-MLNC-RGD (C).....	87
Figura 12: Potencial zeta (mV) das formulações contendo o fármaco doxorrubicina. AB-DOX-MLNC- (A); AB-DOX-MLNC+ (B); AB-DOX-MLNC-RGD (C).....	87
Figura 13: Relação do pH encontrado nas formulações AB-DOX-MLNC-, AB-DOX-MLNC+ e o <i>logD</i> para o cloridrato de doxorrubicina nesses pHs. Gráfico gerado com o programa Chemicalize (https://chemicalize.com/).....	91
Figura 14: Imagens de microscopia óptica (aumento de 100x). A – dispersão de nanocápsulas AB-DOX-MLNC-; B – dispersão de nanocápsulas AB-DOX-MLNC+; C – solução aquosa de doxorrubicina.....	96
Figura 15: Gráficos de intensidade <i>versus</i> tamanho de partícula obtidos por NTA. AB-MLNC- (A), AB-DOX-MLNC- (B), Subtração das distribuições (C).....	97
Figura 16: Gráficos de intensidade <i>versus</i> tamanho de partícula obtidos por NTA. A- AB-MLNC+ (A), AB-DOX-MLNC+ (B) (a flecha representa diferença na escala de intensidade), subtração dos espectros (C).....	98
Figura 17: Espectro de infravermelho e da função derivada da amostra AB-MLNC-RGD no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} (A). Espectro da mesma amostra na região 1800-1480 cm^{-1} e de sua função derivada (B).....	101
Figura 18: Viabilidade celular – MTT. Veículo 1 - DMSO, Veículo 2 - água, TMZ – temozolomida, # diferença em relação ao veículo 1 ($p < 0,05$); ** diferença em relação ao veículo 2 ($p < 0,01$); *** diferença em relação ao veículo 2 ($p < 0,001$).....	104

Figura 19: Ensaio em membrana corioalantoide. As diferenças estatísticas são expressas em relação ao tempo 0 h de cada um dos grupos. * (p<0,05); ** (p<0,01); *** (p< 0,001)..... 108

Figura 20: Imagens representativas dos ensaios em membrana corioalantoide. Cada coluna representa um grupo diferente, enquanto que as linhas representam tempos distintos de captura da imagem. Controle negativo (A); AB-MLNC⁺ (2,21x10⁻³ μmol/L) (B), AB-MLNC⁺ (4,42x10⁻³ μmol/L) (C); AB-MLNC⁺ (8,85x10⁻³ μmol /L) (D); AB-MLNC-RGD (2,03x 10⁻³ μmol /L) (E)..... 109

Figura 21: Imagens representativas dos ensaios em membrana corioalantoide. Cada coluna representa um grupo diferente, enquanto que as linhas representam tempos distintos de captura da imagem. AB-MLNC-RGD (4,06x10⁻³ μmol/L) (F); AB-MLNC-RGD (8,12x10⁻³ μmol/L) (G); AB-DOXO-MLNC-RGD (2,04x10⁻³ μmol/L) (H); AB-DOXO-MLNC-RGD (4,08x10⁻³ μmol/L) (I); AB-DOXO-MLNC-RGD (8,17x10⁻³ μmol/L) (J)..... 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Formulações desenvolvidas.....	60
Tabela 2: Diâmetro médio ponderado por volume D [4,3], SPAN, diâmetro hidrodinâmico médio (z-average, d_h) e índice de polidispersão das formulações MLNC e AB-MLNC (n=3).....	76
Tabela 3: Diâmetro hidrodinâmico médio (z-average) e PDI para as formulações contendo o fármaco e/ou o tripeptídeo (n=3).....	81
Tabela 4: Caracterização das suspensões de nanocápsulas empregando a técnica de NTA.....	84
Tabela 5: Valores de potencial zeta e pH das formulações.....	86
Tabela 6: Teor e eficiência de encapsulação da doxorubicina.....	89
Tabela 7: Concentrações de partículas, alfa-bisabolol, doxorubicina e RGD aplicadas no ensaio de viabilidade celular.....	102
Tabela 8: Concentrações de partículas, alfa-bisabolol, doxorubicina e RGD aplicadas no ensaio de membrana corioalantoide.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

AB: Alfa-bisabolol
AIC: 5-aminoimidazol-4-carboxamida
ARG-GLY-ASP: ácido arginilglicilaspártico
ATCC: *American Type Culture Collection*
BCA: ácido bicinconínico
bEnd.3: células endoteliais de capilares cerebrais
BHE: barreira hematoencefálica
C: citosina
C6: culturas de células de glioma de rato
CA-4: combretastatina
CAM: membrana corioalantoide
CG : *camera gain*
CGTRQ: Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos
CL: *camera level*
COSAT: Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho
CP: Concentração de partículas (part./mL)
D10: diâmetro de partícula a 10% da curva de distribuição
D50: diâmetro de partícula a 50% da curva de distribuição
D90: diâmetro de partícula a 90% da curva de distribuição
DMEM: Eagle modificado de Dulbecco
DMSO: dimetilsulfóxido
DOX.HCl: cloridrato de doxorubicina
DOX: doxorubicina
DPR: desvio padrão relativo
EE%: eficiência de encapsulação
EGFR: fator de crescimento epidermal
EPR: *permeability and retention effect* (efeito de permeabilidade e retenção)
EUA: Estados Unidos da América
FA: fase aquosa
FDA: Food and Drug Administration
FGF-2 fator de crescimento de fibroblastos
FO-I: Fase orgânica I
FO-II: Fase orgânica II
FO-III: Fase orgânica III
FT-IR: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
G: Guanina
Glioblastoma- NOS: *Not Otherwise Specified* (sem outra especificação em tradução literal)
HaCat: queratinócitos humanos imortalizados
HER2: receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano.
HIF: Fator induzido por hipóxia
HPLC: (*High performance liquid chromatography*) cromatografia líquida de alta eficiência
HUVECS: células endoteliais umbilicais humanas
IC₅₀: dose responsável pela redução da viabilidade das células em 50 %
IDH 1: isocitrato desidrogenase -1
IDH 2: isocitrato desidrogenase -2

LNCs: nanocápsulas de núcleo lipídico
MCF-7: células de câncer de mama
MEC: matriz extracelular
metG: Guanina metilada
MGMT: O⁶-metilguanina DNA metiltransferase
MLNC: nanocápsula multiparede
MMP-2: metaloproteinases de matriz 2
MMR: *mismatch repair*
MS: monoesterato de sorbitano
MTIC: 5-(3-metil-(triazen-1-il)imidazol-4-carboxamida
MTT: brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium)
mV: milivolts
NaCl: cloreto de sódio
NaOH: hidróxido de sódio
NIR: fluorescência no infravermelho próximo
nm: nanômetro
NTA: *Nanoparticle Tracking Analysis* (Análise por rastreamento de nanopartículas)
OMS: Organização Mundial da Saúde
PBS: tampão fosfato-salino
PDI: índice de polidispersão
pH: potencial de hidrogênio
PLA: ácido poli(D,L-láctico)
PLGA: poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PMO: organosílica mesoporosa periódica
PTEN: fosfatase e tensina homóloga
RAW 243.7: linhagens de macrófagos
RGD: ácido arginilglicilaspártico
Sd: desvio padrão
SK-MEL-28: cultura de células de melanoma
SNC: Sistema Nervoso Central
T: Timina
T0: tempo 0
T24: tempo 24h
T48: tempo 48h
TCM: triglicerídeos de cadeia média
TCC: triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico
TEA: trietilamina
TERT: telomerase transcriptase reversa
TFA: ácido trifluoroacético
TMZ: temozolomida
TP53: proteína de tumor p53
VEGF: *vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento endotelial vascular)
WHO: World Health organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. REVISÃO DE LITERATURA	31
3.1. Câncer.....	32
3.1.1. Glioblastoma: dados epidemiológicos e características histomorfológicas e genéticas.....	32
3.1.2. Formação de vasos e o desenvolvimento/manutenção dos tumores.....	35
3.1.3. Integrina $\alpha\beta3$: o papel das integrinas no desenvolvimento de cânceres	37
3.2. Tratamentos convencionais	39
3.2.1. Temozolomida.....	40
3.3. Novas estratégias para o tratamento de gliomas	42
3.3.1. Nanotecnologia	42
3.3.1.1. Tripetídeo RGD: integrinas como alvos terapêuticos	42
3.3.1.2. Doxorrubicina	45
3.3.1.3. Anti-inflamatórios no tratamento de glioblastoma.....	46
3.3.1.3.1. Alfa-bisabolol.....	47
3.3.1.4. Das nanocápsulas de núcleo lipídico às LNCs funcionalizadas	49
3.4. Modelo <i>in vivo</i> para testes de angiogênese: Ensaio em membrana corioalantoide (CAM do inglês <i>choriollantoic membrane</i>).....	56
4. MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1. Matérias-primas.....	58
4.2. Equipamentos	59
4.3. Métodos	60
4.3.1. Formulações desenvolvidas	60
4.3.2. Preparação das nanocápsulas de núcleo lipídico	60
4.3.3. Solubilização da quitosana.....	62
4.3.4. Revestimento com quitosana	62
4.3.5. Complexação do íon metálico (Zn^{2+}) às MLNCs	62
4.3.6. Ligação do tripetídeo RGD à superfície das MLNCs.....	63
4.4. Caracterização físico-química	63

4.4.1. Determinação de diâmetros por Difração de Laser (LD, do inglês <i>laser diffraction</i>).....	63
4.4.2. Determinação de diâmetro por Espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>)	63
4.4.3. Análise por rastreamento de nanopartículas (NTA, do inglês <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>)	64
4.4.4. Determinação do Potencial zeta	65
4.4.5. Determinação do pH	65
4.4.6. Eficiência de ligação do RGD à superfície das nanocápsulas	65
4.4.7. Doseamento do alfa-bisabolol	66
4.4.8. Eficiência de Encapsulação do alfa-bisabolol	67
4.4.9. Doseamento da doxorubicina nas formulações	67
4.4.10. Eficiência de encapsulação da doxorubicina	68
4.4.11. Investigação da presença de cristais nas formulações contendo doxorubicina por técnicas combinadas de rastreamento de nanopartículas e microscopia de luz polarizada.....	68
4.4.12. Análise por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier..	68
4.5. Avaliação biológica	69
4.5.1. Cultivo Celular	69
4.5.2. Viabilidade celular.....	69
4.5.3. Ensaio em membrana corialantoide de embrião de <i>Gallus gallus</i>	70
4.6. Descarte de Resíduos	72
4.7. Análise estatística	73
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1. Caracterização das formulações de nanocápsulas	76
5.1.1. Difração de laser (LD), Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Rastreamento de Nanopartículas (NTA)	76
5.1.2. Potencial zeta e pH das formulações.....	84
5.1.3. Eficiência de ligação do RGD	88
5.1.4. Doseamento e eficiência de encapsulação do alfa-bisabolol.....	88
5.1.5. Doseamento e eficiência de encapsulação da doxorubicina	89
5.1.6. Investigação da presença de cristais de doxorubicina: microscopia de luz polarizada e Análise por rastreamento de nanopartículas (NTA)	95
5.1.7. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier	99

5.2. Avaliação biológica.....	102
5.2.1. Atividade antitumoral em linhagem celular de glioblastoma humano U87MG	102
5.2.2. Atividade antiangiogênica em modelo de membrana corioalantoide de ovos embrionados.....	106
6. CONCLUSÕES	113
7. PERSPECTIVAS.....	115
8. REFERÊNCIAS.....	117
9. ANEXOS	135

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Relatos de casos de câncer estão presentes em documentos de antigas sociedades humanas (por exemplo, a sociedade grega). Neles também estão contidos alguns tratamentos aplicados na tentativa de curar a doença. Porém, os registros são raros e remetem a ideia de que o câncer não era uma doença prevalente na antiguidade (DAVID, ZIMMERMAN, 2010).

Considerando o aumento da expectativa de vida e a ampla exposição a fatores que favorecem o desenvolvimento de neoplasias, aliados à predisposição genética, o número de pessoas com esta doença teve um incremento ao longo das últimas décadas (WHITE et al. 2014). Atualmente, o câncer é o maior problema de saúde pública e a segunda causa de morte em todo o mundo (SIEGEL, MILLER, JEMAL, 2016; WHO, 2017).

Conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), os cânceres com maior taxa de mortalidade são os cânceres que acometem os pulmões, fígado, câncer colorretal, estômago e mama. Contudo, as neoplasias no sistema nervoso central (SNC) também apresentam números significativos de mortalidade.

O glioblastoma é o tumor maligno mais frequente entre os tumores primários do SNC, caracterizando-se por ser altamente invasivo devido à intensa atividade mitótica e proliferação vascular. Por consequência, os pacientes têm um prognóstico desfavorável e a taxa de sobrevivência é muito baixa (OMURO, DeANGELIS, 2013; OSTROM et al. 2016).

Mesmo nos tumores benignos há um comprometimento do tecido cerebral devido à própria doença ou ao tratamento empregado e, com isso, ocorrem complicações neurofisiológicas, neurocognitivas e sistêmicas (LACY, SAADATI, JAMES, 2012, ACS, 2016). O tratamento aplicado para os tumores no SNC é semelhante ao tratamento para outros tumores sólidos, como a ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia, utilizadas de forma isolada ou combinada. No caso da quimioterapia, a baixa seletividade dos fármacos para tecidos tumorais provoca diversos efeitos colaterais, como por exemplo, a doxorubicina que pode ser tóxica ao tecido cardíaco, isso impede a aplicação de altas doses de fármacos e a combinação de medicamentos para um tratamento efetivo. Além disso, o SNC conta com a presença da barreira hematoencefálica (BHE) que restringe a permeabilidade de

alguns fármacos, reduzindo as opções para o tratamento (FDA, 2010, LIANG et al. 2010).

Diante das dificuldades no tratamento do câncer, nanopartículas poliméricas vêm sendo exploradas como alternativas para transpor esses obstáculos. Já foi demonstrado em modelos *in vitro* e *in vivo* que nanocápsulas poliméricas contendo fármacos podem acumular-se no local de proliferação tumoral e promover efeito antiproliferativo (BERNARDI et al. 2009, BERNARDI et al. 2013). Portanto, as vantagens da utilização desses sistemas incluem o direcionamento e acúmulo do fármaco no sítio alvo, baixa exposição sistêmica, consequente redução da toxicidade e tempo de meia-vida prolongado (LIANG et al. 2010, ROUSLAHTI, 2012). Ainda, Rodrigues e colaboradores (2014) demonstraram que nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNCs), revestidas com polissorbato 80, podem atravessar a BHE e direcionar fármacos para o SNC.

O acoplamento de ligantes à parede polimérica dos nanocarriadores é outra estratégia para direcionar o fármaco ao tecido tumoral, pois os ligantes podem reconhecer biomarcadores da estrutura vascular do tumor ou das próprias células tumorais (SONG et al. 2016). Neste sentido, um estudo do nosso grupo de pesquisa, demonstrou que ligantes podem formar complexos organometálicos na superfície de nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana (BENDER et al., 2014), sem a necessidade de acoplamento (formação de ligação covalente entre as espécies químicas). Desta forma, recentemente foi aplicado o novo método de síntese para a preparação de nanocápsulas contendo o quimioterápico doxorrubicina e funcionalizada com o tripeptídeo: ácido arginilglicilaspártico (RGD), um ligante da integrina $\alpha\beta3$. Essa formulação apresentou efeito antitumoral frente às células de glioblastoma e de câncer de mama (células com diferentes expressões de integrina $\alpha\beta3$). Quando células não tumorais (queratinócitos humanos com baixa expressão de integrina $\alpha\beta3$) foram expostas a mesma formulação de nanocápsulas, estas apresentaram menor captação celular comparado com a captação pelas células tumorais, o que evidencia o direcionamento via reconhecimento do tripeptídeo e do biomarcador celular (ANTONOW, 2016).

Outra abordagem explorada é a combinação de diferentes substâncias bioativas em uma mesma nanopartícula (SHI et al. 2017). Dessa forma, outro estudo do nosso grupo de pesquisa constatou que a co-encapsulação de alfa-bisabolol e anti-inflamatórios não-esteroides (indometacina/éster de indometacina) em nanocápsulas

poliméricas promove o aumento da citotoxicidade seletiva de células de glioma (TERROSO, 2010). O alfa-bisabolol é uma substância anti-inflamatória que apresenta potencial antitumoral, por provocar a morte de células de glioma humano sem afetar a viabilidade de células astrogliais normais (CAVALIERI et al. 2004, CAVALIERI et al. 2009, MARONGIU et al. 2014 RIGO, VINANTE, 2016). Considerando que processos inflamatórios e angiogênicos estão associados ao início e progressão da gliomatogêneses, a combinação de fármacos anti-inflamatórios, citotóxicos e que inibem a formação de novos vasos sanguíneos pode ser uma alternativa promissora para o tratamento de gliomas (YEUNG, et al. 2013).

Diante do exposto, a hipótese desse trabalho centrou-se no desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo a combinação de alfa-bisabolol e doxorubicina, ora inédita, além da funcionalização com RGD, com intuito de promover a atividade antitumoral em células de glioblastoma de forma mais eficaz do que o tratamento padrão (temozolomida). Ainda, a presença do tripeptídeo na superfície da partícula poderá acarretar em atividade antiangiogênica, que será investigada em membrana corioalantoide de ovos embrionados.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a co-encapsulação de alfa-bisabolol com doxorubicina em nanocápsulas multiparede funcionalizadas com tripeptídeo RGD frente às células de glioblastoma humano e seu potencial antiangiogênico em membrana corioalantoide de ovos de galinha embrionados.

2.2. Objetivos específicos

Desenvolver e determinar as características físico-químicas de nanocápsulas multiparede complexadas com zinco e funcionalizadas com o tripeptídeo RGD, contendo no núcleo as substâncias bioativas alfa-bisabolol e doxorubicina;

Avaliar o efeito antitumoral da formulação frente às células de glioblastoma humano U87MG e comparar a sua eficácia com o tratamento padrão para glioblastoma (temozolomida);

Investigar a atividade antiangiogênica da formulação através da avaliação em membrana corioalantoide (CAM) de ovos de galinha embrionados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Câncer

3.1.1. Glioblastoma: dados epidemiológicos e características histomorfológicas e genéticas

O câncer é um grande desafio para a humanidade. Apesar dos avanços no desenvolvimento de novos tratamentos, da compreensão sobre a relação entre fatores ambientais e genéticos e da fisiopatologia da doença, o câncer se mostra uma das principais causas de morte no mundo (WHO, 2017).

Uma análise sistemática realizada por Fitzmaurice e colaboradores (2017) com dados de 195 países, considerando 32 tipos de câncer, demonstra que houve aumento de 33% na incidência dessa doença entre os anos de 2005 e 2015, o qual é atribuído ao crescimento e envelhecimento populacional. Neste mesmo trabalho, encontram-se dados sobre a incidência e mortalidade de câncer no sistema nervoso central.

Conforme a classificação proposta, essas neoplasias ocupam a 18ª posição referente à incidência e a 12ª causa de morte (FITZMAURICE et al. 2017). De acordo com Miranda-Filho e colaboradores (2017), a incidência é maior em homens do que em mulheres.

Os tumores que afetam o SNC diferem em suas características histomorfológicas. Os tumores que apresentam características morfológicas semelhantes às células gliais normais podem ser subdivididos em: I. astrocitoma; II. oligodendrogliomas e III. ependimomas (HUTTNER, 2012). Tais tumores são chamados, de forma geral, como gliomas e correspondem a 30% dos tumores primários do SNC, sendo responsáveis pela maioria das mortes relacionadas às neoplasias cerebrais (WELLER, 2015).

Os astrocitomas são tumores benignos ou malignos, morfologicamente heterogêneos, que ganham esse nome devido ao predomínio de células morfologicamente semelhantes aos astrócitos (HUTTNER, 2012). Os astrócitos são células abundantes no tecido cerebral e são responsáveis pela reciclagem de neurotransmissores, pela manutenção do equilíbrio oxidativo, além de preservar a barreira hematoencefálica e dar suporte aos neurônios (HAGAN, BOLON, KEENE,

2012). No entanto, a semelhança morfológica com os astrócitos não determina que o tumor se originou dessas células, uma vez que, a origem dessa neoplasia ainda não está clara e é objeto de estudo (LLAGUNO, PARADA, 2016).

Como citado anteriormente, as características histológicas servem como base para a classificação dos tumores do SNC. Dessa forma, a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO) propôs uma subdivisão de acordo com o grau de malignidade (graus I, II, III e IV). Essa classificação leva em consideração a densidade celular, natureza infiltrativa, atipia citológica, atividade mitótica, proliferação microvascular e necrose. Assim, tumores de crescimento lento, normalmente benignos, são considerados como grau I, enquanto que o grau IV são neoplasias agressivas, com alta malignidade (HUTTNER, 2012; GUPTA, DWIVEDI, 2017).

Contudo, em 2016, a WHO lançou uma nova classificação, agora baseada não apenas em características histológicas, mas também em marcadores genéticos e moleculares (LOUIS et al., 2016). Tais classificações têm por objetivo reunir informações que podem auxiliar na escolha do tratamento mais adequado, até mesmo terapias individualizadas (GUPTA, DWIVEDI, 2017).

Neste contexto, o glioblastoma, objeto de estudo desse trabalho, apresenta-se como um tumor altamente celularizado, com fundo fibrilar, exhibe pleomorfismo (diferentes formas celulares) e hiperchromatismo, atípicas celulares; mitoses são frequentes e atípicas, possui alta proliferação vascular e áreas de necroses, circundada por células tumorais em pseudopaliçada (ANATPAT-UNICAMP, 2019) (Figura 1). Dessa forma, é classificado como grau IV, neoplasia maligna.

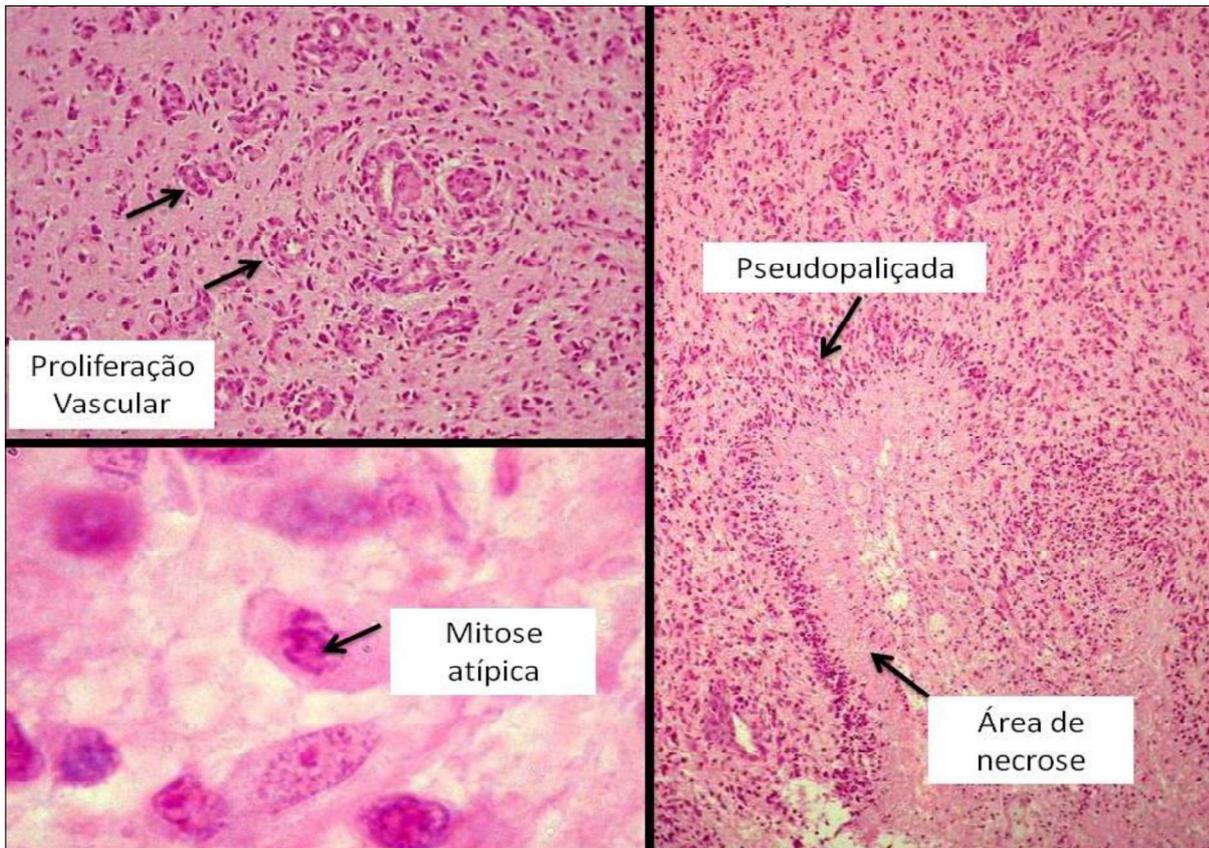


Figura 1: Aspectos histológicos do glioblastoma.
Fonte: Adaptado de ANATPAT-UNICAMP 2019.

Aliando essas particularidades histológicas à investigação genotípica proposta pela WHO (2016), o glioblastoma pode ser também denominado como IDH-*wildtype* ou IDH-*mutant*. A designação IDH-*mutant* refere-se às mutações nos genes IDH1 e IDH2 (isocitrato desidrogenase) as quais produzem metabólitos oncogênicos (COHEN, HOLMEN, COLMAN, 2013).

A ausência dessas mutações corresponde ao glioblastoma IDH-*wildtype*. Enquanto que a não investigação dessas mutações pode levar a determinação de glioblastoma-NOS (*Not Otherwise Specified* - sem outra especificação em tradução literal) (SANTOSH, SRAVYA, ARIVAZHAGAN, 2017). As mutações nos genes IDH ocorrem, principalmente, em tumores secundários, ou seja, que se originam de uma lesão precursora de baixo grau. Nos tumores primários, os quais representam 90% dos glioblastomas diagnosticados, essas mutações normalmente estão ausentes. Além disso, os tumores IDH-*wildtype* se desenvolvem em pessoas idosas (média de 64 anos), enquanto que, o glioblastoma IDH-*mutant* ocorre em sujeitos mais jovens (em média 44 anos) (LOUIS et al. 2016, NØRØXE, POULSEN, LASSEN, 2016).

Outra diferença está no prognóstico e tempo de sobrevida. O glioblastoma IDH-*mutant* possui um melhor prognóstico, assim a sobrevida é praticamente o dobro do tempo de um sujeito cujo diagnóstico é de glioblastoma IDH-*wildtype* (em média 31 meses e 15 meses, respectivamente). A razão pela qual isso ocorre ainda não foi elucidada, mas pode estar relacionada à maior suscetibilidade das células do tumor IDH-*mutant* ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, as terapias utilizadas (COHEN, HOLMEN, COLMAN, 2013, LOUIS et al. 2016).

A investigação de outras alterações genéticas também pode auxiliar na escolha do tratamento e estabelecer o prognóstico do paciente. Entre elas estão: I. TERT – Telomerase transcriptase reversa envolvida na regulação do comprimento dos telômeros; II. TP53 proteína de tumor p53 relacionada a regulação do ciclo celular; III. MGMT - O⁶-metilguanina DNA metiltransferase relacionada ao reparo de DNA (quando presente pode ser um empecilho ao tratamento com temozomida); IV. EGFR – Fator de crescimento epidermal e V. PTEN – fosfatase e tensina homóloga, sendo esses últimos relacionados à proliferação e sobrevivência celular (WALLER et al. 2015, LIU et al. 2016 LOUIS et al. 2016, GUPTA, DWIVEDI, 2017). Vale ressaltar que essas alterações não são exclusivamente encontradas em glioblastoma.

3.1.2. Formação de vasos e o desenvolvimento/manutenção dos tumores

Sabe-se que a formação de novos vasos sanguíneos é fundamental para o crescimento e manutenção tumoral. Além disso, em estágios mais avançados, os vasos sanguíneos podem servir como meio para a disseminação de células tumorais, promovendo metástase (POTENTE, GERHARDT, CARMELIET 2011, ZUAZO-GAZTELU, CASANOVAS 2018).

Os novos vasos são formados por diferentes mecanismos, os quais podem ocorrer simultaneamente e de forma independente. São eles: I. vasculogênese - formação de vasos a partir de células progenitoras; II. angiogênese – formação de novos vasos a partir da rede de vasos pré-existente; III. mimetismo vasculogênico - onde células tumorais se desdiferenciam e passam a apresentar fenótipo semelhante ao endotelial; IV. intussuscepção - divisão dos vasos pré-existentes, sem a necessidade de proliferação celular, apenas remodelamento (ZUAZO-GAZTELU, CASANOVAS 2018).

Além desses processos, as células tumorais podem sequestrar vasos pré-existentes, caracterizando o mecanismo de co-optação (Figura 2) (ZIYAD, IRUELA-ARISPE, 2011, QUIAN et al. 2016). Essas vias de formação de novos vasos são desencadeadas devido a um desequilíbrio entre fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos secretados no microambiente tumoral (FOSTER et al. 2017).

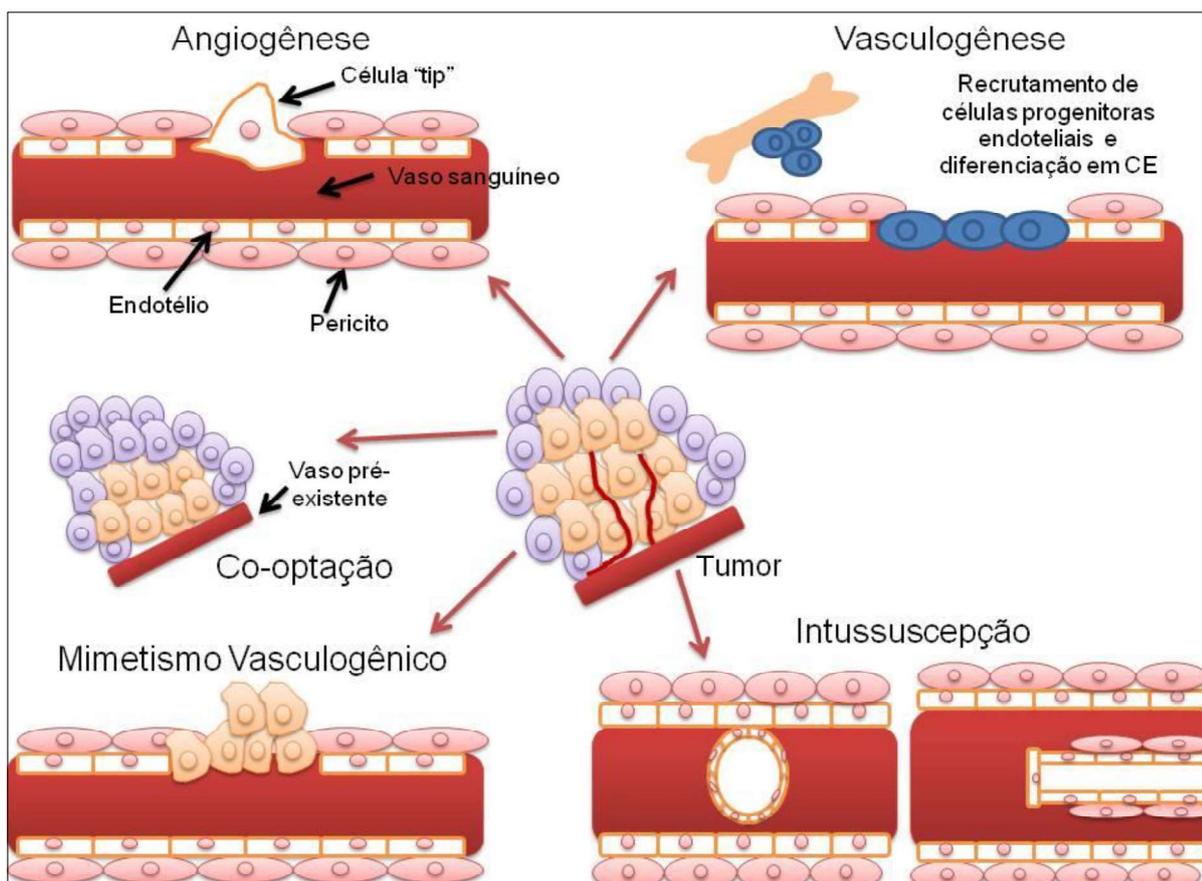


Figura 2: Mecanismos de formação de novos vasos no ambiente tumoral.
 Fonte: do autor, baseado em ZUAZO-GAZTELU, CASANOVAS 2018.

Entre esses processos, a angiogênese possui um papel importante e majoritário na formação de novos vasos. Neste contexto, o tumor se desenvolve em ambiente inicialmente avascular (até aproximadamente 1 a 2 mm de diâmetro), porém a sua expansão provoca hipóxia, afetando principalmente as células que se encontram no centro da massa tumoral (FOSTER et al. 2017).

A falta de oxigênio desencadeia a ativação de fatores, como o fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF), os quais são capazes de promover a transcrição de genes dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF – *vascular endothelial growth factor*). O VEGF reconhece os receptores de mesmo nome na

membrana das células e, assim, ativa a angiogênese. (POTENTE, GERHARDT, CARMELIET 2011, PALMA, BIZIATO, PETROVA 2016). Contudo, esse é um processo complexo e vários fatores de crescimento, citocinas e a própria matriz extracelular podem estar envolvidos (OTROCK et al. 2007, PALMA, BIZIATO, PETROVA, 2016).

Devido a essa superativação, a formação de novos vasos ocorre de forma acelerada, impedindo a completa maturação dos mesmos. Dessa forma, os vasos sanguíneos tumorais são desorganizados e tortuosos, o que dificulta a perfusão sanguínea. Essa desorganização contribui para irrigação ineficiente do tecido tumoral e, com isso, se estabelece um ciclo hipóxia-angiogênese (POTENTE, GERHARDT, CARMELIET 2011, ZIYAD, IRUELA-ARISPE, 2011, FOSTER et al. 2017).

Ainda, quando os tumores atingem tamanhos maiores, a pressão do fluido intersticial aumenta, visto a falta de um sistema linfático competente, e os pequenos vasos podem ser ocluídos. Com isso o sangue fica estagnado e surgem regiões necróticas (FOSTER et al. 2017).

