



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas– IB

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

Nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino e invólucro de poli(metil vinil co-anidrido maleico) contendo doxorubicina: Desenvolvimento e avaliação de sua atividade citotóxica contra células de câncer de mama humano e murino *in vitro*

BRASÍLIA

2017

JANAÍNA MORERA COELHO

Nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino e invólucro de poli(metil vinil co-anidrido maleico) contendo doxorubicina: Desenvolvimento e avaliação de sua atividade citotóxica contra células de câncer de mama humano e murino *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção de título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann

BRASÍLIA

2017

JANAÍNA MORERA COELHO

Nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino e invólucro de poli(metil vinil co-anidrido maleico) contendo doxorubicina: Desenvolvimento e avaliação de sua atividade citotóxica contra células de câncer de mama humano e murino *in vitro*

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann  
(Orientador)

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo  
(Membro titular)

Prof. Dr. Juliano Chaker  
(Membro titular)

Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos  
(Suplente)

Brasília, 24 de fevereiro de 2017.

*Dedico este trabalho aos grandes propulsores do meu desenvolvimento pessoal e profissional, os grandes amores da minha vida: meus pais, Maria e Pedro. Sem vocês eu não chegaria a lugar algum!*

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

## Agradecimentos

A Deus, sublime e magnífica força a mim concedida.

Agradeço ao professor Dr. Luís Alexandre Muehlmann pela oportunidade, paciência e compreensão. Muito obrigada por todos os ensinamentos! Seu entusiasmo, carisma e dedicação à pesquisa me inspiraram e me incentivaram a querer ser alguém melhor.

Ao professor Dr. Ricardo Bentes, exemplo de sucesso, caráter e fraternidade. Obrigada por me receber no laboratório!

Agradeço a minha queridíssima Karen, pela disponibilidade, atenção, carinho e parceria no desenvolvimento e conclusão desse trabalho. Sem você teria sido muito sofrido! Obrigada por tornar esses dias mais leves!

Rayane, parceira demais!!! Obrigada pela amizade e por toda ajuda a qualquer dia e hora! Levarei como exemplo sua organização, dedicação e generosidade! Você é fera!

Agradeço também a Luiza Linda Obrigada pelas risadas nos intervalos da pesquisa e troca de experiências. Sua alegria contagia!

Aos colegas de laboratório, em especial ao meu colega de equipe Nichollas, por todo empenho na síntese da nanopartícula e a grande disponibilidade da Alícia, nos experimentos de citometria!!Muito Obrigada!! E também aos colegas: Raquel, Jaque, Laise, Marina, Henrique, Fred, Paulinha, Ludmila, Débora, Márcia, Maria, Tamara e Cristiane. Obrigada colegas por tornar inesquecível nossa formação. Por tornar tão agradável nossa escolha: abnegação, dedicação e entrega.

Aos integrantes do grupo de pesquisa ImunoNano: muito obrigada pela troca de conhecimento e apoio nos experimentos!

A professora Dra. Carolina Lucci por disponibilizar toda a estrutura da sala de cultivo de células para execução desse trabalho.

Agradeço a microscopista Renata Carvalho pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Ao professor Dr. Sebastião e a doutoranda Katiúscia Jardim pela ajuda nos experimentos utilizando Raman e FTIR.

Dona Zélia, personificação da palavra dedicação. Seu empenho em fazer sempre o melhor foi fundamental para o desenvolvimento da pesquisa de todos do laboratório.

Aos meus pais Pedro e Maria que sempre me ofereceram o melhor que puderam dar, através do seu olhar de apoio, palavras de incentivo, gesto de compreensão, mesmo quando me veio o desânimo. As minhas irmãs Lílian, Solange e Marília, por entenderem minha ausência durante essa jornada.

Agradeço o apoio das instituições de pesquisa: CAPES, CNPQ, INCT e FAP-DF .

## Resumo

Doxorrubicina (DOX) é um fármaco altamente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, porém apresenta efeitos adversos, tais como cardiotoxicidade irreversível. O óleo de rícino, um triacilglicerídeo natural vem sendo investigado como veículo de fármacos. O objetivo geral deste trabalho consistiu em desenvolver nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino e DOX e avaliar sua atividade contra células de câncer de mama humano e murino *in vitro*. Foram obtidas nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino e doxorrubicina com invólucro de poli (metil vinil-éter co-anidrido maléico) modificado com n-octadecilamina. As nanocápsulas apresentaram-se estáveis e monodispersas. Nos ensaios *in vitro*, foram utilizadas as células de adenocarcinoma mamário murino (4T1), fibroblasto murino (NIH-3T3), adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) e célula de epitélio mamário humano (MCF-10A). O tratamento com NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) diminuiu a viabilidade e a adesão de células tumorais. NCR-DOX foi mais interiorizada que DOX livre em células tumorais. A distribuição intracelular da NCR-DOX foi identificada no citoplasma e no núcleo. Os tratamentos com DOX e NCR-DOX em 4T1 e MCF-7 alteraram os padrões morfológicos e diminuíram a confluência de células cancerosas, além disso, provocaram despolarização da membrana e causaram necrose e apoptose tardia. NCR-DOX causou menos fragmentação de DNA do que DOX. Concluiu-se que nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino e doxorrubicina são eficazes contra células tumorais MCF-7 e 4T1.

Palavras chaves: doxorrubicina, óleo de rícino, nanocápsulas, câncer de mama

## Abstract

Doxorubicin (DOX) is an often used drug for the treatment of several types of cancer, but it has adverse side effects such as irreversible cardiotoxicity. Castor oil, a naturally occurring triacylglyceride, has been investigated as a drug vehicle. The overall objective of this work was to develop nanocapsules with castor oil nuclei containing DOX and evaluate its activity against human and murine breast cancer cells *in vitro*. Nanocapsules were obtained using with castor oil core and doxorubicin with n-octadecylamine modified poly (methyl vinyl ether co-anhydride) casing. The nanocapsules were stable and monodisperse. In the *in vitro* assays, murine mammary adenocarcinoma (4T1), murine fibroblast (NIH-3T3), human mammary adenocarcinoma (MCF-7) and human mammary epithelial cells (MCF-10A) were used. NCR-DOX treatment decreased the viability and adhesion of tumor cells. NCR-DOX was more internalized than free DOX in tumor cells. The intracellular distribution of NCR-DOX was identified in the cytoplasm and nucleus. The DOX and NCR-DOX treatments in 4T1 and MCF-7 altered the morphological patterns and decreased the confluence of cancer cells. In addition, they provoked depolarization of the membrane and caused necrosis and late apoptosis. NCR-DOX caused less DNA fragmentation than DOX. It was concluded that castor oil core doxorubicin nanocapsules is effective against MCF-7 and 4T1 tumor cells.

Key words: doxorubicin, castor oil, nanocapsules, breast cancer

## Lista de figuras

Figura 1. Anatomia da mama feminina.....	5
Figura 2. Estrutura química da doxorubicina. ....	7
Figura 3. Estrutura do PVM/MA (poli (metil vinyl-éter-co-anidrido maléico) (Gantrez NA 119) .....	10
Figura 4. Planta e semente de rícino e estrutura do ácido ricinoleico.....	11
Figura 5. Representação da(nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX (NCR-DOX). ....	18
Figura 6. Amostras de NCR (nanocápsula com invólucro polimérico e núcleo de óleo de rícino) e NCR-DOX após centrifugação. ....	31
Figura 7. Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta da NCR-DOX a 4 °C, temperatura ambiente (T.A.) e 37 °C .....	32
Figura 8. Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta da NCR-DOX dispersas em meio de cultivo. ....	33
Figura 10. Curva de calibração de doxorubicina. ....	34
Figura 11. Quantificação de DOX livre após diálise de DOX e NCR-DOX .....	35
Figura 12. Espectros SERS .....	36
Figura 13. Espectros de infravermelho .....	39
Figura 14. Viabilidade de células 4T1 após exposição aos tratamentos.....	40
Figura 15. Viabilidade de células NIH-3T3 após exposição aos tratamentos. ....	41
Figura 16. Viabilidade de células MCF-7 após exposição aos tratamentos.....	42
Figura 17. Viabilidade de células MCF-10A após exposição aos tratamentos.....	43
Figura 18. Índices de adesão celular em tempo real das células 4T1. ....	44
Figura 19. Índices de adesão celular em tempo real das células NIH-3T3. ....	45
Figura 20. Índices de adesão celular em tempo real das células MCF-7.....	46
Figura 21. Índices de adesão celular em tempo real das células MCF-10A. ....	46
Figura 22. Fotomicrografias de células 4T1 e NIH-3T3 coradas com Giemsa. ....	48

