

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ANA CAROLINA CAVAZZIN ASBAHR

NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO E NANOPARTÍCULAS DE  
PROTEÍNA VEGETAL FLUORESCENTES: ESTUDO DE CAPTAÇÃO EM  
CULTURAS CELULARES

Porto Alegre  
2014

ANA CAROLINA CAVAZZIN ASBAHR

NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO E NANOPARTÍCULAS DE  
PROTEÍNA VEGETAL FLUORESCENTES: ESTUDO DE CAPTAÇÃO EM  
CULTURAS CELULARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Nanotecnologia  
Farmacêutica da Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
doutora

Orientadora: Dra. Adriana R. Pohlmann

Co-orientador: Dr. Ruy C. R. Beck

Porto Alegre

2014

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, em nível Doutorado Acadêmico, aprovada em 18 de março de 2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Instituto de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Elenara Lemos Senna

Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Fabiana Seixas

Centro de Desenvolvimento Tecnológico – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Leticia Koester

Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Maria Ismênia Lionzo

Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Asbahr, Ana Carolina Cavazzin  
NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO E NANOPARTÍCULAS  
DE PROTEÍNA VEGETAL FLUORESCENTES: ESTUDO DE  
CAPTAÇÃO EM CULTURAS CELULARES / Ana Carolina  
Cavazzin Asbahr. -- 2014.  
119 f.

Orientadora: Adriana Raffin Pohlmann.  
Coorientadora: Ruy Carlos Ruver Beck.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-  
Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Porto  
Alegre, BR- RS, 2014.

1. Nanotecnologia. 2. Nanocápsulas de núcleo  
lipídico. 3. Nanopartículas proteicas. 4. Captação  
celular. I. Pohlmann, Adriana Raffin, orient. II.  
Beck, Ruy Carlos Ruver, coorient. III. Título.

*Esta tese é dedicada à minha avó Lisette (in memoriam), que não pôde ver este trabalho concluído; aos meus pais, Bárbara e Carlos, que mesmo longe me deram a força necessária para continuar e ao Alex, que com seu carinho e companheirismo tornou tudo mais fácil.*

## **AGRADECIMENTOS**

À prof Adriana Pohlmann e prof Ruy Beck por terem me ajudado a desenvolver meu senso crítico e minhas habilidades como pesquisadora.

À Daniele von Poser e Raquel de Trentin, que mais do que grandes profissionais, foram grandes amigas e ajudaram a me manter de pé mesmo nos momentos mais difíceis.

Às grandes amigas Lorena Oliveira, Camila Rigobelo, Stela Ferrarini, Camila Franco, Francyne Kubaski e Jamila Zardeh que foram minha família enquanto eu estive longe de casa.

Aos colegas do laboratório K204, em especial a Noé Fonseca, Catiúscia Oliveira, Luana Fiel, Michelli Antonov, Márcia Adorne e Fernanda Poletto pela troca de conhecimento e pela ajuda sempre que solicitada.

Ao amigo Willian Prado, que dividiu comigo as alegrias e agruras do trabalho com a rodamina B.

Às colegas Rachel Bulcão, Karina Paese e Rossana Friederich pela ajuda no estudo de biodistribuição.

Às colegas Márcia Fontana e Thatiana Terroso pela grande ajuda nos primeiros passos no cultivo celular.

Às colegas do PPGNanoFarm, Gabriele Dadalt, Aline Ourique e Júlia Santos, pela ajuda em todas as disciplinas, projetos e trâmites burocráticos. Juntas formamos uma ótima equipe!

Ao grupo de pesquisa da prof Andréia Buffon, em especial a Camilo D'Amore e Aline Beckemcamp pela enorme ajuda nas análises de citometria de fluxo e cultivo das células MCF7.

Ao grupo de pesquisa da Dra Úrsula Matte, em especial à Fernanda Sperb, pela ajuda com os macrófagos e outras técnicas de cultivo de células e biologia celular.

À Dra Véronique Préat (Université Catholique de Louvain) e Dr Ulrich Shaeffer (Saarland University) que gentilmente abriram seus laboratórios à minha visita durante a Missão Científica de Curta Duração.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

À UFRGS, CAPES, CNPq e FAPERGS pela infraestrutura, bolsa de estudos e verbas de pesquisa.

“Nunca é tarde para tentar o desconhecido. Nunca é tarde para ir mais longe.”

(Gabriele D’Anunzio)

## RESUMO

A captação de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) e nanopartículas de proteína de algodão (GONP) foi avaliada em células de câncer de mama MCF7. As GONP foram produzidas por reticulação a partir de concentrado proteico de algodão e cloreto de cálcio. O estudo de pré-formulação revelou que o pH inicial e concentração de reticulante interferem no tamanho e polidispersão das partículas, sendo o sistema mais estável obtido em pH 3,0 e 9 mM de  $\text{CaCl}_2$ . As GONP são esféricas, com superfície levemente rugosa, têm pH de  $3,91 \pm 0,14$ , potencial zeta de  $-20,1 \pm 0,608$  mV, um diâmetro aproximado de  $273,8 \pm 12,8$  nm ( $Z_{ave}$ ) e Pdl de  $0,168 \pm 0,51$  por PCS;  $191,5 \pm 23,3$  nm e Span de  $1,93 \pm 0,29$  por DL e  $113,7$  nm por MET. A análise de MEV-EDS confirmou que os componentes majoritários da estrutura são C, Ca e Cl. Cada mL de suspensão possui  $7,00 \times 10^{12} \pm 0,2477$  partículas. O mecanismo de formação das partículas envolve forças hidrofóbicas e reticulação com íons  $\text{Ca}^{2+}$  e sua estabilidade é de 48 h. Para os estudos de captação em células MCF7, foram produzidas GONPf fluorescentes com rod123 e LNCf com PCL covalentemente ligada à roB por deposição interfacial do polímero pré-formado. Os estudos de viabilidade celular por MTT revelaram que GONPf não é tóxica para macrófagos RAW 264.7 e células MCF7 entre  $0,152$  e  $3,056 \times 10^{-2}$  m<sup>2</sup> de superfície aplicada e LNCf, entre  $0,157$  e  $0,785 \times 10^{-2}$  m<sup>2</sup>, com uma  $DL_{50}$  de  $1,02 \times 10^{-2}$  m<sup>2</sup>. A captação das partículas foi avaliada após 24 h de incubação a 37°C/5%  $\text{CO}_2$  e demonstrou ser dose-dependente. As LNCf são captadas por endocitose mediada por caveolina e as GONPf, por um mecanismo misto envolvendo macropinocitose, endocitose dependente de clatrina e endocitose dependente de caveolina. A presença de tensoativo na superfície das LNCf é a causa provável para a menor captação em relação às GONPf.

Palavras-chave: Nanocápsulas de núcleo lipídico; nanopartículas de proteína de algodão; mecanismo de captação

## ABSTRACT

Lipid-core nanocapsules (LNC) and *Gossypium* nanoparticles (GONP) cellular uptake were assessed in breast cancer cells MCF7. GONP were produced by cross-linking a cotton seed proteic concentrate with calcium chloride. Pre-formulation study demonstrated that initial pH and CaCl<sub>2</sub> concentration affect the size and polydispersion of nanoparticles. Best result was obtained with pH 3.0 and 9 mM de CaCl<sub>2</sub>. GONP were spherical, with a slightly rough surface, pH =  $3.91 \pm 0.14$ , zeta potential =  $-20.1 \pm 0.608$  mV and diameter of  $273.8 \pm 12.8$  nm ( $Z_{ave}$ ) and Pdl de  $0.168 \pm 0.51$  measured by PCS;  $191.5 \pm 23.3$  nm and Span  $1.93 \pm 0.29$  measured by laser diffraction and  $113.7 \pm 10.7$  nm measured by TEM. SEM-EDS analysis confirmed that C, Ca e Cl were the main constituent of GONP. Each mL of GONP suspension has  $7.00 \times 10^{12} \pm 0.2477$  particles. Hydrophobic interaction and cross-linking with calcium ions were the basis for GONP formation and the system is stable for 48 h. For cellular uptake studies, fluorescent particles were produced with rhodamine 123 (GONPf). LNCf were prepared by interfacial polymer deposition with PCL covalent linked with rhodamine B. MTT assay showed that GONPf were non-toxic to RAW 264.7 macrophages and MCF7cells in dosis between  $0.152$  e  $3.056 \times 10^{-2}$  m<sup>2</sup> of applied surface and LNCf, between  $0.157$  e  $0.785 \times 10^{-2}$  m<sup>2</sup> and LD<sub>50</sub> =  $1.02 \times 10^{-2}$  m<sup>2</sup>. Nanoparticle uptake was evaluated after 24 h incubation at 37°C/5% CO<sub>2</sub> and is dose dependent. LNCf are internalized by caveolin mediated endocytosis. GONPf, on the other hand were internalized by a macropinocytosis, clathrin dependent endocytosis and caveolin dependent endocytosis. Surfactant presence at LCNf surface may contribute to a less extent uptake relative to GONPf.

Keywords: Lipid-core nanocapsules; cotton seed protein nanoparticles; uptake mechanism

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema dos principais mecanismos de endocitose. A = macropinocitose; B = endocitose dependente de clatrina; C = endocitose dependente de caveolina; o círculo amarelo representa um lisossomo (Adaptado de ADLER, LEONG, 2010).....	40
Figura 2: Espectros UV de cada fração de CPA obtidos no leitor de placas Spectramax M2e. ....	62
Figura 3: Espectros de fluorescência de cada fração de CPA obtidos no leitor de placas Spectramax M2e, com excitação de 305 nm. ....	62
Figura 4: Variação do tamanho de partícula, medido por PCS, em função do pH para as diferentes frações obtidas a partir do CPA.....	63
Figura 5: Potencial zeta das frações de CPA em função do pH. ....	63
Figura 6: Eletroforese das frações SN7 e SN10. As bandas do padrão (P) são referentes a aprotinina (6 kDa); lisozima (16 kDa); anidrase carbônica (36 kDa); álcool desidrogenase (50 kDa); desidrogenase glutâmica (64 kDa); soroalbumina bovina (98 kDa) e miosina (250 kDa). ....	65
Figura 7: Comparativo do tamanho e do índice de polidispersão das nanopartículas obtidas a partir da fração SN10, utilizando o método de PCS. As barras claras correspondem às medições realizadas no dia do preparo das partículas e as barras escuras, à repetição realizada 24 h depois.....	67
Figura 8: Distribuição granulométrica por intensidade da fração SN10, utilizando o método de espectroscopia de correlação de fótons. ....	67
Figura 9: Distribuição granulométrica por intensidade das nanopartículas obtidas a partir da fração SN10 em pH 3. Os índices 1 representam as medidas feitas no dia do preparo das nanopartículas e os índices 2, as medidas feitas 24 horas depois. O sistema D foi obtido pela adição de 1 mM de CaCl <sub>2</sub> ; o sistema E, com 3 mM e o sistema F, com 9 mM. O método utilizado para a medida foi espectroscopia de correlação de fótons. ....	68
Figura 10: Distribuição granulométrica por intensidade das nanopartículas obtidas a partir da fração SN10 em pH 7. Os índices 1 representam as medidas feitas no dia do preparo das nanopartículas e os índices 2, as medidas feitas 24 horas depois. O sistema G foi obtido pela adição de 1 mM de CaCl <sub>2</sub> ; o sistema H, com 3 mM e o sistema I, com 9 mM. O método usado na medição foi PCS.....	69
Figura 11: Distribuição granulométrica por intensidade das nanopartículas obtidas a partir da fração SN10 em pH 11. Os índices 1 representam as medidas feitas no dia do preparo das nanopartículas e os índices 2, as medidas feitas 24 horas depois. O	