Sabe-se também, que nesses vasos as células endoteliais encontram-se mais afastadas umas das outras. As lacunas formadas permitem o aumento da permeabilidade desses vasos em relação aos vasos do tecido normal e promove o efeito EPR (*Permeability and retention effect*), ou seja, aumento da permeabilidade e retenção nesses locais. O efeito EPR permite que moléculas, fármacos e até mesmo nanocarreadores se acumulem no tecido tumoral (DEWHIRST, SECOMB, 2017). Neste contexto, o reconhecimento das particularidades dos vasos sanguíneos que ocupam o espaço tumoral pode nortear o desenvolvimento de novos sistemas de entrega de fármacos, sejam eles passivos (efeito EPR) e/ou ativos (baseado em interações moleculares específicas).

3.1.3. Integrina $\alpha\beta3$: o papel das integrinas no desenvolvimento de cânceres

As integrinas são glicoproteínas formadas por heterodímeros denominados alfa (α) e beta (β). Em mamíferos foram identificados 24 heterodímeros, sendo estes oriundos da combinação de 18 subunidades alfa e 8 subunidades beta (HAMIDI, PIETILÄ, IVASKA, 2016). Essas glicoproteínas se localizam na membrana celular (proteínas transmembrana) e participam da adesão célula-célula, célula-matriz extracelular, diferenciação e migração celular em resposta a sinais indutivos. Também

promovem a secreção de fatores de transdução que influenciam no funcionamento de células adjacentes (SCHAFFNER, DARD, 2003; CHEN, CHEN, 2011; WANG et al. 2013).

Dessa forma, as integrinas podem sinalizar em ambas as direções, ou seja, de fora para dentro da célula e vice-versa (BIANCONI, UNSELD, PRAGER, 2016). Aliado a isso, as integrinas possuem a capacidade de interagir com receptores de fatores de crescimento, levando a potencialização das vias de sinalização e modulação do *turnover* (reciclagem) desses receptores, favorecendo a proliferação celular (BIANCONI, UNSELD, PRAGER, 2016).

Devido ao seu papel na comunicação bidirecional e na adesão celular à matriz extracelular (MEC), essas glicoproteínas são peças importantes no desenvolvimento e manutenção dos tumores (MALRIC et al. 2017). Isso foi relatado por Hanahan e Weinberg (2000) no artigo "*The hallmarks of cancer*" (as marcas do câncer), onde apontam que as integrinas estão envolvidas nas vias de sinalização proliferativa sustentada, na resistência a morte celular, angiogênese, invasão e metástase tecidual.

As integrinas reconhecem o ambiente em que as células estão inseridas e desempenham a função de sobrevivência celular dependente de adesão (ALANKO et al. 2015). Quando as células perdem a ligação com a MEC, mecanismos de morte celular são ativados (*anoikis*) (DESGROSELLIER, CHERESH, 2010). Porém, as células tumorais podem driblar esse sistema.

Uma das vias pela qual isso ocorre é internalização das integrinas ativas em endossomos. Esses endossomos são capazes de manter uma sinalização intracelular, preservando a célula viva e contribuindo também para a metástase tumoral (HAMIDI, IVASKA, 2018).

Contudo, quando ligadas à MEC, estas propiciam uma condição de tração adequada para que as células neoplásicas possam promover a invasão e migração celular. No entanto, isso depende da remodelação da MEC. Há evidências que metaloproteinases de matriz, MMP-2, por exemplo, localizam-se junto às integrinas ($\alpha\beta3$) na superfície celular, promovendo a atividade proteolítica e assim favorecendo a invasão (BROOKS et al. 1994a, MALRIC et al. 2017, DESGROSELLIER, CHERESH, 2010).

Como citado anteriormente, as integrinas estão relacionadas com a formação de novos vasos sanguíneos. Em 1994(a), Brooks, Clark e Cheresch constataram que

a integrina $\alpha\beta3$ é superexpressa durante a angiogênese e, conseqüentemente, a sua inibição reduz a formação de vasos, porém não afeta a estrutura daqueles já existentes. No mesmo ano, Brooks e colaboradores (1994b) perceberam que o uso de inibidores de integrinas promovia a apoptose de células endoteliais e quando da aplicação dos mesmos em modelos de xenoenxerto em membrana corioalantoide de ovos embrionados, ocorria a redução do tamanho tumoral, evidenciando o papel dos vasos sanguíneos na manutenção do tumor.

A expressão das integrinas nas células endoteliais pode ser estimulada por moléculas presentes no microambiente tumoral, bem como, pela hipóxia. Assim como no caso do VEGF, a hipóxia pode induzir a transcrição de genes que codificam integrinas (DAHL et al. 2005, BIANCONI, UNSELD, PRAGER, 2016). A presença dessas nas células endoteliais favorece a migração e sobrevivência celular, necessárias para a formação de novos vasos (AVRAAMIDES, GARMY-SUSINI, VARNER, 2008).

Análises de biópsias de pacientes com glioblastoma apresentam alta expressão de integrinas $\alpha\beta3$. Essa expressão não se restringe apenas às células endoteliais, mas também às células tumorais propriamente ditas. Quando comparado com astrocitomas de baixo grau, a expressão em glioblastoma é maior (SCHNELL et al. 2008, SCHNELL et al. 2009). Neste contexto, as integrinas, principalmente as $\alpha\beta3$, podem ser utilizadas com biomarcadores para prognósticos e também como alvos terapêuticos (DESGROSELLIER, CHERESH, 2010).

3.2. Tratamentos convencionais

Ao longo dos anos, os desafios para o tratamento do câncer foram se modificando. Primeiramente, era necessário entender a doença e estabelecer modelos que permitissem o desenvolvimento de pesquisas (DEVITA, CHU 2008). Com o passar do tempo, os avanços na ciência permitiram compreender, ao menos em parte, a biologia do câncer, descrevendo as características comuns aos cânceres, mesmo quando se desenvolvem em tecidos distintos (HANAHAN, WEINBEG 2000, FOUAD, AANEI, 2017).

Assim, foi possível estabelecer algumas formas de tratamento como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. O tratamento do glioblastoma segue os procedimentos empregados para outros tipos de tumores sólidos, com ressecção cirúrgica para

retirada do tumor e também para realização do diagnóstico histológico e/ou molecular, seguida de radioterapia e quimioterapia de maneira isolada ou em conjunto (OZDEMIR-KAYNAK, QUTUB, YESIL-CELIK TAS, 2018).

A ressecção cirúrgica é desafiadora, uma vez que é necessário retirar a maior parte do tumor possível, porém a remoção de tecido saudável pode levar a déficits na fala e locomoção. Além disso, a falta de uma delimitação clara dificulta a realização do procedimento (ALPHANDÉRY, 2018, WELLER et al. 2017).

O uso da radioterapia pode aumentar a sobrevivência dos pacientes. Ainda, é de suma importância quando do diagnóstico de glioblastoma com MGMT superexpresso, devido à resistência desses tumores ao tratamento com o fármaco padrão, temozolomida (WELLER et al. 2014, WELLER et al. 2017).

Temozolomida é o fármaco amplamente recomendado para o tratamento de glioblastoma e outros tumores do SNC devido a sua permeabilidade na BHE. Além disso, a sua biodisponibilidade é de quase 100% após a administração oral e a eliminação ocorre rapidamente (tempo de meia vida 1,8 h), não há acúmulo de fármaco no organismo após doses repetidas e apresenta um perfil de segurança favorável quando comparado a outros agentes antineoplásicos que já estão no mercado (FRIEDMAN, KERBY, CALVERT, 2000, WELLER et al. 2017).

Fazem parte também do arsenal de quimioterápicos para o tratamento de neoplasias do SNC: a nimustina, a carmustina, a fotemustina, a procarbazina e a vincristina (WELLER et al. 2017). Recentemente, o bevacizumab, anticorpo monoclonal com capacidade antiangiogênica, foi aprovado pelo FDA para o tratamento do glioblastoma (FDA, 2017).

3.2.1. Temozolomida

Temozolomida é um pró-fármaco derivado da imidazotetrazina que atua como agente alquilante de DNA (DRUGBANK, 2019a). A natureza lipofílica, aliada ao tamanho da molécula (194 Da) permite a penetração na BHE (FRIEDMAN, KERBY, CALVERT, 2000, PUBCHEM 2019). Dessa forma, em 1999 o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a sua utilização como terapia antineoplásica para o tratamento de astrocitomas, incluindo o glioblastoma (FDA, 2016).

Ao ser administrada, a temozolomida sofre hidrólise não enzimática em pH fisiológico, sendo convertida para 5-(3-metil-(triazen-1-il)imidazol-4-carboxamida

(MTIC), um composto ativo que posteriormente é novamente hidrolizado a 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC). O MTIC interage com algumas regiões do DNA, metilando-as, principalmente os sítios N⁷ e O⁶ das guaninas e no sítio O³ das adeninas. Apesar da metilação ocorrer nesses três sítios, a alquilação do sítio O⁶ é a principal responsável pela atividade citotóxica (MOODY, WHEELHOUSE, 2014, LEE, 2016).

O mecanismo de citotoxicidade relaciona-se à complementação de bases incorretas devido à metilação da guanina, ou seja, durante a replicação ao invés de ser inserida uma citosina como base complementar (G:C), uma timina é inserida (metG:T). Esse erro é reconhecido pela maquinaria celular e o sistema reparo é ativado (*mismatch repair* -MMR). Contudo, este é realizado na fita de DNA contendo a base correta, a qual é substituída por outra timina estabelecendo um ciclo de quebras e reparos da cadeia de DNA, que desencadeia a resposta apoptótica (TENTORI et al. 1998, MIDDLEMAS et al. 2000).

Como a ação citotóxica não é seletiva, as células normais também são suscetíveis a temozolomida. Entretanto, a replicação rápida das células tumorais torna-as mais sensíveis aos efeitos do fármaco (WESOLOWSKI, RAJDEV, MUKHERJI 2010). Apesar disso, células tumorais podem apresentar resistência ao tratamento com a temozolomida. A resistência está vinculada também aos sistemas de reparo de danos ao DNA.

Células com enzimas de reparo do sistema MMR deficientes (MIDDLEMAS et al. 2000), bem como aquelas que superexpressam a enzima MGMT são capazes de superar os efeitos citotóxicos. O efeito relacionado à MGMT é sua capacidade de retirar o grupo metil da guanina, restaurando-a (SILBER et al. 2012, SANTOSH, SRAVYA, ARIVAZHAGAN, 2017).

Temozolomida também provoca reações adversas, entre elas linfopenia, trombocitopenia, neutropenia e leucopenia, leucemia mieloide, e ainda, alopecia, náuseas, vômitos e convulsões (MERCK, 2016). Diante disso, é necessário buscar alternativas de tratamentos, que sejam menos agressivos aos tecidos saudáveis e eficazes para o tratamento do glioblastoma.

3.3. Novas estratégias para o tratamento de gliomas

3.3.1. Nanotecnologia

Um dos desafios para o tratamento do câncer é a entrega eficaz do fármaco na região tumoral, evitando assim, os efeitos colaterais. Além disso, existem várias barreiras biológicas e do próprio ambiente tumoral (penetração, heterogeneidade tumoral, hipóxia) que devem ser superadas para que essa entrega seja efetiva. Diante disso, pesquisas com nanocarreadores para a entrega de fármacos (*drug delivery*) vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas como alternativa as terapias convencionais para o tratamento do câncer (PIKTEL et al. 2016, ROSENBLUM et al. 2018).

Esses sistemas podem carrear fármacos hidrofóbicos, bem como substâncias hidrofílicas. Também são capazes de alterar a farmacocinética da substância, promovendo liberação sustentada e aumentando a meia-vida plasmática (KARIM, et al. 2016).

A vetorização dos nanocarreadores pode ocorrer por via passiva e/ou ativa. Na forma passiva, os nanocarreadores ficam retidos na região tumoral devido ao efeito EPR, ou seja, a maior fenestração dos vasos sanguíneos (as fenestrações podem variar de 100 nm a 1,2 μ m). Enquanto que na vetorização ativa a superfície do nanocarreador é decorada com uma variedade de moléculas, incluindo peptídeos, anticorpos, aptâmeros e ácidos nucleicos que reconhecem sítios específicos na célula tumoral, podendo acarretar na internalização celular (HOBBS et al. 1998, CERNA et al. 2016, PIKTEL et al. 2016).

3.3.1.1. Tripetídeo RGD: integrinas como alvos terapêuticos

Visto o exposto no tópico “*Integrina $\alpha\beta3$: o papel das integrinas no desenvolvimento de cânceres*”, percebe-se a importância dessas glicoproteínas transmembrana tanto no desenvolvimento tumoral como na formação de novos vasos sanguíneos. Por isso, as integrinas vêm sendo exploradas como possíveis alvos terapêuticos para o câncer.

Neste contexto, descobriu-se um conjunto de integrinas (integrinas RGD-*binding*) presentes em proteínas da MEC, capazes de reconhecer uma sequência específica de peptídeos, apresentando ácido arginilglicilaspártico. Esse

reconhecimento pode ocorrer também com moléculas sintéticas solúveis que apresentam essas sequências peptídicas e, com isso, as integrinas perdem a sua adesão à MEC, desencadeando mecanismos de morte celular (WEIS, CHERESH, 2011).

Diante disso, surgiu o celengitide, um pentapeptídeo cíclico contendo a sequência RGD, antagonista da integrina, que alcançou estudos clínicos de fase III para o tratamento de glioblastoma. O celengitide induz a apoptose através da inibição da interação entre as integrinas e a matriz extracelular, promovendo efeito anti-angiogênico (MAS-MORUNO, RECHENMACHER, KESSLER, 2010).

Apesar dos resultados satisfatórios nas fases iniciais, ao término do estudo clínico de fase III concluiu-se que o uso combinado de celengitide e temozolomida não demonstrou efeitos benéficos adicionais (STUPP et al., 2014). Uma das hipóteses levantadas para esses resultados é a meia vida curta do celengitide na corrente sanguínea, ocasionando baixas concentrações que podem ser agonistas da angiogênese (REYNOLDS et al. 2009, TUCCI, STUCCI, SILVESTRIS, 2014). Porém, vale ressaltar que esses dados foram obtidos com o peptídeo cíclico solúvel, e que a utilização de RGD, ou de peptídeos apresentando esta sequência, como ligantes na superfície de nanocarreadores, pode apresentar resultados distintos.

Diante disso, o peptídeo foi primeiramente explorado para vetorização de fármacos pelo acoplamento direto da molécula de quimioterápico e do RGD. No entanto, a dificuldade para sintetizar e purificar esse conjugado podem ser um empecilho para a sua aplicação (CHEN, CHEN, 2011).

Devido ao reconhecimento RGD–integrina, aliado ao advento da nanomedicina, o tripeptídeo vêm despertando interesse como ligante de superfície de nanocarreadores. Diversos nanocarreadores (lipossomas, micelas, nanocápsulas) contendo quimioterápicos e conjugados com RGD foram testados e apresentaram resultados promissores (DANHIER, BRETON, PRÉAT, 2012, DURO-CASTANO et al. 2017).

O acoplamento de peptídeos à superfície de nanopartículas melhora a internalização pelas células tumorais e promove baixa captação em células normais, adicionalmente permite liberação controlada de fármacos encapsulados no tecido alvo, supressão tumoral e diminuição da densidade vascular (GAO et al. 2013; HU et al. 2016, ZHANG et al. 2016). Além disso, peptídeos acoplados a parede polimérica

de nanocarreadores possibilitaram a transposição da BHE via interação peptídeo-receptor (YANG et al. 2017).

Song et al. (2016) utilizaram nanocarreadores PEG-Ag2S conjugados com RGD cíclico (cRGD) para direcionar o fármaco inibidor endotelial TNP-470 e o quimioterápico doxorrubicina à vasculatura de tumores em um modelo de xenoenxerto com células de glioma humano U87MG (alta expressão de integrina $\alpha\beta 3$). A nanoformulação induziu apoptose e redução da densidade vascular devido ao efeito sinérgico dos fármacos aplicados. Contudo, a presença de cRGD foi fundamental para o direcionamento e liberação do fármaco, pois na ausência do peptídeo, a quantidade de fármaco no tumor foi duas vezes menor.

Em 2017, Belhadj e colaboradores desenvolveram um lipossoma multifuncional contendo doxorrubicina para o tratamento de glioblastoma. O nanocarreador foi funcionalizado com duas moléculas: I. c(RGDyK) e II. P-ácido hidroxibenzoico, sendo o primeiro direcionado as integrinas das células endoteliais e tumorais e o segundo, aos receptores dopaminérgicos da BHE. Os testes *in vitro* demonstraram a capacidade da partícula em internalizar em células de glioma (U87MG), células endoteliais de capilares cerebrais (bEnd.3) e células endoteliais umbilicais humanas (HUVECS) e provocar efeito citotóxico. Além disso, o lipossomo penetrou em esferoides de glioma (mimetismo da BHE *in vitro*). Nos testes *in vivo* mostrou-se capaz de chegar ao tecido encefálico tumoral. Não foi observada toxicidade no tecido cardíaco e houve aumento no tempo de sobrevivência dos animais tratados com o lipossoma.

O RGD pode ser utilizado para o direcionamento de fármacos e diagnóstico de diversos tumores e não apenas para gliomas. Dessa forma, Zhang et al. (2010) observaram o aumento do efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* (melanoma B16F10 em ratos) quando da aplicação de doxorrubicina e combretastatina (CA-4), co-encapsuladas em lipossoma RGD-L[CD], quando comparado a forma livre dos fármacos e o lipossoma não funcionalizado. O desempenho da formulação foi atribuído ao direcionamento do lipossoma para tumor pelo RGD, perturbação vascular pelo fármaco CA-4, provocando o aprisionamento da doxorrubicina no tecido tumoral, causando assim, citotoxicidade.

O tripeptídeo também pode ser aplicado como o objetivo teranóstico. Neste contexto, Li e colaboradores (2017) acoplaram o tripeptídeo a dendrímeros contendo Cy 5.5 (corante fluorescente). A atividade citotóxica foi avaliada *in vitro* em células de

carcinoma escamoso esofágico (TE-1), demonstrando que a partícula funcionalizada apresentava maior atividade quando comparada à partícula sem o tripeptídeo. Por outro lado, *in vivo*, a partícula permitiu a identificação de tumores, mesmo em estágio iniciais, após a aplicação e detecção da imagem por fluorescência no infravermelho próximo (NIR).

Visto o exposto, o RGD pode ser acoplado em nanocarreadores a fim de promover o direcionamento de fármacos e moléculas fluorescente para diagnóstico em diversos tecidos tumorais, desde que estes expressem receptores compatíveis, como no caso das integrinas $\alpha\beta3$.

3.3.1.2. Doxorrubicina

A doxorrubicina é um antibiótico (antraciclina), isolado da bactéria *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, que possui atividade antineoplásica. O mecanismo pelo qual esse fármaco exerce citotoxicidade celular está relacionado à sua capacidade de interação com a enzima topoisomerase II e com os pares de base do DNA, inibindo a replicação e transcrição do material genético e, conseqüentemente, induzindo a morte celular (FDA, 2010; YANG et al. 2014). Devido a essas características, esse fármaco é amplamente utilizado no tratamento de diversos tumores sólidos e leucemias (TACAR, SRIAMORNSAK, DASS, 2013; YANG et al. 2014).

Apesar da sua atividade benéfica, muitos são os efeitos colaterais que decorrem do tratamento com doxorrubicina, entre eles a cardiotoxicidade e toxicidade hematológica (leucopenia, neutropenia, trombocitopenia e anemia) (FDA, 2010). Aliado a isso, a passagem do fármaco pela barreira BHE é limitada, o que dificulta a sua utilização para o tratamento de tumores no SNC, apesar de as células de glioblastoma, por exemplo, serem suscetíveis a doxorrubicina em ensaios *in vitro* (FDA, 2010, ROS et al., 2015).

Frente a essas problemáticas, diversas pesquisas envolvendo a encapsulação de doxorrubicina em nanocarreadores estão em desenvolvimento com o propósito de diminuir a citotoxicidade do quimioterápico em células não tumorais e a entrega do mesmo na região do SNC.

Há muito tempo está no mercado a primeira nanoformulação (lipossomas peguilados) contendo doxorrubicina (Doxil[®]), aprovada pela FDA em 1995. O uso

desse produto possibilitou a diminuição dos efeitos tóxicos do fármaco, principalmente a cardiotoxicidade (dose cumulativa cardiotoxicidade passou de 450 mg/m² - fármaco livre-para >900 mg/m² – para o lipossoma peguilado), prolongou o tempo de meia-vida e proporcionou a redução das doses aplicadas (BARENHOLZ, 2012; GABIZON, PATIL, LA-BECK, 2016). Além disso, a utilização de lipossomas peguilados possibilitou a entrega de doxorubicina a tumores intracerebrais e maior acumulação no tecido tumoral quando comparado ao tecido normal (SIEGAL, HOROWITZ, GABIZON, 1995, GABIZON, SHMEEDA, BARENHOLZ, 2003).

No entanto, apenas mais uma nanoformulação contendo o quimioterápico foi aprovada (Agência de Medicina Europeia, em 2000), o Myocet[®], que é um sistema lipossômico não-peguilado (ANSELMO, MITRAGOTRI, 2016). Outros três sistemas lipossomais estão em estudo de fase I, II e/ou III, são eles: a) lipossomos-HER2 para o tratamento de câncer de mama; b) lipossomos anti-EGFR para tumores sólidos; c) termodox (lipossomo termossensível) para terapia de tumores hepatocelulares (SHI et al. 2017).

Apesar dos lipossomas estarem nos estágios mais avançados dos testes clínicos para entrega de doxorubicina, esses não são os únicos nanocarreadores que têm potencial para a aplicação terapêutica em cânceres. Antonow e colaboradores (2016) desenvolveram, nanocápsulas de núcleo lipídico contendo doxorubicina como um sistema promissor contra células de câncer de mama (MCF-7), pois o nanocarreador foi internalizado via caveolina, e o quimioterápico liberado no interior da célula, local onde desempenhou a sua função citotóxica.

3.3.1.3. Anti-inflamatórios no tratamento de glioblastoma

O processo inflamatório está diretamente ligado a carcinogênese. Há evidências que a inflamação crônica aumenta os riscos para o desenvolvimento de neoplasias, bem como, que está relacionado com a progressão do câncer (RAYBURN, EZELL, ZHANG, 2009, TODORIC, ANTONUCCI, KARIN, 2016).

Em 2011, Hanahan e Weinberg ao revisarem as principais características do câncer no artigo “*Hallmarks of the cancer: The next generation*” evidenciam o papel da inflamação para o desenvolvimento e manutenção de tumores. Segundo os autores, está associado à liberação de fatores de crescimento, fatores inibidores de

morte celular, desequilíbrio oxidativo, o qual pode desencadear instabilidade genética e a secreção de moléculas pró-angiogênicas.

O glioblastoma é um tumor heterogêneo e em sua composição celular conta com um importante infiltrado inflamatório (macrófagos e células da micróglia), o qual é importante para o desenvolvimento da inflamação associada ao tumor (QUAIL, JOYCE, 2017, POON et al. 2017). Neste contexto, surgem algumas terapias com o uso de fármacos anti-inflamatórios de forma isolada ou em combinação com quimioterápicos. Contudo, a monoterapia com anti-inflamatórios não se mostrou eficaz, quando comparada com a terapia em associação com quimioterápicos (RAYBURN, EZELL, ZHANG 2009, YEUNG et al. 2012, CRUSZ, BALKWILL, 2017). Aliado a isso, o uso de anti-inflamatórios pode atuar como agente preventivo ao glioblastoma (TODORIC, ANTONUCCI, KARIN, 2016, AMIRIAN et al. 2018).

No âmbito da nanotecnologia, o nosso grupo de pesquisa desenvolveu e avaliou a atividade de LNCs contendo o anti-inflamatório indometacina e o etil-éster de indometacina em modelos *in vitro* e *in vivo* de glioblastoma. Tais nanopartículas foram capazes de promover efeito antiproliferativo seletivo para as células tumorais, além de serem direcionadas ao tecido neoplásico, provocando a redução do tamanho tumoral, após administração intravenosa ou intraperitoneal (BERNARDI et al. 2008, BERNARDI et al. 2009, BERNARDI et al. 2013, RODRIGUES et al. 2016).

3.3.1.3.1. Alfa-bisabolol

O alfa-bisabolol é um metabólito secundário vegetal, presente em óleos essenciais de plantas como a camomila (*Matricaria chamomilla*) e a candeia (*Eremanthus erythropappus*), essa última, uma planta nativa da mata atlântica e do cerrado brasileiro (LOEUILLE 2015). Essas plantas são amplamente utilizadas na medicina tradicional devido as suas propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e antibacterianas (DUTRA et al 2010), as quais podem ser atribuídas a presença do alfa-bisabolol, bem como, a existência de outras moléculas biologicamente ativas que podem atuar sinergicamente ou de forma combinada com o alfa-bisabolol.

Quimicamente o alfa-bisabolol é considerado um álcool sesquiterpeno monocíclico oleoso (Figura 3), cuja densidade e o peso molecular são 0,93 g/L e 222,72 g/mol, respectivamente (BHATIA et al. 2008, KAMATOU, VILJOEN, 2010, ALBERTTI et al. 2018). Na sua estrutura existem carbonos quirais que propiciam a

formação de quatro estereoisômeros, os quais podem apresentar propriedades farmacológicas distintas. Relatos na literatura demonstram que a atividade biológica do enantiômero α -(-)-bisabolol é mais pronunciada, assim como sua ocorrência na natureza é mais frequente do que os demais (KAMATOU, VILJOEN 2010).

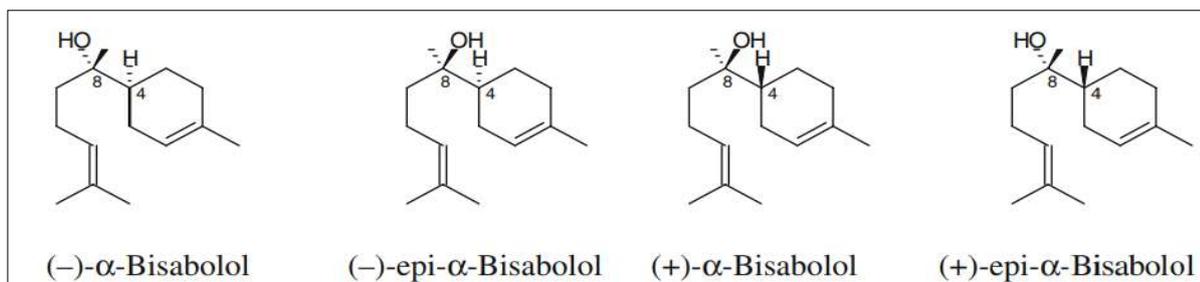


Figura 3: Estereoisômeros do alfa-bisabolol.

Fonte: KAMATOU, VILJOEN 2010.

Além das atividades tradicionais descritas para o alfa-bisabolol, atualmente vêm-se explorando a sua capacidade antitumoral. Trabalhos *in vitro* demonstram que o alfa-bisabolol possui atividade citotóxica (via apoptose) em células de tumores sólidos (glioblastoma e câncer de pâncreas), bem como em células de tumores hematológicos (leucemia linfoblástica aguda), sem comprometer a viabilidade de células normais (astrócitos e fibroblastos) (CAVALIERI et al. 2004, SEKI et al. 2011, BONIFACIO et al. 2012).

Os mecanismos pelos quais o alfa-bisabolol desempenha esse papel citotóxico ainda não foram totalmente esclarecidos, no entanto, pesquisas apontam que esse composto lipofílico interage com as *lipid rafts* das membranas celulares, permitindo assim a sua internalização. Essa relação alfa-bisabolol/*lipid rafts* pode ser a chave para entender os efeitos citotóxicos mais pronunciados em células cancerígenas, pois tais estruturas lipídicas são mais abundantes nesse tipo celular (DARRA et al. 2008).

Aliado a isso o alfa-bisabolol pode comprometer a integridade da membrana plasmática e pode desestabilizar as membranas mitocondriais (via poro de transição de permeabilidade mitocondrial) uma vez que há evidências da liberação do citocromo C (proteína envolvida na cadeia transportadora de elétrons). Recentemente foi relatado que os lisossomos também sofrem ação dessa substância. Esses processos desencadeiam uma cascata de respostas que resultam na morte celular por apoptose (CAVALIERI et al. 2004, CAVALIERI et al 2009, BONIFACIO et al. 2012, RIGO, VINANTE 2016).

A ação antineoplásica do alfa-bisabolol também foi avaliada *in vivo*. Seki e colaboradores (2011) relataram que, após o tratamento oral de ratos com alfa-bisabolol, ocorreu a redução no tamanho de xenoinxertos subcutâneos e peritoneais de câncer pancreático. Aliado a isso, os autores relatam que a utilização dessa substância ativa não provocou perda de peso ou alterações hematológicas, assim como indícios de disfunção renal ou hepática, mostrando que esta molécula pode ser promissora no tratamento do câncer.

Nanopartículas contendo alfa-bisabolol foram avaliadas quanto à citotoxicidade em culturas de células de glioma (C6) e de melanoma (SK-MEL-28) pelo nosso grupo de pesquisa. A encapsulação proveu redução da viabilidade celular, quando comparado com a substância ativa livre para ambos os tipos celulares testados. Isso se deve ao fato de que a nanoencapsulação proporciona liberação controlada da substância ativa e melhora a captação celular, demonstrada pelo aumento da fluorescência no interior das células, quando nanocápsulas marcadas com rodamina foram empregadas no tratamento em cultivo celular (SK-MEL-28) (TERROSO, 2014).

3.3.1.4. Das nanocápsulas de núcleo lipídico às LNCs funcionalizadas

Nanopartículas poliméricas são sistemas de tamanhos submicrométricos (1 a <1000 μm) no qual o polímero é o componente majoritário. De acordo com a sua organização estrutural as nanopartículas poliméricas podem ser classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas (SCHAFFAZICK, et al. 2003).

As nanoesferas são estruturas não vesiculares formadas por uma matriz polimérica, enquanto que nas nanocápsulas, a presença do óleo promove a formação de uma estrutura vesicular, cuja estrutura simplificada é representada na Figura 4. Quando da adição de fármacos a essas estruturas, estes podem se adsorver na partícula, ou ainda, podem estar dispersos, dissolvidos ou aprisionados na estrutura da nanocápsula ou da nanoesfera (SCHAFFAZICK, 2003; GUTERRES, ALVES, POHLMANN, 2007).

Oliveira e colaboradores (2013) descreveram 6 diferentes tipos possíveis de distribuição do fármaco nas nanocápsulas, dependendo das características físico-químicas do mesmo. Dessa forma, fármacos hidrofílicos ficarão na fase aquosa, na qual as nanocápsulas estão suspensas, outros fármacos podem estar dispersos no coloide, seja na parede e/ou no núcleo, ou podem ainda estar na interface ou

totalmente aprisionado ao núcleo, dependendo do $\log D$ do fármaco. Tais partículas podem ser obtidas por diversos métodos de preparação descritos na literatura (VENTHUIR e BOUCHEMAL, 2008; MORA-HUERTAS, FESSI, ELAISSARI 2010).

Em 1989, Fessi e colaboradores desenvolveram o método de deposição interfacial de polímero pré-formado por deslocamento de solvente. O método baseia-se na homogeneização de uma fase orgânica; composta por solvente orgânico parcialmente miscível em água (ex: acetona), óleo, polímero e tensoativo hidrofóbico; além de uma fase aquosa contendo tensoativo hidrofílico. No momento em que as duas fases se encontram ocorre a migração do solvente orgânico para água reduzindo assim a tensão interfacial entre os dois líquidos, permitindo a formação de gotículas de óleo.

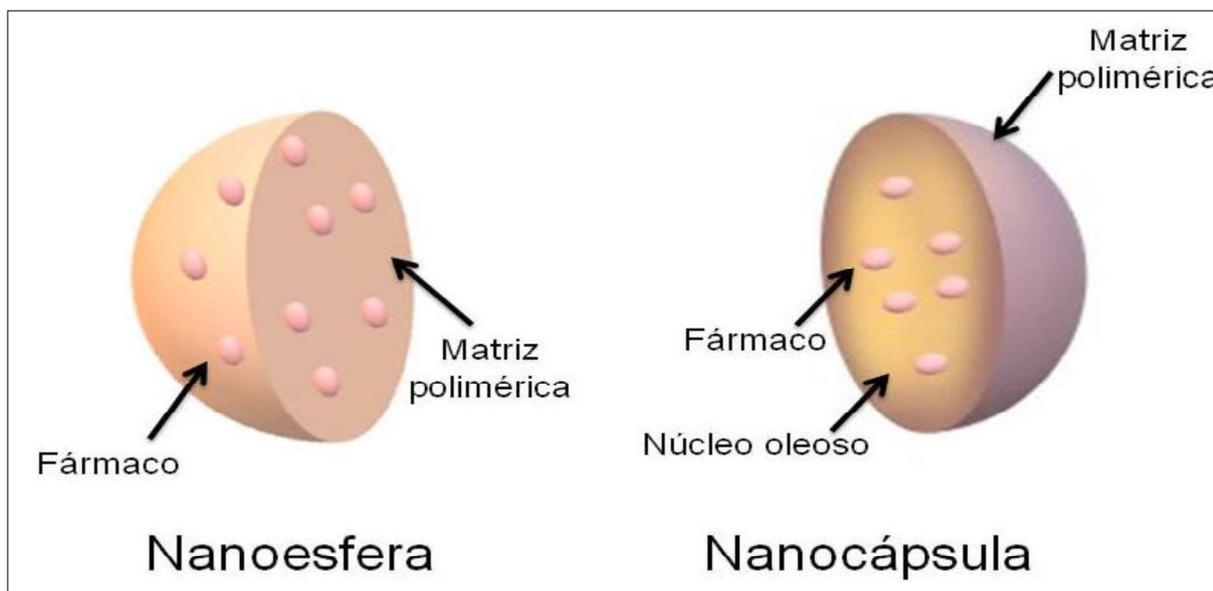


Figura 4: Diferenças entre nanoesfera e nanocápsulas
Fonte: do autor, baseado em SCHAFFAZICK, 2003.