Figura 23. Fotomicrografias de células MCF-7 e MCF-10A coradas com Giemsa. . . . .	49
Figura 24. Incorporação intracelular pelas células 4T1 tratadas com NCR-DOX e DOX . . . . .	50
Figura 25. Incorporação intracelular pelas células MCF-7 tratadas com NCR-DOX e DOX. . . . .	51
Figura 26. Ensaio de interiorização de NCR-DOX e DOX por células 4T1 e MCF-7. . . . .	52
Figura 27. Efeito da inibição de vias de endocitose em células 4T1. . . . .	53
Figura 28. Efeito da inibição de vias de endocitose em células MCF-7. . . . .	54
Figura 29. Fragmentação de DNA, em células 4T1 e MCF-7 por 24 e 48 horas. . . . .	55
Figura 30. Integridade de membrana plasmática, exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática ou apoptose tardia em células 4T1 por 6 horas . . . . .	56
Figura 31. Integridade de membrana plasmática, exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática ou apoptose tardia em células 4T1 por 24 horas . . . . .	57
Figura 32. Integridade de membrana plasmática, exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática ou apoptose tardia em células 4T1 por 48 horas . . . . .	58
Figura 33. Integridade de membrana plasmática, exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática ou apoptose tardia em células MCF-7 por 6 horas . . . . .	59
Figura 34. Integridade de membrana plasmática, exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática ou apoptose tardia em células MCF-7 por 24 horas. . . . .	60
Figura 35. Relação entre tamanho e granulosidade das células 4T1 e MCF-7 por 48 horas. . . . .	61
Figura 36. Potencial de membrana mitocondrial nas células 4T1 em 24 e 48 horas . . . . .	62
Figura 37. Potencial de membrana mitocondrial nas células MCF-7 em 24 horas . . . . .	63
Figura 38. Representação da ativação de ácidos carboxílicos para ligação de amina à molécula. . 65	

## Lista de tabelas

Tabela 1. Materiais utilizados nos experimentos. ....	14
Tabela 2. Concentrações testadas para a modificação do PVM/MA usando como solvente a acetoneitrila. ....	15
Tabela 3. O diâmetro hidrodinâmico (z-average) (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das formulações frescas NCR-DOX(nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e NCR (nanocápsula com invólucro polimérico e núcleo de óleo de rícino) .....	30
Tabela 4. Concentração citotóxica de 50% (CC50) dos diferentes tratamentos em células 4T1, NIH-3T3, MCF-7 e MCF-10A conforme observado pelo ensaio de MTT. ....	43

**Lista de abreviaturas e siglas**

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – Trifosfato de adenosina

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CPK – Creatina fosfoquinase

DAPI – dicloridrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol

DH – Diâmetro hidrodinâmico

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DOX – Doxorubicina

EPR – Efeito de retenção e permeação

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FTIR – Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier

HL-60 – Células de leucemia humana

HLB – equilíbrio hidrófilo-lipófilo

HEPES – Solução tampão ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazina-1-etanossulfônico

CC50 – Concentração que mata 50% das células

INCA – Instituto Nacional de Câncer

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NC – Nanocápsulas

NCR – Nanocápsula com invólucro polimérico e núcleo de óleo de rícino

NIH-3T3 – Fibroblasto murino

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDI – Índice de polidispersão

PEG – Polietilenoglicol

PLA – Poli(ácido lático)

PLGA – Poli(lático-co-glicólico)

PVM/MA – Poli(metil vinil-éter co-anidrido maléico)

PZ – Potencial zeta

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RTCA – Análise de células em tempo real

SERS – Espectroscopia Raman amplificada por superfície

SFB – Soro fetal bovino

T.A. – Temperatura ambiente

UA – Unidades arbitrárias

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 Câncer de Mama e Tratamento .....	4
2.2 Doxorubicina .....	6
2.3 Nanocarreadores e Câncer .....	9
2.4 Óleo de Rícino .....	11
3. JUSTIFICATIVA .....	12
4. OBJETIVOS .....	13
4.1 Objetivo Geral.....	13
4.2 Objetivos Específicos.....	13
5. MATERIAIS E MÉTODOS .....	14
5.1 Materiais.....	14
5.2 Desenvolvimento das nanocápsulas.....	15
5.3 Produção de nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino e invólucro de poli(metil vinil co-anidrido maleico) contendo doxorubicina (NCR-DOX) .....	16
5.4 Caracterização das nanocápsulas .....	19
5.4.1 Análise das propriedades coloidais .....	19
5.4.2 Avaliação da estabilidade da formulação.....	19
5.4.3 Quantificação de DOX em NCR-DOX por cromatografia líquida de alta eficiência....	19
5.4.4 Estrutura das nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino .....	20
5.4.5 Perfil de liberação de DOX.....	21
5.4.6 Determinação de eficiência de encapsulação.....	21
5.4.7 Estudo das características moleculares da NCR-DOX e DOX.....	22
5.4.8 Análise das interações químicas entre NCR-DOX e DOX.....	22
5.5 Estudos <i>in vitro</i> .....	22
5.5.1 Linhagens celulares.....	22
5.5.2 Manutenção da cultura de células .....	23
5.5.3 Tratamentos e análise de viabilidade celular .....	23
5.5.4 Análise de viabilidade celular .....	24
5.5.5 Morfologia e confluência celular .....	25
5.5.6 Índice de adesão celular em tempo real .....	25
5.5.7 Ensaio de interiorização .....	26
5.5.8 Mecanismos de endocitose .....	26

5.5.9 Fragmentação de DNA.....	27
5.5.10 Análise de morte e morfologia celular por citometria de fluxo .....	27
5.5.11 Análise do potencial de membrana mitocondrial.....	28
5.5.12 Análise da interiorização das nanocápsulas por microscopia de fluorescência .....	28
5.6 Análises estatísticas.....	29
6. RESULTADOS.....	30
6.1 Desenvolvimento e caracterização das formulações de nanocápsulas.....	30
6.1.1 Análise morfológica da NCR-DOX.....	33
6.1.2 Perfil de liberação da doxorubicina em NCR-DOX.....	34
6.1.3 Estudo das características moleculares por espectroscopia Raman intensificada por superfície ( <i>SERS</i> ) e espectroscopia de transmitância na região do infravermelho com transformada de Fourier ( <i>FTIR</i> ).....	35
6.2 Estudos <i>in vitro</i> .....	40
6.2.1 Viabilidade celular é menor em células tumorais após tratamento com NCR-DOX ....	40
6.2.2 NCR-DOX reduz a adesão de células tumorais <i>in vitro</i> .....	44
6.2.3 Padrão morfológico e confluência celular são alteradas por NCR-DOX e DOX.....	47
6.2.4 Localização intracelular de NCR-DOX .....	49
6.2.5 A NCR-DOX é interiorizada mais intensamente que a DOX por células 4T1 e MCF-7	51
6.2.6 NCR-DOX é interiorizada ao menos parcialmente por vias ativas .....	52
6.2.7 NCR-DOX causa menos fragmentação de DNA do que DOX .....	55
6.2.8 NCR-DOX e DOX causaram necrose e apoptose tardia em células 4T1 e MCF-7 .....	56
6.2.9 Alterações na morfologia celular de 4T1 e MCF-7 após tratamento com NCR-DOX e DOX.....	61
6.2.10 NCR-DOX leva à despolarização da membrana de células 4T1 e MCF-7.....	62
7. DISCUSSÃO .....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos (INCA, 2017). Seu desenvolvimento é regido por múltiplas etapas que envolvem a capacidade de células normais em adquirir, progressivamente, propriedades tumorigênicas, que podem levar à malignidade. Diferentes alterações são essenciais para transformação maligna de uma célula, entre eles podem ser citadas a autossuficiência nos sinais de crescimento, alterações na via de sinalização, insensibilidade aos sinais antiproliferativos extracelulares, potencial infinito de replicação, evasão da apoptose, angiogênese mantida; capacidade de invadir tecidos adjacentes e evasão do sistema imune (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Dados epidemiológicos apontam as neoplasias malignas como sendo a terceira causa de morte no planeta. Para 2030 é esperada a ocorrência de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes por câncer no mundo (INCA, 2016). Estimativas feitas em 2016 pelo projeto Globocan da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc) apontaram 1.685.210 novos casos de câncer e 595.690 mortes pela doença nos Estados Unidos (MILLER *et al.*, 2016). No Brasil, as projeções para 2016 e 2017 sugerem a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos (INCA, 2016).