sistema J foi obtido pela adição de 1 mM de CaCl <sub>2</sub> ; o sistema K, com 3 mM e o sistema L, com 9 mM. As medidas foram feitas por PCS.....	69
Figura 12: Comparativo do tamanho das nanopartículas obtidas a partir da fração SN7, utilizando o método de PCS. As barras claras correspondem à medição realizada no dia do preparo das partículas e as barras escuras, à repetição após 24 h.....	70
Figura 13: Comparativo do índice de polidispersão das nanopartículas obtidas a partir da fração SN7, utilizando o método de espectroscopia de correlação de fótons. As barras claras correspondem à medição realizada no dia do preparo das partículas e as barras escuras, à repetição da medida após 24 h.....	70
Figura 14: Distribuição granulométrica por intensidade da fração SN7, utilizando o método de PCS .....	71
Figura 15: Distribuição granulométrica por intensidade das nanopartículas obtidas a partir da fração SN7 em pH 3. Os índices 1 representam as medidas feitas no dia do preparo das nanopartículas e os índices 2, as medidas feitas 24 horas depois. O sistema M foi obtido pela adição de 1 mM de CaCl <sub>2</sub> ; o sistema N, com 3 mM e o sistema O, com 9 mM. As medidas foram feitas por PCS.....	71
Figura 16: Distribuição granulométrica por intensidade das nanopartículas obtidas a partir da fração SN7 em pH 7. Os índices 1 representam as medidas feitas no dia do preparo das nanopartículas e os índices 2, as medidas feitas 24 horas depois. O sistema P foi obtido pela adição de 1 mM de CaCl <sub>2</sub> ; o sistema Q, com 3 mM e o sistema R, com 9 mM. O método usado foi PCS .....	72
Figura 17: Distribuição granulométrica por intensidade das nanopartículas obtidas a partir da fração SN7 em pH 11. Os índices 1 representam as medidas feitas no dia do preparo das nanopartículas e os índices 2, as medidas feitas 24 horas depois. O sistema S foi obtido pela adição de 1 mM de CaCl <sub>2</sub> ; o sistema T, com 3 mM e o sistema U, com 9 mM. As medidas foram feitas por PCS .....	73
Figura 18: Efeito das variáveis pH e concentração de reticulante sobre o tamanho das nanopartículas ( $Z_{average}$ ) obtidas a partir de SN10, no dia do preparo e após 24 horas	73
Figura 19: Efeito das variáveis pH e concentração de reticulante sobre o tamanho das nanopartículas ( $Z_{average}$ ) obtidas a partir de SN7, no dia do preparo e após 24 horas..	74
Figura 20: Efeito das variáveis pH e concentração de reticulante sobre o índice de polidispersão das nanopartículas (Pdl) obtidas a partir de SN10, no dia do preparo e após 24 horas.....	74
Figura 21: Efeito das variáveis pH e concentração de reticulante sobre o índice de polidispersão das nanopartículas (Pdl) obtidas a partir de SN7, no dia do preparo e após 24 horas.....	74
Figura 22: Gráficos de potencial zeta para as formulações E, N e O .....	76

Figura 23: Perfis granulométricos por espectroscopia de correlação de fótons das formulações E, N e O.....	77
Figura 24: Perfis granulométricos por difração de laser das formulações E, N e O.....	78
Figura 25: Imagens de MET dos sistemas E, N e O, obtidas com voltagem de 80 V e aumentos de 150000 vezes (barras de 200 nm) e 300000 vezes (sistema O, com barra de 100 nm). ....	79
Figura 26: Imagens obtidas por MEV-EDS (A) e gráficos da composição química das partículas (B) para as formulações E, N e O, com voltagem de 10 kV e aumentos de 22000 vezes (sistemas E e N) e 14000 vezes (sistema O) .....	80
Figura 27: Distribuição de tamanho de partícula por PCS a cada etapa da formação das GONP. Em verde: fração SN7, em vermelho: SN7 em pH 3,0 e em azul: suspensão de nanopartículas .....	82
Figura 28: Efeito da adição de ureia e DTT sobre a turbidez da suspensão de GONP83	
Figura 29: Efeito da adição de concentrações crescentes de SDS à suspensão de GONP .....	83
Figura 30: Doseamento do teor de $Ca^{2+}$ liberado de GONP após diálise (a) e perfil granulométrico das partículas em ausência do reticulante (b). A linha vermelha é referente à formulação dialisada e as demais às amostras recolhidas dos sacos de diálise .....	83
Figura 31: Perfil granulométrico de GONP nos diferentes tempos de leitura do teste de estabilidade. A linha vermelha corresponde à amostra no tempo 0; azul = 24 horas; verde = 48 horas; preto = 72 horas.....	84
Figura 32: Espectro de fluorescência de GONPf e da solução aquosa de rod 123 na mesma concentração de fluoróforo.....	85
Figura 33: Caracterização físico-química das LNCf por a) rastreamento de partículas; b) Difração de laser; c) espalhamento de luz eletroforético.....	87
Figura 34: Efeito da adição de diferentes concentrações de GONPf sobre a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7.....	88
Figura 35: Efeito da adição de diferentes concentrações de LNC e GONP sobre a viabilidade das células MCF7 .....	89
Figura 36: Aspecto das células dos poços controle antes do teste (a) e após 24 h observadas sob luz branca (b) ou com luz fluorescente e filtro vermelho (c); aumento de 20 vezes .....	89
Figura 37: Células tratadas com $0,157 \mu m^2$ de LNCf fotografadas em microscópio de fluorescência após 2 h (a) e 24 h (b), quando se evidenciou a morte celular (aumento de 20 vezes). ....	90

Figura 38: Aspecto das células tratadas com 0,0798 m <sup>2</sup> de LNCf após 24h: (a) em microscópio óptico; (b) em microscópio de fluorescência em campo claro com filtro vermelho; (c) em campo escuro; (d) em microscópio confocal em campo claro; (e) em campo escuro. Os núcleos estão marcados em azul com DAPI. As setas referem-se às LNCf, marcadas em vermelho .....	90
Figura 39: Fotomicrografia dos poços-controle após 24 horas em incubadora a 37 °C e 5% de CO <sub>2</sub> (a) e a 4 °C por 24 horas (b); poços tratados com 50 µL de GONPf (c) ou LNCf (d) .....	91
Figura 40: Microscopia confocal de células tratadas com 0,0340 m <sup>2</sup> de GONPf: Macrófagos após 2h de incubação (a) e Células MCF7 após 24 horas de incubação em campo claro (b) e em campo escuro (c). Os núcleos estão marcados em azul com DAPI. As setas indicam as nanopartículas marcadas em verde (aumento de 60 vezes). .....	92
Figura 41: <i>DotPlot</i> e Histograma das citometrias de fluxo das células MCF7 tratadas com LNCf. O eixo x corresponde à média da intensidade de fluorescência detectada. A área em cinza corresponde ao controle; em azul, células tratadas com 1,57 x 10 <sup>2</sup> m <sup>2</sup> ; em verde, com 3,92 x 10 <sup>2</sup> m <sup>2</sup> e, em vermelho, 7,85 x 10 <sup>2</sup> m <sup>2</sup> .....	93
Figura 42: Captação das LNCf em células MCF7 avaliada por citometria de fluxo. Em (a) intensidade de fluorescência em função da área superficial aplicada e em (b) percentual de células que captam as partículas em função da área superficial aplicada .....	94
Figura 43: <i>DotPlot</i> e histogramas das citometrias de fluxo das células MCF7 tratadas com GONPf. O eixo x é referente à média da intensidade de fluorescência detectada. A área em cinza corresponde ao controle; em azul, células tratadas com 0,76 x 10 <sup>2</sup> m <sup>2</sup> ; em verde, com 1,92 x 10 <sup>2</sup> m <sup>2</sup> e em vermelho, com 3,82 x 10 <sup>2</sup> m <sup>2</sup> .....	94
Figura 44: Captação das GONPf por células MCF7 avaliada por citometria de fluxo. Em (a) intensidade de fluorescência em função da área superficial aplicada e em (b) percentual de células que captam as partículas em função da dose aplicada .....	95
Figura 45: Comparativo da captação das GONPf e da solução de rod123 por células MCF7 avaliada por citometria de fluxo .....	95
Figura 46: Percentual captado em presença de inibidores de captação em relação aos poços tratados apenas com LNCf (p < 0,05) .....	96
Figura 47: Percentual captado em presença de inibidores de captação em relação aos poços tratados apenas com GONPf (p < 0,05) .....	97

Figura A1: Espectros de absorção em UV-vis dos hidrolisados de PCL-rod obtidos com NaOH 0,5 M; 1,0 M e 2,0 M após 2h30 de refluxo .....	112
Figura A2: aspecto do hidrolisado obtido a partir de solução de NaOH 6,0 M sob refluxo durante 2 horas .....	112
Figura A3: (a) CCD do hidrolisado. Os pontos correspondem a PCL-rod (1); roB (2); hidrolisado (3); co-aplicação de PCL-rod e roB (4); (b) CCD do resíduo de hidrólise, (1) PCL-rod; (2) roB; (3) resíduo após 6 horas de hidrólise; (4) resíduo após 4 horas de hidrólise; (5) co-aplicação de PCL-rod e roB.....	113
Figura A4: Espectros de absorção no UV-vis do hidrolisado de PCL-rod e de uma solução de roB em água .....	114
Figura A5: Comparação entre os espectros de absorção no UV-vis do hidrolisado de PCL-rod e de NaOH 0,5M, PCL e mistura física PCL+roB submetidos às mesmas condições de hidrólise .....	115
Figura A6: Curvas de linearidade para roB em água ultrapura (pH = 5,3) .....	115

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desenho experimental para obtenção das nanopartículas de proteína de algodão a partir da fração SN10.....	52
Tabela 2: Desenho experimental para obtenção das nanopartículas de proteína de algodão a partir da fração SN7.....	53
Tabela 3: Formulação de LNCf .....	56
Tabela 4: doses aplicadas de LNCf.....	58
Tabela 5: doses aplicadas de GONPf .....	58
Tabela 6: Ponto isoelétrico das frações de CPA determinados a partir da equação de Boltzmann.....	64
Tabela 7: Variação de turbidez encontrada após a formação das nanopartículas a partir da fração SN10 .....	66
Tabela 8: Variação de turbidez encontrada após a formação das nanopartículas a partir da fração SN7 .....	66
Tabela 9: pH final das formulações .....	75
Tabela 10: Potencial zeta dos sistemas que se apresentaram monomodais nas análises de PCS no dia do preparo e 24 h depois (n=3).....	75
Tabela 11: Resumo da caracterização das nanopartículas de algodão .....	79
Tabela 12: Número de partículas por mL para os 3 lotes de GONP avaliados	81
Tabela 13: Medidas de Zave e Pdl de GONP .....	84
Tabela 14: Caracterização de GONPf.....	85
Tabela A1: Preparo de amostras para o ensaio de exatidão .....	111
Tabela A2: Testes realizados para avaliação da figura de mérito robustez ...	111
Tabela A3: Teor de rodamina no hidrolisado.....	114
Tabela A4: Comparativo entre os valores de r <sup>2</sup> , inclinação e intercepto das curvas da Figura A6 .....	116
Tabela A5: Limites de detecção e quantificação obtidos para a quantificação da rodamina após hidrólise .....	116
Tabela A6: Precisão intradia da quantificação de resíduos de rodamina presentes em PCL-rod .....	116
Tabela A7: Precisão interdica da quantificação de resíduos de rodamina presentes em PCL-rod .....	117

Tabela A8: Exatidão para a quantificação de resíduos de rodamina presentes em PCL-rod.....	117
Tabela A9: Resultados obtidos para a figura de mérito robustez.....	118

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADM	Archer Daniels Midland Company
ATP	Trifosfato de adenosina
AZD	Azida de sódio
AZT	Azitromicina
BSA	Albumina do soro bovina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD	Metil- $\beta$ -ciclodextrina
CMC	Concentração micelar crítica
CPA	Concentrado proteico de algodão
DL	Difração de laser
DMAP	4-( <i>N,N</i> -dimetil)aminopiridina
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
EDC	Endocitose dependente de clatrina
EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EIC	Endocitose independente de clatrina
EIPA	Etil- <i>N</i> -amilorida
FDA	Food and Drug Administration
FeAso	Óxido de fenilarsina
FIII	Filipina III
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GMO	Monooleato de glicerila
GONP	Nanopartícula de proteína de algodão
GONPf	Nanopartícula de proteína de algodão fluorescente
HEPES	Tampão de ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1 piperazinetanol sulfônico
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LNC	Nanocápsula de núcleo lipídico
LNCf	Nanocápsula de núcleo lipídico fluorescente