Além disso, ocorre a migração do polímero para a fase aquosa, na qual ele é insolúvel e devido a essa característica ocorre a precipitação instantânea do mesmo, envolvendo as gotículas de óleo (*self-assembly*). A formação das estruturas em escala nanométrica é dependente da concentração de matéria-prima solúvel na fase orgânica e de tensoativo na fase aquosa, aliado a isso a redução dos solventes por evaporação reduz o tamanho das partículas formadas (FESSI, et al. 1989, VENTURINI et al. 2011, JORNADA et al. 2012).

A formulação original de Fessi e colaboradores (1989) era constituída por poli(D,L-láctico) (PLA), acetona, Epikuron 170, benzoato de benzila, indometacina como fármaco modelo e fase aquosa com poloxamer (Pluronic F68). No entanto, os próprios autores descrevem a versatilidade da metodologia e, portanto, a utilização de diversas matérias-primas para a obtenção de nanopartículas.

Neste contexto, o nosso grupo de pesquisa empregou esse método no desenvolvimento de uma nova classe de nanopartículas, as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNCs). As LNCs são formadas por organogel de triglicerídeo de cadeia média e monoesterato de sorbitano (MS), envolto por um poliéster alifático biodegradável, geralmente poli(ϵ -caprolactona) (PCL), e estabilizadas em água pelo tensoativo não-iônico, polissorbato 80 (JÄGER et al. 2007, VENTURINI et al. 2011, POLETTO et al. 2015).

A substituição do benzoato de benzila, utilizado na formulação de Fessi e colaboradores (1989), por triglicerídeos de cadeia média (triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico) foi decorrente do estudo comparativo realizado por Guterres e colaboradores (2000). Os autores verificaram que o benzoato de benzila possui a capacidade de dissolver os polímeros PLA e PCL, acarretando na formação de micelas ao invés de nanocápsulas, e por consequência a menor estabilidade cinética da formulação.

Em paralelo, a adição de MS à formulação promove maior eficiência de encapsulação do fármaco, uma vez que o MS pode interagir com o fármaco de modo não covalente e mantê-lo no interior da partícula. Na sua ausência, nanocristais podem ser formados, os quais acarretam na presença de populações de tamanho micrométrico (POLETTO et al. 2015). Ainda, a presença de MS no núcleo confere maior rigidez à partícula. Dessa forma, a flexibilidade da mesma pode ser modulada pela adição ou ausência de MS (FIEL et al. 2011). Além disso, maiores concentrações de MS promovem resistência do fármaco à difusão devido ao aumento da viscosidade do núcleo, regulando assim o perfil de liberação de fármacos a partir das nanoestruturas (JÄGER et al. 2009).

Outro fator que influencia a difusão do fármaco do núcleo para a interface da partícula e posteriormente para o meio externo (liberação) é a composição e as características físico-químicas da parede polimérica. Como citado anteriormente, as LNCs possuem parede composta pelo polímero poli(ϵ -caprolactona). Estudos demonstram que maiores concentrações de PCL proporcionam difusão mais lenta do

fármaco, o que reflete no aumento do tempo de meia-vida de liberação da substância ativa a partir das nanocápsulas (CRUZ et al. 2006 e POLETTO et al. 2008).

Aliado a isso, a PCL apresenta biocompatibilidade com sistemas biológicos e biodegradabilidade. A biodegradabilidade está relacionada a processos de hidrólise e formação de ϵ -hidroxil ácido caproíco, um substrato para o ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) (MOORE, SAUDERS, 1998). Calgaroto e colaboradores (2018) demonstraram que a PCL presente nas LNCs sofre hidrólise devido ao meio aquoso em que está inserida, acarretando na perda de massa do polímero, e que esse processo é acelerado na presença de microrganismos, evidenciando a biodegradabilidade do material.

Como pode ser observado, cada matéria-prima que compõe as LNCs contribui para a formação da estrutura supramolecular da partícula, além de conferir propriedades específicas a mesma. No entanto, é necessário que haja uma combinação adequada desses componentes, visando homogeneidade e estabilidade na formulação. Por isso, em 2011 Venturini e colaboradores estabeleceram a proporção ideal de SM, óleo e PCL (1: 4,1: 2,6 p/p) capaz de formar exclusivamente LNCs, ou seja, sem a contaminação por nanoesferas e nanogotículas, mantendo o tamanho das partículas em escala nanométrica.

O tamanho das partículas é apenas um dos aspectos a ser considerado quando da aplicação biológica desses sistemas nanoestruturados. A forma, a carga, hidrofobicidade e química de superfície também afetarão as respostas biológicas (BLANCO, SHEN, FERRARI, 2015).

Neste contexto, Bender e colaboradores (2012) alteram a estrutura primária das LNCs pela adição de um tensoativo aniônico, lecitina de soja (Lipoid[®] S75), com posterior revestimento com um polímero catiônico, a quitosana, visando investigar a hematocompatibilidade de tais estruturas (com e sem revestimento com quitosana). Os resultados apontaram que ambas as formulações não afetavam a coagulação, não provocavam hemólise e tinham pouca influência na agregação plaquetária.

Contudo, o resultado desse estudo foi além da investigação de uma possível aplicação intravenosa das nanocápsulas. Esse estudo permitiu o desenvolvimento de uma partícula multiparede, baseada em uma estratégia de camada por camada (*layer-by-layer*) devido às interações eletrostáticas entre a lecitina e quitosana (grupos amônios presente na quitosana [+]) e grupo fosfato oriundos de impurezas presentes

no Lipoid [-]), além de se manter estável pela presença do polissorbato 80 (POHLMANN et al. 2013, BENDER et al. 2012).

Fiel e colaboradores (2013) propuseram, que nas LNCs, o polissorbato 80 encontra-se na interface partícula água na forma de micelas que promovem a estabilidade da partícula por impedimento estérico. No trabalho de Cé e colaboradores (2016), foi verificado por fotomicrografia eletrônica de transmissão a existência de tais micelas de tensoativo na interface da partícula contendo polissorbato 80 e lecitina, formando uma corona hidrofílica.

Além do desenvolvimento da LNC e elucidação da sua estrutura supramolecular, o nosso grupo de pesquisa desenvolveu micropartículas de quitosana complexadas com íons metálicos (ferro e zinco), visando uma possível aplicação desse sistema para a remoção do antibiótico ciprofloxacino de águas residuais hospitalares e do trato gastrointestinal como estratégia para evitar a resistência a antibióticos. A complexação quitosana-metal nesse sistema dá-se via interação do metal com o par de elétrons livre da amina, presente no polímero, enquanto que o fármaco se liga a partícula por coordenação ao metal (REYNAUD et al. 2011).

Diante dessas observações, surgiu a hipótese de que as LNCs contendo lecitina e revestidas com quitosana poderiam ser complexadas com íons metálicos e posteriormente combinadas com diferentes componentes (que possuam heteroátomos em suas moléculas), a fim de promover a funcionalização de superfície. Tal hipótese foi verificada no trabalho de Bender e colaboradores (2014), os quais utilizaram-se das nanocápsulas multiparede complexadas com íon metálico zinco (Zn^{2+}) e ferro (Fe^{2+}) para a obtenção de uma partícula funcionalizada com o aminoácido fenilalanina (ligante modelo) e com fragmentos do anticorpo scFv anti-LDL(-).

As formulações funcionalizadas com scFv anti-LDL(-) foram testadas quanto à peroxidação lipídica, devido à presença de metais, os quais poderiam contribuir para o estresse oxidativo, uma vez que, o aumento da peroxidação lipídica inviabilizaria a sua aplicação biomédica. Também foi analisado o reconhecimento molecular, uma vez que o reconhecimento específico antígeno-anticorpo pode ser afetado caso os sítios ativos estejam participando das interações anticorpo-partícula. Os resultados obtidos demonstram que a peroxidação lipídica diminui quando os metais estão complexados a partícula e, além disso, o fragmento de anticorpo ligado à partícula

mantém a sua capacidade de reconhecer e reagir com a lipoproteína eletronegativa de baixa densidade [LDL (-)] (BENDER et al. 2014).

Cavalcanti e colaboradores (2016) demonstraram que as partículas multiparede complexadas com zinco e funcionalizadas com scFv anti-LDL(-) não apresentam citotoxicidade para as linhagens de macrófagos (RAW 243.7) e células umbilicais humanas (HUVEC) e ainda promovem a inibição de efeitos pró-inflamatórios, além de reduzir as lesões ateroscleróticas em ratos.

Frente a esses resultados e à alta reatividade do complexo partícula-metal, o sistema pode servir como base para a obtenção de partículas com superfície funcionalizadas (BENDER et al., 2014). Levando isso em consideração, Mayer e colaboradores (2015) desenvolveram uma nanocápsula de núcleo lipídico multiparede complexada com ferro (MLNC) e funcionalizada com a enzima laronidase na tentativa de obter um tratamento eficaz para a doença genética mucopolissacaridose I. A referida formulação não apresentou citotoxicidade para fibroblastos isolados de pacientes com a doença e ainda promoveu aumento na atividade enzimática quando comparada à enzima comercial em solução, aliado à melhora de parâmetros farmacocinéticos (biodistribuição e *clearance*).

Em outro trabalho, visando atingir atividade antiproliferativa, as MLNC foram conjugadas com a enzima bromelina (Bro-MLNC-Zn) e submetidas à análise de citotoxicidade em células de câncer de mama (MCF-7). O sistema funcionalizado com bromelina apresentou-se eficaz na redução de viabilidade celular. Quando comparado com a solução de bromelina, o mesmo efeito foi atingido em uma dose 160 vezes menor. O estudo também propôs uma nova estratégia para a elucidação da arquitetura supramolecular, baseado na utilização de sondas fluorescentes de diferentes colorações, localizados no núcleo (TCM), na parede polimérica composta por PCL e a parede de quitosana e a observação da emissão de fluorescência. A comprovação da estrutura supramolecular das LNC se deu pela colocação de fluorescência dessas sondas com formação de cores secundária da luz (para mais detalhes ver OLIVEIRA et al. 2017) sob o microscópio confocal de fluorescência. Adicionalmente, foi verificado por espectroscopia no infravermelho (FT-IR) que a interação Zn^{+2} e quitosana, ocorre pela ligação do Zn^{+2} ao nitrogênio e um quelato com carbonila e a hidroxila do ligante (BENDER, et al. 2014).

A funcionalização de superfície com moléculas que são capazes de reconhecer receptores celulares superexpressos em células cancerígenas também vêm sendo

investigada pelo nosso grupo como alternativa para o tratamento dessa doença. Por isso, Oliveira e colaboradores. (2018) desenvolveram MLNC contendo o fármaco metotrexato ou seu éster dietil na superfície da partícula, tendo como o objetivo o reconhecimento de receptores de ácido fólico presentes nas membranas celulares das células de câncer de mama (MCF-7). Aliado à funcionalização em uma das partículas testadas havia metotrexato encapsulado, demonstrando a versatilidade do sistema. No entanto, a funcionalização mostrou-se fundamental para a atividade antiproliferativa em células MCF-7 e atuou de forma seletiva, posto que a viabilidade celular da linhagem de células normais (queratinócitos humanos imortalizados – HaCat) não foi afetada (OLIVEIRA et al. 2018).

A mesma estratégia foi aplicada no estudo de Antonow e colaboradores (2018) (encapsulação de fármaco /funcionalização das MLNCs). Contudo, o fármaco encapsulado foi a doxorrubicina, enquanto que a funcionalização foi realizada com o tripeptídeo RGD com a finalidade de direcionamento para células com alta expressão de integrinas $\alpha v\beta 3$ e posterior ação antiproliferativa devido aos efeitos do fármaco. Os resultados obtidos demonstram que a formulação é eficaz na entrega e no desempenho citotóxico. Levando em consideração que as integrinas $\alpha v\beta 3$ estão relacionadas a processos angiogênicos essas partículas também podem ser exploradas quanto ao seu potencial na redução e a formação de vasos e assim restringir a nutrição tumoral.

Apesar da estrutura básica das LNCs ser definida como núcleo oleoso, envolto por polímero e estabilizada por tensoativos, e essa revisão ter focado na combinação tradicional de matérias-primas, vários outros óleos, além do TCM já foram testados, como o exemplo citado anteriormente do alfa-bisabolol (item 3.3.1.3.1.). Outros polímeros também foram utilizados para compor a parede polimérica, obtendo-se resultados satisfatórios (BIANCHIN et al. 2015). Além disso, diversos fármacos, entre hidrofílicos e hidrofóbicos, e substâncias ativas foram submetidos à encapsulação nas LNCs (OLIVEIRA et al. 2013), sendo esses testados como potenciais tratamentos para diferentes doenças e como estruturas capazes de melhorar parâmetros de físico-químicos e farmacológicos, demonstrando assim, a versatilidade do sistema.

3.4. Modelo *in vivo* para testes de angiogênese: Ensaio em membrana corioalantoide (CAM do inglês *choriollantoic membrane*)

Como já relatado anteriormente, a formação de novos vasos sanguíneos é essencial para a nutrição, manutenção e desenvolvimento tumoral (LIU et al. 2010). Contudo, a angiogênese é um processo complexo que envolve não apenas as células endoteliais, mas também células de suporte (células musculares lisas, por exemplo) e a matriz extracelular, assim os métodos *in vitro* não são capazes de mimetizar completamente esse sistema (STATON et al. 2004, TAHERGORABI, KHAZAEI, 2012).

Dessa forma, o ensaio CAM vem sendo explorado como uma alternativa de teste *in vivo* para avaliar os processos angiogênicos e antiangiogênicos estimulados por diversas substâncias (BROOKS, 1994b, KRENN, PAPER, 2009, LIU et al. 2010), uma vez que, a membrana corioalantoide é altamente vascularizada e todos os componentes relacionados à formação de novos vasos sanguíneos estão presentes. Além disso, o CAM é um teste rápido, simples, reprodutível e de baixo custo (RIBATTI, 2014, NOWAK-SLIWINSKA, SEGURA, IRUELA-ARISPE, 2014).

Quanto às questões éticas que envolvem o uso de animais em experimentos, o CAM é um teste não invasivo, onde as condições fisiológicas são mantidas e a ausência de inervação da membrana corioalantoide, aliada ao desenvolvimento incompleto das regiões cerebrais do embrião envolvidas na percepção de dor no período inicial de incubação, reduzem o sofrimento do animal (NOWAK-SLIWINSKA, SEGURA, IRUELA-ARISPE, 2014; RIBATTI, 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Matérias-primas

- Acetato de zinco (Sigma-Aldrich, EUA, cód. 383317);
- Acetona grau HPLC (Neon, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- Ácido Acético Glacial 99,8% (Neon, Brasil);
- Ácido cítrico monohidratado (Synth, Brasil, cód.A1027.01.AG);
- Ácido clorídrico P. A. 37% (Neon, Brasil);
- Ácido Trifluoroacético (Sigma-Aldrich, EUA, cód. T6508);
- Água ultrapura (resistividade de 18,2 M Ω);
- Alfa-bisabolol (Fagron, Brasil, cód. 50763);
- Arginina-Glicina-Ácido aspártico ((ARG-GLY-ASP) (RGD)) (Sigma-Aldrich, Suíça, cód. A8052);
- Cloreto de Sódio (Nuclear, Brasil);
- Cloridrato de Doxorrubicina (Sigma-Aldrich, Índia, cód. D1515);
- Etanol grau HPLC (Panreac, EUA);
- Kit de quantificação de proteínas (BCA Assay Kit) (Sigma-Aldrich, EUA, cód. OPBCA-1KT);
- Fosfatidilcolina de soja Lipoid S75 (Lipoid, Alemanha);
- Monoesterato de sorbitano – (Span 60) (Sigma-Aldrich, Alemanha, cód. S7010);
- Monolaurato de oioxietenosorbitano – Polissorbato 80 (Tween 80) (Sigma-Aldrich, EUA, código. 1754);
- Poli(ϵ -caprolactona) (massa molar média numérica (Mn) 80.000 g mol⁻¹, Sigma-Aldrich, EUA, cód. 440744);
- Poli(ϵ -caprolactona) (massa molar média numérica (Mn) 10.000 g mol⁻¹, Sigma-Aldrich, Japão, cód. 440752);
- Quitosana de baixo peso molecular (Sigma-Aldrich, Islândia, cód. 448869);
- Trietilamina P.S (Tedia, cód. TR1867-002);
- Triglicerídeo dos ácidos cáprico/caprílico (Delaware, Brasil);

- Temozolomida (Sigma-Aldrich, Estados Unidos, cód. T2577)
- Meio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco – DMEM (Gibco, América do Sul)
- Soro fetal bovino (Gibco, América do Sul)
- Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium) – MTT (Sigma Aldrich, Estados Unidos)

4.2. Equipamentos

- Agitador magnético (Fisaton, modelo 725A, Brasil)
- Autoclave (Phoenix, modelo AB12, Brasil)
- Balança analítica (Shimadzu corporation, modelo AUW220D, Japão)
- Câmara climática (Nova Ética, modelo 420-CLD, Brasil)
- Câmera fotográfica (Cyber-Shot Sony 14.1 megapixels)
- Centrífuga (Sigma, modelo 1-14, Alemanha)
- Cromatógrafo de alta eficiência (Schimadzu corporation, Japão) composto por bomba LC-20AT, injetor SIL-20AHT, detector SPD-20A, controlador CBM-20A, válvula LPGE Kit, desgaseificador DGU-20A5R.
- Infravermelho IRPrestige-21 (Shimadzu corporation, Japão).
- Leitor de placas (Spectramax, Molecular Devices, EUA)
- Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido).
- Microscópio óptico de luz polarizada (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Japão)
- NanoSight LM10 (NanoSight Ltd, Reino Unido).
- Potenciômetro (UB-10 Denver, EUA)
- Prensa hidráulica (Carver Laboratory Press, modelo C, EUA).
- Rotaevaporador (Büchi, modelo R-114, Brasil).
- ZetaSizer® Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido)
- Vórtex Cerotomat® MV (Braun Biotech Internation, Alemanha)
- Incubadora (Thermo Scientific , modelo: Forma Series 3 Water Jacket CO2 Incubator, Estados Unidos)

4.3. Métodos

4.3.1. Formulações desenvolvidas

Para melhor compreensão, a seguir serão discriminadas as formulações desenvolvidas (Tabela 1) e suas respectivas composições.

Tabela 1: Formulações desenvolvidas

Formulação/ composição	Núcleo	Reves. c/ quitosana	DOX	Func. c/ RGD
MLNC-	TCC	-	-	-
MLNC+	TCC	X	-	-
AB-MLNC-	AB	-	-	-
AB-MLNC+	AB	X	-	-
AB-MLNC-RGD	AB	X	-	X
AB-DOX-MLNC-	AB	-	X	-
AB-DOX-MLNC+	AB	X	X	-
AB-DOX-MLNC-RGD	AB	X	X	X

TCC: triglicerídeos de cadeia média; AB: alfa-bisabolol; DOX: doxorubicina; RGD: tripeptídeo.

4.3.2. Preparação das nanocápsulas de núcleo lipídico

As nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al. 1989), adaptando metodologias descritas anteriormente (TERROSO et al., 2010, ANTONOW et al., 2016; CALGAROTO et al., 2018) (Figura 5). Dessa forma, 0,1 g da mistura de poli(ϵ -caprolactona) (Mn 10 kg/mol) e de poli(ϵ -caprolactona) (Mn 80 Kg/mol) na proporção 1:9 (m/m) foram dispersos em 25 mL de acetona a 40 °C. A mistura (fase orgânica I; FO-I) foi mantida sob agitação magnética por 1 hora. Após, foi adicionada à FO-I, uma solução contendo 0,04 g de monoesterato de sorbitano e 0,16 g de alfa-bisabolol em 3 mL de etanol (fase orgânica II; FO-II). A mistura foi agitada por 30 minutos na temperatura de 40 °C. Decorrido esse tempo, adicionou-se, à mistura, 0,09 g de Lipoid® S75 dissolvido em 4 mL de etanol (fase orgânica III; FO-III). Após 20 minutos, a fase orgânica final (FO-I + FO-II

+ FO-III) foi injetada, com auxílio de funil, na solução aquosa constituída por 0,08 g de polissorbato 80 e 50 mL de água ultrapura (fase aquosa; FA) sob agitação magnética moderada na temperatura de 40 °C. Após 10 minutos, o solvente orgânico e parte da água foram removidos em evaporador rotativo sob pressão reduzida na temperatura de, no máximo, 40 °C até um volume aproximado de 9 mL. A dispersão foi transferida para balão volumétrico, sendo o volume ajustado para 10 mL com água ultrapura.

Nas formulações contendo o quimioterápico, 1 mg de cloridrato de doxorrubina (DOX.HCl) foi solubilizado em etanol. À solução adicionou-se 14,5 µL de trietilamina (TEA). A mistura foi adicionada à FO-II. Seguindo-se o protocolo acima, a FO-II contendo DOX foi adicionada à FO-I, cuja mistura foi adicionada de FO-III, sendo, então, a fase orgânica final injetada na FA com posterior evaporação e ajuste de volume para 10 mL. As formulações obtidas nessa etapa foram denominadas: AB-MLNC- e AB-DOX-MLNC- (contendo o fármaco doxorrubina).

Para fins de comparação, na etapa de estudos de pré-formulação foram preparadas formulações sem fármaco e contendo triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) (MLNC-) no lugar de alfa-bisabolol.

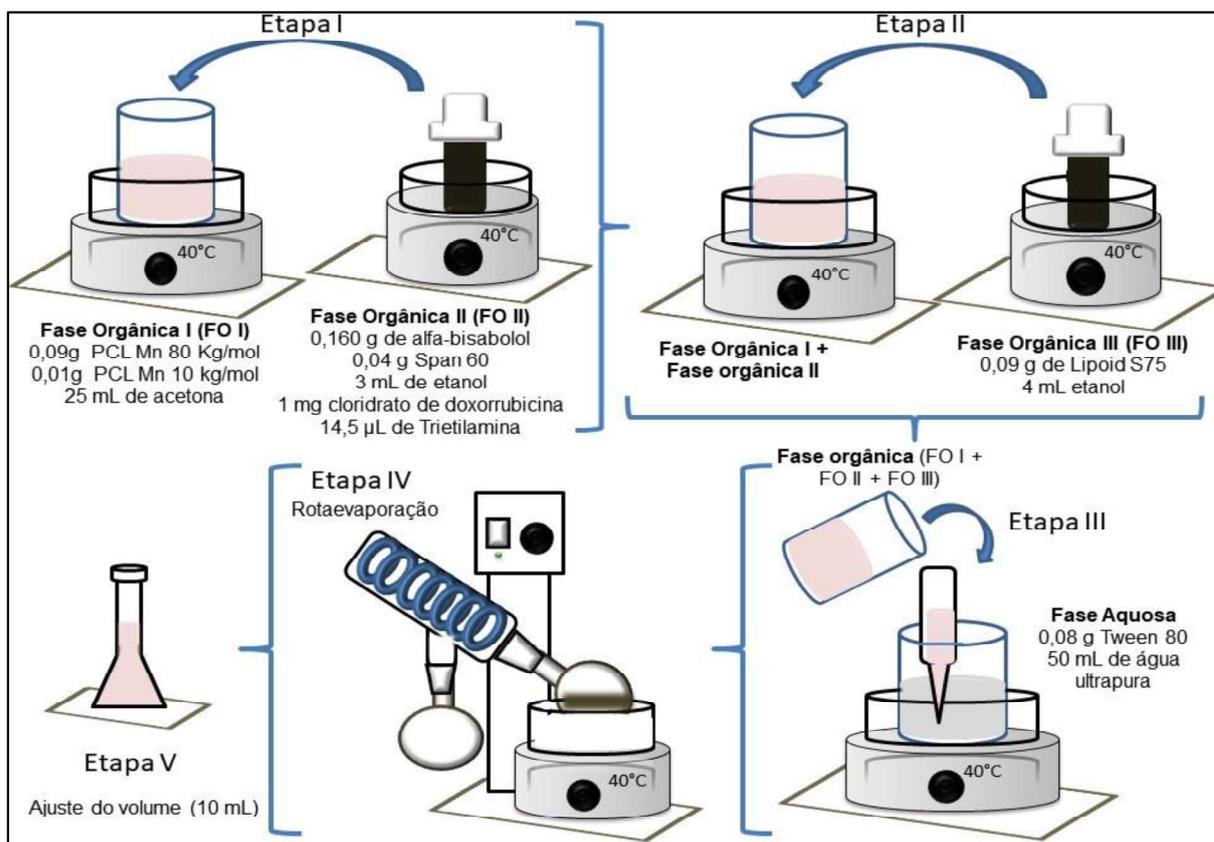


Figura 5: Etapas de preparo das LNCs.
 Fonte: do autor, 2019.

4.3.3. Solubilização da quitosana

Três diferentes soluções de quitosana foram preparadas empregando-se os ácidos: I. ácido acético, II. ácido cítrico, III. ácido clorídrico. Empregando-se o ácido acético, 0,07 g de quitosana foram solubilizados em 9,90 mL de água ultrapura contendo 100 µL de ácido. A solução foi homogeneizada em vórtex por 10 minutos.

Foram pesados 0,1114g de ácido cítrico e adicionados a 8 mL de água ultrapura. Após completa solubilização foram adicionados 0,07 g de quitosana e o volume ajustado para 10 mL. A solução também foi levada ao vórtex por 10 minutos.

A mesma massa de quitosana foi pesada para preparar a solução contendo ácido clorídrico. À quitosana foram adicionados 9,95 mL de água destilada e 50 µL de ácido clorídrico, mantendo em agitação por 10 minutos.

4.3.4. Revestimento com quitosana

As formulações obtidas de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.2. foram revestidas com as diferentes soluções de quitosana preparadas anteriormente. Antes da adição das soluções às formulações, estas foram filtradas (membrana filtrante com poro de 0,45 µm, Nylon, Millipore®). Após, 1 mL da solução de quitosana foi adicionado lentamente, gota a gota, à 9 mL da dispersão de nanocápsulas, permanecendo sob agitação magnética por 2 horas (ADORNE, 2014; BENDER et al. 2012, ANTONOW et al. 2016).

As formulações revestidas com a solução de quitosana acidificada com ácido acético foram denominadas: MLNC+ (núcleo com TCC), AB-MLNC+ (núcleo com alfa-bisabolol) e AB-DOX-MLNC+ (combinação de alfa-bisabolol e doxorrubicina).

4.3.5. Complexação do íon metálico (Zn²⁺) às MLNCs

Preparou-se uma solução aquosa de acetato de zinco com concentração final de 1 mg/mL. Sob agitação magnética, 25 µL da solução de acetato de zinco foram adicionados em 975 µL das formulações revestidas com quitosana (solubilizada com ácido acético), formando assim as nanocápsulas multiparede complexadas com metal (ADORNE, 2014; BENDER et al. 2012, ANTONOW, 2016).

4.3.6. Ligação do tripeptídeo RGD à superfície das MLNCs

Uma solução aquosa de RGD com concentração final de 450 µg/mL foi previamente preparada (1 mL). Sob agitação magnética (500 rpm), 648,79 µL da solução de RGD foram adicionados a 351,21 µL da formulação descrita no item anterior. A agitação foi mantida por 10 minutos para completa homogeneização (ANTONOW, 2016). As suspensões funcionalizadas foram denominadas AB-MLNC-RGD e AB-DOX-MLNC-RGD, esta última contendo o fármaco doxorrubicina.

4.4. Caracterização físico-química

4.4.1. Determinação de diâmetros por Difração de Laser (LD, do inglês *laser diffraction*)

O diâmetro médio baseado no volume das partículas ($D[4,3]$) e a distribuição de tamanhos (polidispersão) foram analisados por difração de laser (Mattersizer 2000). Para efetuar as análises, as amostras foram inseridas diretamente na unidade de dispersão úmida (Hydra 2000SM, Malvern Instruments, Reino Unido) contendo entre 100 mL e 200 mL de água destilada (2000 rpm). As amostras foram adicionadas, sem preparação prévia, até atingir uma obscuração $\geq 2\%$. A polidispersão foi avaliada pelo valor de Span de acordo com a equação (1).

$$Span = \frac{D_{(0,9)} - D_{(0,1)}}{D_{(0,5)}} \quad (1)$$

onde $D_{(0,9)}$, $D_{(0,1)}$ e $D_{(0,5)}$ são os diâmetros de partícula a 90 %, 10 %, 50 % da curva de distribuição de diâmetros cumulativos com base no volume da esfera equivalente. Foi utilizado o índice de refração (IR) de 1,450 para as partículas não revestidas com quitosana e IR de 1,345 para aquelas formulações revestidas com quitosana, enquanto que o IR do meio dispersante foi mantido em 1,33 (água) em todas as análises. As análises foram realizadas em triplicata de lote.

4.4.2. Determinação de diâmetro por Espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*)

O diâmetro médio hidrodinâmico das partículas (*Z-average diameter*), assim como o índice de polidispersão (variância relativa) foram avaliados pela técnica de

espalhamento de luz dinâmico, a qual é baseada na intensidade da luz espalhada por partículas que estão em movimento Browniano, de acordo com a equação de *Stoken-Einstein* (equação 2):

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2)$$

onde d_h é o diâmetro hidrodinâmico, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade e D é o coeficiente de difusão translacional.

Esses parâmetros foram determinados no equipamento ZetaSizer Nano ZS, após preparação prévia da amostra. Para isso, 20 μ L da formulação foram diluídos em 10 mL de água ultrapura previamente filtrada (membrana filtrante com poro de 0,45 μ m, PVDF, Millipore®). As análises foram realizadas a 25 °C, em modo de varredura automático e o espalhamento de luz foi detectado em ângulo de 173 °. As análises foram realizadas em triplicata de lote.

4.4.3. Análise por rastreamento de nanopartículas (NTA, do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*)

A análise de rastreamento de partículas foi realizada no equipamento NanoSight LM10. Essa análise também segue o princípio de espalhamento de luz por partículas que estão em movimento Browniano. Contudo, a câmera (CCD) acoplada permite a visualização e captura do movimento das partículas em vídeo que é analisado pelo software NTA 3.2 Dev Build 3.2.16, gerando além dos dados relativos ao tamanho, a densidade de partículas (partículas/mL).

Para efetuar as análises, as amostras foram diluídas (1:10000 v/v) em água ultrapura previamente filtrada (membrana filtrante com poro de 0,45 μ m, PVDF, Milipore®) e inseridas na câmara porta-amostra com auxílio de uma seringa. Seis vídeos de 10 segundos foram obtidos para cada amostra (em triplicata de lote), utilizando-se obturador e ajustes de ganho manuais (CG 4, CL 11-14). As análises foram realizadas em temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicata de lote.

Após a obtenção das concentrações de partículas por mL pela análise de NTA, estas foram convertidas para concentração em micromolar por litro usando o número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$) (ANTONOW et al. 2018).

4.4.4. Determinação do Potencial zeta

O potencial zeta das suspensões foi determinado pela mobilidade eletroforética das partículas no equipamento ZetaSizer Nano ZS. Em balão volumétrico foram adicionados 20 μL da formulação completando-se o volume para 10 mL com a solução de NaCl 10 mmol L^{-1} previamente filtrada em membrana de PVDF com 0,45 μm de poro (Merck Milipore®). As leituras foram efetuadas a 25 °C. As análises foram realizadas em triplicata de lote.

4.4.5. Determinação do pH

Os valores de pH das suspensões foram determinados na temperatura ambiente, em potenciômetro anteriormente calibrado com soluções-tampão pH 4,0 e 7,0, sem preparação prévia das amostras. Devido ao pequeno volume de formulação obtido após a funcionalização, tais amostras foram submetidas à análise do potencial de hidrogênio com auxílio de fitas indicadoras de pH (Merck Millipore®, Alemanha).

4.4.6. Eficiência de ligação do RGD à superfície das nanocápsulas

A eficiência de ligação do tripeptídeo às nanocápsulas foi avaliada por teste colorimétrico com o kit BCA, seguindo as especificações do fabricante. O teste baseia-se na reação dos grupamentos amina presentes nos aminoácidos com íons de cobre, reduzindo-os (Cu^{2+} para Cu^{1+}) quando em meio alcalino. A quantidade de tripeptídeo pode ser considerada proporcional à redução dos íons cobre. Para facilitar a detecção desse processo, o ácido bicinconínico é adicionado na reação formando um complexo de coloração roxa, o qual pode ser mensurado por espectroscopia no ultravioleta (SIGMA-ALDRICH, 2011).

Neste contexto, foram preparadas curvas-padrões com RGD com concentrações entre 3 e 27 $\mu\text{g/mL}$. Para determinação do teor de RGD foram

analisadas três soluções-mãe com concentração teórica de 450 µg/mL antes das mesmas serem utilizadas para a funcionalização.

Posteriormente, 400 µL da formulação funcionalizada com RGD foram adicionados em dispositivo de filtração de 30 kDa (Merck Millipore). Este foi submetido à centrifugação a 1840 xg por 5 minutos (ADORNE, 2014). Após, o ultrafiltrado foi recolhido e utilizado para a quantificação de RGD, para tanto foi realizada reação de colorimétrica com o kit BCA e leitura de absorbância em comprimento de onda de 562 nm no equipamento leitor de placa Spectramax, as absorbâncias foram empregadas na curva de calibração para quantificação do RGD. A eficiência de ligação às nanocápsulas foi obtida após a aplicação da equação (3). As análises foram realizadas em triplicata de lote.

$$\%EL = \frac{C_t - C_f}{C_t} \times 100 \quad (3)$$

onde %EL é a eficiência de ligação, C_t é a concentração total do peptídeo na formulação, C_f é a concentração do peptídeo dissolvido na fase contínua (baseado em OLIVEIRA et al. 2013).

4.4.7. Doseamento do alfa-bisabolol

O teor de alfa-bisabolol nas formulações foi quantificado a partir do método cromatográfico proposto por Terroso (2010), com modificações. Para a validação parcial deste método foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade (10-50 µg/mL), precisão e exatidão (ANVISA, 2017).