Dentre os tipos de câncer, o de mama é o mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, depois do câncer de pele não melanoma, respondendo por cerca de 25% dos casos a cada ano. É também o mais incidente e que causa a maior mortalidade na população feminina. Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico - quando diagnosticado precocemente e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil (14 óbitos a cada 100 mil mulheres em 2013) e taxas de sobrevida de 87% em cinco anos, nos períodos de 2005 a 2009 (INCA, 2016).

O crescente entendimento sobre as alterações entre as etapas da carcinogênese - iniciação, promoção e progressão - são importantes para direcionar modos de prevenção, métodos de diagnósticos e modalidades terapêuticas (MILLER *et al.*, 2016). O tratamento do câncer concentra-se principalmente no uso isolado ou combinado de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea, terapia hormonal e biológica (INCA, 2017).

Os avanços verificados nas últimas décadas, na área da quimioterapia antineoplásica, têm facilitado consideravelmente a aplicação de outros tipos de tratamento de câncer e permitido maior número de curas. Os agentes citotóxicos não são letais às células neoplásicas de modo seletivo. Isso se deve as diferenças existentes entre o crescimento das células malignas e os das células normais e as pequenas diferenças bioquímicas verificadas entre elas provavelmente se combinam para produzir seus efeitos específicos. Além das diferenças de especificidade, o uso de alguns quimioterápicos provoca efeitos indesejáveis tais como mielodepressão, alopecia e alterações gastrintestinais (náuseas, vômitos e diarreia) (INCA, 2017). Verifica-se também que o uso em longo prazo de um agente anticâncer pode induzir a seleção de clones malignos resistentes ao próprio fármaco e a uma larga variedade de fármacos antitumorais já existentes – resistência cruzada (Kunjachan *et al.*, 2013). Desta maneira, dois grandes desafios devem ser enfrentados para melhorar esta modalidade terapêutica: aumentar a sua eficácia e reduzir a sua toxicidade sistêmica (LI *et al.*, 2015).

Entre os fármacos quimioterápicos mais utilizados atualmente está a doxorrubicina (DOX). Esse fármaco concentra-se principalmente no núcleo da célula, onde exerce seu efeito através de intercalação com o DNA e inibição da biossíntese de macromoléculas (FORREST *et al.*, 2012). Em tecidos-alvo, estas ações do fármaco também podem resultar em danos hematológicos, toxicidades gastrintestinais e cardiotoxicidade, geralmente intensificados pelo efeito cumulativo do fármaco (PURDIE, *et al.*, 2016; MOHAN & RAPOPORT, 2010).

Como uma alternativa para aumentar o índice terapêutico de fármacos anticâncer convencionais, as nanopartículas apresentam características vantajosas no tratamento do câncer. Na literatura são descritos diversos nanocarreadores de fármaco - nanocápsulas, micelas, dendrímeros, lipossomas, nanopartículas metálicas, nanoemulsões entre outras. A farmacocinética de fármacos pode ser modificada pelo uso de nanocarreadores, facilitando a entrega sítio-específica do fármaco (JOANITTI *et al.* 2016; SINHA *et al.*, 2006; ZWICKE *et al.*, 2012; MAEDA, *et al.*, 2000; FAROKHZAD, 2011).

Nanocápsulas são exemplos de nanopartículas que podem veicular o princípio ativo lipofílicos dissolvido em núcleo oleoso (MORA-HUERTAS *et al.*; 2010). Para compor esse núcleo podem ser utilizados diversos óleos de origem sintética ou natural, como por exemplo o óleo de rícino (OGUNNIYI *et al.*, 2006).

Nanocarreadores podem ser preparados com uma grande variedade de polímeros, como o PVM/MA [poli(metil vinil éter-co-anidrido maleico)] que vem sendo usado no desenvolvimento

nanoestruturas nos últimos anos. Esse copolímero, possui características positivas para uso em nanoestruturas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioadesividade( MUEHLMANN *et al.* 2014; JOANITTI *et al.* 2016; SOUZA *et al.* 2014; SOUZA *et al.* 2015; PAULO *et al.* 2016; GANASSIN, 2016). Esses nanocarreadores compostos por polímeros em sua estrutura podem ser utilizadas em diversos sistemas contendo fármacos anticâncer como a DOX. Já foram desenvolvidas e descritas na literatura diferentes nanoestruturas com a finalidade de minimizar a toxicidade desse fármaco na sua forma livre. Em estudo realizado por Ganassin (2016), nanocápsula com núcleo oleoso contendo selol (selenitotriacilglicerol) com invólucro de PVM/MA conjugado à DOX melhorou a distribuição do quimioterápico e reduziu a cardiotoxicidade, entretanto não foi constatado que o selol aumentou a eficácia das nanopartículas nos testes *in vivo* .

Alguns polímeros como poli(ácido lático) (PLA) e o poli(lático-co-glicólico) (PLGA), poli(ácido maleico) (PMA), PEG (polietilenoglicol) geraram bons resultados no carreamento de DOX (DELPLACE *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015). Souza e colaboradores (2014) mostraram que nanocápsulas estabilizadas pelo copolímero poli (vinil, metil-éter-co-anidrido maléico) (PVM/MA), demonstraram potencial para serem utilizadas como terapia contra células de adenocarcinoma de pulmão, desencadeando bloqueio no ciclo celular.

Dessa forma a proposta desse projeto é desenvolver nanocápsulas com invólucro polimérico de PVM/MA - modificado por n-octadecilamina (amina primária com cadeia hidrocarbônica de 18 átomos de carbono) - circundando o núcleo de óleo de rícino para entrega de DOX. Pretende-se, com esta estratégia, aumentar a estabilidade da nanocápsula bem como melhorar ou manter a eficácia de DOX no tratamento de câncer de mama *in vitro*.

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Câncer de Mama e Tratamento

A patogênese do câncer de mama é considerada multifatorial, envolvendo fatores biológicos, endócrinos, vida reprodutiva, comportamento e estilo de vida (SENKUS *et al.*, 2014). Os tumores sólidos são caracterizados pela grande heterogeneidade intratumoral, com grande diversidade citogenética, de receptores hormonais, de susceptibilidade a radio e quimioterapia, de propriedades angiogênicas e de potencial invasivo e metastático (GARCÍA-MANERO *et al.*, 2009; INCA, 2016; OHNO, 2016). O câncer de mama pode ser classificado como lobular, tubular, mucinoso, medular, micropapilar e/ou papilar. Uma minoria dos cânceres de mama se origina no epitélio lobular, chamado carcinoma lobular, sendo mais de 80% dos cânceres de mama tem origem no epitélio ductal (Figura 1) chamado carcinoma ductal (SENKUS *et al.*, 2014; GARCÍA-MANERO *et al.*, 2009).

Existem diferentes marcadores e características histopatológicas/bioquímicas que permitem diferenciar os tipos de câncer de mama e prever o seu comportamento face às terapias existentes (GARCÍA-MANERO *et al.*, 2009). Três dos fenótipos principais são: 1) células que superexpressam receptores de estrogênio (ER+) e marcadores epiteliais como a E-caderina; 2) células que superexpressam receptores para o fator de crescimento epidérmico humano (HER2+) e, por fim, 3) células que não expressam o receptor de estrógeno (ER), progesterona (PR) e nem HER2 (GARCÍA-MANERO *et al.*, 2009). Cerca de 60% dos carcinomas de mama são positivos para os três tipos de receptores sendo que cada tipo apresenta diferentes respostas terapêuticas, taxa de sobrevivência e capacidade de metastização (JOHNSTON, 2011). Esses fenótipos de tumores de mama humanos são atualmente subdivididos em 5 subtipos genomicamente distintos: luminal A, luminal B, enriquecido pra HER2, tipo basal e tumores com baixa expressão de claudina (SIMSTEIN *et al.*, 2003; JÄNICKE, 2009).