LQ	Limite de quantificação
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV-EDS	Microscopia eletrônica de varredura com espectrômetro de energia dispersiva de raios X
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NP	Nanopartícula
PBCA	Poli(cianoacrilato de butila)
PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PCL-rod	PCL ligada covalentemente à rodamina
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons
PEG	Poli(etilenoglicol)
PLGA	Copolímero poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico)
ppt5	Precipitado de CPA obtido em pH5
ppt7	Precipitado de CPA obtido em pH7
roB	Rodamina B
rod123	Rodamina 123
RNAi	RNA interferente
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SN10	Sobrenadante de CPA obtido em pH 10
SN5	Sobrenadante de CPA obtido em pH 5
SN7	Sobrenadante de CPA obtido em pH 7
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
UV-vis	Ultravioleta – visível

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>14</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1. BIOPOLÍMEROS .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2. PROTEÍNAS VEGETAIS .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3. PROTEÍNA DE ALGODÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PROTEICAS .....</b>	<b>32</b>
<b>2.5. MECANISMOS DE CAPTAÇÃO CELULAR DE NANOPARTÍCULAS.....</b>	<b>35</b>
<b>2.5.1. ESTUDOS DE CAPTAÇÃO CELULAR.....</b>	<b>35</b>
<b>2.5.2. MECANISMOS DE CAPTAÇÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>5.1. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POR RETICULAÇÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS .....</b>	<b>75</b>
<b>5.2.1. PH.....</b>	<b>75</b>
<b>5.2.2. POTENCIAL ZETA .....</b>	<b>75</b>
<b>5.2.3. TAMANHO DAS PARTÍCULAS .....</b>	<b>76</b>
<b>5.2.4. TURBIDIMETRIA .....</b>	<b>81</b>
<b>5.2.5. MECANISMO DE FORMAÇÃO DAS GONP.....</b>	<b>81</b>
<b>5.2.6. ESTABILIDADE DE GONP.....</b>	<b>84</b>
<b>5.2.7. PREPARO DE GONPF.....</b>	<b>85</b>
<b>5.3. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS LNCs FLUORESCENTES.....</b>	<b>86</b>
<b>5.4. ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR.....</b>	<b>87</b>

<b>5.5. ANÁLISE QUALITATIVA DA CAPTAÇÃO CELULAR .....</b>	<b>89</b>
<b>5.6. ANÁLISE QUANTITATIVA DA CAPTAÇÃO CELULAR .....</b>	<b>92</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>98</b>
APÊNDICE 1: QUANTIFICAÇÃO DOS RESÍDUOS DE RODAMINA LIGADOS À PCL .....	109
OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE HIDRÓLISE .....	109
HIDRÓLISE DE PCL-ROD .....	110
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	108
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>99</b>

## 1.1. INTRODUÇÃO

A Nanotecnologia abrange várias áreas do conhecimento, desde as ciências básicas como a física e a química até as áreas aplicadas da tecnologia da informação, engenharia de materiais, farmacologia e medicina. Já é conhecido e está sendo explorado seu potencial no desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos, na regeneração de tecidos e como marcadores para técnicas de diagnóstico químicas e por imagem (ETHERIDGE et al., 2013).

Um dos desafios da nanotecnologia é a busca por matérias-primas seguras e adequadas à utilização em nanofármacos, sistemas de liberação, engenharia de tecidos e outras aplicações voltadas à saúde, incluindo derivados do carbono, polímeros, metais, cerâmicas e matérias-primas de origem natural ou biológica (WU, L.-Q.; PAYNE, 2004; REMPEL, 2007; ETHERIDGE, 2013).

Entre os principais polímeros naturais já utilizados na produção de nanoestruturas temos os polissacarídeos, como a quitosana, e proteínas de origem animal como a gelatina, a albumina e a caseína (JAHANSHAH; BABAEI, 2008; JONES; MCCLEMENTS, 2010). As proteínas vegetais têm a vantagem adicional de serem matérias-primas abundantes e que podem ser conseguidas como subproduto de outros processos produtivos, tais como o concentrado proteico de soja, que é fabricado a partir da torta resultante do processo de expressão para obtenção do óleo de soja (NESTERENKO et al., 2013).

O algodão é considerado a espécie vegetal mais importante no fornecimento de fibras têxteis e a segunda fonte de proteínas mais importante no mundo, sendo superado apenas pela soja. Sua produção mundial está estimada em 33 milhões de toneladas, sendo destinada à indústria têxtil e também à obtenção de óleo (AHMAD et al., 2007).

A torta, subproduto da produção de óleo, tem em sua composição cerca de 30 a 40% de proteínas, sendo que, destas, 60% são globulinas, 30% são albuminas e 8,5% são glutelinas. As proteínas do algodão são consideradas fontes potenciais de nutrientes para animais e humanos. No entanto, a presença de gossipol, que apresenta hepatotoxicidade, tem limitado sua

utilização. Vários métodos estão descritos em literatura visando a redução da quantidade desta substância a fim de atingir o limite tolerável de 450 ppm preconizado pelo FDA (GAO; CHANG; et al., 2010).

As proteínas do algodão já foram objeto de vários estudos descritos na literatura científica. Gao, Cao e Li (2010) avaliaram o potencial antioxidante de frações hidrolisadas das proteínas de algodão e constataram que a fração denominada III, rica nos aminoácidos fenilalanina, histidina, prolina, metionina, isoleucina e cisteína, apresentou uma forte atividade antioxidante, inibindo a auto-oxidação do ácido linolênico e apresentando, portanto, uma potencial utilização como aditivo alimentar e ingrediente farmacêutico. A obtenção de bioplástico a partir de concentrados proteicos de algodão também foi avaliada por vários grupos de pesquisa, sendo avaliado o uso de glicerol como plastificante e agentes de reticulação como formaldeído, glutaraldeído e glioxal (GREVELLEC et al., 2001; MARQUIÉ, 2001; YUE et al., 2012). A presença de grupos altamente reativos nas proteínas presentes nesses concentrados os torna interessantes como pontos de partida para reações de copolimerização, enxerto (*grafting*) e reticulação (CHEN, Y. R.; CHEN; WANG, 2011).

Dada a abundância de matéria-prima e a necessidade premente de reutilização de materiais, visando a redução dos resíduos industriais e da poluição do meio-ambiente, bem como o seu potencial como emulsificante e formação de filmes por meio da utilização de reticulantes, justifica-se a utilização do concentrado proteico de algodão como insumo para a obtenção de nanopartículas. Ainda não foram publicados estudos relatando a obtenção de micro e nanopartículas a partir do CPA, sendo o trabalho proposto inédito.

O desenvolvimento de fármacos, sistemas de liberação e formas farmacêuticas deve levar em consideração os possíveis alvos celulares para sua ação e ser desenhados de forma a atingi-los. Na terapia do câncer, na qual são empregados fármacos citotóxicos com graves efeitos adversos para os tecidos normais, a vetorização e a entrega às células cancerígenas torna-se especialmente importante (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010). Vários fármacos já têm seus alvos celulares conhecidos, como o paclitaxel, que age promovendo a polimerização da tubulina e impedindo a divisão celular e a doxorrubicina, que inibe a síntese de ácidos nucleicos (BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2004). Entender se e como os sistemas de liberação de

fármacos são captados pelas células em estudos *in vitro* pode poupar várias etapas de estudo *in vivo*, reduzindo o tempo, o custo e o uso de animais nas pesquisas.

As nanocápsulas de núcleo lipídico têm sido objeto de estudo de nosso grupo de pesquisa há mais de uma década. São sistemas constituídos por uma parede polimérica revestida por tensoativo não-iônico, cujo núcleo é composto por um lipídio sólido e um líquido. A captação das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNCs) desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa foi avaliada por Poletto e colaboradores (2012) em macrófagos isolados por lavagem da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c pela microscopia de fluorescência com excitação multifotônica. As imagens revelaram que o uso de PCL ligada à roB no preparo das LNC conferiu a elas uma emissão de fluorescência forte e estável, podendo o seu uso ser estendido a outros estudos *in vitro* que demandem o uso de marcadores fluorescentes. Além disso, apesar das LNCs conterem uma camada de polissorbato 80, que poderia impedir ou, pelo menos, dificultar a interação do nanocarreador com a superfície celular, foi evidenciada a captação dessas estruturas pelas células fagocíticas. Dessa forma, torna-se interessante verificar a capacidade de captação dessas partículas por outras linhagens celulares, bem como os mecanismos envolvidos no processo, de forma a melhor explorar o seu potencial terapêutico.

O presente trabalho trata do desenvolvimento de nanopartículas de proteína de algodão pela técnica de reticulação com cloreto de cálcio. Juntamente com as LNC, essas nanopartículas foram submetidas a estudos de captação celular em células MCF7 de câncer de mama. O mecanismo pelo qual as nanoformulações são captadas foi investigado usando inibidores farmacológicos e citometria de fluxo. Os resultados obtidos poderão dar direcionamento à escolha de fármacos a serem encapsulados nessas nanoestruturas, bem como modificações em suas formulações a fim de obter o melhor desempenho possível como carreadores em sistemas biológicos.

## 1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

De acordo com a Agência Europeia de Medicamentos, a nanotecnologia abrange estruturas inferiores a 1000 nm, projetadas para terem propriedades diferenciadas. No caso dos medicamentos, seria uma maneira de melhorar suas propriedades, como solubilidade e estabilidade, melhorar a entrega de fármacos, promover a vetorização a sítios específicos, visando diagnóstico, tratamento e a regeneração de células e tecidos (European Medicines Agency, 2014). Do desenvolvimento dos primeiros lipossomas por Gregoriadis e colaboradores na década de 1970 até os dias atuais, um grande número de sistemas nanoestruturados para a entrega de fármacos foi desenvolvido, utilizando como matérias-primas metais, derivados do carbono, lipídeos e polímeros naturais e sintéticos (COUVREUR; VAUTHIER, 2006).

As nanopartículas metálicas e os pontos quânticos estão entre as menores nanoestruturas descritas, com um diâmetro da ordem de dezenas de nanômetros. Ouro, prata, platina e ferro são alguns dos metais utilizados para a obtenção de nanopartículas. A possibilidade de conjugação com fármacos, peptídeos e outros ligantes permite a obtenção de superfícies modificadas visando a vetorização ativa, tornando-as bons carreadores para a entrega de fármacos antitumorais (LIONG, 2008).

Os fulerenos e os nanotubos de carbono são as nanopartículas derivadas do carbono mais conhecidas. Os fulerenos possuem 60 átomos de carbono e formam uma estrutura semelhante a uma bola de futebol ou aos domos desenhados por Richard Fuller. Os nanotubos de carbono podem ser constituídos por uma parede simples ou dupla e ter até metros de comprimento, porém com um diâmetro de cerca de 1 nm, equivalente à aproximadamente metade de uma hélice de DNA (FARAJI; WIPF, 2009).

Entre os sistemas nanoestruturados lipídicos, podem ser citadas as nanoemulsões, os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas e os carreadores lipídicos nanoestruturados. As nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis, compostos por gotículas de cerca de 20 a 200 nm e produzidos por técnicas de emulsificação usando alta energia, como a emulsificação a alta pressão e o ultrassom; por emulsificação espontânea ou ainda, usando a temperatura de inversão de fase (FERNANDES; SONI, 2010).

Os lipossomas são compostos por uma bicamada de lipídeos, organizados em torno de um núcleo aquoso. Devido à sua semelhança com as membras biológicas e dependendo dos lipídeos utilizados em sua composição, podem ser extremamente biocompatíveis e biodegradáveis. Lipossomas catiônicos têm despertado o interesse dos pesquisadores por sua aplicabilidade na terapia gênica, uma vez que suas cargas positivas podem interagir com a carga negativa dos ácidos nucleicos (FERNANDES; SONI, 2010).

Tanto nanopartículas lipídicas sólidas, quanto os carreadores lipídicos possuem uma capacidade de carga comparável a dos lipossomas, porém com melhor estabilidade. As nanopartículas lipídicas sólidas surgiram na década de 1990 e são compostas por um lipídio sólido à temperatura ambiente, estabilizado por um tensoativo. Os carreadores lipídicos nanoestruturados, por sua vez, são compostos por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos, o que lhes confere maior estabilidade, quando comparados com as nanopartículas lipídicas sólidas (ABDEL-MOTTALEB, NEUMANN, 2011).