Utilizou-se pré-coluna Cartridges C18 (4,0 x 3,0 mm, Phenomenex); coluna C 18, Luna 5µ, Phenomenex (150 x 4,60 mm) em cromatógrafo líquido de alta eficiência. Foi utilizada acetonitrila:água (85:15) como fase móvel, seguindo as seguintes condições cromatográficas: comprimento de onda de detecção 207 nm, vazão de 1mL/min; 40 µL de volume de injeção e 8 minutos de tempo de corrida.

Para análise do teor, 20 µL da formulação foram adicionados em acetonitrila (q.s.p 10 mL). Posteriormente, a mistura foi homogeneizada em agitador magnético por 10 minutos. Ao término desse período, a solução foi filtrada em unidade filtrante de 0,45 µm, PVDF, (Merck Millipore®) e submetida à análise.

4.4.8. Eficiência de Encapsulação do alfa-bisabolol

A eficiência de encapsulação foi determinada por ultrafiltração-centrifugação de acordo com a descrição de D'Almeida e colaboradores (2017). Dessa forma, 400 μ L de formulação contendo alfa-bisabolol foram dispostos em dispositivos para ultrafiltração, (10 kDa; Merck Millipore) e submetidos à centrifugação à 13500 \times g durante 10 minutos. O ultrafiltrado obtido foi analisado, sem prévia diluição, por cromatografia líquida de acordo com as condições descritas no item anterior. A eficiência de encapsulação foi determinada segundo equação (4)

$$\%EE = \frac{C_t - C_f}{C_t} \times 100 \quad (4)$$

onde %EE é a eficiência de encapsulação, C_t é a concentração total do fármaco na formulação, C_f é a concentração do fármaco dissolvido na fase contínua (OLIVEIRA et al. 2013).

4.4.9. Doseamento da doxorrubicina nas formulações

O teor de doxorrubicina foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência baseando-se no método validado por Antonow (2016). Assim, foram preparadas três curvas padrão (0,5 a 15 μ g/mL) a partir de solução-mãe contendo 0,213 mg de DOX-HCl em 10 mL de água ultrapura. A especificidade foi comprovada pela análise de uma formulação contendo alfa-bisabolol e na ausência de DOX-HCL.

Utilizou-se pré-coluna Cartridges C18 (4,0 x 3,0 mm, Phenomenex) e coluna RP-18 μ m ODS2 Waters, Spherisorb[®] (150 mm x 4,6 mm x 5). Como fase móvel foi empregada a solução de água:acetonitrila na proporção 1:1 (v/v), acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) até atingir o pH de 2,65.

As seguintes condições cromatográficas foram utilizadas: comprimento de onda de detecção de 254 nm, vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 50 μ L, tempo de corrida de 10 minutos. Para a quantificação do fármaco, 500 μ L das formulações contendo doxorrubicina foram homogeneizados com fase móvel (q.s.p 5 mL) por 15 minutos, em agitador magnético, sendo essa solução posteriormente filtrada em unidade filtrante de 0,45 μ m, PVDF, (Merck Millipore[®]) e submetida à análise (MASSIRLIS et al. 2006, ANTONOW, 2016).

4.4.10. Eficiência de encapsulação da doxorrubicina

A eficiência de encapsulação foi determinada por ultrafiltração-centrifugação a 1844 *xg* por 15 minutos usando dispositivo de ultrafiltração de 10 kDa (Merck Millipore). A concentração de doxorrubicina não associada foi determinada no ultrafiltrado e a eficiência de encapsulação foi calculada a partir da equação (4) (ANTONOW, 2016).

4.4.11. Investigação da presença de cristais nas formulações contendo doxorrubicina por técnicas combinadas de rastreamento de nanopartículas e microscopia de luz polarizada

A investigação da presença de cristais nas formulações contendo o fármaco foi realizada por meio de microscopia de luz polarizada. Uma gota da formulação foi depositada em lâmina de microscopia, coberta por lamínula, levada ao microscópio de luz polarizada e observada em aumento de 100x quanto à presença de estruturas com birrefringência.

Além disso, os gráficos 2D de intensidade de espalhamento de luz *versus* distribuição de tamanho de partícula obtidos pela técnica de NTA (item 4.4.3.) foram analisados de acordo com a metodologia descrita por Jornada e colaboradores (2012). Resumidamente, os gráficos referentes às formulações sem o fármaco e com a doxorrubicina foram comparados delimitando as regiões máximas dos pontos de dispersão (eixos *x* e *y*). Quando cristais estão presentes nas formulações, a intensidade de dispersão varia (aumenta).

4.4.12. Análise por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Visando compreender as interações entre os constituintes das nanocápsulas, as formulações, assim como algumas matérias-primas em solução, foram submetidas à análise pela técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).

Para a análise foram preparadas pastilhas de Brometo de Potássio (KBr) com auxílio de prensa hidráulica, aplicando pressão de aproximadamente 29 Kpa.

Posteriormente, 10 a 20 μL das amostras foram adicionadas às pastilhas, sendo estas mantidas a temperatura ambiente para secagem. Após, as mesmas foram acondicionadas em porta amostra e submetidas à varredura na região de 4000 a 400 cm^{-1} , em equipamento modelo IRPrestige-21 (Shimadzu), com resolução de 4.0 cm^{-1} , e velocidade de 32 *scans*. Os espectros foram obtidos no modo transmitância e o *background* (branco) foi realizado com pastilha de KBr sem a presença da amostra. Os espectros obtidos foram normalizados e analisados no software Origin®, após transformações matemáticas para melhor identificação das bandas.

4.5. Avaliação biológica

4.5.1. Cultivo Celular

As células de glioblastoma humano, linhagem U87-MG, foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA) e cultivadas em meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), pH 7,4, contendo antibióticos penicilina/estreptomicina 0,5 U/ml, e suplementadas com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em incubadora a 37 °C, com 95 % de umidade relativa e 5 % de CO_2 .

4.5.2. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT após 24 h de exposição aos tratamentos e controles. Dessa forma, 5000 células foram dispostas em placas de 96 poços e mantidas na incubadora até total aderência (24h). Posteriormente, foram aplicados os tratamentos: I. AB-DOX-MLNC-RGD (0,5 a 5,0 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicina na formulação), II. Temozolomida (100 a 500 $\mu\text{mol/L}$), os controles utilizados foram os veículos água ultrapura e dimetilsulfóxido (DMSO), além do controle negativo, o qual não recebeu nenhum tratamento. As placas foram novamente incubadas até completar o tempo de tratamento.

Decorrido esse tempo, o meio de cultivo foi removido e as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS, 100 μL por poço), o tampão foi retirado e essa etapa repetida mais uma vez. Após, adicionou-se novamente meio de cultivo (90 μL por

poço) e 10 µL de MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium)) na concentração de 5 mg/mL. Feito isso, a placa foi incubada por 2 h a 37 °C.

Ao término desse período, a solução foi removida e os cristais de formazam originados pelo metabolismo celular foram dissolvidos com DMSO (100 µL por poço). A absorbância foi obtida nos comprimentos de onda de 570 e 630 nm em leitor de placas.

As análises dos resultados foram realizadas pela subtração da absorbância obtida no comprimento de onda de 570 nm daquelas obtidas no comprimento de onda de 630 nm. A absorbância final do controle negativo foi considerada como 100% de viabilidade e as absorbâncias dos tratamentos foram comparadas em relação ao controle. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes (n=3).

4.5.3. Ensaio em membrana corioalantoide de embrião de *Gallus gallus*

O ensaio em membrana corioalantoide foi utilizado para avaliar a capacidade antiangiogênica das formulações e foi previamente aprovado em Comitê de Ética no Uso de Animais sob o protocolo nº 33993 (anexo 9.1). Dessa forma, 49 ovos fertilizados de galinha (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758), pesando aproximadamente 65 g, foram divididos aleatoriamente em 10 grupos (n=4 ou 5) (controle negativo, três concentrações de cada uma das seguintes formulações (AB-MLNC+, AB-MLNC-RGD e AB-DOX-MLNC-RGD)).

Os ovos foram fornecidos pelo Aviário de Ensino e Pesquisa, do departamento de zoologia da UFRGS. Ao serem recebidos, esses foram higienizados com álcool 70 % (v/v). Posteriormente, foram incubados a 37 °C, com umidade relativa de 80 %, em câmara climática até o 6º dia de desenvolvimento.

Após esse período inicial de incubação, foi realizada uma pequena abertura na casca, junto à câmara de ar. Essa abertura possibilitou o acesso à membrana interna da casca, a qual foi cuidadosamente removida, possibilitando a visualização da membrana corioalantoide (Figura 6).

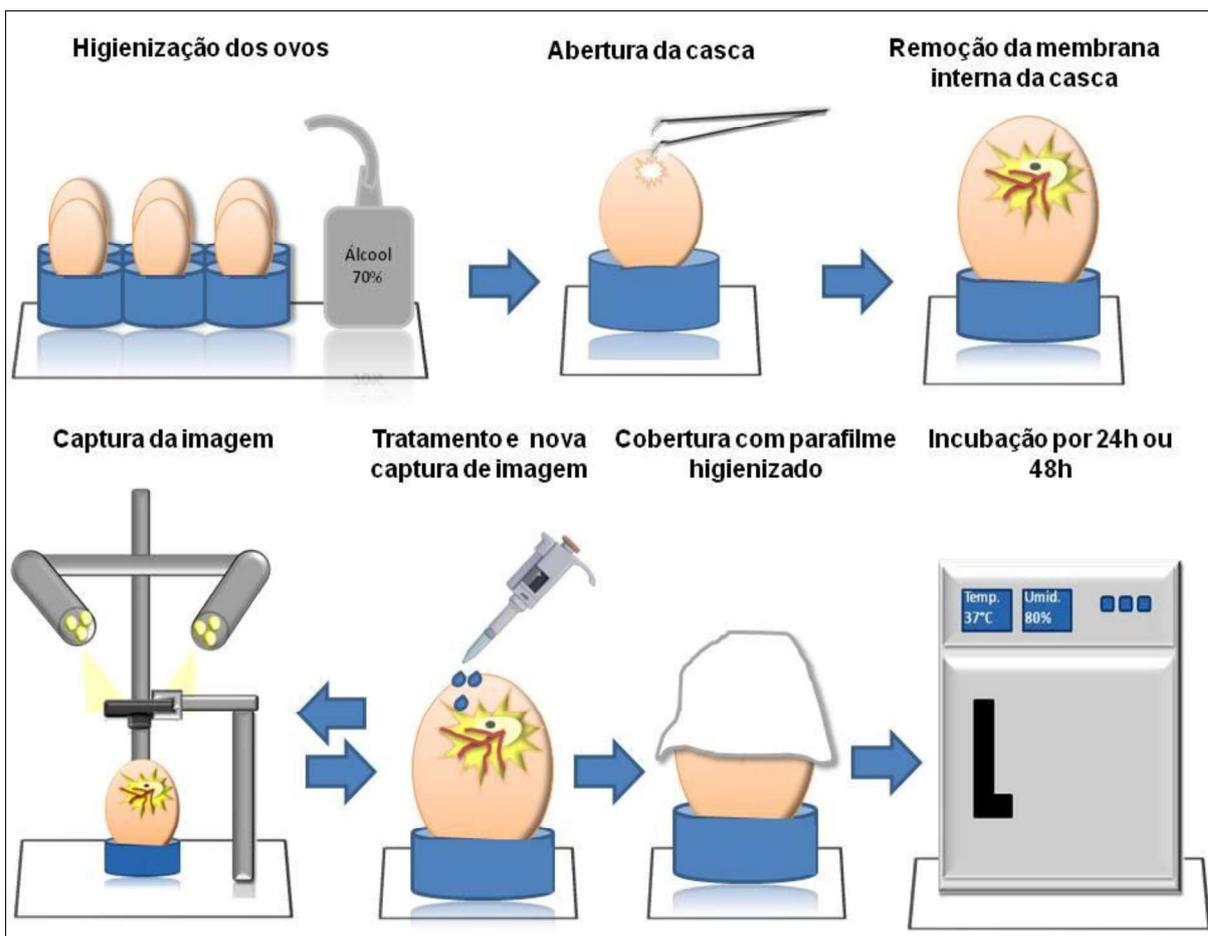


Figura 6: ensaio em membrana corioalantoide de ovo embrionado.
 Fonte: do autor, 2019.

Antes de receber qualquer tratamento, a membrana corioalantoide de cada ovo foi fotografada caracterizando o tempo inicial do ensaio (tempo 0 – T0). Passada essa etapa, as formulações ou a solução fisiológica (0,9% de NaCl (p/v)) foram aplicadas sobre a CAM (volume máximo aplicado 100 μ L). Os ovos, então, foram selados com parafilme higienizado (álcool 70%) a fim de diminuir a contaminação microbiana e evitar a desidratação do embrião. Após, foram incubados novamente até completar 24h de exposição. Ao término das 24h, retirou-se o parafilme e foi realizada uma nova captura de imagem, caracterizando o tempo 24h do tratamento (T24). Em seguida, os ovos foram selados e incubados até 48h onde o processo de captura de imagem foi repetido (tempo 48 – T48).

As imagens obtidas foram transformadas para escala de cinza, utilizando o software Adobe® Photoshop® CS2 versão 9.0 (<https://www.adobe.com>) a fim de aumentar o contraste entre as áreas com e sem vasos. Feito isso, as imagens foram submetidas à análise da média de pixels na escala cinza no software de domínio

público ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) (McKenzie et al., 2015). Para efetuar essa análise as imagens dos três tempos (0, 24 e 48 horas) foram dispostas lado a lado e para todas as imagens foram selecionadas áreas circulares de mesmo tamanho (282792 pixels²). Posteriormente foi acionada a função de análise (*analyze-mensure*) e a média de pixels na escala de cinza obtida para cada foto nos diferentes tempos de análise. Esse procedimento foi efetuado para os 4/5 ovos de cada grupo. Vale ressaltar que a escala de cinza varia de 0 a 255, sendo o 0 referente ao preto e 255 ao branco. Assim, quando há angiogênese o valor da média de pixels na escala cinza fica mais próximo a 0 e o contrário ocorre quando há inibição de crescimento, ou seja, os valores se aproximam de 255.

Ao término do experimento os ovos foram submetidos a resfriamento por no mínimo 24h. Passado esse período, os ovos foram macerados seguindo as normas descritas no “Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais do Conselho Federal de Medicina Veterinária” (CFMV, 2013), e descartados conforme as diretrizes de descarte de resíduo biológico preconizadas pela universidade e descritas no item 4.6.

4.6. Descarte de Resíduos

Os resíduos químicos gerados durante o desenvolvimento do trabalho foram separados, identificados de forma clara e completa, além de armazenados em frascos adequados para posterior disposição final. Foram utilizados frascos de armazenamento de 1 a 4 litros e com bocal largo, os quais foram preenchidos até 75% de sua capacidade. Os resíduos foram periodicamente recolhidos pela Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT) e estes foram enviados ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos (CGTRQ) do Instituto de Química da UFRGS.

Os resíduos biológicos também foram caracterizados, segregados e acondicionados em local adequado até o recolhimento e descarte final. Os resíduos foram dispostos, em sacos brancos leitosos, constituídos de material resistente à ruptura e vazamento, e identificados com o símbolo de risco biológico. Os mesmos foram mantidos sob refrigeração até o momento da coleta pela empresa terceirizada responsável.

4.7. Análise estatística

Os dados foram plotados em planilhas Excel (Microsoft®) e analisados em *GraphPad Prisma* versão 5.0. Foram utilizadas análises aplicando-se *one-way* ANOVA com pós-teste de *Tukey* para as análises físico-químicas, bem como as análises de MTT. As análises do modelo de membrana corioalantoide foram realizadas utilizando *Two-way* Anova aplicando-se pós-teste Bonferroni para múltiplas comparações.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das formulações de nanocápsulas

5.1.1. Difração de laser (LD), Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

As formulações foram preparadas por deposição interfacial de polímero pré-formado utilizando a combinação de matérias-primas e concentrações, descritas anteriormente por Terroso (2010) (alfa-bisabolol), Antonow (2016) (doxorubicina/RGD), e Calgaroto e colaboradores (2018) (mistura de PCL Mn 80 Kg/mol e PCL Mn 10 kg/mol, proporção 9:1 m/m). Por se tratar de uma nova formulação com proporções de matérias-primas ainda não empregadas em conjunto, optou-se por preparar, no primeiro momento, nanocápsulas com núcleo constituído de TCC e MS (MLNC), a fim de comparar suas características físico-químicas com aquelas que iríamos determinar para as formulações contendo alfa-bisabolol (AB-MLNC).

Dessa forma, ambas as formulações apresentaram-se macroscopicamente homogêneas, com coloração esbranquiçada e opalescente. O diâmetro médio ponderado por volume $D[4,3]$ variou entre 139 a 142 nm. A polidispersão de diâmetros (Span) permaneceu próximo a 1, demonstrando uma estreita faixa de distribuição de tamanhos para as formulações (Tabela 2). Após revestimento com quitosana, os diâmetros médios e polidispersão se mantiveram constantes, não sendo determinada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações (Tabela 2).

Tabela 2: Diâmetro médio ponderado por volume $D[4,3]$, SPAN, diâmetro hidrodinâmico médio (z-average, d_h) e índice de polidispersão das formulações MLNC e AB-MLNC ($n=3$).

Formulação	$D[4,3]$ (nm)	Span	d_h (nm)	PDI
MLNC-	139±4	1,00±0,08	136±3	0,114±0,02
MLNC+	138±6	1,19±0,06	137±3	0,153±0,01
AB-MLNC-	142±1	1,08±0,04	139±10	0,120±0,012
AB-MLNC+	141±1	1,15±0,006	146±4	0,170±0,004

Recentemente foi descrito por Bianchin e colaboradores (2015) que a técnica de difração de laser (dados plotados em gráficos radar) pode ser utilizada para determinar a impressão digital das suspensões de nanocápsulas em estudos de pré-formulação, permitindo a identificação rápida e inequívoca de sistemas altamente polidispersos, identificando agregados presentes na amostra. As formulações para aplicação em nanomedicina não devem, e muitas vezes não podem, formar agregados, primeiramente porque perde-se o controle de cedência do fármaco pela falta de estabilidade cinética do coloide, e, em segundo, porque podem ser planejadas para administração injetável. No caso de formação de agregados, os eixos 1 e 4, que correspondem aos dados de diâmetro médio ponderal por volume e diâmetro no percentil 90 da curva de distribuição por volume, teriam valores aumentados e os ângulos formados pelos eixos (8,1,2) e (3,4,5) diminuiriam de valores, tornando-se mais agudos quanto maior a presença de agregados de nanopartículas.

Dessa maneira, os valores de $D[4,3]$ por volume e por número, além dos diâmetros de partículas a 10%, 50% e 90% da curva de distribuição de tamanhos ($d_{(0,1)}$, $d_{(0,5)}$ e $d_{(0,9)}$, respectivamente) foram utilizados para plotar os gráficos radar (Figura 7) para todas as formulações. Os formatos dos gráficos obtidos demonstram estreita polidispersão, bem como, similaridade de perfis ($p > 0,05$) entre as formulações preparadas, indicando que a substituição do núcleo oleoso não afetou a distribuição de tamanho nem o diâmetro médio das nanocápsulas (Figura 7). Esses dados corroboram com aqueles encontrados no trabalho de Bianchin e colaboradores (2015), onde verificou-se que a troca do núcleo oleoso não afetou de forma significativa o sistema, fornecendo gráficos radar semelhantes para partículas com núcleo formado por TCC, óleo mineral, metoxicinamato de octila ou ácido oleico.

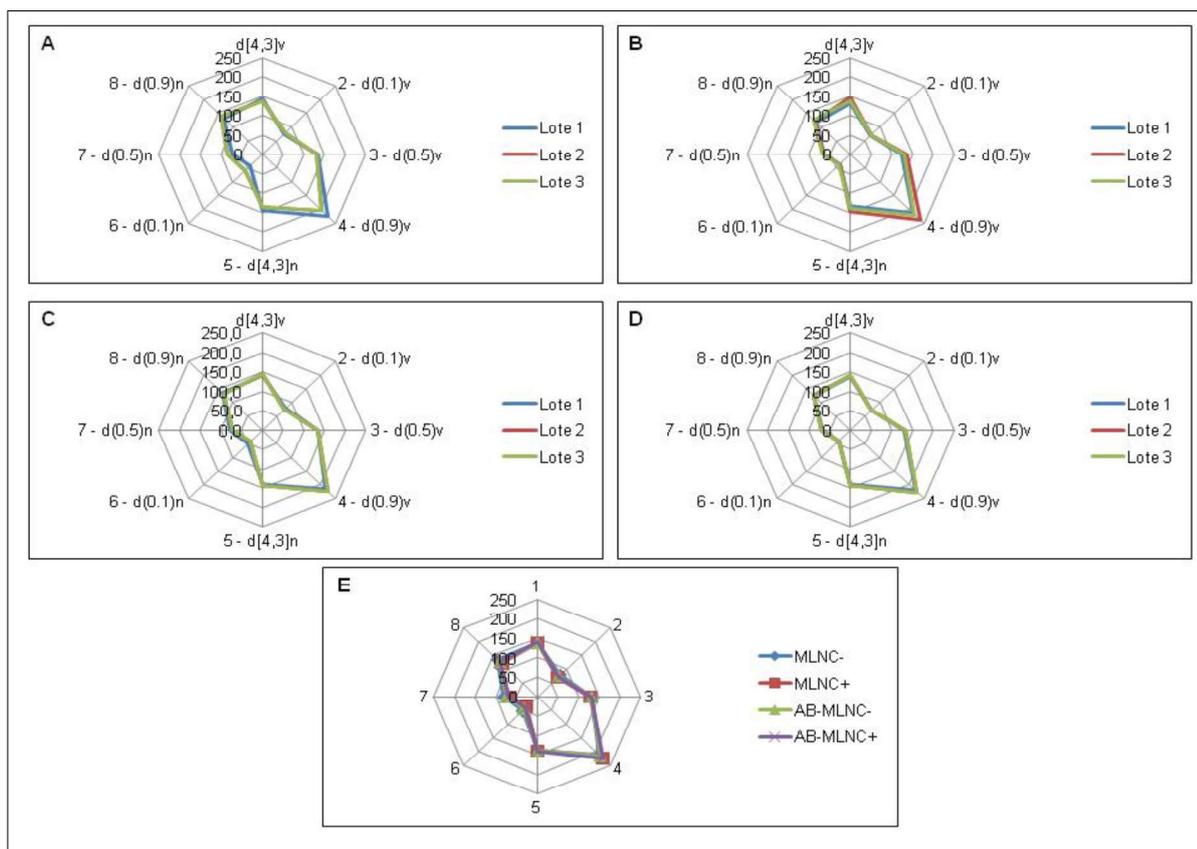


Figura 7: Gráficos radar para as formulações MLNC e AB-MLNC. Eixos: 1, diâmetro médio ponderado por volume de partículas, $D[4,3]_v$; 2, diâmetro no percentil 10 da curva de distribuição por volume, $d(0,1)_v$; 3, diâmetro no percentil 50 da curva de distribuição em volume, $d(0,5)_v$; 4, diâmetro no percentil 90 da curva de distribuição por volume, $d(0,9)_v$; 5, diâmetro médio ponderado por volume em número de partículas, $D[4,3]_n$; 6, diâmetro no percentil 10 da curva de distribuição em número $d(0,1)_n$; 7, o diâmetro no percentil 50 da curva de distribuição por número, $d(0,5)_n$ e 8, diâmetro no percentil 90 da curva de distribuição por número, $d(0,9)_n$. MLNC- (A), MLNC+ (B), AB-MLNC- (C), AB-MLNC+ (D), comparação de perfis em gráfico radar das formulações (E),

Outra técnica empregada para a análise do diâmetro de partícula foi o espalhamento de luz dinâmico. Os resultados obtidos demonstraram diâmetros hidrodinâmicos médios (z-average, ajuste pelo método de Cumulants) entre 136 a 146 nm e PDI inferior a 0,2, evidenciando novamente baixa polidispersão. Os diâmetros encontrados nesse trabalho são maiores do que aqueles descritos na literatura para nanocápsulas contendo lecitina e revestidas com quitosana (BENDER et al. 2014, OLIVEIRA et al. 2018, CÉ et al. 2016). Esse aumento nos diâmetros pode estar relacionado à diferença da parede polimérica, uma vez que nos trabalhos citados anteriormente foi utilizada a PLC de massa molar numérica (M_n) 10kg/mol e no presente trabalho utilizou-se a mistura (9:1, m/m) de PLC 80 Kg/mol e 10 Kg/mol. A

massa molar do polímero influencia a viscosidade da fase orgânica, ou seja, quanto maior a massa molar mais viscosa a fase orgânica. Quanto maior a viscosidade da fase orgânica, maior é o diâmetro das nanocápsulas (Jornada et. al, 2012). Cabe salientar que no estudo de Jornada e colaboradores foi determinado que o controle de diâmetro com baixa polidispersão é possível quando a auto-organização dos materiais é realizada em regime diluído, ou semidiluído, o que foi considerado no presente estudo.

A parede polimérica composta pela combinação de PCL com diferentes massas molares foi descrita por Drewes e colaboradores (2016) e Calgaroto e colaboradores (2018), onde os diâmetros médios mensurados por ambas as técnicas de caracterização (DL e DLS) são maiores do que os valores encontrados no presente estudo. No entanto, vale ressaltar que as partículas desenvolvidas anteriormente com a mistura de PCL não continham lecitina, que é dispersa em etanol durante o processo. Assim, a presença do etanol na fase orgânica aumenta a solubilidade do MS, e é responsável pela diminuição dos diâmetros observada para as duas séries MLNC e AB-MLNC.

Adicionalmente, as distribuições de tamanhos de partículas determinadas por DLS, quando avaliadas por intensidade e também por volume, apresentaram-se unimodais (Figura 8). A avaliação dos resultados de DLS pela relação intensidade/tamanho é mais adequada, uma vez que o método está baseado na teoria de Rayleigh que relaciona o espalhamento de luz ao diâmetro da partícula (d^6). Assim, partículas maiores espalham mais luz do que partículas menores, sendo possível detectar facilmente agregados na amostra. No entanto, partículas com volumes muito diferentes podem ser identificadas quando a análise é transformada (considerando a teoria de Mie) para volume/tamanho, uma vez que o raio da partícula é considerado (volume de uma esfera é igual a $4/3\pi(r)^3$) (MALVERN INSTRUMENTS, 2013).

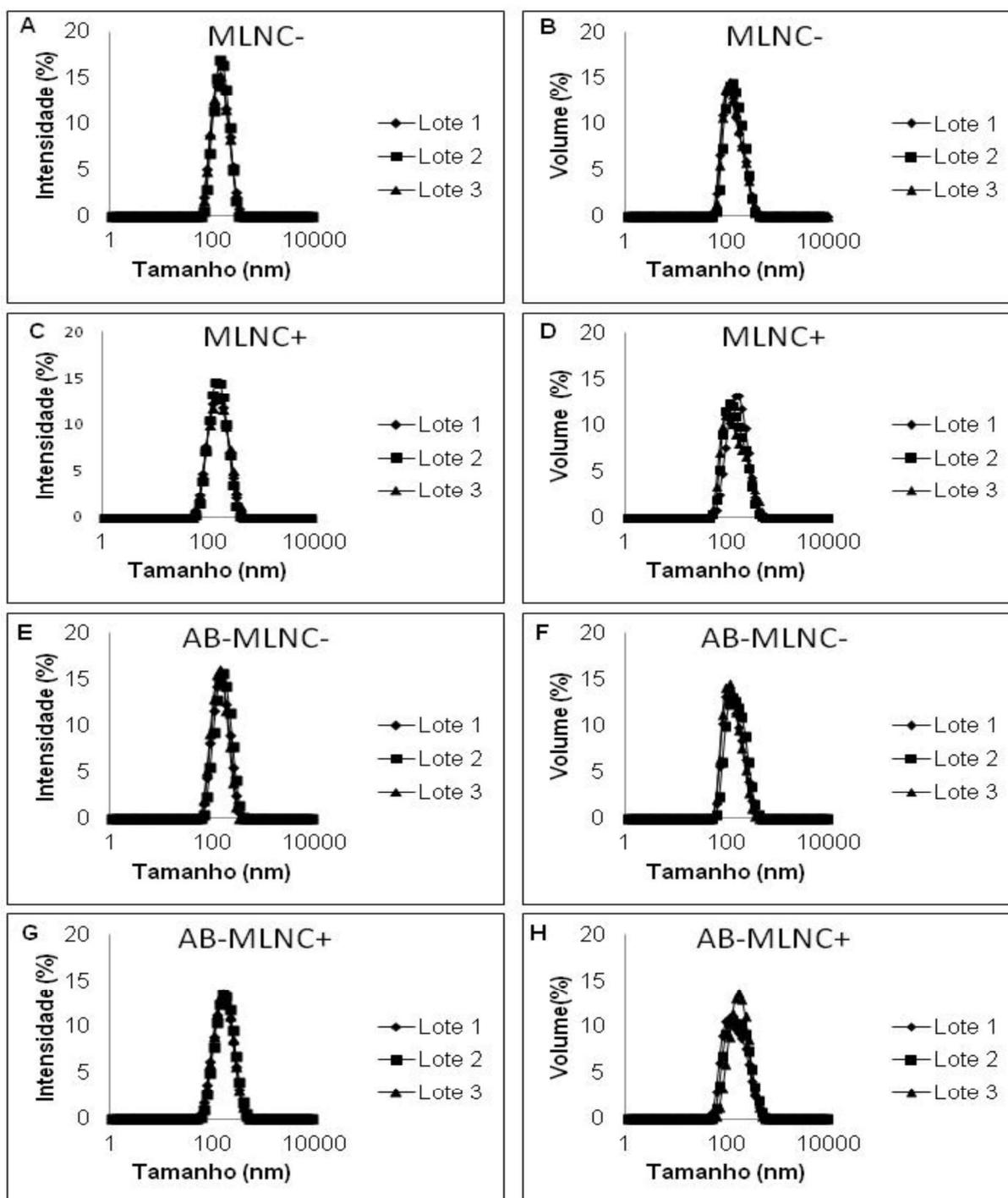


Figura 8: Resultados de DLS por intensidade e volume para as formulações (n=3): MLNC- (A e B), MLNC+ (C e D), AB-MLNC- (E e F), AB-MLNC+ (G e H).

Devido ao tamanho adequado das nanocápsulas obtidas com o alfa-bisabolol, não foi necessário nenhum ajuste de concentração de matérias-primas. Dessa forma, prosseguiu-se o estudo visando à funcionalização de superfície com o tripeptídeo RGD e posterior encapsulação do fármaco.

As formulações sem fármaco, mas revestidas com RGD apresentaram coloração similar às formulações contendo alfa-bisabolol. No entanto, as dispersões preparadas com o fármaco doxorrubicina apresentaram-se, ao final do processo, macroscopicamente homogêneas, com coloração levemente avermelhada e sem material precipitado.

Essas formulações foram, então, avaliadas quanto ao diâmetro de partículas por DLS, cujos dados estão discriminados na Tabela 3. Pode-se observar que estas formulações também apresentam baixo PDI e os diâmetros situam-se entre 138 e 147 nm. De acordo com os dados obtidos, a encapsulação da doxorrubicina, bem como a funcionalização, não alteraram significativamente o tamanho das partículas ($p > 0,05$). Aliado a isso, as curvas de distribuição de tamanhos por intensidade e por volume apresentam perfil unimodal, assim como pode-se ajustar o decaimento exponencial da função de correlação pelo método de Cumulants (Figura 9 e 10).

Tabela 3: Diâmetro hidrodinâmico médio (z-average) e PDI para as formulações contendo o fármaco e/ou o tripeptídeo (n=3).

Formulação	z-average (nm)	PDI
AB-MLNC-RGD	141±10	0,139±0,010
AB-DOX-MLNC-	140±1	0,148±0,030
AB-DOX-MLNC+	147±4	0,176±0,005
AB-DOX-MLNC-RGD	138±2	0,191±0,010

Os diâmetros encontrados para as partículas com doxorrubicina e RGD estão de acordo com o estudo de Antonow e colaboradores (2018), onde foram preparadas nanocápsulas de núcleo lipídico (com TCC e MS) contendo doxorrubicina e funcionalizadas com RGD.

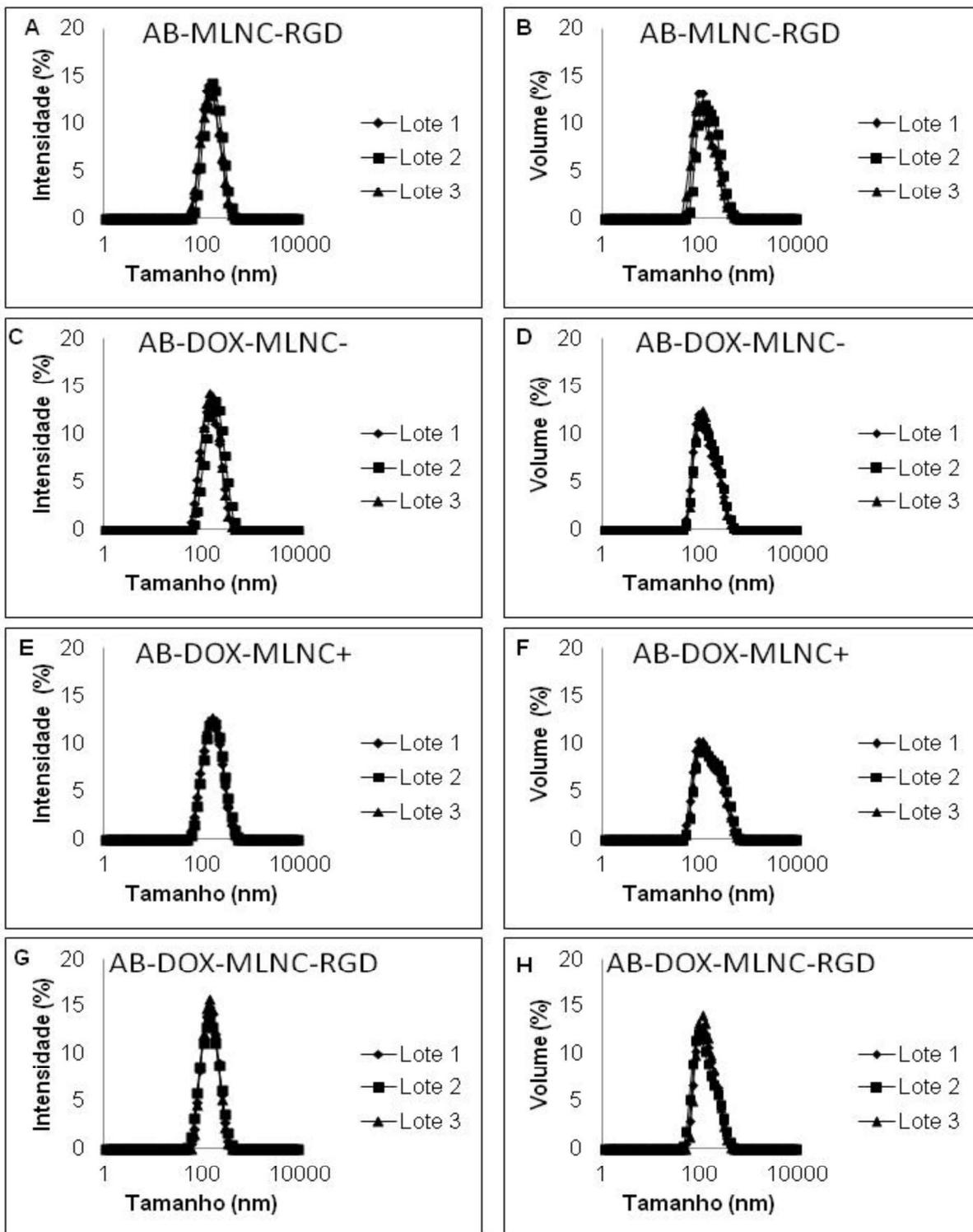


Figura 9: Resultados de DLS por intensidade e volume para as formulações (n=3): AB-MLNC-RGD (A e B), AB-DOX-MLNC- (C e D), AB-DOX-MLNC+ (E e F), AB-DOX-MLNC-RGD (G e H).