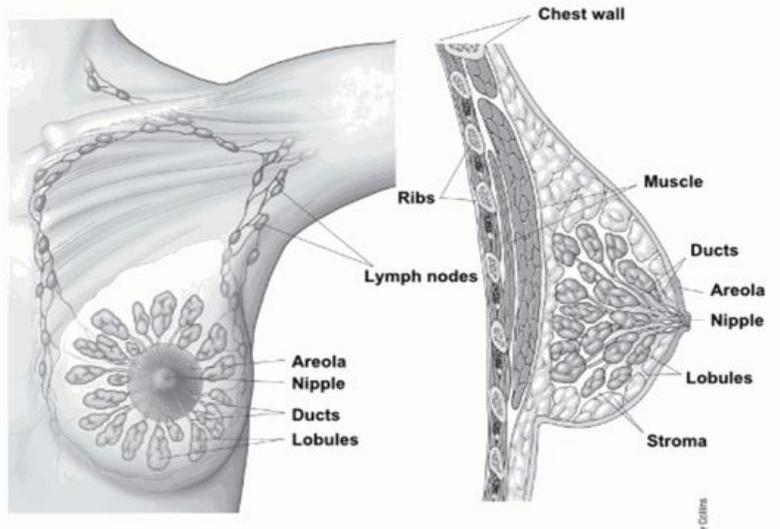


Figura 1. Anatomia da mama feminina (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Os tumores podem ser classificados em: estágio I (tumores < 2 cm e confinados à mama), estágio II (tumores < 5 cm com envolvimento ou não dos linfonodos axilares móveis), estágio IIIa (tumores > 5 cm, acompanhados ou não por envolvimento de linfonodos axilares), estágio IIIb (lesões mais avançadas) e estágio IV (todos os tumores com metástase à distância (SINGLETARY *et al.*, 2008). O surgimento de metástases é responsável pela grande maioria dos óbitos, devido ao alto grau de malignidade que estes tumores apresentam (SENKUS *et al.*, 2014).

As modalidades de tratamento do câncer de mama podem ser divididas em tratamento local que incluem a cirurgia e radioterapia (estádios I e II). E o tratamento sistêmico que consiste na quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica (INCA, 2016). O tratamento primário é a cirurgia para a remoção da massa tumoral (mastectomia total ou parcial, com remoção dos glânglios linfáticos de regiões adjacentes, depende da localização do tumor, do tamanho, dentre outros fatores). A avaliação dos linfonodos axilares tem função prognóstica e terapêutica (INCA, 2016).

Após a cirurgia, o tratamento complementar com radioterapia pode ser indicado em algumas situações. Essa terapia consiste no uso de raios ionizantes para destruir as células cancerosas remanescentes (INCA, 2016; JOHNSTON, 2011).

Pacientes com tumores maiores, porém ainda localizados, enquadram-se no estágio III. O tratamento sistêmico é determinado de acordo com o risco de recorrência (idade da paciente, comprometimento linfonodal, tamanho tumoral, grau de diferenciação), assim como das características tumorais que irão ditar a terapia mais apropriada. Essa última baseia-se

principalmente na mensuração dos receptores hormonais (receptor de estrogênio e progesterona) - quando a hormonioterapia pode ser indicada; e também de HER-2 (fator de crescimento epidérmico 2) com possível indicação de terapia biológica anti-HER-2 (INCA, 2016).

Como exemplos de fármacos atualmente disponíveis para a quimioterapia do câncer da mama estão as antraciclinas (doxorubicina e epirubicina) e os taxanos (docetaxel e paclitaxel), que formam a primeira linha de tratamento do câncer de mama em estágio inicial. Muitos outros medicamentos quimioterápicos são úteis no tratamento de mulheres com câncer de mama, como: agentes da platina, vinorelbina, capecitabina, gemcitabina, mitoxantrone, ixabepilona, paclitaxel ligado à albumina, eribulin, entre outros (INCA, 2017).

Alguns fármacos anticâncer utilizados atualmente apresentam certas limitações devidas a suas janelas terapêuticas estreitas. Nesse sentido, o desenvolvimento de sistemas de entrega capazes de melhorar a farmacocinética destas moléculas constitui uma estratégia importante para avançar no tratamento do câncer (PÉREZ –HERRERO *et al*, 2015).

## 1.2 Doxorubicina

A DOX, também conhecida como adriamicina, é uma molécula que pertence à classe das antraciclinas, sendo amplamente utilizado no tratamento de uma variedade de tumores sólidos e neoplasias hematológicas (OCTAVIA *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2001; MENNA *et al.*, 2008).

Esse fármaco apresenta característica anfifílica (Figura 2), o que permite ligar proteínas do plasma, ser solúvel em meios aquosos em pH ácido a levemente básico, e se dissolver na porção hidrofóbica de membranas celulares. Isso quer dizer que seus grupamentos químicos facilitam sua citotoxicidade, permitindo que a mesma entre em diversos compartimentos intracelulares, incluindo o núcleo e mitocôndrias, atuando em vários níveis por diferentes mecanismos moleculares (MITRY & EDWARDS, 2016; MOHAN & RAPOPORT, 2010).

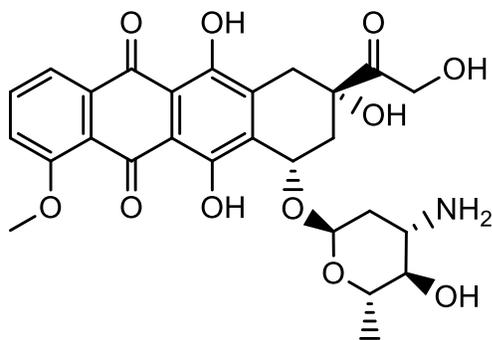


Figura 2. Estrutura química da doxorubicina.

Apesar do longo tempo em que vem sendo utilizada e da quantidade de informação escrita sobre este fármaco, seus mecanismos de citotoxicidade ainda não estão totalmente esclarecidos (MITRY & EDWARDS, 2016; OCTAVIA *et al.*, 2012). Dentre os mecanismos de citotoxicidade atribuídos à DOX estão a intercalação entre as bases nitrogenadas do DNA, levando à inibição da síntese de macromoléculas; a produção de espécies reativas através da interação com oxirredutases intracelulares; produção de lesões no DNA através da inibição da topoisomerase II, levando ao processo de apoptose (MITRY & EDWARDS, 2016; ZHANG *et al.*, 2016; OCTAVIA *et al.*, 2012; MENNA *et al.*, 2008).

Os mesmos mecanismos moleculares da DOX que ocorrem no núcleo, também podem ser observados na mitocôndria. A acumulação de DOX nesse local pode aumentar a geração de danos e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) comprometendo os componentes da cadeia respiratória, resultando em estresse oxidativo, peroxidação lipídica, perda de citocromo C das mitocôndrias permeabilizadas com consequente ativação de caspases (ALJABALI *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2015).

Apesar de a DOX ser altamente eficaz contra células tumorais, sua utilização como um agente quimioterapêutico é seriamente prejudicada por sua toxicidade limitar-se a dose terapêutica e pela presença de efeitos adversos graves, tais como mielossupressão, cardiotoxicidade e distúrbios gastrointestinais, além da frequente seleção de clones cancerosos resistentes a este fármaco na massa tumoral (FORREST *et al.*, 2012; MENNA *et al.*, 2008).

Aljabali e colaboradores (2013) ressaltam que o metabolismo mitocondrial é crítico para a sobrevivência de células cancerosas resistentes, sendo que a entrega de DOX nessa organela pode ser um mecanismo importante para contornar a resistência. Além dos cardiomiócitos, as células

endoteliais também são afetadas pela ativação de caspases e pela degradação do DNA internucleossomal induzidas pela DOX (OCTAVIA *et al.*, 2012).