## **2.1. Nanopartículas produzidas a partir de polímeros sintéticos**

As nanopartículas poliméricas estão entre os sistemas nanométricos mais utilizados devido à sua estabilidade, segurança e por permitirem a modificação de superfície, propriedade fundamental para a obtenção de carreadores para vetorização ativa. Incluem tipos variados de sistemas como as nanoesferas, micelas poliméricas, dendrímeros e nanocápsulas (FARAJI; WIPF, 2009).

As micelas poliméricas são formadas por auto-organização de polímeros dibloco ou tribloco, compondo uma parede hidrofílica e um interior hidrofóbico. As micelas inversas (*polymersomes*), por outro lado, são formadas por uma parede hidrofóbica e um interior hidrofílico, de maneira análoga à estrutura de um lipossoma (FERNANDES; SONI, 2010). Os dendrímeros, por sua vez, são estruturas formadas por um núcleo funcional e cadeias poliméricas ramificadas com as quais moléculas de fármaco podem interagir por forças de van der

Waals, ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas (DEVALAPALLY; CHAKILAM, 2007).

As nanoesferas são partículas matriciais constituídas por polímero e tensoativo, nas quais o fármaco encontra-se disperso ou adsorvido. Quando o sistema inclui um óleo em sua composição, tem-se a formação de nanocápsulas, com o núcleo oleoso circundado por uma parede polimérica. Dependendo da natureza do fármaco a ser carregado por estas estruturas, este poderá estar encapsulado no núcleo, disperso ou adsorvido na parede polimérica (GUTERRES; ALVES, 2007).

### **2.1.1. Nanocápsulas de núcleo lipídico**

As nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) são um sistema híbrido composto por uma parede polimérica e um núcleo lipídico no qual um lipídio sólido está disperso em um óleo. As proporções ótimas dos componentes da LNC foram definidas por Venturini e colaboradores em 2011, de forma que, durante o processo de formulação, sejam obtidas exclusivamente nanocápsulas, evitando a presença de nanoesferas e nanoemulsão no sistema. As partículas são em geral produzidas por deposição interfacial do polímero pré-formado, em que uma fase orgânica contendo o polímero e os componentes lipofílicos é injetada em uma fase aquosa contendo tensoativo de alto EHL, sendo o solvente orgânico e parte da água removidos por evaporação à pressão reduzida.

A presença do lipídio sólido no núcleo das LNC as torna mais rígidas quando comparadas com nanocápsulas convencionais (FIEL et al, 2011) e contribui para o controle da liberação dos fármacos hidrofóbicos presentes no núcleo. As LNC possuem duas barreiras difusionais, pois além do núcleo hidrofóbico a tortuosidade da parede polimérica constitui outra barreira à difusão (POLETTTO et al, 2008; JÄGER et al, 2009). Dependendo do coeficiente de distribuição (logD) do fármaco a ser encapsulado, são possíveis seis formas de distribuição no nanocarreador (OLIVEIRA et al, 2012):

- Tipo I: não são passíveis de nanoencapsulação em LNC (valores de logD negativos)

- Tipo II: parte do fármaco fica retida na parede polimérica e parte permanece na fase contínua (logD próximo a zero)
- Tipo III: o fármaco se encontra na fase contínua, disperso na interface com o polímero e dissolvido no núcleo (logD próximo a 2,0)
- Tipo IV: o fármaco encontra-se disperso principalmente no polímero e parte dele encontra-se dissolvido no núcleo (logD próximo a 2,0)
- Tipo V: parte do fármaco está dissolvida no núcleo, parte está dispersa no polímero e o restante está na fase contínua, formando agregados (logD próximo a 3)
- Tipo VI: grande parte do fármaco está dissolvida no núcleo e o restante, disperso na parede polimérica (logD próximo de 4,0)

Entre as principais propriedades biológicas já descritas para as LNC, pode-se citar o aumento da tolerância gastrointestinal em ratos tratados com LNC contendo diclofenaco (SCHAFFAZICK et al, 2003) ou indometacina (RAFFIN et al, 2003). LNC contendo indometacina apresentaram citotoxicidade frente a células de glioma (BERNARDI et al, 2008); reduziram o desenvolvimento de glioblastomas em ratos (BERNARDI et al, 2009); protegeram células de hipocampo do dano causado pela isquemia (BERNARDI et al, 2010) e atenuaram a perda de memória em ratos em modelos de doença de Alzheimer (BERNARDI et al, 2012). Além disso, aumentaram a concentração cerebral de resveratrol após administração oral (FROZZA et al, 2010) e LNC contendo nimesulida reduziram o edema de pata e a formação de granulomas (LENZ, et al, 2012). Todos esses estudos demonstram a aplicabilidade das LNC e seu potencial uso em medicamentos.

## **2.2. Biopolímeros**

Os principais polímeros naturais usados na produção de carreadores nanoestruturados são polissacarídeos e proteínas, de origem animal ou vegetal. A seleção de materiais para a produção de nanocarreadores depende

de fatores que incluem (JAHANSHAHI; BABAEI, 2008; JONES; MCCLEMENTS, 2010; MISHRA; HUBENAK; MATHUR, 2013):

- tamanho final e carga de superfície desejados para as partículas;
- propriedades físico-químicas do fármaco ou substância que se pretende encapsular
- a segurança do material, incluindo aspectos de biodegradabilidade, biocompatibilidade e antigenicidade
- perfil de liberação desejado
- capacidade do biopolímero de se associar na forma de partículas

Os carreadores resultantes podem ter estrutura interna homogênea, como uma nanoesfera, ou um núcleo oleoso, formando uma estrutura núcleo-casca (*core-shell*), ou ainda ser uma nanoemulsão, visto que proteínas têm propriedades tensoativas.

Nanomateriais derivados de proteínas teriam a vantagem de ser biodegradáveis e não antigênicos, além de facilitar a adição covalente de ligantes graças, por exemplo, a presença de átomos de enxofre em alguns aminoácidos (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012).

Um dos nanomedicamentos presentes no mercado americano desde 2005 é o Abraxane<sup>®</sup> composto de paclitaxel ligado a nanopartículas de albumina em forma de pó para suspensão para perfusão endovenosa (MISHRA et al., 2013).

Recentemente, Han e colaboradores (2014) propuseram o uso de nanopartículas catiônicas de albumina bovina como vetores de siRNA para entrega em células A549 (câncer de pulmão), HepG2 (câncer de fígado) e B16 (melanoma). Para a preparação das nanopartículas, inicialmente, a albumina bovina foi conjugada à etilenodiamina e ligada à EDCI para obtenção de diferentes graus de cationização. Soluções de albumina catiônica foram misturadas com soluções da sequência de siRNA, formando as partículas por interação eletrostática em diferentes proporções N/P (nitrogênio do polycation/fosfato do RNA). Foram obtidas altas eficiências de captação, com escape do siRNA de endossomos e lisossomos.

A presença de grupos tiol reativos torna a albumina interessante para a construção de nanocarreadores para vetorização ativa. Martínez e colegas (2013) desenvolveram nanopartículas de albumina e albumina/alginato para entrega de tamoxifeno, utilizando folato como ligante de vetorização. BSA foi tratada com 2-mercaptoetanol para obtenção de BSA-SH e o alginato, conjugado à L-cisteína mediante uma reação com carbodiimida (ALG-Cis). As nanopartículas resultantes foram incubadas com uma solução alcoólica de tamoxifeno e liofilizadas. Foram obtidas partículas negativas, com potencial zeta variando entre -10 e -43 mV e tamanhos da ordem de 350 nm (PCS). Após a conjugação com tamoxifeno, o potencial zeta passou a ser positivo, com valores em torno de +30 mV. A captação das nanopartículas foi testada em células MCF7, HeLa e T47D. Apesar das células MCF7 expressarem receptores de folato, a conjugação com ácido fólico não aumentou significativamente a captação.

Nanossistemas compostos por gelatina vêm sendo descritos desde o final da década de 1970. É uma matéria-prima disponível em grau farmacêutico, de baixo custo, raramente contaminada com pirogênicos e com a possibilidade de ser esterilizada. Como outras proteínas de origem animal, possui uma antigenicidade, porém em baixo grau. A estrutura primária da gelatina oferece várias possibilidades de modificação química e ligação covalente de fármacos e ligantes para vetorização ativa (ELZOGHBY, 2013).

Nanopartículas de gelatina são, em geral, produzidas por reticulação com glutaraldeído. Jain *et al* (2008) produziram nanopartículas de gelatina por dessolvatação com acetona e reticuladas com glutaraldeído para a encapsulação de didanozina. Após a produção das NPs, resíduos de manose foram adicionados por reação com os grupos amino livres presentes na superfície. As partículas resultantes tinham em torno de 325 nm (MEV), com potencial zeta de +6,2 mV. A captação celular foi avaliada em macrófagos alveolares e demonstrou que a manosição aumenta muito a capacidade das NPs de serem captadas, o que era esperado, uma vez que os macrófagos expressam receptores para manose.

### 2.3. Proteínas vegetais

Entre as proteínas vegetais já empregadas na produção de nanoformulações estão a gliadina, zeína, legumina e os isolados de soja.

A gliadina é um conjunto de proteínas extraídas do glúten, descrita como potencialmente mucoadesiva e com grande tropismo por regiões do trato gastrointestinal superior. A sua composição rica em aminoácidos neutros favoreceria a interação via pontes de hidrogênio com a mucosa, enquanto que os grupos dissulfeto das cadeias laterais poderia favorecer a interação com a mucina. Nanopartículas de gliadina poderiam ser usadas para a entrega de fármacos hidrofóbicos e anfifílicos (ARANGO et al., 2000; JAHANSHAH; BABAEI, 2008; LAI; GUO, 2011).

Devido à sua alta hidrofobicidade, a gliadina pode ser usada para a produção de nanopartículas sem o uso de outros aditivos químicos e tratamentos físicos, pois as interações hidrofóbicas seriam capazes de mantê-las estáveis (ELZOGHBY et al., 2012).

A zeína é uma proteína derivada do milho, insolúvel em água, mas solúvel em etanol. Sua composição se divide em 75% de aminoácidos hidrofóbicos e 25% de aminoácidos hidrofílicos. Alguns estudos demonstram sua capacidade em veicular fármacos pouco solúveis em água. Dispersões líquido-líquido foram produzidas a partir de uma solução de zeína em etanol incorporadas em soluções de zeína em água em agitadores de alta velocidade. Quando a quantidade de etanol nas gotículas cai a um valor crítico, a proteína torna-se insolúvel e precipita, formando as nanopartículas (ELZOGHBY et al., 2012; LAI; GUO, 2011; PODARALLA; PERUMAL, 2012).

A legumina é uma das principais proteínas de reserva das sementes de ervilha. Sua estrutura é bastante semelhante à caseína. Em 2010, Donsi e colaboradores propuseram o uso de nanoemulsões de legumina para a entrega de nutracêuticos, como vitamina E e as demais vitaminas lipossolúveis. Soluções de legumina foram homogeneizadas com óleo de girassol em ultraturrax, seguida por homogeneização a alta pressão. Foram obtidas emulsões com ótima estabilidade e tamanho de gota em torno de 200 nm (DONSÌ et al., 2010).

Os isolados de proteína de soja têm como componentes majoritários as globulinas 7S ( $\beta$ -conglucina) e 11S (glicina). (ELZOGHBY et al., 2012) Zhang e colaboradores (2012) propuseram a obtenção de nanopartículas de soja por reticulação da proteína desnaturada com cloreto de cálcio e obtiveram nanopartículas estáveis por 21 dias a 4°C e compatíveis com células Caco-2.

#### **2.4. Proteína de algodão**

O algodão é considerado a espécie vegetal mais importante no fornecimento de fibras têxteis e a segunda fonte de proteínas mais importante no mundo, sendo superado apenas pela soja (AHMAD et al., 2007). Sua produção mundial está estimada em 33 milhões de toneladas, sendo destinada à indústria têxtil e também à obtenção de óleo. A espécie mais utilizada para fins comerciais é o *Gossypium hirsutum*, mas também são usadas a *G. barbadensis*, *G. arboreum* e *G. herbaceum* (WENDEL et al., 2009).