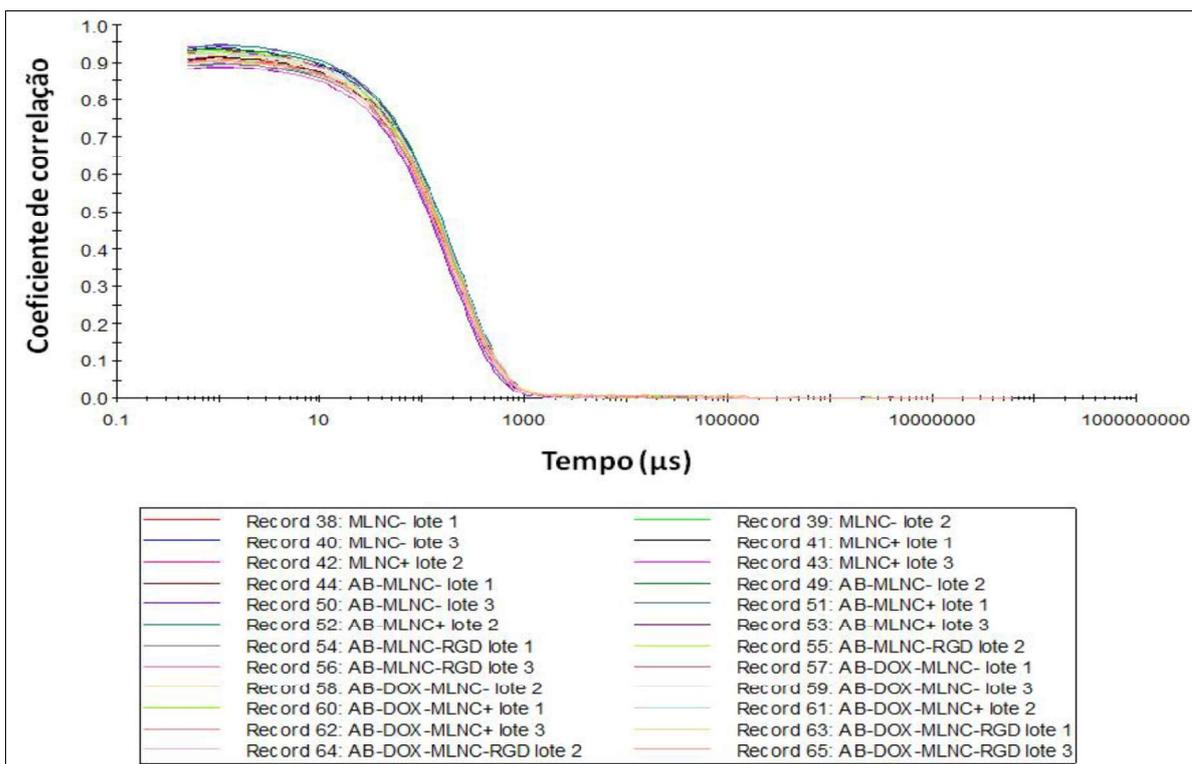


Figura 10: Coeficiente de correlação das formulações MLNC-, MLNC+, AB-MLNC-, AB-MLNC+, AB-MLNC-RGD, AB-DOX-MLNC-, AB-DOX-MLNC+, AB-DOX-MLNC-RGD (n=3).

As dispersões de nanocápsulas também foram avaliadas pela técnica de NTA, dados na Tabela 4. A densidade de partículas variou de $4,89 \times 10^{12}$ a $2,44 \times 10^{13}$ enquanto que os diâmetros observados se situaram entre 126 e 170 nm. A redução no número de partículas após a funcionalização está relacionada às sucessivas diluições realizadas para obter a formulação contendo o tripeptídeo.

As análises por DLS e NTA baseiam-se no movimento Browniano das partículas em dispersão, porém podem ser observadas diferenças entre os diâmetros obtidos por ambas as técnicas. Essa diferença pode estar relacionada com o número de partículas que são analisadas através de cada técnica, pois normalmente o número de partículas analisadas por NTA é menor que o número de partículas analisadas por DLS. Essa relação entre a concentração da amostra e o diâmetro foi relatada Filipe, Have e Jiskoot (2010), os quais para poder comparar os resultados obtidos por ambas as técnicas tiveram que investigar as concentrações ideais que permitiam realizar essa comparação de forma confiável. No entanto, a técnica de NTA apresenta a possibilidade de visualização das partículas em movimento Browniano e também a densidade de partículas na amostra.

Tabela 4: Caracterização das dispersões de nanocápsulas empregando a técnica de NTA.

	AB-MLNC-	AB-MLNC+	AB-MLNC- RGD	AB-DOX- MLNC-	AB-DOX- MLNC+	AB-DOX- MLNC- RGD
Diâm. Médio (nm)	136±16	154±2	148±10	126±5	141±8	170±19
Moda (nm)	123±15	133±6	136±9	113±4	123±8	142±10
SD (nm)	31±3	38±3	47±12	27±1	39±3	44±5
D10 (nm)	101±13	112±4	109±5	93±4	101±7	123±12
D50 (nm)	129±15	143±4	135±9	120±4	132±8	162±19
D90 (nm)	178±20	212±4	201±21	164±6	187±13	230±36
CP	2,09±0,95 x10 ¹³	1,59±0,31 x10 ¹³	4,89±1,5 x10 ¹²	2,44± 0,4 x10 ¹³	1,31±0,14 x10 ¹³	4,9±0,8 x10 ¹²

SD: Desvio padrão calculado pelo NTA; D10: diâmetro de partícula a 10% da curva de distribuição; D50: diâmetro de partícula a 50% da curva de distribuição; D90: diâmetro de partícula a 90% da curva de distribuição; CP: Concentração de partículas (part./mL) considerando a diluição (10000x).

5.1.2. Potencial zeta e pH das formulações

O potencial zeta das suspensões de nanocápsulas, o qual é um indicativo da carga superficial das partículas, foi estimado por mobilidade eletroforética (Figuras 11 e 12, Tabela 5). O potencial zeta é um parâmetro físico-químico bastante utilizado para estimar a estabilidade de uma dispersão quando o mecanismo é dependente da repulsão eletrostática entre as partículas, além de ser um parâmetro de controle, quando a superfície da partícula é modificada, pois diferentes componentes localizados na interface podem alterar o potencial de superfície. Isso pode ser verificado em processos de otimização de novos sistemas nanoestruturado, inclusive no desenvolvimento de sistemas *layer by layer*, (MOSQUEIRA et al. 2000, CARNEIRO-DA-CUNHA, et al. 2011, IRIGOYEN et al. 2009, BHATTACHARJEE, 2016)

Valores muito baixos (menores que -30 mV) ou elevados (maiores que +30 mV) representam sistemas estáveis, quando a estabilidade é regida por repulsão eletrostática (SHARMA et al. 2014). No entanto, a estabilidade de sistemas coloidais também pode ocorrer por impedimento estérico (MOSQUEIRA et al. 2000). Na estabilização por impedimento estérico os valores de potencial zeta podem ser nulos ou próximos de zero (FIEL et al. 2011), no entanto a camada polioxigenada na superfície das partículas forma uma corona hidrofílica diminuindo a interação partícula-partícula, responsável pela agregação.

Dessa forma, as formulações de nanocápsulas sem revestimento de quitosana apresentaram valores de potencial zeta negativos, próximos a -11 mV (Tabela 5). Valores de potencial zeta negativos são reportados na literatura para sistemas nanoestruturados contendo lecitina (BENDER et al. 2014, OLIVEIRA et al. 2017a) e são relacionados à presença de grupamentos fosfatos (PO_3^-) do ácido fosfatídico encontrado na estrutura da lecitina e que podem estar na superfície da partícula (MOSQUEIRA et al. 2000). Aliado a isso, a presença do tensoativo não-iônico, polissorbato 80, contribui para valores próximos de zero (CATTANI et al. 2010). Os baixos valores de potencial zeta e a presença de polissorbato 80 na superfície sugerem que a estabilidade das suspensões esteja ocorrendo por impedimento estérico com pouca contribuição de um mecanismo de repulsão eletrostática.

Como esperado, o revestimento com quitosana inverteu os valores de potencial zeta, os quais passaram a ser positivos (Tabela 5). Os valores positivos estão relacionados aos grupamentos amina (NH_3^+) presentes na estrutura da quitosana (CARNEIRO-DA-CUNHA, et al. 2011). Tais grupamentos são importantes para que ocorra o revestimento, pois podem interagir com os grupos fosfatos da lecitina (SONVICO et al. 2006).

Após a funcionalização com RGD, os valores de potencial zeta permaneceram positivos. Contudo há diferença ($p < 0,05$) entre o potencial após o revestimento da dispersão sem o fármaco (AB-MLNC+) quando comparado à formulação contendo doxorrubicina (AB-DOX-MLNC+). A hipótese para esse resultado é a interação da própria doxorrubicina com a superfície da partícula.

No entanto, é importante observar a distribuição unimodal (Figuras 11 e 12) para o potencial zeta após o revestimento e funcionalização, o que segundo Bender et al. (2014) sugere que esses processos ocorreram de maneira a formar uma monocamada de RGD complexado.

O pH das formulações variou de 4,00 a 7,30, (Tabela 5) estando de acordo com os valores reportados para formulações preparadas por nanoprecipitação, emulsão-difusão ou *layer-by-layer* (MORA-HUERTAS, FESSI, ELAISSARI, 2010). O pH observado na formulação não revestida, contendo doxorubicina (AB-DOX-MLNC-), está relacionado com a presença da trietilamina na formulação. A trietilamina é uma base utilizada com a finalidade de neutralizar o cloridrato de doxorubicina liberando a base livre (MISSIRLIS et al. 2006, LINCE et al. 2011, MIAO, et al. 2013) e tornando o fármaco mais hidrofóbico, e, assim, possibilitando maior eficiência de encapsulação. Enquanto que, o pH ácido das formulações revestidas, está relacionado com a solução de quitosana utilizada para o revestimento.

Tabela 5: Valores de potencial zeta e pH das formulações.

Formulação	Potencial zeta (mV)	pH
AB-MLNC-	-11,4±0,6	5,79±0,38
AB-MLNC+	18,4±0,4	4,04±0,01
AB-MLNC-RGD	14,9±1,2	4*
AB-DOX-MLNC-	-11,6±1,5	7,30±0,3
AB-DOX-MLNC+	11,8±2,0	4,18±0,04
AB-DOX-MLNC-RGD	13,4±1	4*

*Potencial de hidrogênio aferido com fita de pH.

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, insolúvel em água. Seu pKa encontra-se próximo a 6 e, portanto, a solubilização ocorrerá em faixas de pH abaixo desse valor, devido a ionização do grupo amino (JANEGITZ et. al., 2007). Por consequência, as soluções de quitosana possuem baixo pH, devido à presença do ácido acético e isso influencia no potencial de hidrogênio das formulações revestidas.

O volume de formulação obtido após a funcionalização foi de apenas 1 mL, por isso o pH dessas formulações foi aferido com fitas apropriadas. Percebe-se que, aparentemente, não ocorre alteração no pH após a adição do acetato de zinco e do tripeptídeo.

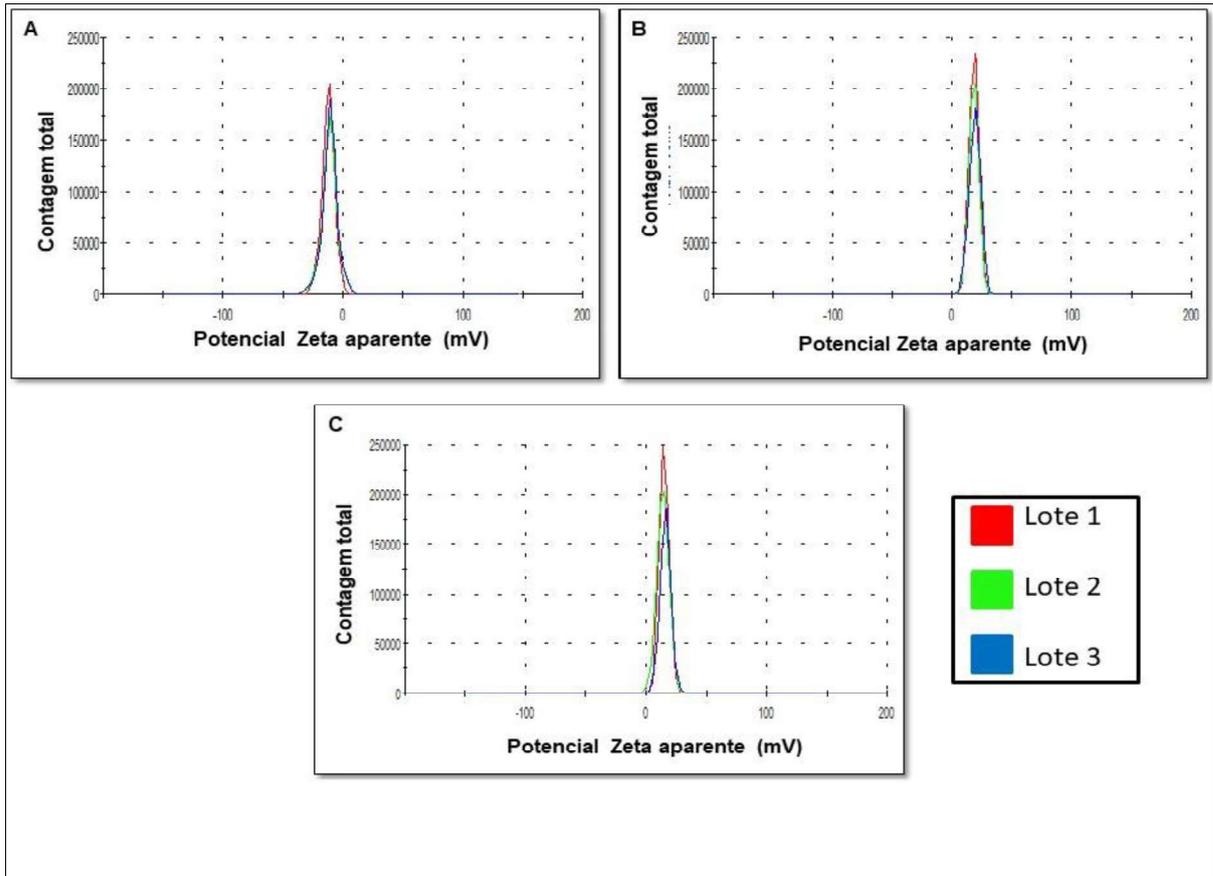


Figura 11: Potencial zeta (mV) das formulações sem o fármaco doxorrubicina. AB-MLNC- (A); AB-MLNC+ (B); AB-MLNC-RGD (C).

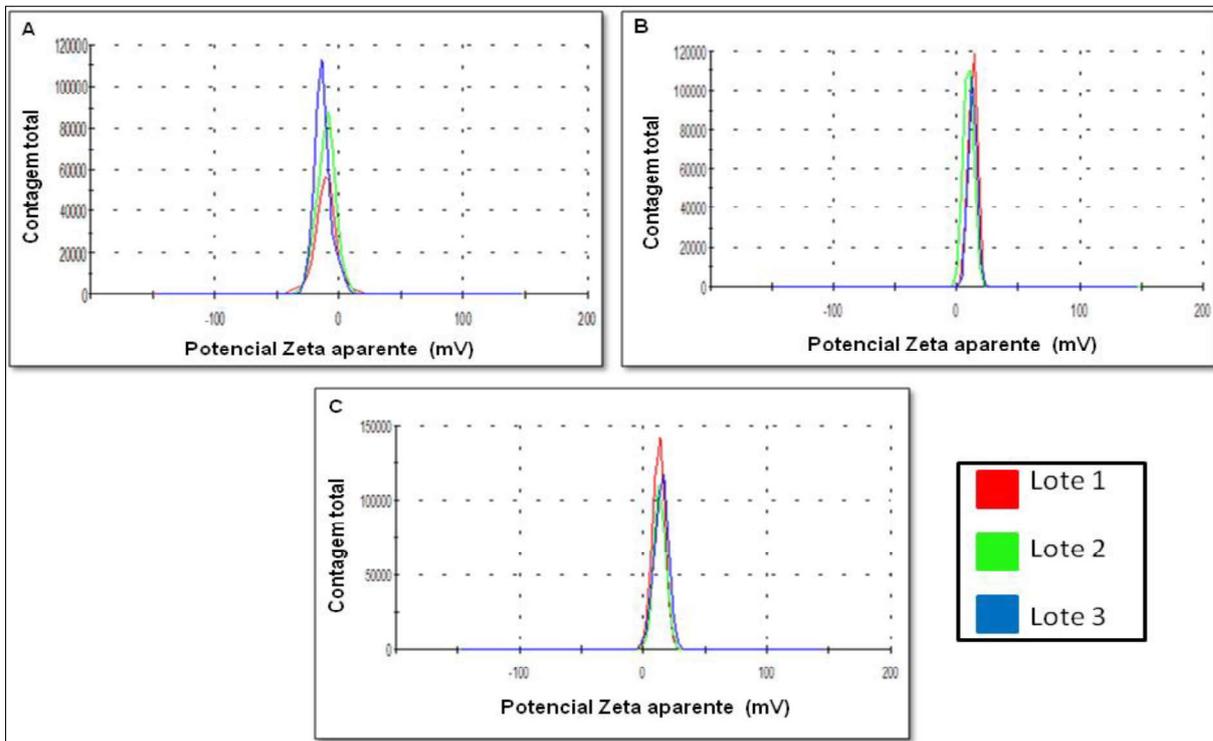


Figura 12: Potencial zeta (mV) das formulações contendo o fármaco doxorrubicina. AB-DOX-MLNC- (A); AB-DOX-MLNC+ (B); AB-DOX-MLNC-RGD (C).

5.1.3. Eficiência de ligação do RGD

A vetorização de fármacos pelo emprego de nanocarreadores funcionalizados é uma alternativa para melhorar a entrega em sítios específicos (VAUTHIER, BOUCHEMAL, 2009). No entanto, a vetorização dependerá da interação do ligante com a partícula e, conseqüentemente, com as moléculas de reconhecimento no sítio ativo.

Neste contexto, a ligação do RGD às nanocápsulas foi determinada por método colorimétrico conforme descrito no item 4.4.6. da metodologia. Como etapa inicial, foi preparada uma curva de calibração a partir de uma solução de RGD com concentração de 1 mg/mL. A curva apresentou-se linear com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9971 (Anexo 9.2).

O teor de RGD foi estimado pela quantificação da solução de RGD preparada para a funcionalização (n=3) e ajustado para o volume de solução que foi adicionado na formulação durante a funcionalização. Dessa forma, o teor médio nas soluções foi de 288,93±8,23 µg/mL. Por outro lado, a eficiência de ligação foi avaliada após a ultrafiltração-centrifugação da formulação AB-MLNC-RGD, obtendo-se eficiência de ligação de 92,21±0,1%. Esses resultados estão de acordo com Antonow e colaboradores (2018), cuja eficiência de ligação foi de 94,3±5,9%, em uma formulação semelhante à desenvolvida no presente trabalho. Esses dados sugerem que a funcionalização foi efetiva.

Optou-se pelo uso da formulação sem o fármaco para estimar a eficiência de ligação devido à doxorrubicina possuir cor e apresentar em sua estrutura química um grupo amina. Esse grupo poderia reagir com os íons Cu^{2+} e gerar resultados falso-positivos. Tal interferência foi demonstrada no estudo de Kader, Liu (1997), os quais testaram a quantificação de proteínas na presença e ausência de doxorrubicina, evidenciando que a presença do fármaco intensifica a cor da reação, quando comparada a reação da proteína padrão (albumina) isolada.

5.1.4. Doseamento e eficiência de encapsulação do alfa-bisabolol

O método de quantificação de alfa-bisabolol foi realizado de acordo metodologia descrita por Terroso (2010), com modificações. O método foi específico (Anexo 9.3), uma vez que não foram observados picos no cromatograma no tempo de

retenção do alfa-bisabolol (5,5 min.) quando avaliada uma formulação sem a substância ativa – dispersão de nanoesferas.

A curva de calibração mostrou-se linear com r igual a 0,9997 (Anexo 9.4). A precisão intradia apresentou DPR de 2,53. A recuperação do ponto mais baixo (10 µg/mL) foi de 101%, enquanto que no ponto médio (30 µg/mL) e alto (50 µg/mL) foram 101% e 100%, respectivamente, indicando que o método é exato e está de acordo com os parâmetros preconizados na RDC 166 (ANVISA, 2017).

O teor de alfa-bisabolol obtido foi de 15,37±0,58 mg/mL, com eficiência de encapsulação próxima a 100% (AB-MLNC). Esses dados de quantificação e EE% corroboram com resultados descritos por D’Almeida e colaboradores (2017), demonstrando que não há perda da substância ativa durante a preparação das formulações.

5.1.5. Doseamento e eficiência de encapsulação da doxorubicina

O método utilizado para a quantificação da doxorubicina demonstrou-se específico (Anexo 9.5) e linear (Anexo 9.6), com coeficiente de correlação de 0,9998. O doseamento foi realizado para as três formulações contendo o fármaco, ou seja, AB-DOX-MLNC-, AB-DOX-MLNC+ e AB-DOX-MLNC-RGD.

O teor das formulações variou entre 94,88±2,61 µg/mL e 30,79±0,53 µg/mL devido às sucessivas diluições para as etapas de revestimento e funcionalização. Além disso, as taxas de eficiência de encapsulação diferiram para as três formulações (tabela 6).

Tabela 6: Teor e eficiência de encapsulação da doxorubicina.

Formulação	AB-DOX-MLNC-	AB-DOX-MLNC+	AB-DOX-MLNC-RGD
Teor (µg/mL)	94,88±2,61	85,39±0,82	30,79±0,53
EE%	98,07±0,71	64,32±7,15	65,89±3,63

Observou-se que, após o revestimento, ocorreu redução de aproximadamente 35% da eficiência de encapsulação. Isso pode estar relacionado com a alteração do pH da dispersão de nanocápsulas revestidas, o qual passa de 7,30 para aproximadamente 4,00 (Tabela 5).

Levando em consideração que o cloridrato de doxorrubicina utilizado na preparação das formulações é hidrofílico, e que durante o processo adiciona-se TEA com o objetivo de torná-lo mais hidrofóbico, a doxorrubicina pode estar interagindo com a superfície da partícula e não totalmente encapsulada. Assim, com a adição de prótons hidrogênio a doxorrubicina volta a um estado hidrofílico e fica solúvel na fase aquosa, o que por consequência reduz a EE%.

Oliveira e colaboradores (2013) desenvolveram um algoritmo a fim de auxiliar na determinação do mecanismo de distribuição de substâncias nas nanocápsulas de núcleo lipídico, apresentando seis configurações possíveis. Além disso, demonstraram que o parâmetro físico-químico, $\log D$, é o mais apropriado para prever tal distribuição. O $\log D$ é o coeficiente de distribuição corresponde à solubilidade diferencial de moléculas ionizáveis no sistema octanol-água dependendo da faixa de pH observada (lipofilicidade) (BHAL, 2007).

Analisando o $\log D$ do cloridrato de doxorrubicina (Figura 13) percebe-se que em pH 4,18 este se encontra em -1,51, ou seja, mais hidrofílico do que no pH 7,30, o que condiz com os resultados encontrados. De acordo com o algoritmo, considerando os valores de $\log D$ para a doxorrubicina (-1,51 e 0,10), além da eficiência de encapsulação, os possíveis tipos de distribuições do fármaco na partícula seriam: encapsulado, na parede da nanocápsula, além de distribuído na fase aquosa, uma vez que fármacos com $\log D$ próximos aos verificados para a doxorrubicina, apresentam configuração de distribuição semelhante (OLIVEIRA, et al. 2013).

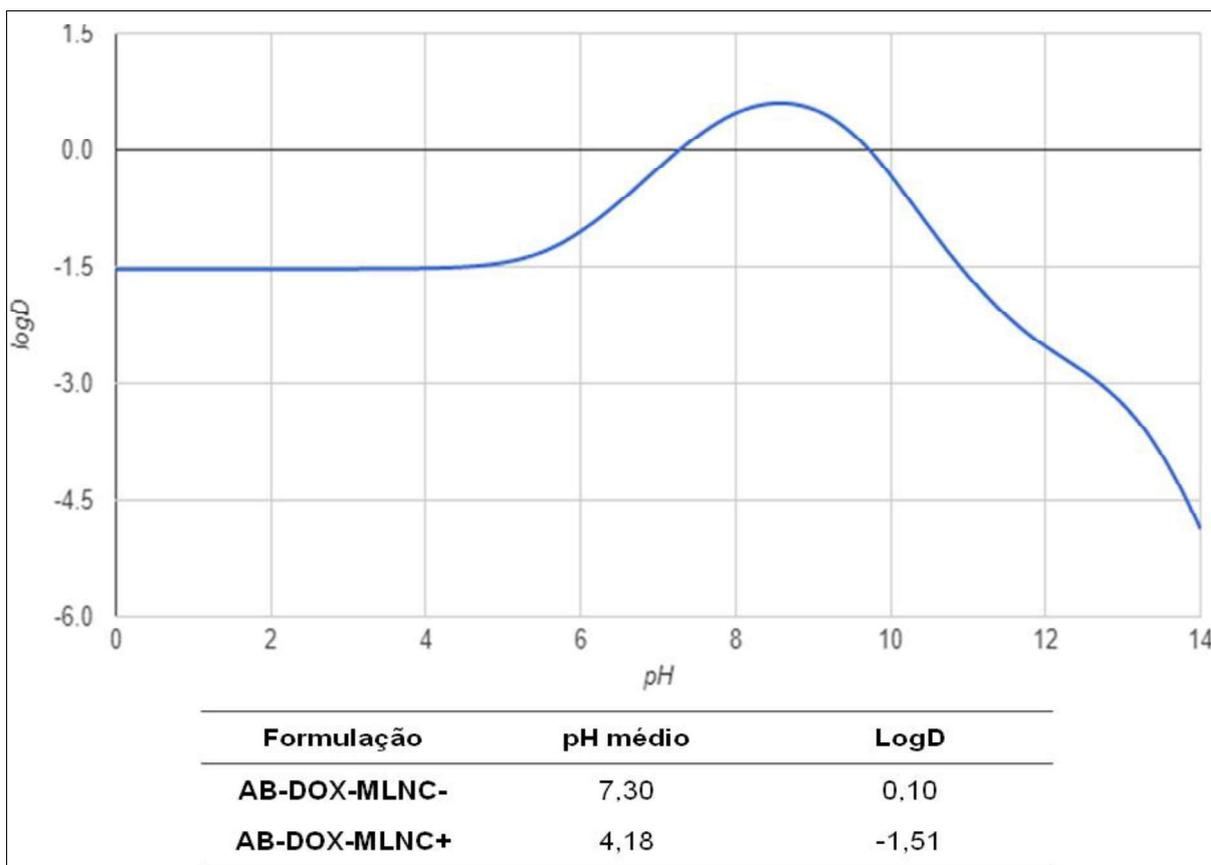


Figura 13: Relação do pH encontrado nas formulações AB-DOX-MLNC-, AB-DOX-MLNC+ e o $\log D$ para o cloridrato de doxorubicina nesses pHs. Gráfico gerado com o programa Chemicalize (<https://chemicalize.com/>).

Além do $\log D$, a estrutura química do fármaco pode favorecer interações com outros componentes da cápsula, alterando a eficiência de encapsulação. Oliveira e colaboradores (2013) verificaram que mesmo apresentando $\log D$ negativo (-2,43) o metotrexato estava interagindo com a LNC, pois apresentava perfil de distribuição na dispersão semelhante a substâncias com $\log D$ positivos (melatonina e diclofenaco de sódio). Os autores sugeriram que os grupos amina da estrutura química do metotrexato pode favorecer a interação com grupos carboxilatos do polímero (PCL) utilizado.

Visando melhorar a eficiência de encapsulação da doxorubicina foram testados revestimentos com soluções aquosas de quitosana acidificadas com ácido clorídrico e ácido cítrico.

O ácido cítrico, de acordo com sua estrutura química, pode doar três prótons hidrogênio, por isso, após calcular a massa molar equivalente ao ácido acético (pode doar apenas um próton hidrogênio), apenas 1/3 da massa de ácido cítrico foi utilizada para preparar a solução de quitosana. A formulação de nanocápsulas foi então

submetida ao revestimento e posteriormente analisada quanto à eficiência de encapsulação e o diâmetro hidrodinâmico médio (z-average) por DLS.

A eficiência de encapsulação aumentou quando comparada ao resultado anterior, ficando próxima a 73%, porém ocorreu alteração no tamanho da partícula, de 147 nm para 752,8 nm e PDI de 0,975. A alteração do tamanho após o uso do ácido cítrico pode ter relação à sua estrutura química, a qual favorece a reticulação com a quitosana, uma vez que possui 3 átomos de hidrogênio que interagem com os grupos amina adjacentes, intercalando-se entre as cadeias de quitosana (LUSIANA, SISWANTA, MUDASIR, 2016).

Posteriormente, foram efetuados testes com o ácido clorídrico. Como o ácido clorídrico é um ácido forte, a solução aquosa de quitosana preparada com a mesma concentração molar de ácido acético apresentou pH muito baixo, entre 0 e 1 (fora de pH). Por isso, uma nova solução de ácido clorídrico foi preparada e adicionada gota a gota na solução de quitosana até pH aparente de 4,0, o qual deveria solubilizar a quitosana. No entanto, a solubilização completa não ocorreu.

Diante disso, optou-se por revestir a formulação com a solução quitosana acidificada com ácido clorídrico (pH entre 0 e 1) e posteriormente neutralizar a formulação com hidróxido de sódio (NaOH 0,1 mol/L) (até pH 7,0). Contudo, ocorreu a precipitação da quitosana, inviabilizando estudos posteriores. A desestabilização do sistema pode estar relacionada ao fato de que o pKa da quitosana é próximo a 6,5, então pH muito altos podem desprotonar as aminas e desestabilizar o sistema (SONVICO et al. 2006).

Devido aos resultados insatisfatórios após essas alterações, optou-se por dar continuidade ao estudo com a dispersão de nanocápsulas revestida com quitosana acidificada com ácido acético, mesmo esta apresentando eficiência de encapsulação de aproximadamente 65%. Isto porque, a parcela de fármaco na fase aquosa permite que este esteja disponível logo após a administração da formulação e a porção encapsulada pode ser liberada gradativamente.

Por ser um fármaco com certa solubilidade em água, a encapsulação do cloridrato de doxorrubicina em nanopartículas de núcleo lipídico é dificultada. A utilização da base livre do fármaco, após extração pode ser uma alternativa para melhorar a eficiência de encapsulação nesse sistema (ANTONOW et al. 2018). No entanto, esses processos demandam tempo e a recuperação após a síntese não é completa (MIAO et al 2015, LINCE et al. 2011).

Como alternativa a esse processo, são descritas metodologias que recorrem à adição de bases, sendo elas trietilamina ou hidróxido de sódio, no momento do preparo das partículas (OLIVEIRA et al. 2016, ZHAO et al. 2017). Algumas dessas metodologias contam com o uso de solventes orgânicos, como clorofórmio, o que demanda etapas de purificação (MISSIRLIS et al. 2002) deixando o processo mais demorado e oneroso. Diante disso, utilizou-se a TEA no momento da preparação da formulação evitando etapas adicionais e utilizando como solvente apenas acetona e etanol.

Chittasupho e colaboradores (2014) desenvolveram nanopartículas de PLGA contendo doxorubicina e funcionalizadas com o peptídeo LCF131, na tentativa de criar um sistema de entrega capaz de reduzir a viabilidade de células de câncer de pulmão. A metodologia aplicada apresentava uma etapa de obtenção da base livre de doxorubicina pela adição de NaOH, e posterior preparação e funcionalização. Assim como no presente estudo, as taxas de encapsulação iniciais foram mais elevadas (74%, pH 7,2), no entanto, após a adição do peptídeo houve redução da EE%. Os autores atribuíram essa diminuição à acidez do meio (pH 6,5) e consequente ionização dos grupamentos amina do fármaco. Porém, a atividade biológica da dispersão não foi prejudicada, uma vez que esta apresentou maior seletividade para as células cancerígenas e a entrega de fármaco foi superior àquela partícula com 74% de EE%, a qual não possuía a funcionalização de superfície.