Vários mecanismos estão envolvidos na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina, a qual está relacionada à dose cumulativa total administrada, aos níveis agudos de pico, à idade do paciente e à administração concomitante a outros antineoplásicos cardiotoxicos (Holm *et al.*, 2015). A cardiomiopatia está fortemente ligada a um aumento do estresse oxidativo no tecido cardíaco, assim como a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Danos induzidos, tais como peroxidação lipídica e desregulação da concentração de cálcio intracelular também são importantes mecanismos comumente associados à toxicidade cardíaca induzida pela DOX. Além dos cardiomiócitos, as células endoteliais também são afetadas pela ativação de caspases e pela degradação do DNA internucleossomal induzidas pela DOX (OCTAVIA *et al.*, 2012). Além disso, existem várias limitações no tratamento do câncer incluindo baixa biodisponibilidade em tumores sólidos. A sensibilidade dos tumores à DOX depende tanto da sua distribuição dentro da região tumoral, quanto da sensibilidade intrínseca destes tumores (WIN *et al.*, 2015).

Nesse sentido, várias abordagens utilizando nanocarreadores para entrega de DOX em tumores sólidos têm sido consideradas. Esses sistemas potencialmente aumentam a acumulação do fármaco no sítio-alvo, assim como aumentam sua biodisponibilidade, prolongando o tempo na circulação sistêmica, aumentando assim a eficácia terapêutica. Esses eventos podem ser favorecidos pelo direcionamento passivo por meio do efeito EPR (do inglês *enhanced permeability and retention*, ou efeito de permeação e retenção aumentadas) (ZHANG *et al.*, 2016; WIN *et al.*, 2015).

Entre os nanocarreadores, podem ser citados nanopartículas poliméricas, lipossomas, micelas, dendrímeros, nanobastões, nanoemulsões, entre outros (ALJABALI *et al.*, 2013). DOXIL<sup>®</sup> e Lipodox<sup>®</sup> são formulações lipossômicas de doxorubicina, clinicamente aprovados e utilizados para o tratamento de câncer de mama, ovário, mieloma múltiplo. Daunorubicina lipossomal (DaunoXome<sup>®</sup>) é usado na primeira linha de tratamento do sarcoma Kaposi avançado (WIN *et al.*, 2015).

### 1.3 Nanocarreadores e Câncer

Os vários processos químicos que guiam a síntese de materiais em escala nanométrica desempenham um papel crítico na adaptação das propriedades físicas e químicas de nanopartículas. Estas propriedades incluem alta relação área de superfície/ volume, elevada energia superficial, novos comportamentos mecânicos, térmicos, elétricos, magnéticos e ópticos, entre outros. Entre esses sistemas estão as nanocápsulas, micelas, nanoemulsões, dendrímeros, lipossomas entre outros (CHEN *et al.*, 2016; ZWICKE *et al.*, 2012; FERRARI, 2005).

Os nanocarreadores têm sido utilizados como agentes teranósticos contra o câncer. As nanopartículas possuem grande área de superfície funcionalizável, podendo ser utilizadas para conjugação com agentes terapêuticos (SINHA *et al.*, 2006). Além disso, estes sistemas possibilitam a distribuição tecidual mais seletiva, liberação controlada e direcionamento de fármacos a alvos específicos de forma passiva ou ativa (ZWICKE *et al.*, 2012).

No direcionamento passivo, as nanopartículas são favorecidas pelo efeito EPR, decorrente da vasculatura mal formada e da drenagem linfática ineficiente em tumores sólidos. Outra forma de entrega é a ativa, sendo possível a adição de ligantes na partícula transportadora tendo como alvo seus receptores celulares específicos (SINHA *et al.*, 2006; ZWICKE *et al.*, 2012; MAEDA *et al.*, 2000; FAROKHZAD, 2011).

O desenho racional de nanopartículas desempenha um papel crítico, uma vez que características físicas e estruturais, tais como tamanho, carga, forma e características de superfície podem afetar a biodistribuição, farmacocinética e internalização do fármaco (ZWICKE *et al.*, 2012).

Para que as nanopartículas possam circular por mais tempo no organismo elas precisam escapar do sistema fagocitário mononuclear e assim aumentar seu tempo de permanência na circulação sistêmica, fazendo com que uma concentração mais elevada chegue aos tecidos tumorais (FENG, 2010; KNOP *et al.*, 2010; PASUT *et al.*, 2015).

Dentre as nanoestruturas, as nanocápsulas poliméricas (NPs) podem ser citadas como veículos com potencial para melhorar o índice terapêutico de fármacos. Seu tamanho geralmente permite atravessar as barreiras fisiológicas e minimizar o seu reconhecimento pelo RES. Com isso, obtém-se maior biodisponibilidade e internalização celular, aliadas a uma baixa toxicidade e eficiente excreção pelo corpo (LI *et al.*, 2015; MOHAN & RAPOPORT, 2010; FENG, 2010). As nanocápsulas são geralmente constituídas por um invólucro polimérico ao redor de um núcleo

oleoso ou aquoso, sendo que o fármaco pode estar dissolvido ou disperso no núcleo, ou associado à trama polimérica (SCHAFFAZICK, 2003).

Existem diversas técnicas para produção de NPs descritas na literatura e, de acordo com as características físico-químicas do fármaco a ser encapsulado (RONG *et al.* 2011). Os métodos se baseiam na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados. Em 1986, Fessi e colaboradores propuseram este método no qual a mistura de um solvente miscível com água (geralmente acetona ou etanol) contendo o fármaco, polímero, tensoativo e óleo, é vertida sobre uma fase aquosa (contendo tensoativo). A formação das NPs ocorre instantaneamente através da rápida difusão do solvente que é removido por pressão reduzida (SCHAFFAZICK, 2006; GUTERRES *et al.*, 1995; MORA-HUERTAS, *et al.*, 2010)

Em um tipo de nanocápsula desenvolvido por de Souza e colaboradores (2014), o PVM/MA foi utilizado para compor a trama polimérica do invólucro que envolvia um núcleo oleoso composto por selol (selenitotriacilglicerol). A presença do polímero, com carga negativa, conferiu estabilidade à nanoestrutura. A formulação foi citotóxica contra células de adenocarcinoma de pulmão e também citostática, pois mostrou capacidade de bloquear o ciclo celular.

A estrutura química do PVM/MA (Figura 3) possibilita a hidrólise do grupamento anídrido do copolímero gerando dois grupamentos carboxila, os quais aumentam a capacidade do polímero em formar ligações com estruturas biológicas (ex: mucosas), principalmente aquelas com grupamentos hidroxila ou amina. Além disso, esses grupamentos anídrido podem ser ligados com moléculas de direcionamento ativo, usadas para entrega específica a alvos biológicos. Essas propriedades são positivas para a sua utilização em nanocarreadores de fármacos (DE SOUZA, 2014; CAMPANERO *et al.*, 2003; AGUILAR-ROSAS *et al.*, 2015).

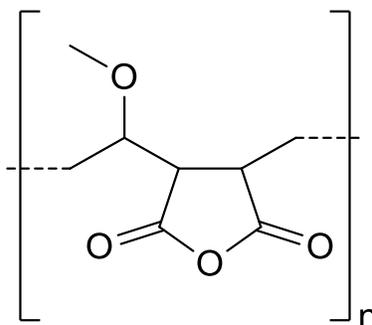


Figura 3. Estrutura do PVM/MA (poli (metil vinil-éter-co-anidrido maléico) (Gantrez NA 119).

## 1.4 Óleo de Rícino

O óleo de rícino é derivado da planta *Ricinus communis*, um membro da família Euphorbiaceae (Figura 4). O óleo é atualmente usado em setores tais como agricultura, alimentos, têxteis, papel, plástico, borracha, cosméticos, perfumarias, eletrônicos, produtos farmacêuticos, tintas, aditivos, lubrificantes e biocombustíveis (OGUNNIYI *et al.*, 2006).

Esse óleo apresenta vantagens como sua natureza renovável, biodegradabilidade e baixo custo. Além disso, quando comparado com os demais óleos vegetais, o óleo de rícino é mais viscoso, menos solúvel em hexano e mais solúvel em etanol (GUNSTONE, 2004; CHEN *et al.* 2016; MUBOFU, 2016). O ácido ricinoleico (Figura 4c) perfaz cerca de 90% dos ácidos graxos do óleo de rícino.