A torta, subproduto da produção de óleo, tem em sua composição cerca de 30 a 40% de proteínas, sendo que, destas, 60% são globulinas, 30% são albuminas e 8,5% são glutelinas. As proteínas do algodão são consideradas fontes potenciais de nutrientes para animais e humanos. No entanto, a presença de gossipol, que apresenta hepatotoxicidade, tem limitado sua utilização. Vários métodos estão descritos em literatura visando a redução da quantidade desta substância a fim de atingir o limite tolerável de 450 ppm preconizado pelo FDA (GAO; CHANG; et al., 2010).

Os primeiros estudos com proteínas de algodão datam de 1925, com os trabalhos de Jones e Csonka. Segundo os autores, a torta poderia ser dividida em 5 frações: Frações de alto teor de cinzas I e II; proteína-pentose; glutelinas e  $\alpha$  e  $\beta$ -globulinas. O estudo posterior de Karon, Adams e Altschul (1950) determinou, por eletroforese, a presença de dois componentes majoritários e dois minoritários. A primeira globulina caracterizada foi a alcalina A ou congossipina, também conhecida como globulina 7S presente no endosperma da semente de algodão, com um peso molecular de 119 kDa (ROSSI-FANELLI et al., 1964; ZARINS; PHILLIPS, 1984).

A composição em aminoácidos típica das tortas excedentes da produção de óleo de algodão foi descrita por Li e colaboradores (2010) e está transcrita no Quadro 1.

Quadro 1: Composição em aminoácidos das tortas de semente de algodão

<b>Aminoácido</b>	<b>Quantidade (%)</b>
<b>Alanina</b>	1,42 ± 0,03
<b>Arginina</b>	4,54 ± 0,05
<b>Asparagina</b>	1,57 ± 0,06
<b>Ácido aspártico</b>	1,94 ± 0,05
<b>Cisteína</b>	0,70 ± 0,04
<b>Glutamina</b>	3,81 ± 0,08
<b>Ácido glutâmico</b>	4,39 ± 0,10
<b>Glicina</b>	2,12 ± 0,04
<b>Histidina</b>	1,08 ± 0,03
<b>Hidroxiprolina</b>	0,05 ± 0,00
<b>Isoleucina</b>	1,19 ± 0,02
<b>Leucina</b>	2,26 ± 0,03
<b>Lisina</b>	1,66 ± 0,03
<b>Metionina</b>	0,66 ± 0,01
<b>Fenilalanina</b>	2,02 ± 0,04
<b>Prolina</b>	1,89 ± 0,06
<b>Serina</b>	1,72 ± 0,04
<b>Triptofano</b>	0,44 ± 0,01
<b>Treonina</b>	1,25 ± 0,03
<b>Tirosina</b>	1,10 ± 0,03
<b>Valina</b>	1,69 ± 0,02

Fonte: adaptado de Li e colaboradores (2010)

Gao, Cao e Li (2010) avaliaram o potencial antioxidante de frações hidrolisadas das proteínas de algodão e constataram que a fração denominada III, rica nos aminoácidos fenilalanina, histidina, prolina, metionina, isoleucina e cisteína, apresentou uma forte atividade antioxidante, inibindo a auto-oxidação

do ácido linolênico e apresentando, portanto, uma potencial utilização como aditivo alimentar e ingrediente farmacêutico.

A presença de grupos altamente reativos nas proteínas presentes nos concentrados proteicos de algodão os torna interessantes como pontos de partida para reações de copolimerização, enxerto e ligações cruzadas (CHEN, Y. R. et al., 2011). A obtenção de bioplástico a partir destas reações foi avaliada por vários grupos de pesquisa (GREVELLEC et al., 2001; MARQUIÉ, 2001; YUE et al., 2012). Grevellec *et al* (2001) propuseram a produção de bioplástico por extrusão e termomoldagem usando o glicerol como plastificante. Já Chen, Chen e Wang produziram um bioplástico utilizando glicerol, glutaraldeído (para a obtenção de ligações cruzadas) e montmorilonita de sódio, moldado sob pressão. Como resultado, obtiveram um produto com propriedades mecânicas e resistência a água melhoradas. Yue e colaboradores (2012), por sua vez, promoveram inicialmente a desnaturação das proteínas, seguida da ligação cruzada com formaldeído, glutaraldeído ou glioxal. Por fim, glicerol foi adicionado para dar flexibilidade ao filme e a mistura foi submetida à moldagem por pressão a quente. Como resultado, foram obtidos bioplástico com grande estabilidade térmica, resistência à absorção de água e resistência mecânica.

## **2.5. Métodos de preparação de nanopartículas proteicas**

Nanopartículas de proteínas podem ser preparadas por meio de vários métodos físico-químicos como segregação/gelificação, agregação, redução de tamanho e remoção de solvente.

As forças-motrizes da formação de nanoestruturas a partir de biopolímeros são as interações físico-químicas entre as moléculas e entre estas e o meio no qual estão inseridas. A grande maioria dos métodos de produção de nanopartículas a partir de biopolímeros consiste em alterar as condições do meio de forma controlada para que os biopolímeros deixem de interagir com o meio para interagir entre si. Temperatura, pH, força iônica e presença de não-solventes são os principais meios para induzir a formação de partículas (JONES; MCCLEMENTS, 2010).

Interações eletrostáticas podem ocorrer entre espécies carregadas, lembrando que a carga de superfície tem correlação direta com o pH do meio. Por serem moléculas grandes e complexas, proteínas, muitas vezes, têm regiões de carga positiva e negativa dentro da mesma molécula (ELZOGHBY, 2013).

As interações hidrofóbicas são resultado de uma exclusão termodinamicamente favorável das espécies apolares em relação à água. Nas proteínas globulares, a cadeia polipeptídica é geralmente dobrada formando uma estrutura compacta esferoide, no interior da qual estão alojados a maioria dos aminoácidos apolares. O uso de técnicas que levam a desnaturação da proteína como aquecimento, adição de sais e alteração de pH fazem com que a estrutura terciária da proteína se desorganize e exponha esses resíduos, tornando-os altamente propícios a fazerem interações hidrofóbicas com os resíduos das moléculas vizinhas. A agregação, neste caso, pode ser irreversível (JONES; MCCLEMENTS, 2010; ELZOGHBY, 2013).

Interações por exclusão de volume resultam do fato de duas moléculas diferentes não poderem ocupar o mesmo espaço devido à sua forma, conformação ou carga, reduzindo a entropia do sistema. Acima de uma concentração crítica, forças osmóticas favorecem a separação de fases das diferentes espécies envolvidas. Tendo sido separadas, as fases podem ser extrusadas para formar um sistema composto por uma fase aquosa dispersa em outra fase aquosa (emulsão de água em água –  $A_1/A_2$ ). As partículas podem então ser formadas pela adição de um gelificante à fase interna (JONES; MCCLEMENTS, 2010).

Reações químicas entre proteínas incluem formação de pontes dissulfeto, oxidação fenólica, reação de Maillard e transglutaminase. Ligações cruzadas entre peptídeos podem ser feitas pela adição de aldeídos (glutaraldeído, formaldeído), enzimas (transglutaminase ou lacase) e íons minerais (potássio, cálcio, tripolifosfato) (ELZOGHBY; EL-FOTOH, 2011; DHAYAL, 2014).

### Emulsificação (JAHANSHAH; BABAEI, 2008; ELZOGHBY, 2013)

Este método consiste em preparar uma solução aquosa de proteína e verte-la sobre óleo vegetal, seguida de agitação a alta velocidade. Pode ou não ser usado um agente de reticulação para estabilização da estrutura.

### Dessorção de solvente (JONES; MCCLEMENTS, 2010)

Neste método, a proteína e a substância a ser encapsulada são dissolvidas em um solvente adequado. Condições que piorem a interação das moléculas de proteína com o solvente, tais como adição de co-solventes incompatíveis, agentes de agregação ou diminuição de volume por evaporação induzem a agregação das moléculas de proteína, promovendo a encapsulação da substância de interesse.

De acordo com a maneira pela qual a interação proteína/solvente é perturbada, o método recebe outras denominações:

- Adição de sais ao meio: produção de partículas por precipitação por sais (*salting out*) ou coacervação
- Adição de um não-solvente: dessolvatação
- Evaporação: deslocamento de solvente ou deposição interfacial

### Injeção (JONES; MCCLEMENTS, 2010)

Partículas são formadas por injeção quando uma solução do biopolímero é adicionada a um meio que promova a gelificação, como a presença de um ácido ou base ou, ainda, que esteja em uma temperatura adequada.

### Reticulação (ELZOGHBY, 2013; JONES; MCCLEMENTS, 2010)

Para a reticulação, *cross-linking* ou ligação cruzada são utilizados agentes químicos capazes de promover reações com os grupo amino-terminais dos peptídeos, tais como os aldeídos; pontes dissulfeto entre os aminoácidos sulfurados ou íons metálicos que formam pontes de sal entre as cadeias peptídicas de cargas iguais entre si, mas oposta à do íon, diminuindo as forças de repulsão e estabilizando a partícula.

Enzimas como a genipina, obtida dos frutos de gardênia reagem ligando dois resíduos de lisina livres entre cadeias diferentes de aminoácidos e, apesar

do tempo longo de reação requerido para a estabilização completa, tem a grande vantagem de ser muito menos tóxica que o glutaraldeído.

## **2.6. Mecanismos de captação celular de nanopartículas**

### **2.6.1. Estudos de captação celular**

O desenvolvimento da pesquisa científica tem detalhado cada vez mais os mecanismos das doenças, de forma que, se há 100 anos pensava-se em um órgão afetado, hoje pensamos em tipos de células doentes ou até mesmo organelas doentes, citando como exemplo as mitocondriopatias que afetam os músculos e, até mesmo, o sistema nervoso central (VASCONCELLOS et al., 2007).

Para que os fármacos possam desenvolver sua ação, uma série de interações com diversos tipos de células é necessária. Em primeiro lugar, é preciso cruzar a membrana plasmática, difundir no citoplasma e, finalmente, atingir a organela-alvo. Dependendo de como a interação com a membrana plasmática ocorre e o tipo de receptor que é ativado, este fármaco pode ser direcionado para a degradação lisossomal. Da mesma forma, pode ser alvo de bombas de efluxo, como a glicoproteína P e ser exocitado. O uso de nanocarreadores pode modular a entrada de fármacos na célula, de forma a evitar a degradação e/ou o efluxo e promover uma resposta farmacodinâmica mais adequada. Assim, conhecer os mecanismos de internalização dos carreadores nanoestruturados torna-se fundamental para garantir que a entrega seja adequada (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009).

Várias linhagens celulares já foram utilizadas em estudos de captação celular envolvendo nanoestruturas, entre elas as células MDCK de rim de cães (HARUSH-FRENKEL; ROZENTUR; et al., 2008), U87MG de gliomas (MO et al., 2012) e diferentes linhagens de macrófagos, como J772 (ZAKI; NASTI; TIRELLI, 2011) e RAW 264 (CHAUDHARI, KIRAN R. et al., 2012).

Embora a captação de nanopartículas por células do sistema fagocítico mononuclear seja *a priori* indesejada, uma vez que os carreadores são retirados da corrente sanguínea e impedidos de atingir os órgãos-alvo, os nanossistemas podem ser direcionados para a captação por macrófagos a fim de atuarem como “cavalos de Tróia”. Considerando que vários agentes

infeciosos são capazes de sobreviver dentro das células após serem fagocitados, a entrega de antibióticos neste ambiente torna-se importante para uma maior eficácia do tratamento. A nanoestruturação de ampicilina em partículas de poli(butilcianoacrilato) aumentou a eficácia do fármaco em modelos murinos de infecções por *Listeria monocitogenes* e *Salmonella typhimurium*. A entrega de fármacos antirretrovirais a macrófagos é também importante, uma vez que estas células são reservatórios virais, incluindo o HIV (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009). Outra abordagem interessante é o tratamento de doenças inflamatórias intestinais, como a retocolite ulcerativa e a doença de Crohn. Macrófagos circulantes que sejam recrutados para o intestino poderão carrear fármacos para o tratamento da inflamação. Além disso, macrófagos e células dendríticas fazem parte do sistema imunológico associado ao intestino e, devido à inflamação, encontram-se ativados e em grande número, sendo capazes de captar as nanopartículas e promover o acúmulo de fármaco para o tratamento da região afetada (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012).