A eficiência de encapsulação da doxorubicina, em nanocápsulas lipídicas sólidas, descrita no trabalho de Miao e colaboradores (2013), também foi próxima a 60%, mesmo após a etapa de liberação da base pela adição de trietilamina. No entanto, em testes biológicos as nanocápsulas promoveram maior atividade antiproliferativa de células de câncer de mama (MCF-7) e câncer de ovário (SKOV3) multirresistentes, quando comparado ao fármaco livre.

Nanopartículas de núcleo aquoso também foram preparadas na tentativa de melhorar a eficiência de encapsulação. Neste contexto, Vrignaud e colaboradores (2013) desenvolveram uma partícula de núcleo aquoso circundado por poliureias, além da presença de uma camada oleosa. No entanto, a EE ficou em torno de 80%, demonstrando que mesmo em sistemas que mantém o fármaco em seu estado hidrofílico não há completa encapsulação.

O pH é um fator muito importante para o controle da encapsulação de moléculas ionizáveis, como demonstrado no desenvolvimento de lipossomas

contendo doxorubicina, como por exemplo o Myocet®, lipossoma contendo doxorubicina aprovado pela Agência de medicina Europeia (BARENHOLZ, 2012, ANSELMO, MITRAGOTRI, 2016). Nesses sistemas há um gradiente de pH entre a fase interna e externa da partícula, sendo o núcleo mais ácido o que favorece a permanência do fármaco no interior da partícula. Aliado a isso, há um gradiente iônico, o que permite que a doxorubicina, internalizada no lipossoma, forme dímeros, que se agregam em estruturas semelhantes a fibras, favorecendo a obtenção de uma alta eficiência de encapsulação (LI, et al. 1998, BARENHOLZ, 2012).

Na literatura também são descritos alguns trabalhos empregando doxorubicina, cuja eficiência de encapsulação chega a 90% (ZHANG et al. 2010, ZHAO et al. 2017). Contudo, o tipo de nanopartícula, as técnicas de preparação, matérias-primas, concentração e características físico-químicas (hidrofobicidade) do fármaco são diferentes do presente estudo. De acordo com Mora-Huertas, Fessi e Elaissari (2010) esses parâmetros podem afetar os resultados de encapsulação do fármaco.

Contudo, a eficiência de encapsulação não é capaz de determinar a eficácia quando da aplicação da partícula em sistemas biológicos *in vitro/in vivo*. Pereira e colaboradores (2018) demonstraram que LNCs contendo metotrexato, mesmo com EE de apenas 46%, foram capazes de atravessar a barreira hematoencefálica após administração intravenosa ou oral, sem causar danos à mesma e proporcionando redução do tumor (glioma). Os animais não apresentaram perda de peso e leucopenia, a qual ocorre quando da administração do fármaco livre.

Da mesma forma, Charão e colaboradores (2015) mostraram que LNCs contendo melatonina, cuja eficiência de encapsulação é de apenas 32%, podem reduzir os efeitos citotóxicos e genotóxicos ocasionados pela exposição ao Paraquat (herbicida) em células epiteliais alveolares A549. Os efeitos produzidos após a aplicação das LNCs são mais acentuados do que a melatonina livre, indicando que a nanoencapsulação parcial da melatonina melhora o seu potencial terapêutico.

5.1.6. Investigação da presença de cristais de doxorubicina: microscopia de luz polarizada e Análise por rastreamento de nanopartículas (NTA)

A redução da EE e conseqüente presença do fármaco na fase aquosa poderia levar a formação de cristais de doxorubicina nessa fase da formulação. Por isso, realizou-se investigação quanto à presença dos mesmos.

Para isso, as formulações AB-DOX-MLNC- e AB-DOX-MLNC+ foram submetidas à microscopia em microscópio ótico de luz polarizada sem preparo prévio da amostra (Figura 14, A e B). Como pode ser observado nas imagens, não há presença de material indicativo de cristais. Mesmo quando da utilização dos filtros de polarização não são observadas estruturas birrefringentes (dados não apresentados). O mesmo pode ser observado na solução aquosa do cloridrato de doxorubicina (Figura 14, C).

Para confirmar esses resultados uma solução aquosa de doxorubicina, na mesma concentração que a encontrada nas formulações de nanocápsulas (100 µg/mL) foi submetida à ultrafiltração-centrifugação e posterior quantificação do ultrafiltrado por cromatografia líquida. A hipótese dessa análise estava centrada no fato de que se houvessem cristais, esses ficariam retidos na membrana de filtração reduzindo o teor no ultrafiltrado. Isso não ocorreu, uma vez que a recuperação do ultrafiltrado foi de $97,6 \pm 2,6\%$.

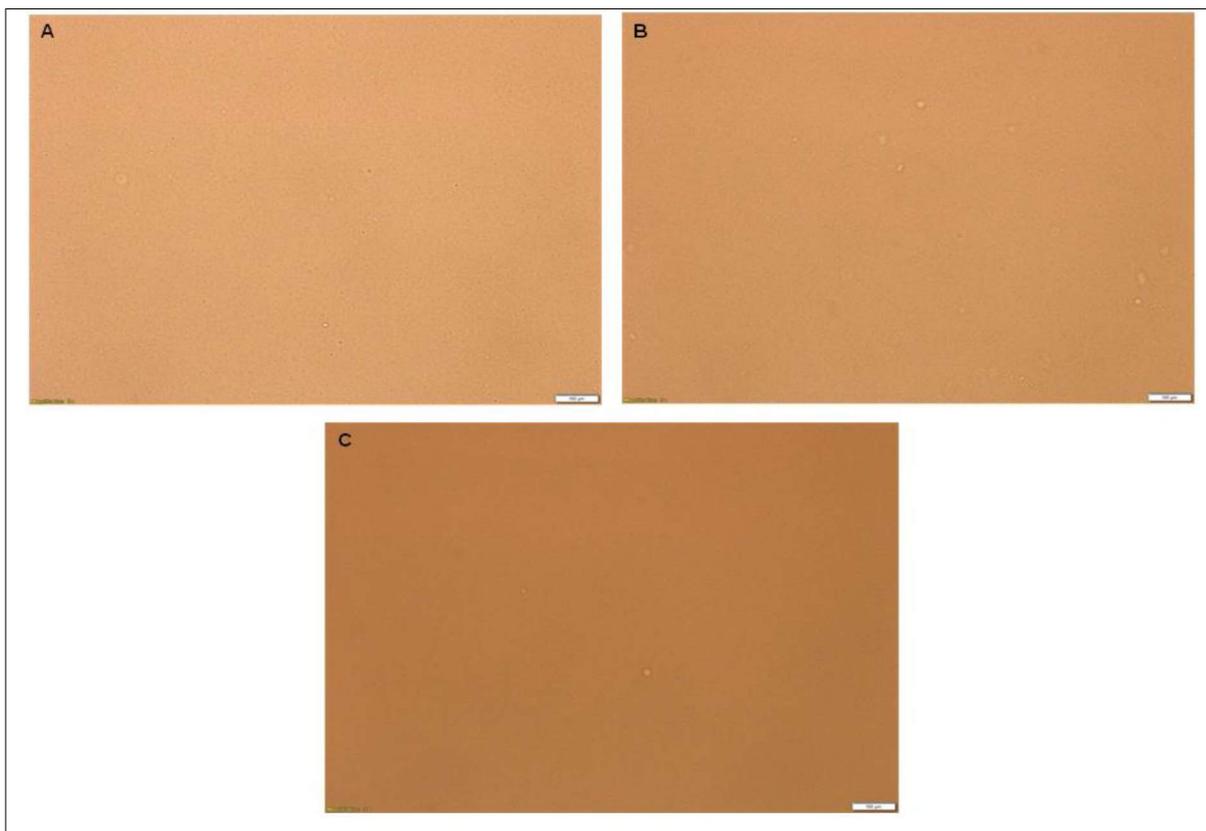


Figura 14: Imagens de microscopia óptica (aumento de 100x). A – dispersão de nanocápsulas AB-DOX-MLNC-; B – dispersão de nanocápsulas AB-DOX-MLNC+; C – solução aquosa de doxorubicina.

Outra análise empregada na investigação da presença de cristas é o NTA. Dessa forma, os gráficos de intensidade *versus* tamanho de partícula foram avaliados quanto à distribuição de pontos nos eixos “x e y”, comparando as dispersões obtidas para as formulações sem fármaco com as dispersões das formulações contendo doxorubicina. Assim, o ponto mais alto do eixo “y” foi considerado o limite superior e ponto mais distante de zero, no eixo “x” o limite lateral, isso para as formulações sem fármaco.

O retângulo obtido pela ligação dos pontos nos eixos “x” e “y” foi utilizado como referência dos pontos máximos de dispersão. Assim, esse retângulo foi transposto para os gráficos das formulações contendo o fármaco (Figura 15 e 16 A e B). A presença de pontos fora dos limites podem representar a presença de cristais de fármaco, como relatado por Jornada e colaboradores (2012).

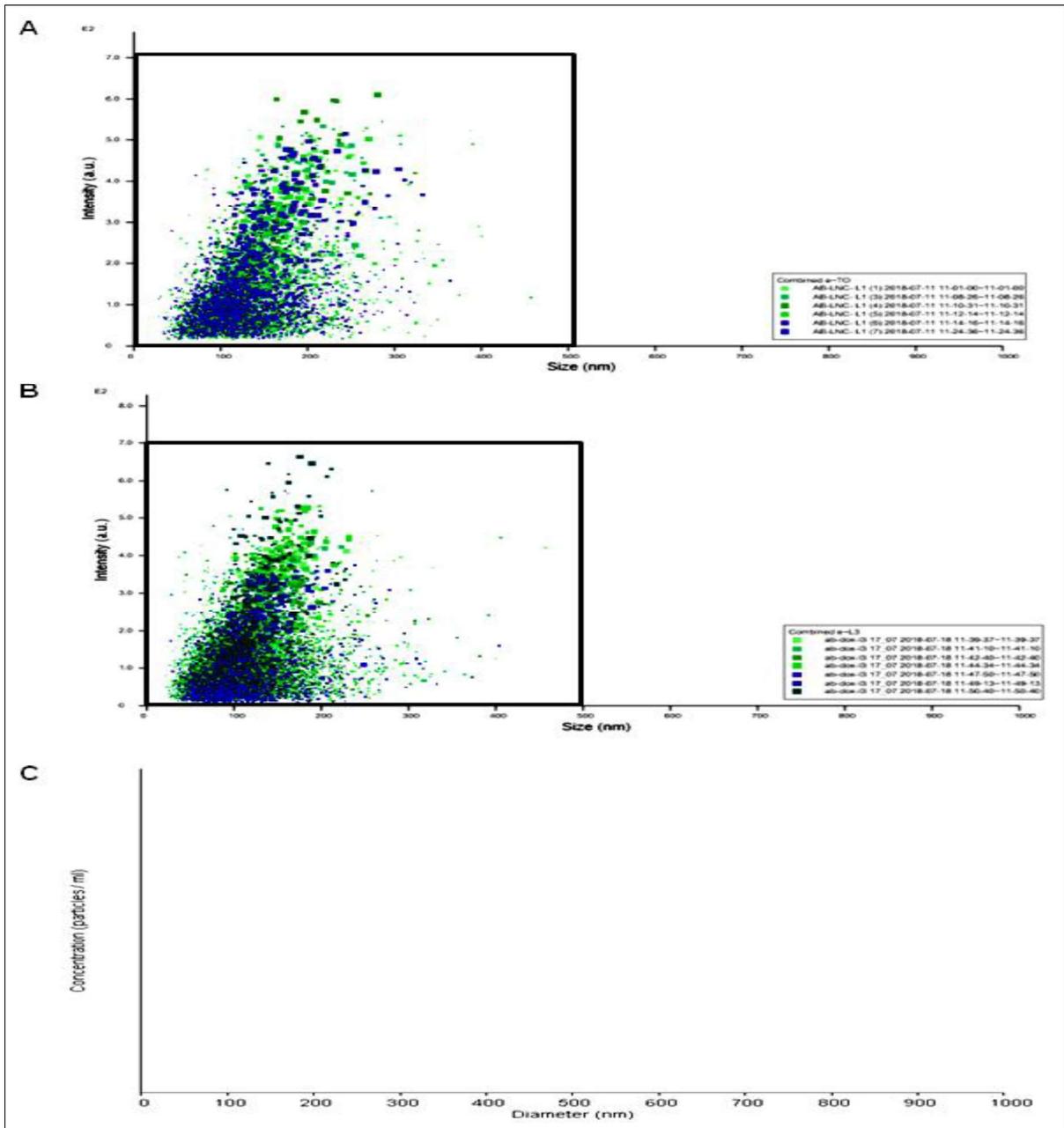


Figura 15: Gráficos de intensidade *versus* tamanho de partícula obtidos por NTA. AB-MLNC- (A), AB-DOX-MLNC- (B), Subtração das distribuições (C).

Contudo, não foram encontrados pontos fora desses limites e a análise de subtração dos pontos de dispersão do gráfico obtido para as formulações sem fármaco, daqueles com a formulação contendo doxorrubicina, não apresentaram pontos dispersos (Figuras 15, C e 16, C). Durante as análises da solução aquosa do cloridrato de doxorrubicina pelo NTA não foi possível evidenciar partículas com movimento Browniano e os gráficos de distribuição de partículas não possuíam indicações da presença de agregados (dados não apresentados).

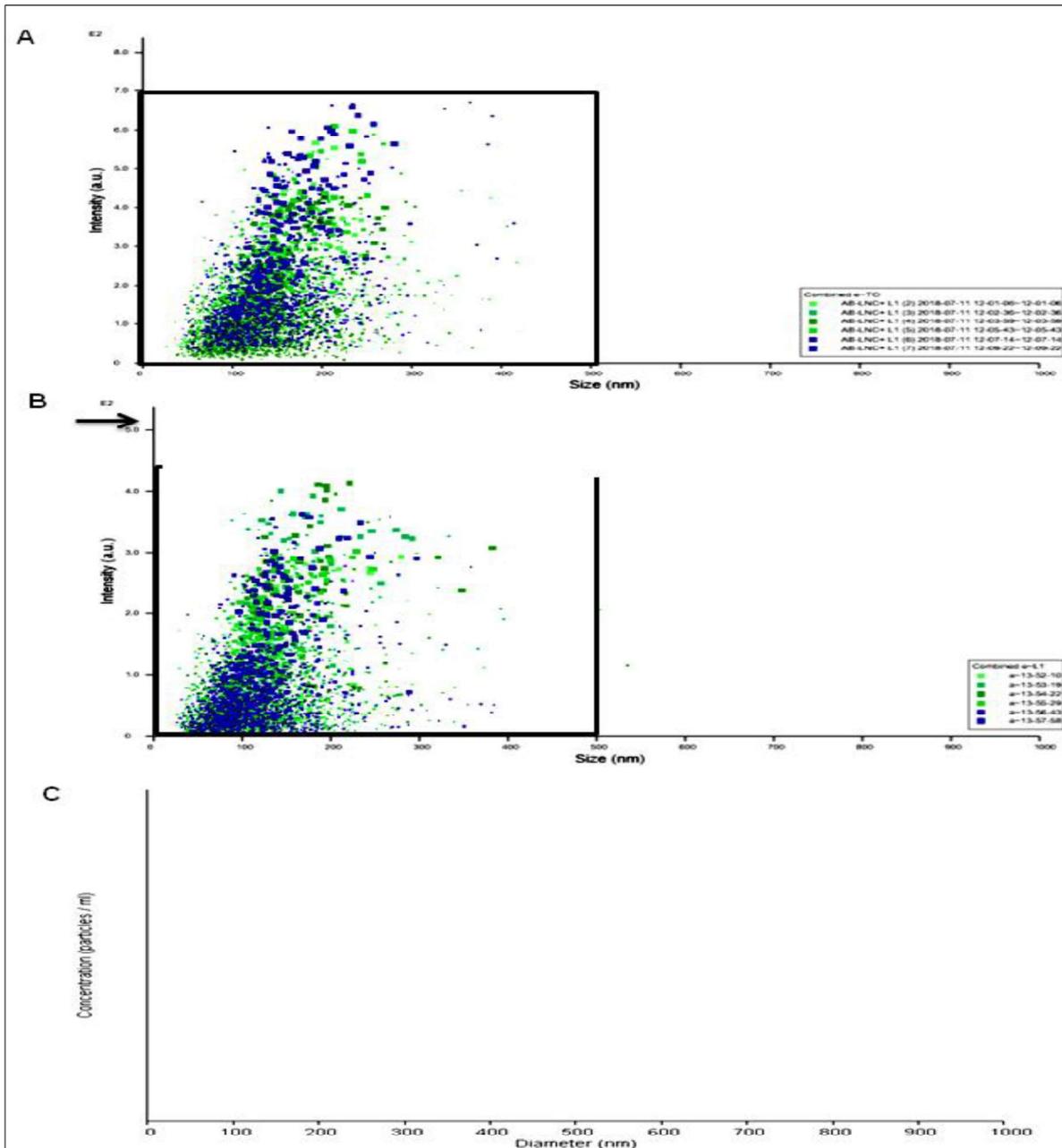


Figura 16: Gráficos de intensidade *versus* tamanho de partícula obtidos por NTA. A- AB-MLNC+ (A), AB-DOX-MLNC+ (B) (a flecha representa diferença na escala de intensidade), subtração dos espectros (C).

Há relatos na literatura que a doxorrubicina pode se agregar e formar cristais, mas isso é dependente da concentração da solução, além do pH, força iônica da solução e tempo de armazenamento, sendo que a forma não ionizada (neutra) da doxorrubicina favorece essa condição de agregação (ABRAHAN et al. 2005, MUNNIER et al. 2007). Contudo, Li et al. (1998) demonstram que em solução aquosa o cloridrato de doxorrubicina não forma agregados, corroborando com o presente estudo.

5.1.7. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho baseia-se na absorção da radiação eletromagnética na região infravermelha do espectro eletromagnético. Essa absorção faz com que as moléculas possam vibrar com maior rapidez e maior amplitude em torno das ligações covalentes que as unem. Assim, o momento dipolar da molécula se altera quando a vibração ocorre. Esta alteração pode gerar um sinal que é captado na forma de espectro. Assim, essa técnica pode auxiliar na identificação de diferentes grupos funcionais específicos presentes na amostra analisada, bem como obter informação da natureza específica das moléculas (PETIBOIS, DÉLÉRIS, 2006, PAVIA et al. 2010).

Neste contexto, a técnica espectroscópica foi utilizada para caracterizar a dispersão de nanocápsulas. Vale ressaltar que os resultados apresentados no presente trabalho são parciais e referem-se à formulação sem o fármaco, ou seja, AB-MLNC-RGD (Figura 17, A).

Foi utilizada a função da derivada do sinal para melhorar a identificação dos picos. Dessa forma, no intervalo de $3800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ o espectro apresentou modos vibracionais em 3502 cm^{-1} do modo longitudinal da hidroxila ($\nu \text{ OH}$), encontrou-se banda em 3452 cm^{-1} referente ao modo longitudinal do grupo NH relacionado a interações fracas ($\nu \text{ NH}$, ligação de hidrogênio), e em 3397 cm^{-1} o modo longitudinal da hidroxila ou o modo $\nu_{\text{as}} \text{ NH}$, que sofre interações de pontes de hidrogênio.

Foram observados no intervalo de $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ os modos vibracionais de hidrocarbonetos, em 2965 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} \text{ CH}_3$) referente ao modo assimétrico do grupo metila; 2923 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} \text{ CH}_2$) do modo longitudinal simétrico do grupo metileno; e em 2858 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{ CH}_2$) foi verificado o modo simétrico longitudinal do grupo metileno, descritos anteriormente por Oliveira e colaboradores (2017a) para as suspensões de MLNC, e por Abdelkader e colaboradores (2016) para a lecitina (LIPOID S75). Essas bandas se intensificaram após a adição de quitosana (dados não mostrados) devido a maior quantidade de grupos hidrocarbonetos. Também ocorrem alargamentos das bandas, em especial a banda a 2923 cm^{-1} , que se relaciona ao maior grau de desordem destes grupos funcionais.

Na região do espectro entre $1800 \text{ cm}^{-1} - 1480 \text{ cm}^{-1}$ foram identificadas bandas em 1729 e 1740 cm^{-1} ($\nu \text{ C=O}$), sendo a primeira banda relacionada à presença de grupo carbonila, grupo ceto. Enquanto que a última foi relatada por Abdelkader e

colaboradores (2016) como banda característica do Lipoid S75 (lecitina). No entanto, devido à complexidade do sistema pode haver contribuição de carbonilas de outros compostos. Além disso, observou-se o alongamento vibracional característico do alfa-bisabolol em 1646 cm^{-1} (ou Amida I), e a deflexão angular do cicloalceno ($\delta\text{ C=C}$) em 1678 cm^{-1} (OLIVEIRA et al. 2017b). (Figura 17, B). Ainda, verificou-se a presença do modo vibracional em 1628 cm^{-1} referentes aos grupamentos amina ($\nu\text{ -NH}_3^+$). Finalmente, foram identificadas bandas em 1581 cm^{-1} ($\delta\text{ NH}_2$ ou $\nu\text{ C-C}$, anel ou $\nu_{\text{as}}\text{ COO-}$), 1550 cm^{-1} ($\delta\text{ N-H}$, $\nu\text{ C-N}$ Amida II, $\nu_{\text{as}}\text{ COO-}$), a 1515 cm^{-1} ($\nu\text{ C-C}$, anel + $\delta\text{ C-H}$), a 1551 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{ COO-}$), a 1465 cm^{-1} ($\delta\text{ CH}_2$, $\delta\text{ CH}_3$), a 1427 cm^{-1} ($\delta\text{ C=O}$), 1396 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{ COO-}$).

Modos de ligação do grupo carboxilato podem ser determinados através da magnitude de separação das bandas dos modos longitudinais do grupo carboxilato assimétrico e simétrico ($\Delta = (\nu_{\text{as}}\text{ COO-}) - (\nu_{\text{s}}\text{ COO-})$) (ZELEŇÁK, VARGOVÁ, GYÖRYOVÁ, 2007). Dessa forma, ao verificar a diferença entre $\Delta = (1551\text{ cm}^{-1}\nu_{\text{as}}\text{ COO-}) - (1396\text{ cm}^{-1}\nu_{\text{s}}\text{ COO-}) = 155\text{ cm}^{-1}$, sugere-se que o grupo carboxilato na amostra encontram-se monodentado.

No intervalo de $1280 - 1000\text{ cm}^{-1}$ observaram-se os modos vibracionais relacionados à presença de fósforo. Assim, se identificou em 1244 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{ PO}_2^-$), em 1161 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{ C-O}$, CO—C-O ligações éster, $\nu\text{ C-O}$, $\gamma\text{ COH}$), e em 1093 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{ PO}_2^-$) a presença de modos ativos relacionados a fósforo da lecitina.

Os modos vibracionais observados indicam a presença de grupos característicos dos componentes da nanocápsula e de grupos funcionais que sugerem interação entre os componentes, como por exemplo, os modos vibracionais relacionados com pontes de hidrogênio e modo monodentado do carboxilato. Além disso, após a adição da quitosana ocorreu a intensificação de bandas na região correspondente as vibrações de hidrocarbonetos, sugerindo a sua interação com o sistema. No entanto, não foram identificadas as bandas características do modo vibracional Z-H (453 cm^{-1} e 524 cm^{-1}) (OLIVEIRA, et al. 2017a), dessa forma, não é possível inferir que ocorreu interação do zinco com a nanocápsula após a adição do acetato de zinco à formulação. Porém, esses são resultados preliminares e novas investigações serão realizadas para elucidar o tipo de interação entre os componentes da partícula.

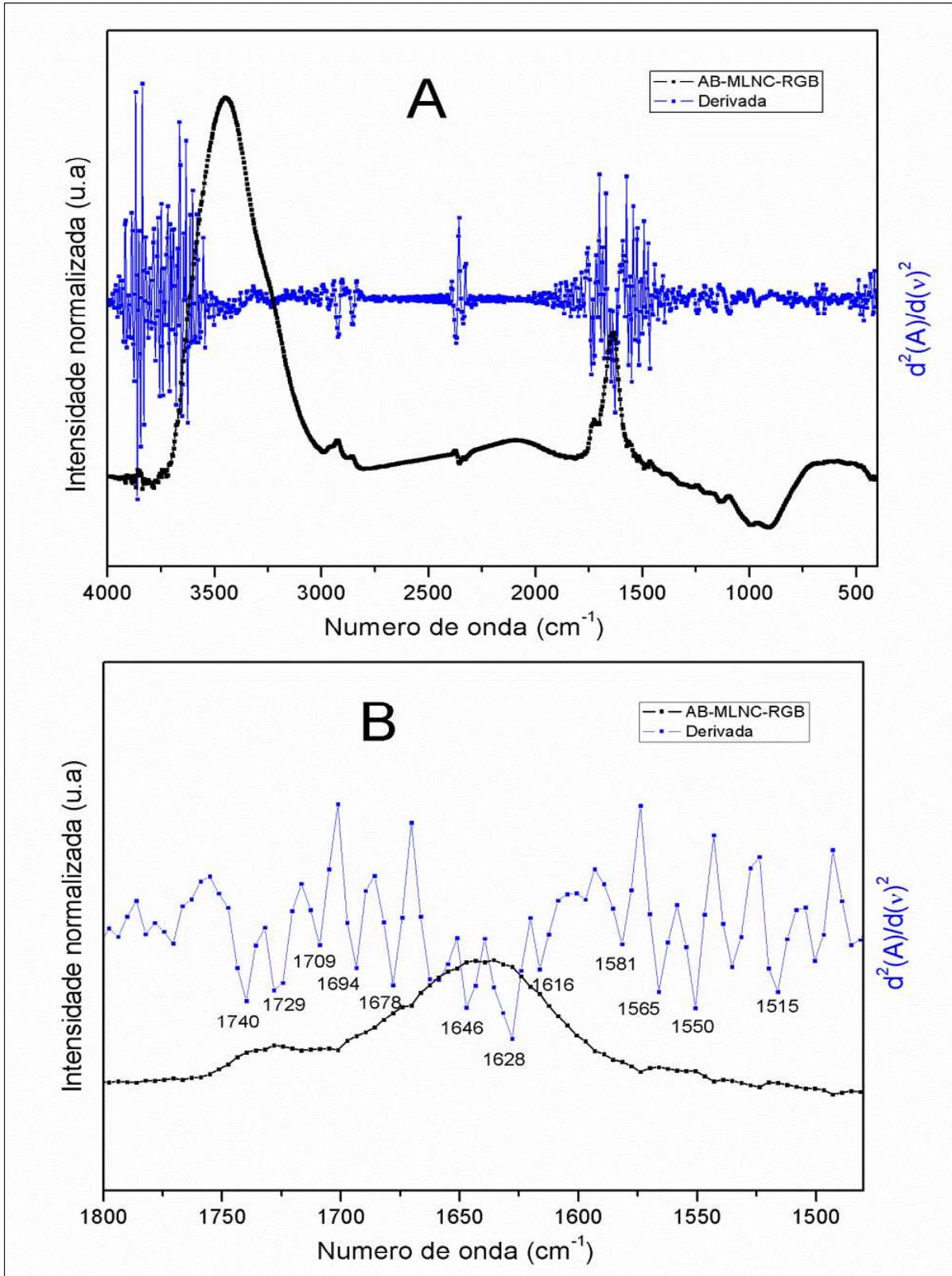


Figura 17: Espectro de infravermelho e da função derivada da amostra AB-MLNC-RGD no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} (A). Espectro da mesma amostra na região 1800-1480 cm^{-1} e de sua função derivada (B).

5.2. Avaliação biológica

5.2.1. Atividade antitumoral em linhagem celular de glioblastoma humano U87MG

A atividade antiproliferativa da formulação AB-DOX-MLNC-RGD foi avaliada em células de glioblastoma humano, linhagem U87MG, após 24 h de exposição. Foram aplicadas 6 concentrações diferentes da formulação, as quais estão discriminadas na tabela a seguir, juntamente com a densidade de partículas e concentrações de alfa-bisabolol, doxorrubicina e RGD correspondentes (Tabela 7). Para facilitar a compreensão, ao longo do texto os resultados serão descritos de acordo com a concentração de doxorrubicina presente na formulação (exemplo: AB-DOX-MLNC-RGD 0,5 corresponde a 0,5 $\mu\text{mol/L}$ de doxorrubicina). Também foram aplicadas diferentes concentrações de temozolomida solúvel em DMSO (100 a 500 $\mu\text{mol/L}$), além dos veículos (DMSO e água) a fim de comparar com a formulação desenvolvida.

Tabela 7: Concentrações de partículas, alfa-bisabolol (AB), doxorrubicina (DOX) e RGD aplicadas no ensaio de viabilidade celular.

Formulação	Conc. part. ($\mu\text{mol/L}$)	Conc. AB. ($\mu\text{mol/L}$)	Conc. DOX. ($\mu\text{mol/L}$)	Conc. RGD ($\mu\text{mol/L}$)
AB-DOX-MLNC-RGD 0,5	$7,79 \times 10^{-05}$	354,42	0,50	7,34
AB-DOX-MLNC-RGD 1,0	$1,57 \times 10^{-04}$	712,86	1,00	14,77
AB-DOX-MLNC-RGD 2,0	$3,12 \times 10^{-04}$	1421,70	2,00	29,45
AB-DOX-MLNC-RGD 3,0	$4,69 \times 10^{-04}$	2134,56,	3,00	44,22
AB-DOX-MLNC-RGD 4,0	$6,25 \times 10^{-04}$	2843,40	4,00	59,24
AB-DOX-MLNC-RGD 5,0	$7,81 \times 10^{-04}$	3556,26	5,00	73,68

AB. – alfa bisabolol, DOX. – doxorrubicina

Decorrido o tempo do tratamento, as concentrações 0,5, 2, 3, 4 e 5 $\mu\text{mol/L}$ de AB-DOX-MLNC-RGD apresentaram redução na viabilidade celular quando comparadas ao veículo 2 (água), a qual variou de $59 \pm 8,05\%$ a $40,30 \pm 2,62\%$ (Figura 18). Enquanto que, apenas a concentração de 200 $\mu\text{mol/L}$ do fármaco temozolomida apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) ao ser comparada à viabilidade das

células expostas ao DMSO (veículo 1), sendo a viabilidade celular após o tratamento igual a $69,13 \pm 11,88$ % (Figura 18).

Os dados observados para a formulação são semelhantes aos resultados encontrados anteriormente por Antonow e colaboradores (2018), quando da aplicação de nanocápsulas contendo TCC, doxorubicina e funcionalizadas com RGD em linhagem U87MG durante 24h. No trabalho de Antonow e colaboradores (2018), a viabilidade celular variou de 51 a 35 % após a aplicação da formulação contendo 1,7 a 17 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicina.

Percebe-se que no presente trabalho a viabilidade celular na maior concentração de doxorubicina aplicada (5 $\mu\text{mol/L}$) aproximou-se daquela encontrada por Antonow e colaboradores (2018) com a concentração de 17 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicina. Diante desses resultados pode-se propor que a combinação de doxorubicina, alfa-bisabolol e RGD proporciona maior atividade antiproliferativa à formulação quando se compara aquela desenvolvida por Antonow e colaboradores (2018), uma vez que foi necessária menor concentração de doxorubicina para se obter efeito antiproliferativo semelhante.

A dose responsável pela redução da viabilidade das células em 50 % (IC_{50}) determinada para a formulação AB-DOX-MLNC-RGD foi de 2,78 $\mu\text{mol/L}$. Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, utilizando LNCs (partículas sem funcionalização de superfície com RGD) contendo doxorubicina e TCC, o IC_{50} observado para células de câncer de mama (MCF-7) foi de 4,49 $\mu\text{mol/L}$ após 24h de exposição, valor próximo foi observado para a doxorubicina em solução 4,77 $\mu\text{mol/L}$ para a mesma linhagem (ANTONOW, 2016, ANTONOW et al. 2017). Quando empregadas LNCs contendo alfa-bisabolol, sem associação com outro fármaco ou substância ativa, o IC_{50} calculado foi de 4,57 μM , sendo este valor 19 vezes menor quando comparado ao alfa-bisabolol em solução (IC_{50} 88,46 μM) após aplicação em células de glioma de rato (C6) (TERROSO, 2014).

O menor valor de IC_{50} observado para a formulação desenvolvida no presente trabalho pode estar relacionado às distintas linhagens celulares investigados, bem como, pode ser um efeito da associação de alfa-bisabolol (via desestabilização de membranas) e doxorubicina (intercalante de DNA), além da funcionalização com RGD.

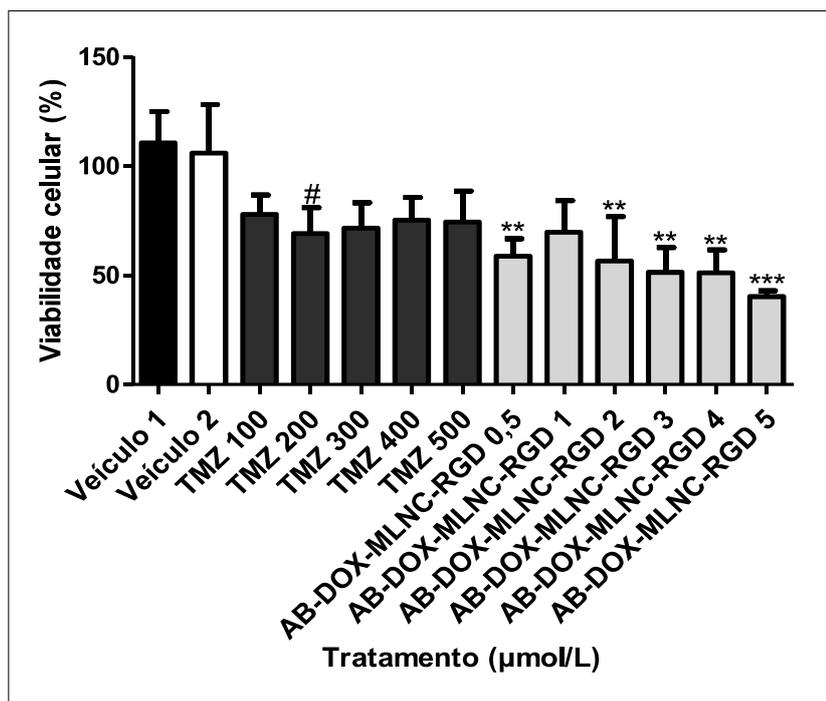


Figura 18: Viabilidade celular – MTT. Veículo 1 - DMSO, Veículo 2 - água, TMZ – temozolomida, # diferença em relação ao veículo 1 ($p < 0,05$); ** diferença em relação ao veículo 2 ($p < 0,01$); *** diferença em relação ao veículo 2 ($p < 0,001$).