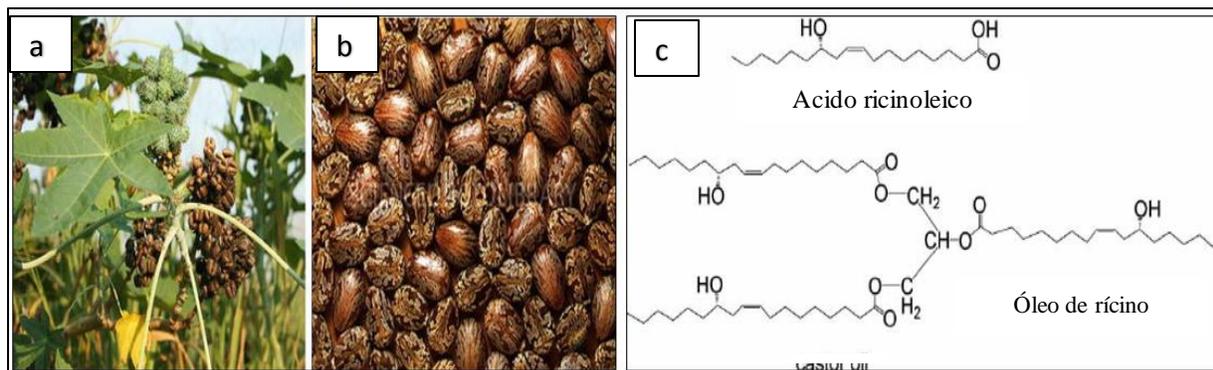


Figura 4. Planta (a) e semente (b) de rícino e estrutura do ácido ricinoleico e óleo de rícino (MUBOFU, 2016).

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços terapêuticos dos últimos anos, o câncer de mama continua sendo responsável por alta taxa de mortalidade na população humana e os tratamentos utilizados contra essa doença provocam uma série de efeitos adversos graves. Dessa forma, o tratamento convencional dos cânceres de mama baseado em fármacos quimioterápicos permanece um desafio para a qualidade de vida dos pacientes. Pesquisas que visem melhorias na resposta ao tratamento e promovam aumento da sobrevida dos pacientes portadores apresentam-se altamente promissoras.

A nanotecnologia tem emergido como uma estratégia promissora para resolver impasses biotecnológicos, dentre eles a entrega de fármacos. O uso de nanopartículas pode proteger fármacos da degradação e inativação no percurso para o tecido alvo, o que reduz a concentração necessária do fármaco para a obtenção de eficiência terapêutica e consequentemente diminuindo os efeitos colaterais.

Neste contexto, nanocápsula contendo DOX sintetizada com núcleo oleoso de origem natural - óleo de rícino - suprime o uso de surfactante fazendo uso da n-octadecilamina ligada ao PVM/MA. Esse modelo é promissor para aplicações biológicas por facilitar a sua produção e permitir diminuir a toxicidade associada ao veículo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Desenvolver nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino contendo o quimioterápico DOX e invólucro de PVM/MA modificado com n-octadecilamina, e avaliar sua atividade citotóxica contra células de câncer de mama humano e murino *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

a. Desenvolver nanocápsulas com invólucro polimérico de PVM/MA modificado com n-octadecilamina circundando um núcleo de óleo de rícino contendo DOX.

b. Avaliar às nanocápsulas de maneira a aumentar ou manter sua atividade citotóxica contra células de câncer de mama 4T1 e MCF-7 *in vitro* e reduzir sua atividade contra células não tumorais: NIH-3T3 e MCF-10A;

c. Avaliar as características coloidais – potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão – e morfológicas das nanocápsulas;

d. Avaliar as características moleculares das nanopartículas desenvolvidas e seus constituintes por meio da espectroscopia de Infravermelho (FTIR) e espectroscopia Raman.

e. Verificar a atividade das nanocápsulas em ensaio de viabilidade em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1), fibroblastos murinos (NIH-3T3), MCF-7 (Célula de adenocarcinoma mamário humano) e MCF-10A (Célula de epitélio mamário humano de origem não-tumoral)

f. Verificar o perfil de interiorização e mecanismos de indução de morte das nanocápsulas em células 4T1 e MCF-7 *in vitro*;

g. Analisar o perfil de distribuição intracelular das nanocápsulas em células 4T1 e MCF-7 *in vitro*;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

Tabela 1. Materiais utilizados nos experimentos.

<b>Materiais</b>	<b>Fabricante</b>
7AAD (7-amino-actinomicina D)	BD, EUA
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)	Invitrogen, EUA
Acetona (99,60%)	J.T. Backer, Brasil
Acetonitrila (99,95% - grau HPLC)	J.T. Backer, Brasil
Ácido tricloroacético ( $\geq 99,0\%$ )	Sigma, EUA
Anexina V	BD, EUA
Azul de tripan	Sigma, EUA
Brometo de potássio (KBr) ( $\geq 99,0\%$ )	Sigma, EUA
Dimetilsulfóxido (DMSO) ( $\geq 99,5\%$ )	Sigma, EUA
DMAP (diaminometil piridina)	Sigma, EUA
DMF (dimetil formamida)	Sigma, EUA
Cloridrato de doxorrubicina (Padrão da Farmacopéia Européia)	Sigma, EUA
Estreptomicina	Gibco, EUA
Etanol (99,3° INPM)	J.T. Backer, Brasil
EDCI (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride)	Sigma, EUA
Fator de crescimento epidermal	Gibco, EUA
Giemsa	Laborclin, Brasil
Glicose	J.T. Baker, Brasil
HOBT (1-hidroxibenzotriazolico hidratado)	Sigma, EUA
Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)	Gibco, EUA
Membranas de diálise (50KDa)	Spectrum Laboratories, EUA
Metanol (99,96% - grau HPLC)	J.T. Backer, Brasil
Nitrato de prata	Sigma, EUA
n-octadecilamina ( $\geq 99,0\%$ )	Sigma, EUA
Óleo de rícino	Sigma, EUA
Penicilina	Gibco, EUA
Peróxido de Hidrogênio	Vetec, Brasil
PVM/MA (Gantrez AN-119)	ISP, Brasil
RNase	BD, EUA
Rodamina 123	Probes – Thermo Fisher, EUA
Soro fetal bovino	Gibco, EUA
Solução salina tamponada com fosfato (PBS)	Laborclin, Brasil
Tampão de ligação (0,1M de HEPES (pH 7,4); 1,4 M de NaCl e 25mM de CaCl <sub>2</sub> )	(Sigma, EUA)
Tetróxido de ósmio	Electron Microscopy Sciences, EUA
Tripsina	Gibco, EUA

## 4.2 Desenvolvimento das nanocápsulas

As nanocápsulas foram preparadas juntamente com o químico e pesquisador Nichollas Serafim Camargo do laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília.

Para o preparo das nanocápsulas, o polímero PVM/MA foi transformado de tal forma a adquirir características anfífilas, ou seja, possuir proporções hidrofílicas formadas por carboxilatos e porções hidrofóbicas formadas pela cadeia hidrocarbônica de 18 átomos de carbono da n-octadecilamina ou de oito átomos de carbono do n-octanol. Essa adição de caudas hidrofóbicas ao polímero foi realizada para proporcionar estabilidade às nanoestruturas formadas, fossem elas do tipo micelas ou nanocápsulas com núcleo oleoso, por meio da formação de um núcleo hidrofóbico mantido estável por interações hidrofóbicas em meio aquoso e por forças de London. Diversas formulações foram testadas a fim de se obter um sistema estável e com boa polidispersão.

As primeiras tentativas de modificação do PVM/MA foram baseadas na reação espontânea de ataque nucleofílico da hidroxila (n-octanol) ou da amina (n-octadecilamina) ao carbono do grupamento anidrido do PVM/MA. Para tal, em 5 mL de acetonitrila, foram dissolvidos o PVM/MA e n-octanol ou n-octadecilamina, nas concentrações listadas na Tabela 2. Cada solução foi então deixada por 24 h sob agitação magnética branda e temperatura ambiente. Na sequência, a cada mistura reacional foram adicionados 10 mL de etanol e 10 mL de água, já que estes solventes precipitam o PVM/MA de maneira a formar coloides transparentes ou translúcidos (indicativo de nanoestruturas), dispersões opacas (indicativos de nanoestruturas maiores que 200 nm) ou agregados macroscópicos. Nestes testes, todas as concentrações e reagentes testados produziram agregados macroscópicos, de maneira que não foram utilizados em experimentos adicionais.

Tabela 2. Concentrações testadas para a modificação do PVM/MA usando como solvente a acetonitrila.