As células MCF7 foram isoladas pela primeira vez em 1970 a partir do lavado pleural de uma paciente apresentando adenocarcinoma de mama metastático. As células foram imortalizadas e constituíram uma linhagem celular bem definida em 1973. Seu nome é a sigla derivada de Michigan Cancer Foundation (SOULE et al., 1973). As MCF7 expressam receptores de estrogênio e progesterona, sendo seu crescimento estimulado em presença de estradiol (especialmente quando implantadas em modelos animais) e inibido em presença de agentes antiestrogênicos. Como as demais linhagens de células luminais do tipo A, como T47D e SUM185, não expressa o fator de crescimento epidermal humano (HER2) (LEVENSON; JORDAN, 1997; HOLLIDAY; SPEIRS, 2011).

Apenas algumas linhagens derivadas de células MCF7, como MCF7/ADR, MCF7/VP e MCF7/AdVp3000, expressam transportadores de efluxo que promovem a resistência a múltiplos fármacos e cujo principal exemplo é a superfamília de proteínas ABC (*ATP-binding cassette*). Por ser este um dos principais mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células cancerígenas a antineoplásicos, estas linhagens são utilizadas em estudos

envolvendo fármacos susceptíveis, como a doxorubicina e o etoposídeo (CHAUVIER; MORJANI; MANFAIT, 2002; MOITRA et al., 2012).

Jain e colaboradores (2012) avaliaram nanocápsulas líquido cristalinas de monooleato de glicerila (GMO) contendo paclitaxel, conhecido não só pela sua eficácia, como também por sua baixa solubilidade em água e por produzir importantes efeitos adversos, tais como a neurotoxicidade e anafilaxia. Considerando o potencial indutor de hemólise do GMO, os autores usaram o polietilenoglicol (PEG) para tornar as nanocápsulas hemocompatíveis. O PEG tem como vantagens adicionais prevenir o reconhecimento pelo sistema imune e aumentar o tempo de circulação sanguínea, controlar a liberação e aumentar a estabilidade física das nanopartículas. Foram realizados ensaios de citotoxicidade pela técnica de MTT e a captação celular foi avaliada utilizando partículas fluorescentes contendo 6-cumarina e contagem em citômetro de fluxo. Ficou evidenciado que, enquanto o paclitaxel foi capaz de induzir a morte celular em 50% das células em sua maior dose ( $0,23 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ), as nanocápsulas tiveram o mesmo efeito com uma dose de  $0,073 \pm 0,006 \mu\text{M}$ . Observou-se, também, que o efeito citotóxico aumentou com o tempo de contato das nanocápsulas com as células MCF7 (24, 48 e 72 h). O estudo de captação celular em citômetro de fluxo revelou que as nanocápsulas não PEGladas são captadas em maior quantidade que as PEGladas. Os autores atribuem esse resultado ao fato do PEG impedir as interações do GMO com a parede celular, o qual tem conhecida propriedade de bioadesiva. Foram avaliados os tempos de incubação de 0,5; 2 e 24 horas, sendo observada a maior captação em 24 horas, tanto para os sistemas PEGlados quanto não PEGlados.

Outro estudo envolvendo as células MCF7 foi o de Bazylińska e colaboradores (2012), no qual foi avaliada a captação celular de uma nanocápsula multicamada contendo IR-768, uma cianina para uso em terapia fotodinâmica. Os carreadores foram fabricados segundo uma técnica camada por camada (*layer-by-layer*) a partir de uma nanoemulsão. A parede das nanocápsulas é constituída de 4-estirenosulfonato de polissódio (PSS) e cloreto de poli(dialil-dimetil amônio) (PDADMAC), os quais possuem cargas opostas. Foram avaliados o efeito da espessura da parede e de sua carga superficial sobre a captação celular. As células foram mantidas em incubação

por 24 horas com os diferentes tipos de nanocápsulas avaliadas contendo ou não o fármaco em avaliação ou com o IR-768 em doses que permitissem uma concentração final de  $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de fármaco no meio. O melhor desempenho de captação foi conseguido com as nanocápsulas revestidas com quatro camadas de PSS/PDADMAC. Também se observou que partículas positivamente carregadas apresentaram melhor desempenho que as negativamente carregadas. Por meio da microscopia confocal foi possível observar que a cianina livre estava regularmente difusa no citoplasma da célula, com uma fluorescência mais intensa ao redor da membrana nuclear. O sistema cujo núcleo foi construído a partir de uma nanoemulsão de dimetilsulfato de dodecamida N,N-bis[propil- 3,3'(trimetilamônio)] ficou acumulado tanto no núcleo quanto no citoplasma das células, sendo considerado o mais promissor para uma investigação futura mais aprofundada.

A captação de nanopartículas de polibutilcianoacrilato PEGlado conjugadas com zoledronato e contendo docetaxel por células MCF7 e BO2 (modelo para metástases ósseas) foi objeto de estudo de Chaudhari e colaboradores (2012). Da mesma forma que nos estudos anteriores, a captação foi avaliada por microscopia confocal e citometria de fluxo e a citotoxicidade, por meio do ensaio de MTT. A captação das nanopartículas conjugadas com zoledronato, após 30 minutos de incubação, foi 1,62 vezes maior que a das partículas PEGladas e não conjugadas. A internalização das nanopartículas conjugadas atingiu 100% após 120 minutos de estudo e foi cerca de 40% superior em relação à captação das não-conjugadas. O  $\text{IC}_{50}$  determinado no ensaio de MTT também demonstrou que as partículas conjugadas são mais citotóxicas que os demais sistemas testados. Apenas para a linhagem BO2 foram realizados ensaios para determinação do mecanismo de internalização, sugerindo que este seja mediado por clatrina e caveolina para as nanopartículas não conjugadas. Considerando que o uso de inibidores para os dois transportadores isoladamente e simultaneamente não impediu a captação da totalidade das nanopartículas conjugadas com zoledronato, sugere-se que outros mecanismos de transporte estejam envolvidos nesse caso, sendo necessária uma avaliação complementar posterior.

Nanopartículas de poli(lactídeo)-D- $\alpha$ -tocoferil-succinato de polietilenoglicol (PLA-TPGS) foram desenvolvidas por Tan (2014) e colegas para encapsulação de docetaxel e tamoxifeno usando a técnica de nanoprecipitação. As partículas resultantes, com diâmetro de cerca de 180 nm tiveram sua captação avaliada em células MCF7 em diferentes tempos de incubação. A captação foi tempo e dose-dependente, porém, comparando a captação das NPs com a do fluoróforo livre usado como marcador (6-cumarina) nas doses mais altas do estudo, 6 e 12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , observa-se que as NPs são menos captadas, possivelmente porque a alta concentração fora da célula favoreceu a entrada por gradiente.

A captação das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNCs) desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa foi avaliada por Poletto e colaboradores (2012) em macrófagos isolados por lavagem da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c.  $5 \times 10^5$  células foram transferidas para placas de 24 poços contendo lamínulas redondas em seu interior e incubadas com 200  $\mu\text{L}$  de suspensão de LNC por 2 h. Na sequência, as lamínulas foram removidas, lavadas com PBS e observadas em microscópio de fluorescência com excitação multifotônica. As imagens revelaram que o uso de PCL ligada à roB no preparo das LNC conferiu a elas uma emissão de fluorescência forte e estável, podendo o seu uso ser estendido a outros estudos *in vitro* que demandem o uso de marcadores fluorescentes.

### **2.6.2. Mecanismos de captação**

Os mecanismos pelos quais uma célula capta uma nanoestrutura variam de acordo com vários fatores, como o tipo de célula, tamanho da partícula, sua composição e carga de superfície (IVERSEN; SKOTLAND; SANDVIG, 2011; HÜHN et al., 2013).

Embora o tipo de célula seja o fator determinante para a eficiência com que as nanopartículas são captadas, vários autores demonstraram que seu tamanho também exerce influência na extensão da captação. Partículas entre 20 e 50 nm seriam mais captadas que partículas menores ou maiores que estas (IVERSEN; SKOTLAND; SANDVIG, 2011; SHANG; NIENHAUS, 2014).

Alguns estudos, por outro lado, demonstram que a captação de partículas entre 100 e 200 nm também é eficiente (WIN; FENG, 2005; HILLAIREAU; COUVREUR, 2009).

Considerando que a superfície celular apresenta uma carga negativa, seria esperado que partículas com carga positiva fossem mais captadas que aquelas com carga negativa. Isso é real para algumas linhagens celulares como as HeLa, mas não o é para as células HEK, por exemplo (FRÖHLICH, 2012; IVERSEN et al., 2011).

Os mecanismos de captação diferem bastante em células polarizadas e não-polarizadas, sendo que, nas primeiras, a face apical pode captar partículas por mecanismos diferentes em relação à face basolateral (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009).

A endocitose é o processo pelo qual uma célula capta macromoléculas e substâncias particuladas. De forma simples, o material a ser ingerido é circundado por uma porção de membrana plasmática, formando a vesícula endocítica. Os principais mecanismos de endocitose estão representados na Figura 1.

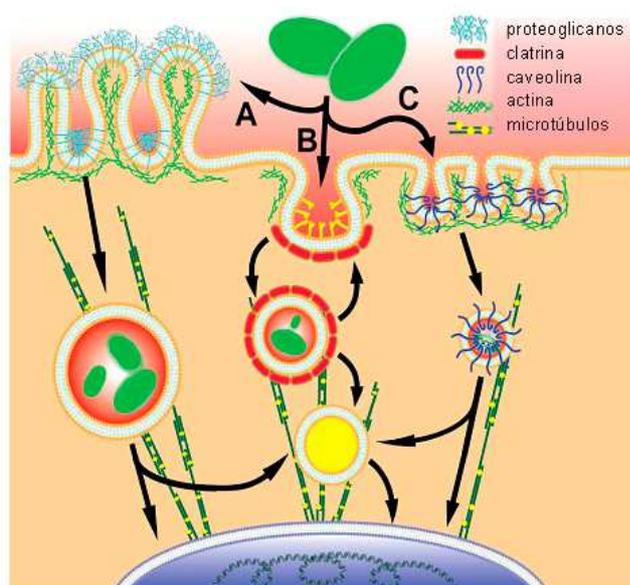


Figura 1: Esquema dos principais mecanismos de endocitose. A = macropinocitose; B = endocitose dependente de clatrina; C = endocitose dependente de caveolina; o círculo amarelo representa um lisossomo (Adaptado de ADLER, LEONG, 2010).

A fagocitose é usada para a captação de partículas maiores que 500 nm. A vesícula resultante, o fagossomo, pode ter um tamanho maior que 250 nm de diâmetro. Depois de formado, o fagossomo segue para os lisossomos, havendo a fusão entre as membranas para formação do fago-lisossomo e digestão do material fagocitado. Qualquer material que não possa ser degradado permanece nos lisossomos, formando os corpos residuais que podem posteriormente ser exocitados (ALBERTS et al., 2010).

As células fagocíticas possuem, em sua membrana, receptores que devem ser ativados para que a fagocitose ocorra. Uma vez ocorrida a ativação, desencadeia-se a polimerização da actina por GTPases da família Rho, permitindo a formação dos pseudópodos que envolverão o micro-organismo ou material a ser fagocitado. Para fechar o fagossomo, a PI 3-quinase promove a despolimerização da actina (ALBERTS et al., 2010).

O mecanismo de endocitose melhor conhecido é o mediado por clatrina ou endocitose dependente de clatrina (EDC). Vários nutrientes e receptores envolvidos em mecanismos de transdução de sinal, como LDL e transferrina, são internalizados por este processo. As fossas revestidas de clatrina ocupam cerca de 2% da área total da membrana plasmática. O tempo de vida destas estruturas é curto: em pouco mais de um minuto ela é formada, invagina-se e destaca-se para formar uma vesícula revestida de clatrina. Além da clatrina, as vesículas são revestidas por uma segunda camada de proteínas adaptadoras AP-2, que ligam o revestimento de clatrina à membrana e aprisionam também várias proteínas transmembrana, que incluem os receptores que se ligam à molécula-carga. A ligação das proteínas adaptadoras com fosfoinosítídeos auxilia no controle dos eventos de tráfego celular. À medida que a vesícula de clatrina se forma, proteínas citoplasmáticas solúveis como a dinamina formam um anel ao redor do pescoço de cada vesícula. A dinamina, ainda, recruta outras proteínas que auxiliam no dobramento da membrana no ponto do pescoço da vesícula, alterando a composição lipídica ou torcendo a bicamada. O endossomo recém-formado segue para o encontro dos lisossomos por via do transporte por microtúbulos (ADLER; LEONG, 2010; ALBERTS et al., 2010).