Antonow e colaboradores (2018) demonstraram que a funcionalização de superfície das nanocápsulas de núcleo lipídico com o tripeptídeo RGD influencia na viabilidade celular de células com alta expressão de integrinas, como a linhagem U87MG. A presença do peptídeo pode facilitar a internalização celular via reconhecimento ligante-receptor, uma vez que em testes com a nanocápsula marcada com rodamina o sinal de fluorescência foi maior do que em células com baixa expressão de integrinas $\alpha\beta3$. Além disso, Buckeley e colaboradores (1993) demonstraram que peptídeos contendo a sequência RGD, ao serem internalizados, podem desencadear a ativação de caspase-3, levando à apoptose. A ativação de apoptose também é relatada para células proliferativas vasculares após entrar em contato com RGD (BROOKS et al. 1994).

Song e colaboradores (2016) verificaram que a presença do peptídeo (RGD cíclico) promove maior entrega (2 vezes mais do que a partícula sem o peptídeo) de fármaco em modelos de xenoinxertos com células de U87MG. O reconhecimento e entrega específica também foi relatado, por Song e colaboradores (2017), para lipossomas conjugados com RGD (RDG-Lipo-PEG/Apa) contendo apatinib, avaliados frente à cultura de células de câncer de colorretal (linhagem HCT116). Também houve redução do IC_{50} quando da aplicação da partícula com RGD ($1,33 \mu\text{M}$) ao ser

comparado com o fármaco livre (14,83 μM), e o lipossoma não conjugado com RGD (4,96 μM), porém o tempo de exposição foi de 48h. Os resultados *in vivo* demonstram maior redução do tumor nos animais (xenoenerto de HCT116) tratados com RDG-Lipo-PEG/Apa.

Zhang e colaboradores (2010) também observaram a redução do IC_{50} após a aplicação de lipossomas modificados com RGD e contendo a combinação de fármacos, combrestatina CA-4 e doxorubicina, em células B16F10 (melanoma) (0,06 μM). O lipossoma não funcionalizado apresentou menor atividade antiproliferativa mesmo quando continha a co-encapsulação de fármacos (0,10 μM). Enquanto que, a doxorubicina livre apresentou IC_{50} de 0,11 μM após incubação de 36h.

O IC_{50} para o tratamento com temozolomida, no presente estudo, foi de 860,22 $\mu\text{mol/L}$, ou seja, aproximadamente 300 vezes maior do que aquele encontrado para a formulação. No entanto, deve-se ter parcimônia na interpretação desses resultados, pois valores elevados de IC_{50} são descritos na literatura para a linhagem U87MG tratada com temozolomida (TMZ) (LEE, 2016).

Apesar da linhagem U87MG ser considerada sensível ao tratamento com temozolomida ocorrem discrepâncias entre os trabalhos publicados quanto ao IC_{50} para o tratamento com TMZ, pois há relatos de IC_{50} próximos a 10 μM , bem como valores mais altos que 500 μM (revisado em LEE, 2016). Valores elevados no IC_{50} podem estar relacionados a mecanismos de resistência a morte celular. Annovazzi e colaboradores (2015) avaliaram 16 cultivos celulares quanto a citotoxicidade após exposição à temozolomida, doxorubicina e paclitaxel. Além disso, marcadores de resistência à morte celular foram investigados.

Diferentemente do que foi encontrado no presente trabalho, Annovazzi e colaboradores (2015) descreveram IC_{50} de 45 μM quando a linhagem U87MG foi exposta a temozolomida. Além disso, os autores relatam que nessa linhagem o promotor MGMT encontra-se metilado e por isso essa é uma linhagem considerada sensível ao tratamento. O IC_{50} relatado para a doxorubicina foi de apenas 0,72 μM . Outro fator importante abordado pelos autores foi a forma de manutenção do cultivo celular, ou seja, como células aderentes ou em neuroesferas. A forma de neuroesferas mostrou-se mais resistentes ao tratamento com ambos os fármacos, com IC_{50} de 170 μM e 0,92 μM para a temozolomida e doxorubicina, respectivamente. Esses dados propõem que diferentes métodos de cultivo podem fornecer resultados distintos.

Apesar dessas singularidades nos ensaios *in vitro* a temozolomida ainda é um fármaco amplamente utilizado na clínica como quimioterapia, isso se deve ao fato de ser um quimioterápico de administração oral que possui alta biodisponibilidade e ainda possui a capacidade de transpor a BHE (FRIEDMAN, KERBY, CALVERT, 2000).

No entanto, existem mecanismos de resistência à morte nas células tumorais que dificultam o tratamento com a temozolomida. Neste contexto, é necessário buscar novas alternativas para o tratamento de gliomas. De acordo com os resultados apresentados, a formulação desenvolvida no presente trabalho apresenta características físico-químicas e também atividade antiproliferativa *in vitro* que fazem desta uma candidata para novos ensaios pré-clínicos, visando futuramente, a sua aplicação para o tratamento de glioblastoma.

5.2.2. Atividade antiangiogênica em modelo de membrana corioalantoide de ovos embrionados

A atividade antiangiogênica das formulações foi avaliada no ensaio de membrana corioalantoide de ovos embrionados. A membrana corioalantoide é um anexo extraembrionário, rico em vasos sanguíneos, que é responsável pelas trocas gasosas do embrião durante o seu desenvolvimento. Assim como o embrião, os vasos da CAM se desenvolvem e modificam-se ao longo dos dias de incubação, dessa forma, os vasos sanguíneos presentes na CAM são imaturos até o oitavo dia de incubação, pois não possuem todas as camadas teciduais que caracterizam os vasos maduros (RIBATTI, 2008). Assim, substâncias que induzem o processo angiogênico ou o inibem podem ser avaliados após a aplicação na membrana corioalantoide. Implantes de células cancerígenas também podem ser inseridos na CAM, e com isso ensaios para verificar o processo de formação de novos vasos, relacionado ao microambiente tumoral, podem ser desenvolvidos (RIBATTI, 2016).

Neste contexto, foram avaliadas as formulações AB-MLNC+, AB-MLNC-RGD e AB-DOX-MLNC-RGD quanto a sua influência na atividade angiogênica da CAM. Foram investigadas três concentrações diferentes para cada formulação, conforme discriminado na Tabela 8. As aplicações foram realizadas sobre a membrana corioalantoide, no sexto dia de incubação e as imagens foram capturadas no tempo 0, tempo 24 e tempo 48, após a abertura da casca e aplicação do tratamento.

Tabela 8: Concentrações de partículas, alfa-bisabolol (AB), doxorubicina (DOX) e RGD aplicadas no ensaio de membrana corioalantoide.

Grupo (conc. de part. $\times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$)	Conc. part. ($\mu\text{mol/L}$)	Conc. AB. ($\mu\text{mol/L}$)	Conc. DOX. ($\mu\text{mol/L}$)	Conc. RGD ($\mu\text{mol/L}$)
Controle (soro fisiológico)	-	-	-	-
AB-LNC⁺ ($2,21 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$)	$2,21 \times 10^{-3}$	10068,70	-	-
AB-LNC⁺ ($4,42 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$)	$4,42 \times 10^{-3}$	20137,39	-	-
AB-LNC⁺ ($8,85 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$)	$8,85 \times 10^{-3}$	40274,78	-	-
AB-MLNC-RGD ($2,03 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$)	$2,03 \times 10^{-3}$	10068,70	-	208,60
AB-MLNC-RGD ($4,06 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$)	$4,06 \times 10^{-3}$	20137,39	-	416,20
AB-MLNC-RGD ($8,12 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$)	$8,12 \times 10^{-3}$	40274,78	-	834,40
AB-DOX-MLNC-RGD ($2,04 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$)	$2,04 \times 10^{-3}$	10068,70	14,16	208,60
AB-DOX-MLNC-RGD ($4,08 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$)	$4,08 \times 10^{-3}$	20137,39	28,32	416,20
AB-DOX-MLNC-RGD ($8,17 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$)	$8,17 \times 10^{-3}$	40274,78	56,65	834,40

Vale ressaltar que as análises das imagens capturadas foram realizadas com base no número médio de pixels na escala de cinza, a qual varia de 0 (preto) a 255 (branco). Assim, o efeito angiogênico pode ser observado pela redução do valor médio de pixels na escala de cinza enquanto que, o efeito antiangiogênico é caracterizado pelo aumento no valor médio de pixels na escala de cinza.

Levando isso em consideração e de acordo com dados apresentados na Figura 19, observa-se que a formação de novos vasos, após 24h de exposição, ocorre de forma significativa para todas as concentrações testadas das formulações AB-MLNC-RGD, AB-DOX-MLNC-RGD e para a maior concentração de AB-MLNC+. O desenvolvimento expressivo de vasos entre o sexto e oitavo dia de incubação está relacionado com a alta expressão de fatores como VEGF e FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos) (BAUM et al. 2010, MARINACCIO NICO, RIBATTI, 2013, RIBATTI, 2016), os quais estão diretamente relacionados ao processo de angiogênese.

No entanto, em 24h não foi verificada diferença significativa na formação de novos vasos para as formulações AB-MLNC+ ($2,21 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$) e AB-MLNC+ ($4,42 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$)

quando comparadas ao T0 dos seus respectivos grupos. Contudo, ao avaliar as imagens (Figura 20, B e C, respectivamente) observa-se que novos vasos estão presentes na CAM após esse período, indicando que o processo de angiogênese não foi interrompido, apenas se mostrou mais lento, uma vez que em 48h, para todas as concentrações de AB-MLNC+, foram registradas diferenças significativas no crescimento de vasos ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Essas diferenças nos estágios de desenvolvimento dos embriões e, conseqüentemente, dos anexos embrionários podem ocorrer devido à variação natural nos tamanhos dos ovos, mudanças sazonais na viabilidade e vigor do embrião, além de diferenças entre o tempo de coleta e posterior incubação dos ovos (HAMBURGER, HAMILTON, 1951).

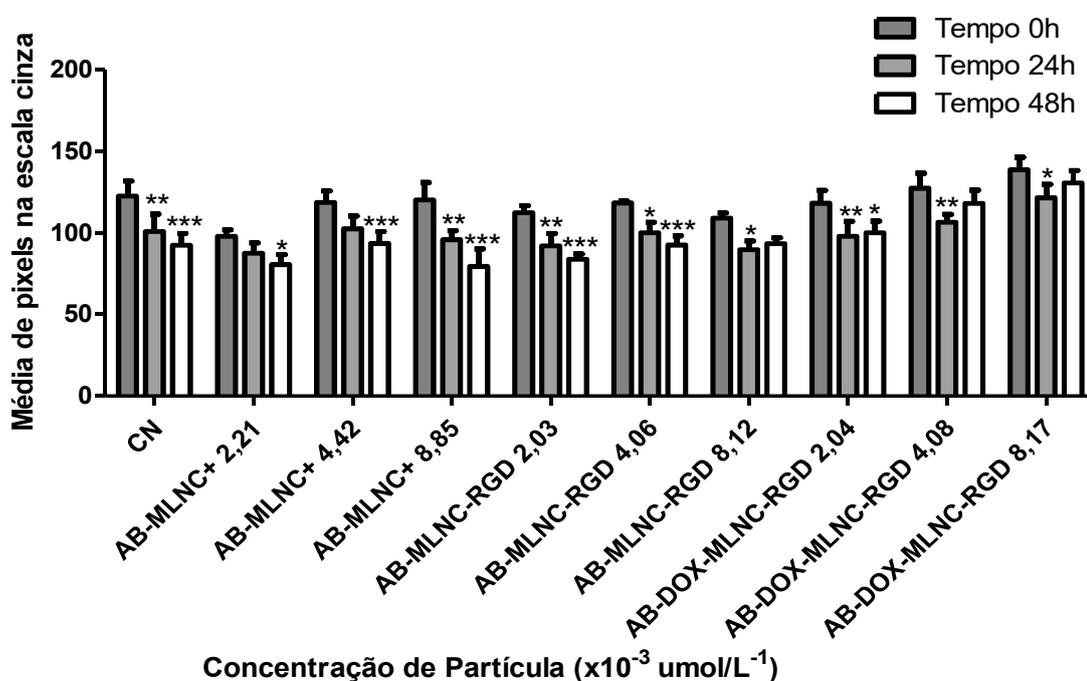


Figura 19: Ensaio em membrana corioalantoide. As diferenças estatísticas são expressas em relação ao tempo 0 h de cada um dos grupos. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

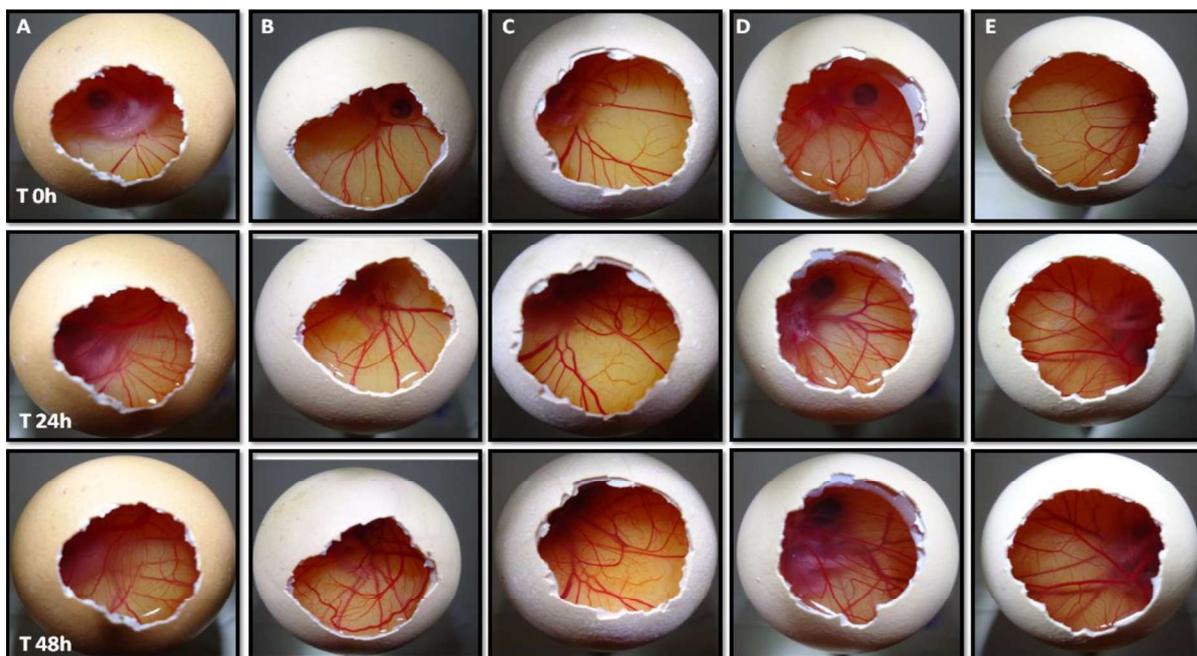


Figura 20: Imagens representativas dos ensaios em membrana corioalantoide. Cada coluna representa um grupo diferente, enquanto que as linhas representam tempos distintos de captura da imagem. Controle negativo (A); AB-MLNC+ ($2,21 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$) (B), AB-MLNC+ ($4,42 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$) (C); AB-MLNC+ ($8,85 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$) (D); AB-MLNC-RGD ($2,03 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$) (E).

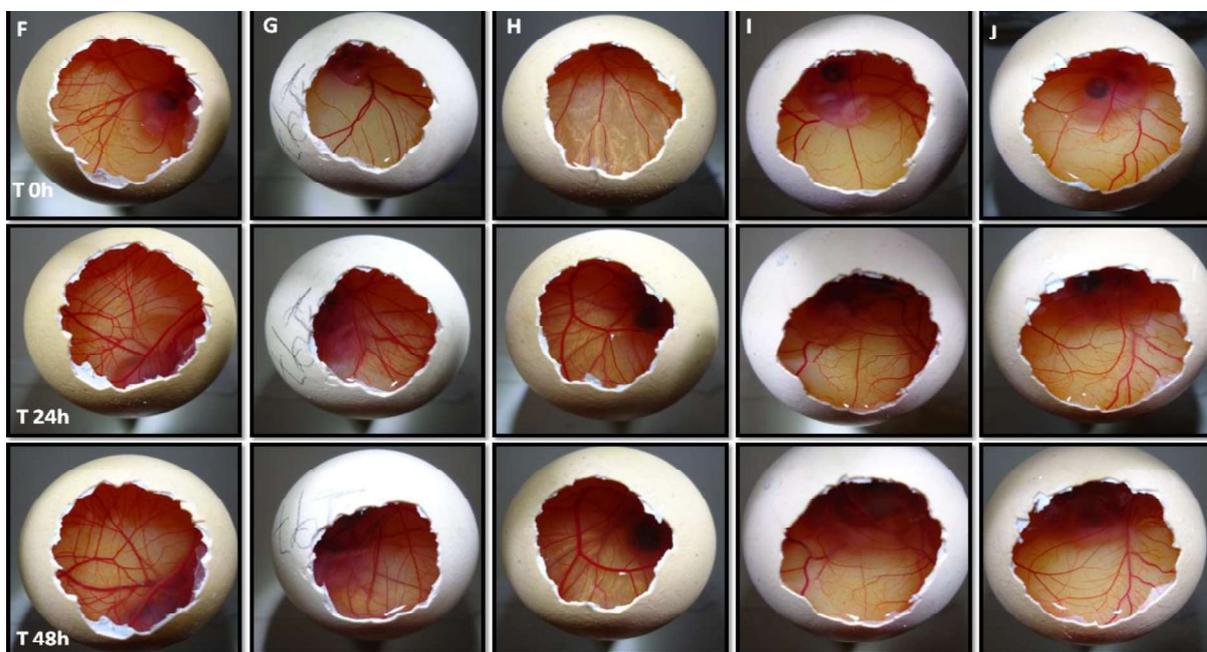


Figura 21: Imagens representativas dos ensaios em membrana corioalantoide. Cada coluna representa um grupo diferente, enquanto que as linhas representam tempos distintos de captura da imagem. AB-MLNC-RGD ($4,06 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$) (F); AB-MLNC-RGD ($8,12 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$) (G); AB-DOX-MLNC-RGD ($2,04 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$) (H); AB-DOX-MLNC-RGD ($4,08 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$) (I); AB-DOX-MLNC-RGD ($8,17 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$) (J).

Em 48h, a maior concentração da formulação AB-MLNC-RGD ($8,12 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$), bem como, as concentrações AB-DOX-MLNC-RGD ($4,08 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$) e AB-DOX-MLNC-RGD ($8,17 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$) não diferiram significativamente do T0 de seus respectivos grupos. Isso sugere inibição do processo angiogênico, uma vez que em 24h havia diferença significativa em relação ao tempo 0 ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Nas imagens (Figura 21, G, I, J) podem ser observadas diferenças ao longo do tempo, em 24h percebe-se a presença de capilares, os quais não são visíveis em 48h, conseqüentemente ocorre aumento da média de pixels na escala de cinza.

Levando em consideração a presença do tripeptídeo nessas formulações, esses resultados podem refletir a influência do mesmo no processo angiogênico. Em 1994 (b), Brooks e colaboradores evidenciaram que a aplicação de peptídeo cíclico contendo RGD possuía a capacidade de inibir a formação de novos vasos por induzir apoptose das células endoteliais proliferativas via reconhecimento de integrinas $\alpha\beta_3$, sem afetar vasos já estabelecidos. A importância das integrinas $\alpha\beta_3$ no desenvolvimento da rede de vasos da CAM foi demonstrado anteriormente pelos mesmos autores (BROOKS et al. 1994a). A inibição da angiogênese também foi observada por Conconi e colaboradores (2010) quando da aplicação do peptídeo linear GRGDSP e o tripetídeo RGD em membrana corioalantoide.

Em 2005, Belvise e colaboradores também verificaram que a aplicação de peptídeos, contendo a sequência RGD, na CAM apresenta atividade inibitória ao crescimento de novos vasos. Ainda, a aplicação desses peptídeos não afetou a viabilidade do embrião, indicando baixa toxicidade desses compostos. Esses dados corroboram com o que foi observado durante a execução do presente trabalho, uma vez que não foram identificados sinais de toxicidade após a aplicação das formulações, pois os embriões se mantiveram vivos até o final do experimento e mantiveram também, os movimentos e morfologia característica (observação visual). Importante destacar que alguns embriões morreram ao longo dos ensaios, porém quando esse fato era registrado, os ovos apresentavam sinais de escoamento de albumina pela casca. Isso ocorre devido às irregularidades da abertura da mesma e ao manuseio dos embriões.

Além disso, observa-se que a formulação contendo doxorrubicina apresenta atividade antiangiogênica até mesmo na concentração intermediária (AB-DOX-MLNC-RGD($4,08 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$)) aplicada, uma vez que em 48 h também não verificou-se diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado ao seu respectivo T0. Esse resultado sugere

que a doxorubicina pode exercer uma função antiproliferativa, uma vez que essa substância possui a capacidade de intercalar-se no DNA e assim impede a replicação do material genético (YANG et al. 2014), atuando de forma simultânea a inibição provocada pelo RGD. A atividade antiangiogênica da doxorubicina nesse período de desenvolvimento embrionário é favorecida, uma vez que as células vasculares estão em elevada atividade mitótica, a qual permanece até o décimo dia de incubação (AUSPRUNK, KNIGHTON, FOLKMAN, 1974, RIBATTI et al. 2001). Esse evento mimetiza a proliferação celular endotelial que ocorre no microambiente tumoral.

A capacidade antiangiogênica da doxorubicina foi demonstrada por Zhang e colaboradores (2002). Os autores verificaram que a aplicação de baixas concentrações de doxorubicina em cultivos celulares de HUVEC reduz a viabilidade das mesmas e diminui atividade migratória, proliferação celular e formação de tubo capilar *in vitro*. Essa atividade se intensifica quando da aplicação concomitante do anticorpo monoclonal DC101 anti-L1k-1. Além disso, quando avaliada a densidade de vasos em xenoenxertos de leiomiossarcoma (SKLMS-1), após aplicação de baixas de doxorubicina em combinação com o anticorpo monoclonal DC101 anti-L1k-1 ocorreu maior redução quando comparado com a aplicação do anticorpo de forma isolada. Os autores relacionaram a atividade antiangiogênica da doxorubicina a ativação de caspase 3 e conseqüentemente, apoptose.

Nanopartículas poliméricas (carboximetilcelulose) conjugadas a doxorubicina e ao RGD foram propostas por Mansur e colaboradores (2018). Essas nanopartículas foram avaliadas em ensaio CAM demonstrando que a dupla conjugação (doxorubicina/RGD) promove a redução no número de vasos quando comparado ao controle (PBS). Outro efeito observado foi a capacidade de diminuir a toxicidade da doxorubicina, uma vez que quando está foi aplicada isoladamente, em altas doses, provocou a morte dos embriões. *In vitro* a formulação apresentou citotoxicidade para diferentes linhagens tumorais (U87MG, MCF-7 e SAOS – osteosarcoma humano imortalizado), no entanto, a conjugação mostrou-se protetiva a toxicidade da doxorubicina ao ser aplicado em células normais (HEK 293T – células renais embrionárias humanas), quando comparado ao fármaco livre.

Vu e colaboradores (2018) também aplicaram (via intravenosa) nanopartículas biodegradáveis (PMO organosílica mesoporosa periódica) em vasos da membrana corioalantoide, porém com objetivo de avaliar a redução tumoral (xenoenxerto de células Ov8GFP- câncer de ovário) e a toxicidade da doxorubicina quando em

solução e após a encapsulação. Os autores verificaram redução do tumor após 3 dias da aplicação das formulações. Além disso, o fígado, rins, intestino e coração dos embriões tratados com a formulação não apresentaram deformação morfológica, o que era observado nos órgãos dos embriões tratados com doxorubicina em solução. Ainda, a dose mais alta (200 µg/mL) de doxorubicina provocou a morte de 100 % dos embriões, o que não foi verificado no grupo tratado com a partícula contendo a mesma concentração do fármaco em solução. Quando da investigação da distribuição da partícula conjugada com sonda fluorescente nos diferentes órgãos e no tumor, verificou-se tropismo da partícula para a região tumoral, com baixa distribuição nos órgãos do embrião.

Roma-Rodrigues e colaboradores (2016) aplicaram nanopartículas de ouro (AuNPs) conjugadas com diferentes peptídeos (P1, P2- mistura dos dois peptídeos e P-3), além dos peptídeos em solução em membrana corioalantoide (*ex ovo* – embrião cultivado fora da casca, em suporte específico). Os autores constataram que P1 promoveu atividade angiogênica, P3 antiangiogênica e a mistura dos peptídeos promoveu resposta intermediária. Além disso, verificaram que a conjugação dos peptídeos a nanopartícula aumenta a resposta *in vivo*, sem toxicidade aparente. Os autores atribuem isso ao reconhecimento específico entre os peptídeo e receptores celulares, o que melhora à internalização da partícula pelas células. O acoplamento dos peptídeos à nanopartícula permite a concentração de várias moléculas do peptídeo em um mesmo local, aumentando assim as chances de promover atividade biológica.

Os resultados do presente estudo demonstram que o tripeptídeo RGD pode ser utilizado como uma molécula para reconhecimento de moléculas na superfície celular e como via de entrega específica de fármacos, uma vez que a formulação desenvolvida foi capaz de reduzir a viabilidade celular de células tumorais com alta expressão de integrina $\alpha\beta3$ e ainda promoveu a atividade antiangiogênica, sem toxicidade aparente para os embriões expostos a formulação.

No entanto, novos estudos deverão ser desenvolvidos para compreender os mecanismos pelos quais a nanocápsula promove esses efeitos, bem como estudos complementares *in vivo* para conhecer a sua ação sobre o desenvolvimento tumoral, assim como, nos processos angiogênicos relacionados diretamente ao tumor, além da investigação da toxicidade em diferentes órgãos.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados anteriormente apresentados, pode-se concluir que os objetivos propostos para o presente trabalho foram atingidos, pois foi possível desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico contendo no núcleo a combinação de doxorubicina e alfa-bisabolol, sem a necessidade de etapa prévia de extração da base da doxorubicina, com características físico-químicas adequadas para formulações nanotecnológicas visando a aplicação biológica.

Ainda, a ligação do RGD a superfície foi efetiva atingindo aproximadamente 92% o que se traduz em $9,42 \times 10^4$ moléculas de RGD por cápsula. Considerando a eficiência de encapsulação da doxorubicina e do alfa-bisabolol, cada nanocápsula contém $4,9 \times 10^6$ moléculas do óleo e $4,5 \times 10^3$ do fármaco. Aliado a isso a formulação AB-DOX-MLNC-RGD apresentou atividade antitumoral *in vitro* frente à linhagem U87MG e atividade antiangiogênica *in vivo* avaliada por CAM, sem provocar a mortalidade do embrião, fazendo desta formulação uma candidata promissora para novos ensaios pré-clínicos para o tratamento de glioma.

7. PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

A fim de elucidar a morfologia da partícula, a formulação AB-DOX-MLNC-RGD será submetida a caracterização por microscopia eletrônica de transmissão. Ainda, serão realizadas as análises por FT-IR das formulações contendo doxorrubicina.

Em trabalhos futuros, poderá ser investigada a ação antitumoral da formulação frente a outras linhagens celulares de glioblastoma, bem como, de outros tipos tumorais. Além disso, serão realizados ensaios para investigar a internalização das partículas pelas células tumorais, os mecanismos de morte e mecanismos antiproliferativos desencadeados pela formulação. Também serão investigados os efeitos da formulação em células não tumorais (seletividade).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS

ABDELKADER, H. et al. Phytosome-hyaluronic acid systems for ocular delivery of L-carnosine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 2815, 2016.

ABRAHAM, S. A. et al. The liposomal formulation of doxorubicin. **Methods in Enzymology**. Academic Press, p. 71-97, 2005.

ACS, American Cancer Society. About Brain and Spinal Cord Tumor in Adults. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8567.00.pdf>>. Acesso em: 09 de julho de 2017.

ADOBE PHOTOSHOP Disponível em:<<https://www.adobe.com>>.

ADORNE, Márcia. One-pot síntese de nanocápsulas multiparedes funcionalizadas com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL(-): otimização do processo e seleção de formulação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2014.

ALANKO, J. et al. Integrin endosomal signalling suppresses anoikis. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 11, p. 1412, 2015.

ALBERTTI, L. A. G. et al. Identification of the Bisabolol Synthase in the Endangered Candeia Tree (*Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch). **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

ALPHANDÉRY, E. Glioblastoma treatments: An account of recent industrial developments. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

AMIRIAN, E. S. et al. Aspirin, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), and Glioma Risk: Original Data from the Glioma International Case-Control Study and a Meta-Analysis. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, p. cebp. 0702.2018, 2018.

ANATPAT. Glioblastoma multiforme: disponível em:<<http://anatpat.unicamp.br/lamneuro14.html>>. Acesso em: 27 de novembro de 2019.

ANNOVAZZI, L. et al. The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment. **International Journal of Oncology**, v. 46, n. 6, p. 2299-2308, 2015.

ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S. Nanoparticles in the clinic. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 1, n. 1, p. 10-29, 2016.

ANTONOW, M. B. et al. Liquid formulation containing doxorubicin-loaded lipid-core nanocapsules: Cytotoxicity in human breast cancer cell line and in vitro uptake mechanism. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 374-382, 2017.

ANTONOW, M. et al. Arginylglycylaspartic Acid-Surface-Functionalized Doxorubicin-Loaded Lipid-Core Nanocapsules as a Strategy to Target Alpha (V) Beta (3) Integrin Expressed on Tumor Cells. **Nanomaterials**, v. 8, n. 1, p. 2, 2018.

ANTONOW, Michelli Barcelos. Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanocápsulas multiparedes complexadas com zinco e funcionalizadas com RGD para reconhecimento por integrinas $\alpha\beta3$ presentes em células tumorais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) 2016.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução Da Diretoria Colegiada - Rdc N° 166, De 24 De Julho De 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

AUSPRUNK, D. H.; KNIGHTON, D. R.; FOLKMAN, J. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. **Developmental Biology**, v. 38, n. 2, p. 237-248, 1974.

AVRAAMIDES, C. J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J. A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 8, p. 604-617, 2008.

BARENHOLZ, Y. C. Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 117-134, 2012.

BAUM, O. et al. VEGF-A Promotes Intussusceptive Angiogenesis in the Developing Chicken Chorioallantoic Membrane. **Microcirculation**, v. 17, n. 6, p. 447-457, 2010.

BELHADJ, Z. et al. Multifunctional targeted liposomal drug delivery for efficient glioblastoma treatment. **Oncotarget**, v. 8, n. 40, p. 66889, 2017.

BELVISI, L. et al. Biological and molecular properties of a new $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ integrin antagonist. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 11, p. 1670-1680, 2005.

BENDER, E. A. et al. Hemocompatibility of poly (ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, n. 1, p. 271-279, 2012.

BENDER, E. A. et al. New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL (-)-functionalized nanocapsules. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 11, p. 2975-2987, 2014.

BERNARDI, A. et al. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters**, v. 281, n. 1, p. 53-63, 2009.

BERNARDI, A. et al. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: an in vitro study. **European Journal of Pharmacology**, v. 586, n. 1, p. 24-34, 2008.

BERNARDI, A. et al. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and inhibition of survival pathways. **International Journal of Nanomedicine**. Auckland, **DOVE Medical Press**. v. 8, p. 711-729, 2013.

BHAL, S. K. Lipophilicity descriptors: Understanding when to use logP & logD. **ACD/Labs PhysChem Software Application Notes**, 2007.

BHATIA, S. P. et al. Fragrance material review on α -bisabolol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. S72-S76, 2008.

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

BIANCHIN, M. D. et al. Radar charts based on particle sizing as an approach to establish the fingerprints of polymeric nanoparticles in aqueous formulations. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 30, p. 180-189, 2015.

BIANCONI, D.; UNSELD, M.; PRAGER, G. Integrins in the Spotlight of Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2037, 2016.

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, 2015.

BONIFACIO, M. et al. α -bisabolol is an effective proapoptotic agent against BCR-ABL+ cells in synergism with Imatinib and Nilotinib. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e46674, 2012.

BROOKS, P. C.; CLARK, R. A.; CHERESH, D. A. Requirement of vascular integrin α -v β -3 for angiogenesis. **Science**, v. 264, n. 5158, p. 569-572, 1994a.

BROOKS, P. C. et al. Integrin α v β 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1157-1164, 1994b.

BUCKLEY, C. D. et al. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. **Nature**, v. 397, n. 6719, p. 534, 1999.

CALGAROTO, S. et al. Chemical stability, mass loss and hydrolysis mechanism of sterile and non-sterile lipid-core nanocapsules: the influence of the molar mass of the polymer wall. **Reactive and Functional Polymers**, v. 133, p. 161-172, 2018.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. et al. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 522-528, 2011.

CATTANI, V. B. et al. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 1-3, p. 116-124, 2010.

CAVALCANTE, M. F. et al. A nanoformulation containing a scFv reactive to electronegative LDL inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 107, p. 120-129, 2016.

CAVALIERI, E. et al. Involvement of mitochondrial permeability transition pore opening in α -bisabolol induced apoptosis. **FEBS Journal**, v. 276, n. 15, p. 3990-4000, 2009.

CAVALIERI, E. et al. α -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, n. 3, p. 589-594, 2004.

CÉ, R. et al. Chitosan-coated dapson-loaded lipid-core nanocapsules: Growth inhibition of clinical isolates, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus* ssp.. **Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 511, p. 153-161, 2016.