Teste	PVM/MA (mg/mL)	n-octanol (mg/mL)	N-octadecilamina (mg/mL)
1	20	0,2	-
2	20	1,0	-
3	20	2,0	-
4	20	3,0	-
5	20	4,0	-
6	20	-	0,2
7	20	-	1,0
8	20	-	2,0
9	20	-	3,0
10	20	-	4,0

Os testes anteriores falharam em produzir um polímero com características que possibilitassem à formação de nanoestruturas pelo método de nanoprecipitação, provavelmente pela presença de grupamentos carboxílicos decorrentes da hidrólise dos grupamentos anidrido na presença de água no meio reacional. Foi então testada a ativação de grupos carboxílicos do PVM/MA antes da reação com a n-octadecilamina. Para tal, 100 mg de PVM/MA, 5 mg de DMAP (diaminometil piridina) e 0,8 g de EDCI [cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida] foram dissolvidos em 5 ml de DMF (dimetil formamida) e então a reação prosseguiu sob agitação magnética por 30 minutos. Na sequência, 0,81 g de HOBT (1-hidroxibenzotriazolico hidratado) foi adicionado ao sistema e a reação permaneceu sob agitação durante 30 minutos. Então, foram adicionados 10 mg de n-octadecilamina e a reação prosseguiu por mais 24 horas. Após esta reação, duas alíquotas de 2 mL da solução do polímero modificado foram coletadas. A uma alíquota foram adicionados 4 ml de etanol e 4 ml de água, contudo não houve precipitação do polímero. À outra alíquota foram adicionados apenas 4 ml de água e foi constatada a formação de um coloide translúcido. Contudo, o sistema formado não era estável em pH neutro ou básico.

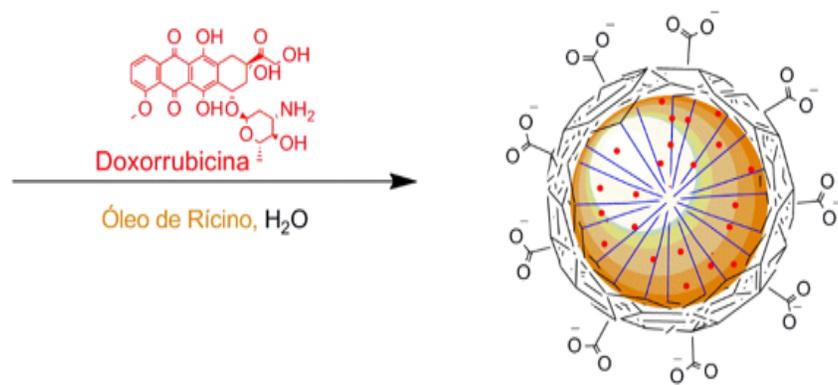
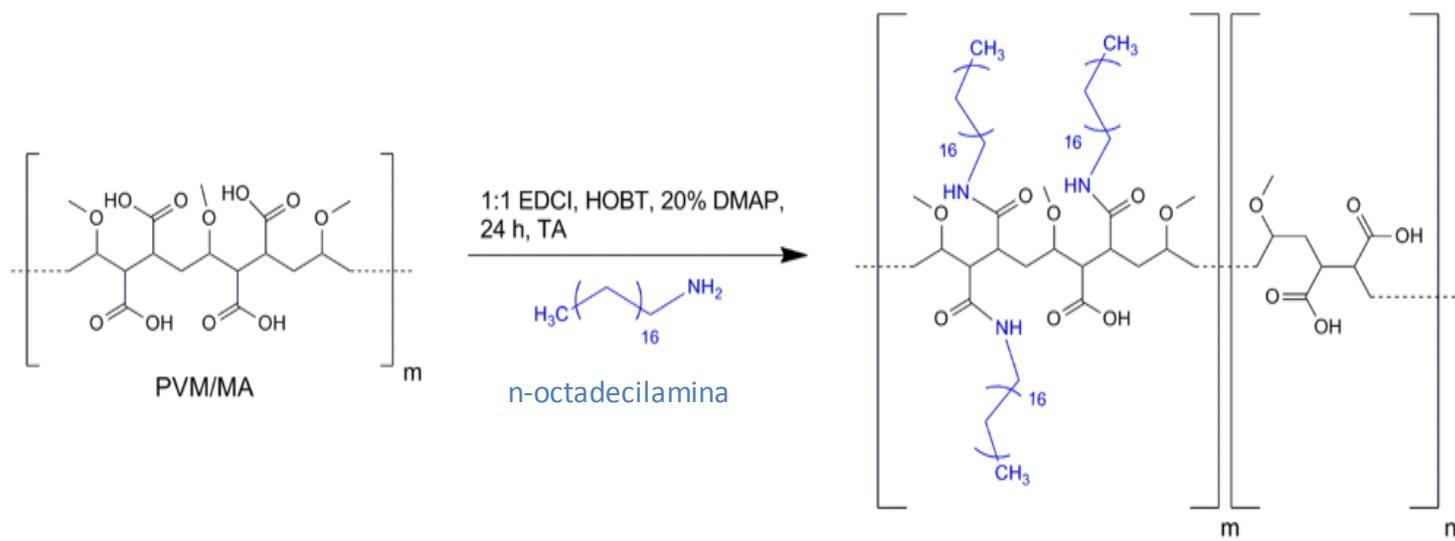
Para aperfeiçoar a estabilidade da nanoestrutura, foi necessário a adição de um núcleo oleoso. Assim, 40 mg de óleo de rícino foram dissolvidos em 2 ml da solução contendo o polímero modificado com n-octadecilamina (equivalente a 20 mg de PVM/MA/mL) em um Becker. Então, 4 ml de etanol e 4 ml de água foram adicionados ao sistema, formando assim um sistema com polidispersão baixa, partículas com tamanho nanométrico, e estável em pH neutro. Tal sistema foi utilizado para a incorporação de DOX, conforme descrito a seguir.

#### **4.3 Produção de nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino e invólucro de poli(metil vinil co-anidrido maleico) contendo doxorubicina (NCR-DOX)**

Em um preparo típico das nanocápsulas, 5 mg de cloridrato de DOX foram neutralizados com 4 µL de etanol basicado com sódio metálico 0.03% m:v (etóxido de sódio) em 100 µL de DMSO. Na sequência, foram adicionados 2 ml da solução polímero modificado com n-octadecilamina (equivalente a 20 mg de PVM/MA/mL) e 40 mg de óleo de rícino. Neste passo foi formada uma solução transparente contendo todos os componentes das nanocápsulas, ou seja, forma básica da DOX, óleo de rícino e o polímero modificado. Na sequência, foram adicionados 4 mL de

água destilada e a mistura imediatamente assumiu aspecto opaco, indicando a formação de solução coloidal. O polímero, por ser anfifílico, forma o invólucro das nanocápsulas, projetando para o interior destas nanoestruturas as caudas hidrofóbicas de seus resíduos de n-octadecilamina, as quais interagem com o óleo de rícino empacotado no núcleo. A DOX, por estar na sua forma básica, permanece dissolvida no núcleo oleoso. A estrutura da NCR-DOX está esquematicamente representada na Figura 5.

Após a formação das nanocápsulas, a dispersão de nanocápsulas foi mantida sob diálise em água:metanol (1:1, v:v) por 24 h no escuro para remover moléculas solúveis pequenas não associadas às nanoestruturas. Na sequência, os solventes orgânicos foram removidos por destilação sob pressão reduzida (40 mbar, 30 °C) em rotaevaporador (RotavaporR110®, BuchiSwitzerland, Suíça). Essa preparação foi imediatamente caracterizada e/ou estocada a 4 °C até o uso. Também foi preparada uma formulação de nanocápsulas com as mesmas concentrações dos componentes, mas sem adição de DOX, denominada NCR (nanocápsula com invólucro polimérico e núcleo de óleo de rícino) como controle para alguns dos experimentos *in vitro*.



### NCR-DOX

Figura 5. Representação de uma nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX (NCR-DOX). Em azul (n-octadecilamina), em laranja (óleo de rícino), em vermelho (DOX) e preto (PVM/MA).

## 4.4 Caracterização das nanocápsulas

### 4.4.1 Análise das propriedades coloidais

O diâmetro hidrodinâmico (DH), o potencial zeta (Zp) e o índice de polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas foram medidos em aparelho de dispersão dinâmica de luz (Zetasizer ZS90, Malvern®). Para cada leitura, a formulação foi previamente diluída em água ultrapura, na concentração de 5% (v:v). A temperatura para análise foi mantida em 25 °C, o ângulo de leitura em 90°. O laser usado emitia luz em  $\lambda$  633 nm. Os resultados foram apresentados como a média das triplicatas, sendo da replicata composta por 10 medições.