A endocitose mediada por caveolina foi originalmente descrita como o modo pelo qual os vírus SV40 entram nas células. Os cavéolos são invaginações da membrana plasmática, no formato de um frasco, com cerca de

50 a 80 nm, revestidas por caveolina-1. Estão presentes na membrana plasmática de quase todos os tipos de célula e se formam a partir de microdomínios da membrana plasmática ricos em colesterol, glicosíngolipídeos e GPIs, proteínas de membrana ancoradas por glicosilfosfatidilinositol. As caveolinas, unidades estruturais dos cavéolos, são proteínas integrais de membrana que possuem uma alça hidrofóbica no lado citosólico da membrana, mas não se estende através desta. Uma vez endocitado, o material fica retido em uma vesícula rodeada pela membrana caveolar, de natureza lipídica, estabilizada pelas caveolinas. Os cavéolos destacam-se da membrana celular com ajuda da dinamina e, segundo alguns autores, podem entregar seu conteúdo para compartimentos semelhantes a endossomos, formando o caveossomo. Estudos mais recentes, no entanto, concluíram que os caveossomos são, na verdade, um artefato em células que superexpressam constructos de caveolina-1, devendo o uso do termo ser abandonado. Alguns estudos consideram que as vesículas internalizadas por mecanismos caveolina dependentes não passariam pelos lisossomos (ADLER; LEONG, 2010), sendo entregues diretamente no retículo endoplasmático. Por outro lado, outros autores consideram que as vesículas se fundem normalmente com endossomos acidificados capazes de transferir o material para os lisossomos (IVERSEN et al., 2011).

A macropinocitose é o mecanismo predominante na captação de fluidos e solutos que rodeiam a célula. Todas as substâncias presentes no fluido são captadas por ondulações da membrana celular guiadas pela actina. Ao contrário dos fagossomos, as vesículas pinocíticas são menores, com cerca de 100 nm de diâmetro que podem evitar a fusão com os lisossomos, evitando a degradação de seu conteúdo interno (ADLER; LEONG, 2010).

Para avaliar os mecanismos de captação celular são utilizadas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia confocal e inibidores de vias de captação.

Os primeiros estudos de mecanismo de captação realizados há mais de 20 anos utilizavam meios pobres em íons potássio ou incubação com sacarose hipertônica (0,45 M) para bloquear a EDC e demonstrar a existência de diferentes mecanismos de captação. Mais tarde, comprovou-se serem métodos agressivos para as células, pois a depleção de  $K^+$  leva à inibição da síntese de

proteínas e de DNA, leva a mudanças no fluxo de íons e pH interno da célula e causa despolarização da membrana celular. Alta concentração de sacarose, por sua vez, pode afetar outros mecanismos de transporte, chegando a inibir completamente a captação em fase fluida (macropinocitose) em fibroblastos (IVERSEN et al., 2011).

Na microscopia eletrônica, a marcação da membrana com vermelho de rutênio é essencial para definir se vesículas verdadeiras são observadas ou se são apenas invaginações ainda conectadas à superfície celular. O tamanho das vesículas contendo as partículas endocitadas é um importante indicativo do mecanismo de captação envolvido. Em geral, vesículas maiores, obtidas após um curto período incubação indicam um mecanismo de macropinocitose (IVERSEN et al., 2011; KHANDELIA et al., 2013).

Na microscopia confocal os mecanismos de captação são sugeridos baseados em colocalização com marcadores celulares fluorescentes ou com substâncias cujo mecanismo de captação já seja conhecido. A toxina do cólera, captada por cavéolos, e o glicosíngolípídeo lactosilceramida, captado por cavéolos e captação dependente de balsas lipídicas, são exemplos de substâncias utilizadas nestes estudos. No Quadro 1 estão apresentados alguns dos marcadores empregados para a colocalização de nanopartículas (IVERSEN et al., 2011)

Quadro 2: Marcadores utilizados em estudos de colocalização em microscopia confocal

<b>Marcador</b>	<b>Compartimento celular localizado</b>
<b>Caveolina</b>	Cavéolos
<b>LDL</b>	Vesículas de clatrina
<b>Transferrina</b>	Vesículas de clatrina e endossomos
<b>LysoTracker<sup>R</sup></b>	Lisossomos
<b>TGN46</b>	Trans-Golgi

Adaptado de TORGERSEN et al., 2001.

A principal crítica a esses estudos é que o marcador utilizado pode ser captado por diferentes mecanismos simultaneamente, o que pode levar a

interpretações equivocadas (TORGERSEN et al., 2001). Além disso, limitações na resolução tornam difícil concluir se a nanoestrutura está aderida à membrana celular ou efetivamente internalizada, como também assegurar que as estruturas em estudo estão efetivamente colocalizadas ou apenas muito próximas entre si. Uma falsa colocalização pode ser facilmente obtida se áreas contínuas de fluorescência são sobrepostas com *spots* do outro marcador.

Os inibidores farmacológicos são frequentemente usados para investigar o mecanismo de tráfico celular responsável pela captação de nanopartículas. A azida de sódio (AZD) depleta todos os mecanismos de transporte dependentes de ATP. Trata-se de um potente inibidor da fosforilação oxidativa, por bloquear a citocromo c oxidase e a ATP hidrolase (BOWLER et al., 2006).

A amilorida (EIPA) bloqueia a macropinocitose por baixar o pH submembranar (pH citosólico na região próxima à membrana plasmática) e evitando a sinalização por Rac1 e Cdc42. Outro possível inibidor para este mecanismo é a citocalasina D, que inibe a polimerização da actina. Tem como desvantagem não ser eficaz em algumas células aderentes (IVERSEN et al., 2011).

Para a inibição da endocitose mediada por clatrina, um dos possíveis inibidores é a clorpromazina, que atua inibindo a GTPase que corta as vesículas da membrana. O óxido de fenilarsina (FeAsO) é um arsenito trivalente capaz de se ligar a múltiplos alvos celulares, entre eles a GTPase-Rho e tirosino-fosfatases reguladoras do citoesqueleto, perturbando a EDC por esses dois mecanismos (HARUSH-FRENKEL; ALTSCHULER; BENITA, 2008).

A metil-beta-ciclodextrina (CD) inibe tanto processos dependentes quanto independentes de clatrina, incluindo a macropinocitose, formando vesículas pequenas, por depletar o colesterol. Este processo pode levar ao extravasamento de líquidos e até à destruição da membrana celular, razão pela qual é necessário verificar a integridade das células durante o estudo. Uma entrada excessiva de íons cálcio na célula, por exemplo, poderia ativar quinases e fosfatases cálcio-dependentes e alterar profundamente o metabolismo celular (HARUSH-FRENKEL; ALTSCHULER; et al., 2008).

A filipina III (FIII) e a nistatina também interagem com o colesterol, afetando, desta maneira, mecanismos de transporte independentes de clatrina. Ambas são tóxicas e seu uso deve ser cuidadosamente avaliado. A genisteína

é um inibidor de várias tirosino-quinases e também capaz de inibir a formação de vesículas do vírus SC40 mediada por caveolina, porém, não pode ser considerada um inibidor seletivo para esta via de captação. Há relatos de que a genisteína inibiria a F-actina e atuaria em receptores que necessitam da fosforilação da tirosina envolvidos na EDC (HARUSH-FRENKEL; ALTSCHULER; et al., 2008; IVERSEN et al., 2011).

A azitromicina (AZT) bloqueia a endocitose em fase fluida por interagir com receptores de transferrina e auxilia na investigação de processos de endocitose independentes de clatrina (TYTECA et al., 2001).

A avaliação da captação celular de nanoestruturas pode ser realizada em células alteradas geneticamente para suprimir a expressão de determinadas proteínas envolvidas nos mecanismos de transporte. A expressão de uma proteína mutante, no entanto, pode resultar numa concentração maior que aquela observada em células normais e levar a interações de baixa afinidade entre os ligantes, não observadas em células normais. Alguns exemplos de proteínas nocauteadas para estudar a endocitose são (IVERSEN et al., 2011):

- AP180: necessária na nucleação das vesículas revestidas por clatrina na membrana plasmática, com isso sendo utilizada para estudo da EDC
- Caveolinas: podem estabilizar receptores nos cavéolos e a membrana celular fora destes. Pode regular, ainda, outros mecanismos endocíticos
- Cdc42: GTPase da família Rho, está envolvida nos processos de endocitose, fagocitose e macropinocitose
- Dinamina: GTPase importante para a cisão da membrana, envolvida em vários mecanismos endocíticos
- Rac1: reguladora da endocitose mediada por RhoA e macropinocitose, interfere na polimerização da actina no citoesqueleto

O tratamento com RNA interferente (RNAi) pode resultar em alterações celulares não desejadas e trazer modificações não relevantes para a proteína-alvo. A inibição de um mecanismo endocítico pode exacerbar outras vias de captação, dificultando a conclusão de qual mecanismo é responsável em maior extensão para a captação da nanoestrutura em estudo (IVERSEN et al., 2011).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a captação de nanocápsulas de núcleo lipídico e nanopartículas de proteína de algodão em células MCF7.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Obter e caracterizar nanopartículas de proteína de algodão;
- Investigar o mecanismo de formação das nanopartículas de proteína de algodão;
- Verificar o efeito da incubação das nanopartículas de algodão sobre a viabilidade celular em células fagocíticas (macrófagos) e não-fagocíticas (MCF7);
- Avaliar qualitativamente e quantitativamente a captação celular das nanopartículas de proteína de algodão e das nanocápsulas de núcleo lipídico nas células MCF7;
- Propor mecanismo de captação para ambos os tipos de partículas em células MCF7.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MOTTALEB, M. M. A.; NEUMANN, D.; LAMPRECHT, A. L. Lipid nanocapsules for dermal application: a comparative study of lipid-based versus polymer-based nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 79, p. 36-42, 2011.

ABNT. **Águas - Determinação de Dureza Total - Método titulométrico do EDTA-Na**. NBR 12621. ABNT. Rio de Janeiro: 4 p. 1992.

ADLER, A. F.; LEONG, K. W. Emerging links between surface nanotechnology and endocytosis: Impact on nonviral gene delivery. **Nano Today**, v. 5, n. 6, p. 553-569, 2010.

AHMAD, S. et al. Dose soil salinity affect yield and composition of cottonseed oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.** , v. 84, p. 845-851, 2007.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396

ARANGO, M. A. et al. Bioadhesive potential of gliadin nanoparticulate systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 333-341, 2000.

BAZYLIŃSKA, U. et al. Nanoemulsion-templated multilayer nanocapsules for cyanine-type photosensitizer delivery to human breast carcinoma cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, p. 406-420, 2012.

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

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

BERNARDI, A. et al. Protective effects os indomethacin-loaded nanocapsules against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: involvement of neuroinflammation. **Neurochemistry International**, v. 57, p. 629-636, 2010.

BERNARDI, A. et al. Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by A $\beta$ 1-42 in Alzheimer's disease models. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 4927-4942, 2012.

BOWLER, M. W. et al. How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 23, p. 8646-8649, 2006.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 11, p. 1649-1659, 2004.

BRASIL. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução RE 899 2003.

BUDAVARI, S. **The Merck Index. An Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals** New Jersey: Merck & Co 1996. 1741

CHAUDHARI, K. R. et al. Targeting Efficiency and Biodistribution of Zoledronate Conjugated Docetaxel Loaded Pegylated PBCA Nanoparticles for Bone Metastasis. **Advanced Functional Materials**, v. 22, n. 19, p. 4101-4114, 2012.

CHAUDHARI, K. R. et al. Opsonization, Biodistribution, Cellular Uptake and Apoptosis Study of PEGylated PBCA Nanoparticle as Potential Drug Delivery Carrier. **Pharmaceutical research**, v. 29, n. 1, p. 53-68, 2011.

CHAUVIER, D.; MORJANI, H.; MANFAIT, M. Homocamptothecin-daunorubicin association overcomes multidrug-resistance in breast cancer MCF7 cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 73, p. 113-125, 2002.