CERNA, T. et al. Nanocarrier drugs in the treatment of brain tumors. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment: Volume**, v. 2, p. 408, 2016.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados - Brasília, v. 1, p.49 2012. Disponível em: <<http://portal.cfmv.gov.br/uploads/files/Guia%20de%20Boas%20Pr%C3%A1ticas%20para%20Eutanasia.pdf>>. Acesso em: 22 de julho de 2017.

CHARÃO, M. F. et al. Protective effects of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat-induced cytotoxicity and genotoxicity in a pulmonary cell line. **Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 784, p. 1-9, 2015.

CHEMICALIZE. Disponível em: <<https://chemicalize.com/>>.

CHEN, K.; CHEN, X. Integrin targeted delivery of chemotherapeutics. **Theranostics**, v. 1, p. 189, 2011.

CHITTASUPHO, C. et al. Targeted delivery of doxorubicin to A549 lung cancer cells by CXCR4 antagonist conjugated PLGA nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 2, p. 529-538, 2014.

COHEN, A. L.; HOLMEN, S. L.; COLMAN, H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 13, n. 5, p. 345, 2013.

CONCONI, M. T. et al. Effects on in vitro and in vivo angiogenesis induced by small peptides carrying adhesion sequences. **Journal of Peptide Science**, v. 16, n. 7, p. 349-357, 2010.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 10, p. 584, 2015.

CRUZ, L. et al. Physico-chemical characterization and in vivo evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, interfacial alkaline hydrolysis and antiedematogenic activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 3154-3162, 2006.

D'ALMEIDA, A. P. L. et al. α -bisabolol-loaded lipid-core nanocapsules reduce lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 4479, 2017.

DAHL, C., et al. "Hypoxia-inducible factor regulates $\alpha\beta 3$ integrin cell surface expression. **Molecular biology of the cell**. P.1901-1912, 2005.

DANHIER, F.; BRETON, A. L.; PRÉAT, V. RGD-based strategies to target alpha (v) beta (3) integrin in cancer therapy and diagnosis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 11, p. 2961-2973, 2012.

DARRA, E. et al. Insight into the apoptosis-inducing action of α -bisabolol towards malignant tumor cells: Involvement of lipid rafts and Bid. **Archives of biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 113-123, 2008.

DAVID, A. R.; ZIMMERMAN, M. R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 10, p. 728-733, 2010.

DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 1, p. 9, 2010.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643-8653, 2008.

DEWHIRST, M. W.; SECOMB, T. W. Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 12, p. 738, 2017.

DREWES, C. C. et al. Novel therapeutic mechanisms determine the effectiveness of lipid-core nanocapsules on melanoma models. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 1261, 2016.

DRUGBANK, Temozolomida. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00853>>. Acesso em: 22 de janeiro de 2019.

DURO-CASTANO, A. et al. Modulating angiogenesis with integrin-targeted nanomedicines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2017.

DUTRA, R. C.; FERRAZ, S. O.; PIMENTA, D. S., SOUSA, O. V..Caracterização morfoanatômica das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeisch, Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.6, pp.818-824, 2010.

FDA. Food Drug Administration. Avastin, 2017. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/125085s319lbl.pdf>. Acesso em: 23 de janeiro de 2019.

FDA. Food Drug Administration. Temozolomida, 2016. Disponível em:<https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/021029s031lbl.pdf>. Acesso em: 28 de janeiro de 2019.

FDA. Food Drug Administration. Doxorubicin hydrochloride for injection USP, 2010. Disponível em:<https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/050467s070lbl.pdf>. Acesso em: 15 de junho de 2017.

FESSI, H. P. F. D. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FIEL, L. A. et al. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. **Soft Matter**, v. 7, n. 16, p. 7240-7247, 2011.

FIEL, L. A. et al. Variable temperature multiple light scattering analysis to determine the enthalpic term of a reversible agglomeration in submicrometric colloidal formulations: a quick quantitative comparison of the relative physical stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 431, p. 93-104, 2013.

FILIPPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796-810, 2010.

FITZMAURICE, C. et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 4, p. 524-548, 2017.

FORSTER, J. C. et al. A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment. **Hypoxia**, v. 5, p. 21, 2017.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C.. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017.

FRIEDMAN, H. S.; KERBY, T.; CALVERT, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 7, p. 2585-2597, 2000.

GABIZON, A. A.; PATIL, Y.; LA-BECK, N. M. New insights and evolving role of pegylated liposomal doxorubicin in cancer therapy. **Drug Resistance Updates**, v. 29, p. 90-106, 2016.

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; BARENHOLZ, Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 5, p. 419-436, 2003.

GAO, H. et al. Ligand modified nanoparticles increases cell uptake, alters endocytosis and elevates glioma distribution and internalization. **Scientific Reports**, v. 3, p. 2534, 2013.

GUPTA, A.; DWIVEDI, T.. A simplified overview of World Health Organization classification update of central nervous system tumors 2016. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**, v. 8, n. 4, p. 629, 2017.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug target insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

GUTERRES, S. S.; WEISS, V.; de LUCCA FREITAS, L.; POHLMANN, A. R. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug Delivery, London**, v. 7, p. 195-199, 2000.

HAGAN, C. E.; BOLON, B.; KEENE, C. D. Nervous system. In: **Comparative Anatomy and Histology**, p. 339-394, 2012.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, p. 49-92, 1951.

HAMIDI, H.; IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, p. 1, 2018.

HAMIDI, H.; PIETILÄ, M.; IVASKA, J. The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting. **British Journal of Cancer**, v. 115, n. 9, p. 1017, 2016.

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

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HOBBS, S. K. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 8, p. 4607-4612, 1998.

HU, Q. et al. Tumor Microenvironment and Angiogenic Blood Vessels Dual-Targeting for Enhanced Anti-Glioma Therapy. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 36, p. 23568-23579, 2016.

HUTTNER, A. Overview of primary brain tumors: pathologic classification, epidemiology, molecular biology, and prognostic markers. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 26, n. 4, p. 715-732, 2012.

IMAGEJ. Disponível em: < <http://rsb.info.nih.gov/ij/>>.

IRIGOYEN, J. et al. Specific ζ -potential response of layer-by-layer coated colloidal particles triggered by polyelectrolyte ion interactions. **Langmuir**, v. 25, n. 6, p. 3374-3380, 2009.

JÄGER, A. et al. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, n. 1-2, p. 297-305, 2007.

JÄGER, E. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 130-140, 2009.

JANEGITZ, B. C. et al. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 879, 2007.

JORNADA, D. S. et al. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**, v. 8, p. 6646-6655, 2012.

KADER, A.; LIU, H. Interference of anthracycline derivatives with measurement of proteins with BCA. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2201-2202, 1997.

KAMATOU, G. P. P; VILJOEN, A. M. A review of the application and pharmacological properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol rich oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 1, p. 1-7, 2010.

KARIM, R. et al. Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: current state-of-the-art. **Journal of Controlled Release**, v. 227, p. 23-37, 2016.

KRENN, L.; PAPER, D. H. Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense* L.). **Phytomedicine**, v. 16, n. 12, p. 1083-1088, 2009.

LACY, J.; SAADATI, H.; JAMES, B. Y. Complications of brain tumors and their treatment. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 26, n. 4, p. 779-796, 2012.

LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes & Diseases**, v. 3, n. 3, p. 198-210, 2016.

LI, M-M. et al. Effects of arginine–glycine–aspartic acid peptide-conjugated quantum dots-induced photodynamic therapy on pancreatic carcinoma in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2769, 2017.

LI, X. et al. Doxorubicin physical state in solution and inside liposomes loaded via a pH gradient. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1415, n. 1, p. 23-40, 1998.

LIANG, X. J. et al. Circumventing tumor resistance to chemotherapy by nanotechnology. **Multi-Drug Resistance in Cancer**, p. 467-488, 2010.

LINCE, F. et al. Preparation of polymer nanoparticles loaded with doxorubicin for controlled drug delivery. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 11, p. 2410-2419, 2011.

LIU, A. et al. Genetics and epigenetics of glioblastoma: applications and overall incidence of IDH1 mutation. **Frontiers in Oncology**, v. 6, p. 16, 2016.

LIU, Y. et al. Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 28, p. 25007-25015, 2011.

LLAGUNO, S. R. A.; PARADA, L. F. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. **British journal of Cancer**, v. 115, n. 12, p. 1445, 2016.

LOEUILLE, B. *Eremanthus* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5315>>. Acesso em: 27 de novembro de 2018.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.

LUSIANA, R. A.; SISWANTA, D.; MUDASIR, M. Preparation of Citric Acid Crosslinked Chitosan/Poly (Vinyl Alcohol) Blend Membranes for Creatinine Transport. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 144-150, 2016.

MALRIC, L. et al. Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update. **Oncotarget**, v. 8, n. 49, p. 86947, 2017.

MALVERN INSTRUMENTS. Zetasizer Nano Series User Manual, 2013. Disponível em: <<https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/user-manuals/MAN0485EN.html>>. Acesso em: 02 de janeiro de 2019.

MANSUR, A. A. P et al. Design and development of polysaccharide-doxorubicin-peptide bioconjugates for dual synergistic effects of integrin-targeted and cell-penetrating peptides for cancer chemotherapy. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 1973-2000, 2018.

MARINACCIO, C.; NICO, B.; RIBATTI, D. Differential expression of angiogenic and anti-angiogenic molecules in the chick embryo chorioallantoic membrane and selected organs during embryonic development. **International Journal of Developmental Biology**, v. 57, n. 11-12, p. 907-916, 2014.

MARONGIU, L. et al. The inclusion into PLGA nanoparticles enables α -bisabolol to efficiently inhibit the human dendritic cell pro-inflammatory activity. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 8, p. 2554, 2014.

MAS-MORUNO, C.; RECHENMACHER, F.; KESSLER, H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate. Design, synthesis and clinical evaluation. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 10, n. 10, p. 753-768, 2010.

MAYER, F. Q. et al. Laronidase-functionalized multiple-wall lipid-core nanocapsules: promising formulation for a more effective treatment of mucopolysaccharidosis type I. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 3, p. 941-954, 2015.

McKENZIE B, KAY G, MATTHEWS K. H, KNOTT R. M, CAIRNS D. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: quantification using Photoshop® and ImageJ. **International Journal of Pharmaceutics** v. 490, .p. 1-8., 2015.

MERCK, HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION Temodar, 2016. Disponível em: <<http://kadmon.com/files/Temozolomide-pi.pdf>>. Acesso em: 27 de fevereiro de 2019.

MIAO, J. et al. Drug resistance reversal activity of anticancer drug loaded solid lipid nanoparticles in multi-drug resistant cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 110, p. 74-80, 2013.

MIDDLEMAS, D. S. et al. Biochemical correlates of temozolomide sensitivity in pediatric solid tumor xenograft models. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 3, p. 998-1007, 2000.

MIRANDA-FILHO, A. et al. Cancers of the brain and CNS: global patterns and trends in incidence. **Neuro-Oncology**, v. 19, n. 2, p. 270-280, 2016.

MISSIRLIS, D. et al. Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 2, p. 120-129, 2006.

MOODY, C.; WHEELHOUSE, Richard. The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 7, p. 797-838, 2014.

MOORE, G. F.; SAUNDERS, S. M. **Advances in Biodegradable Polymers**. iSmithers Rapra Publishing, 1998.

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

MOSQUEIRA, V. C. Furtado et al. Poly (D, L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.

MUNNIER, E. et al. On the interaction of doxorubicin with oleate ions: fluorescence spectroscopy and liquid-liquid extraction study. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 7, p. 1006-1010, 2007.

NØRØXE, D. S.; POULSEN, H. S.; LASSEN, U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. **ESMO open**, v. 1, n. 6, p. e000144, 2016.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; SEGURA, T.; IRUELA-ARISPE, M. L.. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. **Angiogenesis**, v. 17, n. 4, p. 779-804, 2014.

OLIVEIRA, C. de et al. Enhanced and selective antiproliferative activity of methotrexate-functionalized-nanocapsules to human breast cancer cells (MCF-7). **Nanomaterials**, v. 8, n. 1, p. 24, 2018.

OLIVEIRA, C. P. et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1141-1150, 2013.

OLIVEIRA, C. P. et al. Bromelain-functionalized multiple-wall lipid-core nanocapsules: Formulation, chemical structure and antiproliferative effect against human breast cancer cells (MCF-7). **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 2, p. 438-452, 2017(a).

OLIVEIRA, F. S. et al. Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of α -bisabolol, β -cyclodextrin and α -bisabolol/ β -cyclodextrin complex. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 92, p. 1111-1118, 2017(b).

OLIVEIRA, M. S. et al. Solid lipid nanoparticles co-loaded with doxorubicin and α -tocopherol succinate are effective against drug-resistant cancer cells in monolayer and 3-D spheroid cancer cell models. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, n. 1, p. 292-300, 2016.

OMURO, A.; DeANGELIS, L. M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. **Jama**, v. 310, n. 17, p. 1842-1850, 2013.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009–2013. **Neuro-Oncology**, v. 18, n. suppl_5, p. v1-v75, 2016.

OTROCK, Z. K. et al. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 39, n. 2, p. 212-220, 2007.

OZDEMIR-KAYNAK, E.; QUTUB, A. A.; YESIL-CELIK TAS, O. Advances in Glioblastoma Multiforme Treatment: New Models for Nanoparticle Therapy. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 170, 2018.

PALMA, M. de; BIZIATO, D.; PETROVA, T. V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 8, p. 457, 2017.

PAVIA, D. L.; et al. Introdução à espectroscopia. (tradução da 4ª edição norte-americana). São Paulo: Cengage Learning Ed., 2010.

PEREIRA, N. R. C. et al. Mechanisms of the effectiveness of poly (ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules loaded with methotrexate on glioblastoma multiforme treatment. **International Journal Nanomedicine**, v. 13, p. 4563, 2018.

PETIBOIS, C.; DÉLÉRIS, G.; Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. **Trends in Biotechnology**, Elsevier Ltd., 24, 10, 2006.

PIKTEL, E. et al. Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 39, 2016.

POHLMANN, A. R. et al. Poly (ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.

POLETTI, F. S. et al. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 4, p. 472-478, 2008.

POLETTI, F. S. et al. . How sorbitan monostearate can increase drug-loading capacity of lipid-core polymeric nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, p. 827-837, 2015.

POON, C. C. et al. Glioblastoma-associated microglia and macrophages: targets for therapies to improve prognosis. **Brain**, v. 140, n. 6, p. 1548-1560, 2017.

POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 873-887, 2011.

PUBCHEM, Temozolomida. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/temozolomide>>. Acesso em 22 de janeiro 2019.

QIAN, C-N. et al. Revisiting tumor angiogenesis: vessel co-option, vessel remodeling, and cancer cell-derived vasculature formation. **Chinese Journal of Cancer**, v. 35, n. 1, p. 10, 2016.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. The microenvironmental landscape of brain tumors. **Cancer Cell**, v. 31, n. 3, p. 326-341, 2017.

RAYBURN, E. R.; EZELL, S. J.; ZHANG, R. Anti-inflammatory agents for cancer therapy. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 29, 2009.

REYNAUD, F. et al. Spray-dried chitosan-metal microparticles for ciprofloxacin adsorption: kinetic and equilibrium studies. **Soft Matter**, v. 7, p. 7304-7312, 2011.

REYNOLDS, A. R. et al. Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. **Nature Medicine**, v. 15, n. 4, p. 392, 2009.

RIBATTI, D. Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 270, p. 181-224, 2008.

RIBATTI, D. et al. Chorioallantoic membrane capillary bed: A useful target for studying angiogenesis and antiangiogenesis in vivo. **The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 264, n. 4, p. 317-324, 2001.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. **Mechanisms of Development**, v. 141, p. 70-77, 2016.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. **Experimental Cell Research**, v. 328, n. 2, p. 314-324, 2014.

RIGO, A; VINANTE, F. The antineoplastic agent α -bisabolol promotes cell death by inducing pores in mitochondria and lysosomes. **Apoptosis**, v. 21, n. 8, p. 917-927, 2016.

RODRIGUES, S. F. et al. Lipid-Core Nanocapsules Act as a Drug Shuttle Through the Blood Brain Barrier and Reduce Glioblastoma After Intravenous or Oral Administration. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 5, p. 986-1000, 2016.

ROMA-RODRIGUES, C. et al. Peptide-coated gold nanoparticles for modulation of angiogenesis in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 2633, 2016.

ROS, M. da et al. The use of anthracyclines for therapy of CNS tumors. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 6, p. 721, 2015.

ROSENBLUM, D. et al. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1410, 2018.

RUOSLAHTI, E. Peptides as targeting elements and tissue penetration devices for nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 24, n. 28, p. 3747-3756, 2012.

SANTOSH, V.; SRAVYA, P.; ARIVAZHAGAN, A. Molecular Pathology of Glioblastoma-An Update. In: **Advances in Biology and Treatment of Glioblastoma**. Springer, Cham. p. 19-55, 2017.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova. São Paulo. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737**, 2003.

SCHAFFNER, P.; DARD, M. M. Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 60, n. 1, p. 119-132, 2003.

SCHNELL, O. et al. Expression of integrin $\alpha\beta 3$ in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. **Brain Pathology**, v. 18, n. 3, p. 378-386, 2008.

SCHNELL, O. et al. Imaging of integrin $\alpha\beta 3$ expression in patients with malignant glioma by [18F] Galacto-RGD positron emission tomography. **Neuro-oncology**, v. 11, n. 6, p. 861-870, 2009.

SEKI, T. et al. Antitumor effects of α -bisabolol against pancreatic cancer. **Cancer Science**, v. 102, n. 12, p. 2199-2205, 2011.

SHARMA, S. et al. Interfacial and colloidal properties of emulsified systems: Pharmaceutical and biological perspective. In: **Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development**. 2014. p. 149-172.

SHI, J. et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 1, p. 20-37, 2017.

SIEGAL, T.; HOROWITZ, A.; GABIZON, A. Doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes for the treatment of a brain tumor model: biodistribution and therapeutic efficacy. **Journal of Neurosurgery**, v. 83, n. 6, p. 1029-1037, 1995.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7-30, 2016.

SIGMA ALDRICH, TECHNICAL BULLETIN. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/qpbcabul.pdf>>. Acesso em: 22 de julho de 2018.

SILBER, J. R. et al. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: Promise and problems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1826, n. 1, p. 71-82, 2012.

SONG, C. et al. Enhanced Nanodrug Delivery to Solid Tumors Based on a Tumor Vasculature-Targeted Strategy. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 23, p. 4192-4200, 2016.

SONG, Z. et al. Cyclic RGD peptide-modified liposomal drug delivery system for targeted oral apatinib administration: enhanced cellular uptake and improved therapeutic effects. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1941, 2017.

SONVICO, F. et al. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, n. 1, p. 67-73, 2006.

STATON, C. A. et al. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 85, n. 5, p. 233-248, 2004.

STUPP, R. et al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 10, p. 1100-1108, 2014.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 157-170, 2013.

TAHERGORABI, Z.; KHAZAEI, M. A review on angiogenesis and its assays. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, n. 6, p. 1110, 2012.

TENTORI, L. et al. Inhibition of O6-alkylguanine DNA-alkyltransferase or poly (ADP-ribose) polymerase increases susceptibility of leukemic cells to apoptosis induced by temozolomide. **Molecular Pharmacology**, v. 52, n. 2, p. 249-258, 1997.

TERROSO, Thatiana Ferreira. Co-encapsulação de indometacina/éster etílico de indometacina e alfa-bisabolol em nanocápsulas poliméricas: efeito citotóxico e seletivo em células de glioma. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2010.

TERROSO, Thatiana Ferreira. Desenvolvimento de nanopartículas contendo α -bisabolol e avaliação das suas potenciais atividades citotóxicas e gastroprotetora. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2014.

TODORIC, J.; ANTONUCCI, L.; KARIN, M. Targeting inflammation in cancer prevention and therapy. **Cancer Prevention Research**, v. 9, n. 12, p. 895-905, 2016.

TUCCI, M.; STUCCI, S.; SILVESTRIS, F. Does cilengitide deserve another chance?. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 13, p. e584-e585, 2014.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025-1058, 2009.

VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, p. 200-208, 2011.

VRIGNAUD, S. et al. Aqueous core nanocapsules: a new solution for encapsulating doxorubicin hydrochloride. **Drug development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1706-1711, 2013.

VU, B. T. et al. Chick chorioallantoic membrane assay as an in vivo model to study the effect of nanoparticle-based anticancer drugs in ovarian cancer. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8524, 2018.

WANG, F. et al. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13447-13462, 2013.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1359, 2011.

WELLER, M. et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 9, p. e395-e403, 2014.

WELLER, M. et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 6, p. e315-e329, 2017.

- WELLER, M. et al. Glioma. **Nature reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15017, 2015.
- WESOLOWSKI, J. R.; RAJDEV, P.; MUKHERJI, S. K. Temozolomide (Temodar). **American Journal of Neuroradiology**, v. 31, n. 8, p. 1383-1384, 2010.
- WHITE, Mary C. et al. Age and cancer risk: a potentially modifiable relationship. **American journal of preventive medicine**, v. 46, n. 3, p. S7-S15, 2014.
- WHO. World Health Organization. Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em 10 de junho de 2017.
- YANG, F. et al. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 1, p. 84-89, 2014.
- YANG, Z. et al. Delivering siRNA and Chemotherapeutic Molecules Across BBB and BTB for Intracranial Glioblastoma Therapy. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 4, p. 1012-1022, 2017.
- YEUNG, Y. T. et al. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 3, p. 591-606, 2013.
- ZELEŇÁK, V.; VARGOVÁ, Z.; GYÖRYOVÁ, K. Correlation of infrared spectra of zinc (II) carboxylates with their structures. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 66, n. 2, p. 262-272, 2007.
- ZHANG, L. et al. Combined anti-fetal liver kinase 1 monoclonal antibody and continuous low-dose doxorubicin inhibits angiogenesis and growth of human soft tissue sarcoma xenografts by induction of endothelial cell apoptosis. **Cancer research**, v. 62, n. 7, p. 2034-2042, 2002.
- ZHANG, M. et al. Glioma-Targeted Drug Delivery Enabled by a Multifunctional Peptide. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 775-781, 2016.
- ZHANG, Y. et al. Targeted delivery of RGD-modified liposomes encapsulating both combretastatin A-4 and doxorubicin for tumor therapy: in vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 3, p. 467-473, 2010.
- ZHAO, Y. et al. Targeted delivery of doxorubicin by nano-loaded mesenchymal stem cells for lung melanoma metastases therapy. **Scientific Reports**, v. 7, p. 44758, 2017.
- ZIYAD, S.; IRUELA-ARISPE, M. L. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 12, p. 1085-1096, 2011.
- ZUAZO-GAZTELU, I.; CASANOVAS, O. Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 248, 2018.

9. ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. Carta de aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais – UFRGS

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 33993

Título: Co-encapsulação de alfa-bisabolol e doxorubicina em nanocápsulas multiparede funcionalizadas com RGD: avaliação das atividades antitumoral e antiangiogênica

Vigência: 09/10/2017 à 08/10/2019

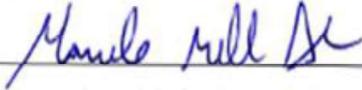
Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ADRIANA RAFFIN POHLMANN - coordenador desde 09/10/2017
SILVIA STANISCUASKI GUTERRES - pesquisador desde 09/10/2017
Fabrício Figueiró - pesquisador desde 09/10/2017
KARINA PAESE - pesquisador desde 09/10/2017
Aline de Cristo Soares Alves - Aluno de Doutorado desde 09/10/2017
Danieli Rosane Dallemole - Aluno de Mestrado desde 09/10/2017

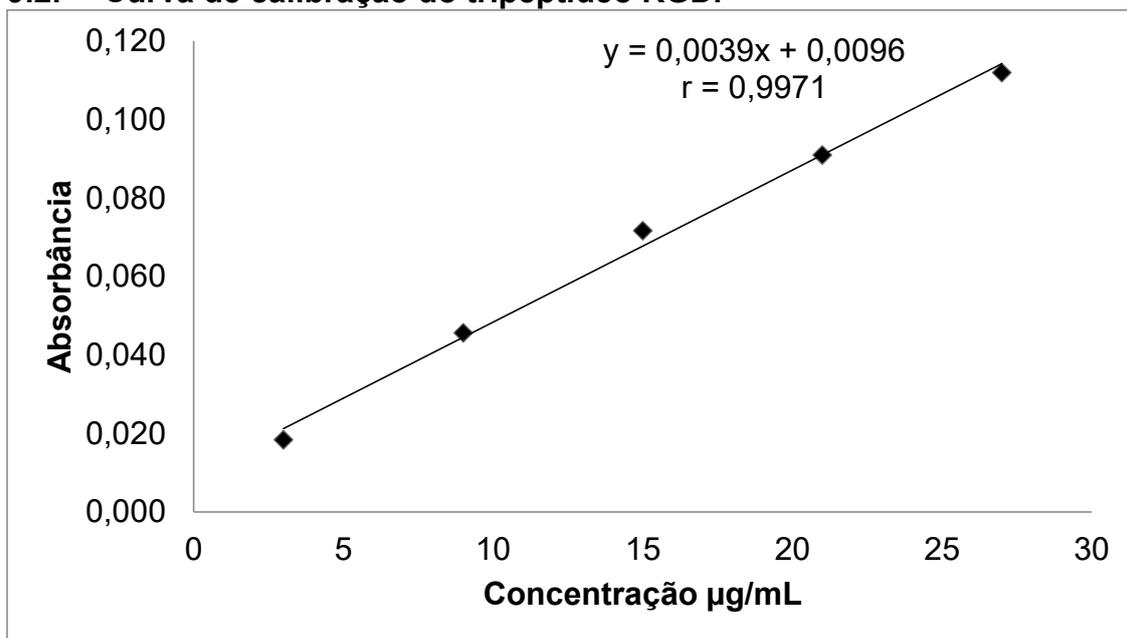
Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 18/12/2017 - Sala 330 do Anexo I do Prédio da Reitoria- Campus Centro - UFRGS - Bairro Farrroupilha - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 80 ovos embrionados da espécie Gallus gallus domesticus, pesando aproximadamente 65g, adquiridos junto a empresa Mercoaves (Porto Alegre, RS, Brasil - CNPJ: 04.137.827/0003-64); de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 4 de Janeiro de 2018

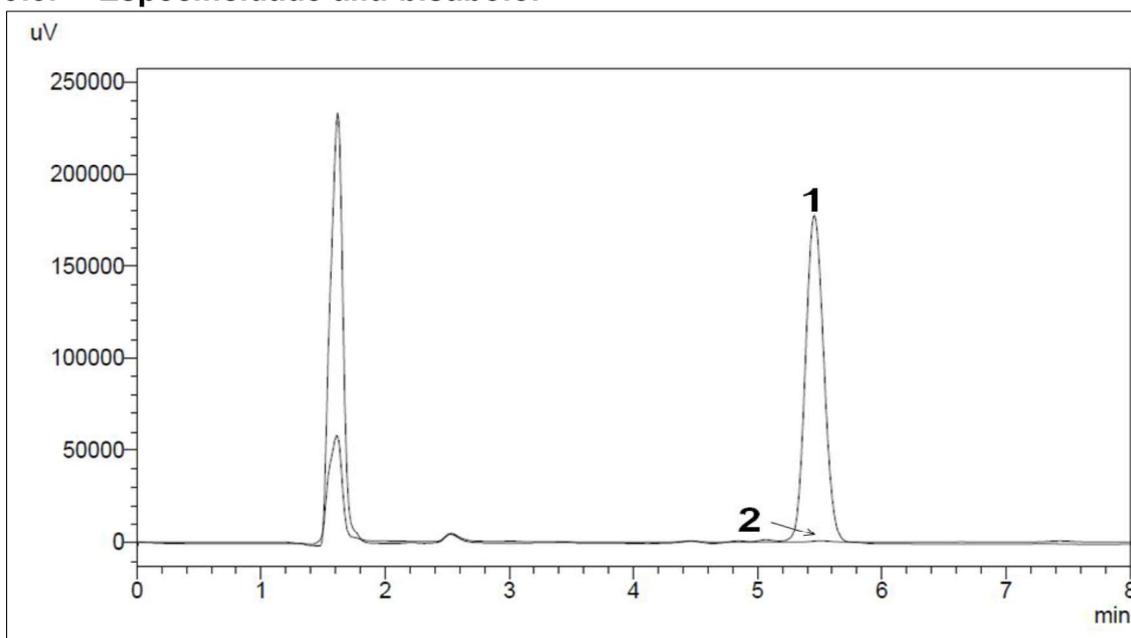


MARCELO MELLER ALIEVI

9.2. Curva de calibração do tripeptídeo RGD.

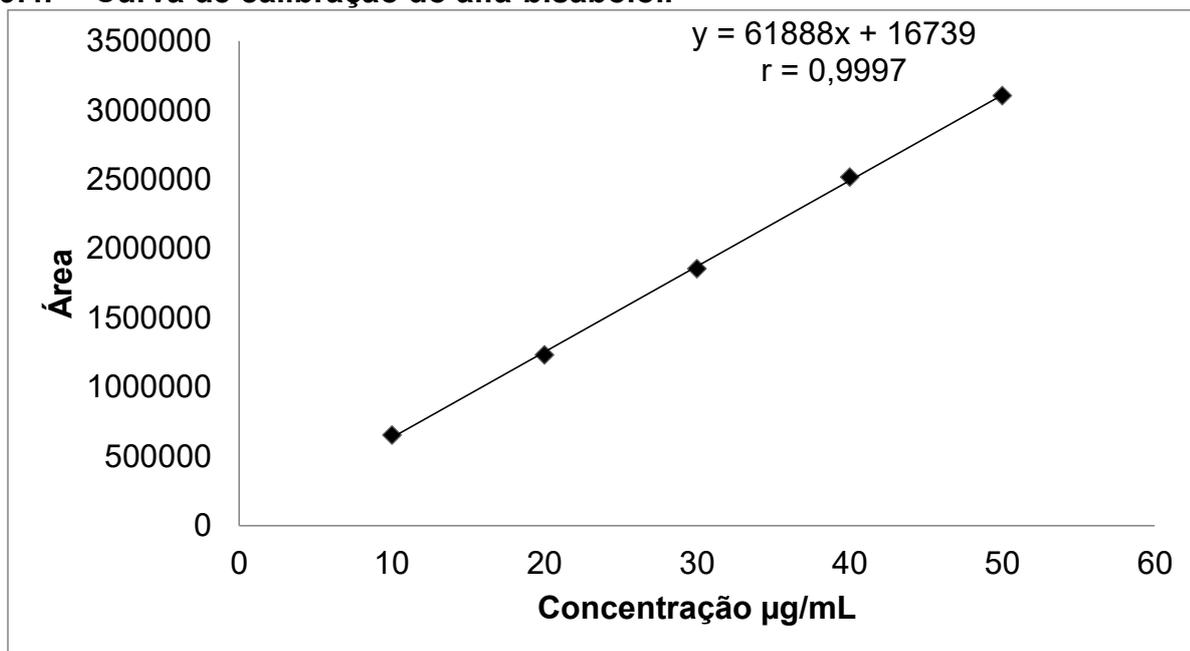


9.3. Especificidade alfa-bisabolol

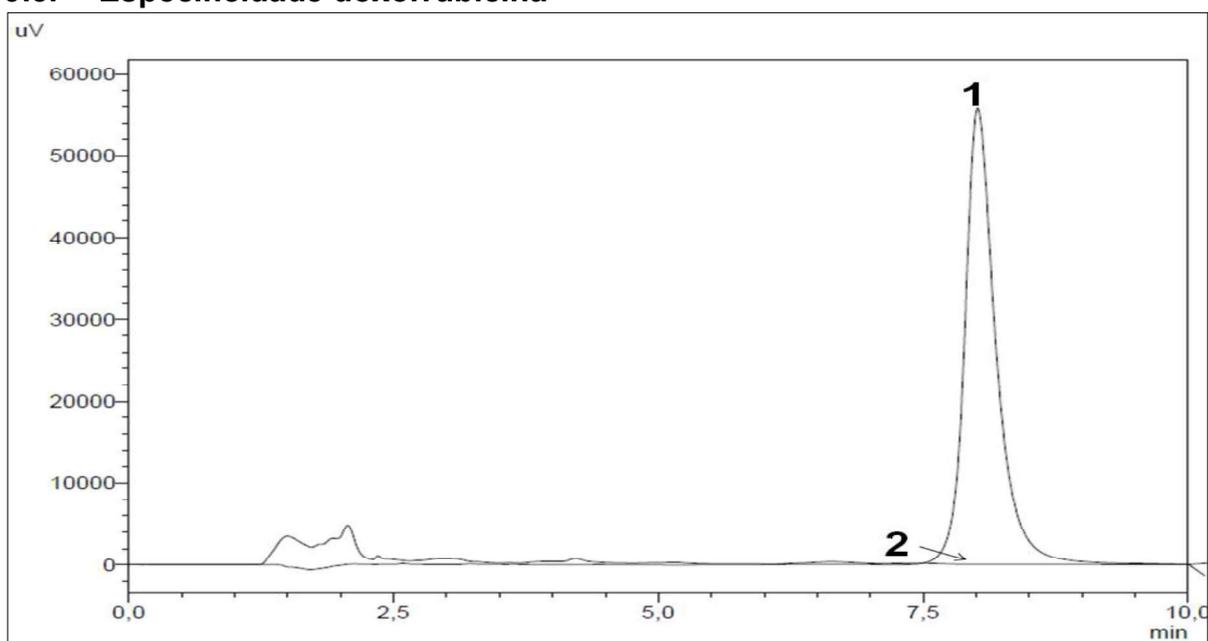


Cromatograma referente a análise de: Solução de Alfa-bisabolol 30 µg/mL (1) e dispersão de nanoesferas após tratamento com acetonitrila (2).

9.4. Curva de calibração do alfa-bisabolol.



9.5. Especificidade doxorrubicina



Cromatograma referente a análise de: Solução de Cloridrato de doxorrubicina 10 $\mu\text{g/mL}$ (1) e dispersão da formulação AB-MLNC+ após tratamento com fase móvel (água (50): acetonitrila (50) acidificada com TFA, pH 2,65) (2).

9.6. Curva de calibração da doxorubicina.