CHEN, Y. R.; CHEN, X. J.; WANG, C. S. Study on Properties of Cottonseed Protein Plastics. **Advanced Materials Research**, v. 399-401, p. 1261-1267, 2011.

CHEN, Z. et al. Hyaluronic acid-coated bovine serum albumin nanoparticles loaded with brucine as selective nanovectors for intra-articular injection. **International Journal of Nanomedicine**, p. 3843, 2013.

CHO, E. J. et al. Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2093-2110, 2013.

COLLNOT, E.M.; ALI, H.; LEHR, C.M. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 235-246, 2012.

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

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 135-146, 2010.

DELI, M. A. et al. Characterization of Rhodamine-123 as a Tracer Dye for Use In In vitro Drug Transport Assays. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e33253, 2012.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 2547-2565, 2007.

DHAYAL, S. K. et al. Controlled formation of protein nanoparticles by enzymatic cross-linking of  $\alpha$ -lactalbumin with horseradish peroxidase. **Food hydrocolloids**, v. 36, p. 53-59, 2014.

DING, D. et al. Novel Self-assembly Endows Human Serum Albumin Nanoparticles with an Enhanced Antitumor Efficacy. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 1, p. 213-222, 2013.

DONSÌ, F. et al. Development of Novel Pea Protein-Based Nanoemulsions for Delivery of Nutraceuticals. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10653-10660, 2010.

ELZOGHBY, A. O.; EL-FOTOH, W. S. A.; ELGINDY, N. A. Casei-based formulations as promising controlled release drug delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 153, p. 206-216, 2011.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 1, p. 38-49, 2012.

ELZOGHBY, A. O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 1075-1091, 2013.

ETHERIDGE, M. L. et al. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2013.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Nanotechnology**. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special\\_topics/general/general\\_content\\_000345.jsp&mid=WC0b01ac05800baed9](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/general/general_content_000345.jsp&mid=WC0b01ac05800baed9). Acessado em 15/04/2014.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic and medicinal chemistry**, v. 17, p. 2950-2962, 2009.

FERNANDES, C.; SONI, U.; PATRAVALE, V. Nano-interventions for neurodegenerative disorders. **Pharmacological research**, v. 62, p. 166-178, 2010.

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

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, p. 5577, 2012.

FROZZA, R. L. et al. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, p. 694-703, 2010.

GAO, D.; CAO, Y.; LI, H. Antioxidant activity of peptide fractions derived from cottonseed protein hydrolysate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1855-1860, 2010.

GAO, D. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from cottonseed protein hydrolysate. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 53, p. 8977-8983, 2010.

GREVELLEC, J. et al. Processability of Cottonseed Proteins into Biodegradable Materials. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1104-1109, 2001.

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.

HAN, J. et al. Cationic Bovine Serum Albumin Based Self-Assembled Nanoparticles as siRNA Delivery Vector for Treating Lung Metastatic Cancer. **Small**, v. 10, n. 3, p. 524-535, 2014.

HARUSH-FRENKEL, O.; ALTSCHULER, Y.; BENITA, S. Nanoparticle-Cell Interactions: Drug Delivery Implications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 25, n. 6, p. 485-544, 2008.

HARUSH-FRENKEL, O. et al. Surface Charge of Nanoparticles Determines Their Endocytic and Transcytotic Pathway in Polarized MDCK Cells. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 2, p. 435-443, 2008.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular Molecular Life Science**, v. 66, p. 2873-2896, 2009.

HOLLIDAY, D.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, p. 215-221, 2011.

HÜHN, D. et al. Polymer-Coated Nanoparticles Interacting with Proteins and Cells: Focusing on the Sign of the Net Charge. **ACS Nano**, v. 7, n. 4, p. 3253-3263, 2013.

IVERSEN, T.-G.; SKOTLAND, T.; SANDVIG, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. **Nano Today**, v. 6, n. 2, p. 176-185, 2011.

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.

JAHANSHAH, M.; BABAEI, Z. Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, p. 4926-4934, 2008.

JAIN, S. K. et al. Mannosylated gelatin nanoparticles bearing an anti-HIV drug didanosine for site-specific delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 4, n. 1, p. 41-48, 2008.

JAIN, V. et al. Paclitaxel loaded PEGylated glyceryl monooleate based nanoparticulate carriers in chemotherapy. **Biomaterials**, v. 33, n. 29, p. 7206-7220, 2012.

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 374-397, 2010.

JR, W. A. P.; EAVES, P. H. Aqueous Acetone Extraction of Cottonseed. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 44, n. 7, p. 460-464, 1967.

KAKRAN, M. et al. Functionalized Graphene Oxide as Nanocarrier for Loading and Delivery of Ellagic Acid. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 29, p. 4503-4512, 2011.

KARON, M. L.; ADAMS, M. E.; ALTSCHUL, A. M. The Electrophoretic Analysis of Peanut and Cottonseed Meals and Proteins. **The Journal of Physical and Colloid Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 56-66, 1950.

KHANDELIA, R. et al. Gold Nanoparticle-Protein Agglomerates as Versatile Nanocarriers for Drug Delivery. **Small**, v. 9, n. 20, p. 3494-3505, 2013.

LAI, L. F.; GUO, H. X. Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. **International journal of pharmaceuticals**, v. 404, n. 1-2, p. 317-323, 2011.

LENZ, Q. F. et al. Semi-solid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules showed in-vivo anti-inflammatory activity in chronic arthritis and fibrovascular tissue models. **Inflammation Research**, v. 61, p. 305-310, 2010.

LEVENSON, A. S.; JORDAN, V. C. MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. **Cancer Research**, v. 57, p.3071-3078, 1997.

LI, X. et al. Composition of amino acids in feed ingredients for animal diets. **Amino Acids**, v. 40, n. 4, p. 1159-1168, 2010.

LIONG, M. et al. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting and drug delivery. **ACS nano**, v. 2, n. 5, p. 889-896, 2008.

LIU, Y.; FENG, S.-S. Surfactant chain length effects on nanoparticles of biodegradable polymers for targeted drug delivery. **AIChE Journal**, v. 58, n. 11, p. 3289-3297, 2012.

MARQUIÉ, C. Chemical Reactions in Cottonseed Protein Cross-Linking by Formaldehyde, Glutaraldehyde, and Glyoxal for the Formation of Protein Films with Enhanced Mechanical Properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4676-4681, 2001.

MARSHALL, H. F. Isolation and purification of cottonseed 7S storage protein and its subunits. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1454-1457, 1990.

MARTÍNEZ, A. et al. Folate-Targeted Nanoparticles Based on Albumin and Albumin/Alginate Mixtures as Controlled Release Systems of Tamoxifen: Synthesis and In Vitro Characterization. **Pharmaceutical research**, v. 31, n. 1, p. 182-193, 2013.

MISHRA, D.; HUBENAK, J. R.; MATHUR, A. B. Nanoparticle systems as tools to improve drug delivery and therapeutic efficacy. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101, n. 12, p. 3646-3660, 2013.

MO, L. et al. Preparation and characterization of teniposide PLGA nanoparticles and their uptake in human glioblastoma U87MG cells. **International journal of pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 815-824, 2012.

MOITRA, K. et al. Differential gene and microRNA expression between etoposide resistant and etoposide sensitive MCF7 breast cancer cell lines. **Plos One**, v. 7, n. 9, p. e45268, 2012.

NESTERENKO, A. et al. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 469-479, 2013.

OLCOTT, H. S.; FONTAINE, T. D. Composition of Cottonseeds. III. Solubility of Proteins in Alkaline Solutions of Neutral Salts1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 6, p. 1334-1339, 1940.

OLIVEIRA, C. P. et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, p. 1141-1150, 2012.

PODARALLA, S.; PERUMAL, O. Influence of Formulation Factors on the Preparation of Zein Nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 3, p. 919-927, 2012.

POLETTI, F. S. et al. Fluorescent-Labeled Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules: Synthesis, Physicochemical Properties and Macrophage Uptake. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 89-98, 2012.

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.

RAFFIN, R. P. et al. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indomatacina: estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 163-172, 2003.

RAMETTE, R. W.; SANDELL, E. B. Rhodamine B Equilibria. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 19, p. 4872-4878, 1956.

REMPEL, A. A. Nanotechnologies. Properties and applications of nanostructured materials. **Russian Chemical Reviews**, v. 76, n. 5, p. 435-461, 2007.

ROSSI-FANELLI, A. et al. isolation of a monodisperse protein fraction from cottonseed. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 15, n. 2, p. 110-115, 1964.

SARVER, J. G. et al. Microplate Screening of the Differential Effects of Test Agents on Hoechst 33342, Rhodamine 123, and Rhodamine 6G Accumulation in Breast Cancer Cells that Overexpress P-Glycoprotein. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 7, n. 1, p. 29-34, 2002.

SCHAFFAZICK, S.R. et al. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p.501-506, 2003.

SHANG, L.; NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G.U.; Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **Journal of nanobiotechnology**, v. 12, n. 5, 11 p., 2014.

SOULE, H. et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, p. 1409-1416, 1973.

TAN, G.-R.; FENG, S.-S.; LEONG, D. T. The reduction of anti-cancer drug antagonism by the spatial protection of drugs with PLA-TPGS nanoparticles. **Biomaterials**, v. 35, n. 9, p. 3044-3051, 2014.

TORGERSEN, M. L. et al. Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 3737-3747, 2001.

TSALIKI, E.; KECHAGIA, U.; DOXASTAKIS, G. Evaluation of the foaming properties of cottonseed protein isolates. **Food hydrocolloids**, v. 16, p. 645-652, 2002.

TSALIKI, E.; PEGIADOU, S.; DOXASTAKIS, G. Evaluation of the emulsifying properties of cottonseed protein isolates. **Food hydrocolloids**, v. 18, n. 4, p. 631-637, 2004.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Thermodynamic properties and moisture adsorption isotherms of cottonseed protein isolate and different forms of cottonseed samples. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 133-143, 2007.

TYTECA, D. et al. Azithromycin, a lysosomotropic antibiotic, impairs fluid-phase pinocytosis in cultured fibroblasts. **European Journal of Cell Biology** v. 80, n. 7, p. 466-478, 2001.

VASCONCELLOS, L. F. R. et al. Síndrome psicótica evoluindo com demência como manifestação clínica de deleção do DNA mitocondrial. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 65, n. 1, p. 114-117, 2007.

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

WENDEL, J. F. et al. Evolution and Natural History of the Cotton Genus. In: PATERSON, A. H. (Ed.). **Plant Genetics and Genomics: Crops and Models**. Athens: Springer, v.3, 2009. p.3-22.

WIN, K. Y.; FENG, S. S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 26, p. 2713-2722, 2005.

WU, L.-Q.; PAYNE, G. F. Biofabrication: using biological materials and biocatalysts to construct nanostructured assemblies. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 593-599, 2004.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.

YANG, C.-H. et al. Gefitinib Reverses Chemotherapy Resistance in Gefitinib-Insensitive Multidrug Resistant Cancer Cells Expressing ATP-Binding Cassette Family Protein. **Cancer research**, v. 65, n. 15, p. 6943-6949, 2005.

YUE, H. B. et al. Preparation and characterisation of bioplastics made from cottonseed protein. **Green Chemistry**, v. 14, n. 7, p. 2009, 2012.

ZAKI, N. M.; NASTI, A.; TIRELLI, N. Nanocarriers for Cytoplasmic Delivery: Cellular Uptake and Intracellular Fate of Chitosan and Hyaluronic Acid-Coated Chitosan Nanoparticles in a Phagocytic Cell Model. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 12, p. 1747-1760, 2011.

ZARINS, Z. M.; PHILLIPS, R. D. A Rapid Procedure for Isolation of the 7A Storage protein of Cottonseed and Its Characterization. **Cereal Chemistry**, v. 61, n. 6, p. 471-474, 1984.

ZATTONI, A. et al. Turbidimetric Detection Method in Flow-Assisted Separation of Dispersed Samples. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 23, p. 6469-6477, 2003.

ZATTONI, A. et al. Characterization of winemaking yeast by cell number-size distribution analysis through flow field-flow fractionation with multi-

wavelength turbidimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 293-301, 2004.

ZHANG, J. et al. Preparation and in vitro evaluation of calcium-induced soy protein isolate nanoparticles and their formation mechanism study. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 390-399, 2012.