### 4.4.2 Avaliação da estabilidade da formulação

A estabilidade da formulação NCR-DOX e NCR dispersas em água foi avaliada em diferentes condições. Para isso alíquotas contendo formulação foram submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento: temperatura ambiente (~25 °C), 4 °C e 37 °C. As características coloidais (DH, Zp e PDI) foram então avaliadas a cada 15 dias.

Para avaliar sua estabilidade nas condições de testes com células *in vitro* as nanocápsulas foram dispersas em meio de cultivo e acondicionadas em estufa a 37 °C nas condições de cultivo celular contendo soro fetal bovino e antibiótico. Foram analisadas 1, 24 e 48 horas após sua dispersão em meio de cultivo.

As dispersões de nanocápsulas – NCR-DOX e NCR – também foram avaliadas quanto ao pH e foram centrifugadas (Centrífuga Hettich – Mikro 220R Alemanha) a  $31.514 \times g$  por 30 minutos em microtubos sob temperatura de 4 °C para a investigação de separação de fases ou decantação no coloide.

### 4.4.3 Quantificação de DOX em NCR-DOX por cromatografia líquida de alta eficiência

Após o preparo de NCR-DOX, a presença de DOX na nanocápsula foi quantificada pela adição de 20  $\mu$ L em balão volumétrico de 10 mL e volume foi completado com acetonitrila e água

(65:35, v:v). O balão foi deixado por 1 minuto em banho ultrassônico e em seguida filtrado em unidade de poro de 0,22 $\mu$ L e levado ao CLAE para dosagem de DOX.

A quantificação de DOX incorporada ao sistema foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu-Prominence) acoplada ao desgaseificador (Modelo DGU 20A5), com módulo de distribuição de solvente (modelo LC- 20AT), amostrador automático (modelo SIL-20AHT), forno de coluna (Modelo CTO-20A), detector de fluorescência (Modelo RF-10AXL) e controlador do sistema CBM-20A. A fase estacionária consistiu de uma coluna C18 de fase-reversa ACE AQ (25 x 0,4 cm, 5  $\mu$ m diâmetro de partícula) (ACE, Aberdeen, Scotland) com uma pré-coluna (1 x 0,4 cm, 5  $\mu$ m diâmetro de partícula) (ACE, Aberdeen, Scotland). Soluções de DOX com concentrações entre 0,05 e 2,0  $\mu$ g/mL preparadas em mistura de metanol:água (1:1 v:v) foram utilizadas para obtenção da curva padrão para calibração. A fase móvel consistiu de mistura de 65% de ácido tricloroacético 0,05 M aquoso e 35% de acetonitrila (v:v). As medições fluorimétricas foram realizadas em célula de fluxo de 12  $\mu$ L com comprimento de onda de excitação de 470 nm e de emissão de 555 nm. O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L, a taxa do fluxo durante o ensaio foi de 1 mL/min a uma pressão de trabalho de 120 kgf.cm<sup>-2</sup>. A temperatura da coluna foi mantida em 30 °C. O tempo de retenção para DOX foi de 5,5 minutos. O software LC solution (Shimadzu, Tokyo, Japan) foi usado para o processamento e identificação dos dados cromatográficos.

#### 4.4.4 Estrutura das nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino

A forma das nanocápsulas foi observada em microscópio eletrônico de transmissão (MET) modelo Tecnai Spirit G2 fabricado por FEI Company/Óregon, USA. As análises foram realizadas no laboratório de microscopia aplicada às ciências da vida - LAMAV do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) pela pesquisadora Dra. Ranata Carvalho Silva . As amostras foram depositadas em telas de cobre de (400 malhas) e recobertas com Formvar 0,5% e secas em papel filtro para espalhamento da solução. As telas foram armazenadas em placas de Petri e analisadas após 24 horas. As imagens foram obtidas em diferentes magnificações.

#### 4.4.5 Perfil de liberação de DOX

O perfil de liberação da DOX das nanocápsulas NCR-DOX foi analisado pelo método de CLAE por 24 horas (20, 40, 60, 80, 100, 120, 180, 240, 420 e 1440 minutos) após a síntese. Para quantificação da DOX livre passível de remoção por diálise, foram utilizadas utilizando membranas com poros de 50 kDa (membranas de ester celulose, SpectrumLabs, EUA). Em um experimento típico, 1 mL da formulação NCR-DOX e da DOX livre (0,25 mg de DOX/mL) foi adicionado à bolsa de diálise, que foi selada e imersa em 249 mL de meio dialisador (metanol e água, 1:1 (v:v) por 24 horas, a 37 °C, sob agitação contínua a 180 rpm. Na sequência, em determinados tempos, 1 mL de meio dialisador foi recolhido e o mesmo volume foi repostado ao sistema. As alíquotas retiradas foram mantidas congeladas até análise em HPLC. Os valores foram plotados de acordo com a porcentagem acumulada de liberação da DOX.

#### 4.4.6 Determinação de eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi calculada utilizando a fórmula:

$$\text{Eficiência de encapsulação} = \frac{\text{DOX total} - \text{DOX ultra filtrado}}{\text{DOX total}} \times 100$$

Após diálise, a dosagem de DOX total presente na NCR-DOX foi estimada pela adição de 20 µL do coloide a 5 mL de metanol, a solução foi deixada por um minuto em banho ultrassônico e em seguida a proporção final de água foi ajustada para 50% (v:v), e a solução foi filtrada em unidade de poro de 0,22 µL e levado ao CLAE para dosagem de DOX.

A concentração de DOX no filtrado foi calculada pela adição de 300 µL de NCRDOX à unidade filtrante 10K Amicon (Millipore, EUA) e, após centrifugação a 14000 rpm, o eluído no tubo coletor foi diluído 2x em solução de metanol:água (1:1), filtrado em unidade de poro de 0,22 µL e levado ao CLAE para dosagem de DOX. O retido na unidade filtrante foi diluído 1000x em solução de metanol, sonicado por um minuto, a proporção final de água foi ajustada para 50%, e a solução foi filtrada em unidade de poro de 0,22 µL e levado ao CLAE para dosagem de DOX. Como controle da técnica, o mesmo procedimento descrito acima foi realizado com solução de DOX em água ultrapura.

#### 4.4.7 Estudo das características moleculares da NCR-DOX e DOX

Com o intuito de identificar as interações químicas entre a DOX, PVM/MA, n-octadecilamina e óleo de rícino nas nanocápsulas NCR-DOX, espectros de absorvância na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (sigla em inglês, *FTIR*) (Vertex 70, Bruker, EUA) com resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$ , via de análise média de 32 scans. Para o preparo da pastilha, as amostras secas foram diluídas em KBr seco e limpo na proporção de 1:100 (m:m).

#### 4.4.8 Análise das interações químicas entre NCR-DOX e DOX

A técnica de espectroscopia Raman amplificada por superfície (sigla em inglês SERS) foi utilizada para caracterizar as eventuais interações químicas entre os componentes das nanocápsulas NCR-DOX. Para tal, as amostras foram diluídas em água destilada (1:2, v:v) e foram depositadas em placas cobertas por filme de nitrato de prata a  $6 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$  e secas com o auxílio de nitrogênio gasoso. Os espectros SERS foram obtidos em temperatura ambiente em espectrômetro triplo (Jobin Yvon modelo T64000, Tripla Raman Spectrometer, Horiba, Japão). Para garantir a reprodutibilidade dos espectros de SERS e evitar aquecimento das amostras foi utilizado feixe do laser de íon argônio com densidade de potência de  $0,1\text{ W/cm}^2$ . O feixe foi focalizado na amostra por meio de uma lente cilíndrica. Utilizou-se a linha de 514,5 nm e potência ótica de 200 mW no estudo. A luz espalhada foi coletada na configuração de macro-Raman.

### 4.5 Estudos *in vitro*

#### 4.5.1 Linhagens celulares

Células tumorais murinas das linhagens 4T1 (adenocarcinoma mamário) e MCF-7 (célula de adenocarcinoma mamário humano) foram obtidas do banco de células da *American Type Culture Collection* (ATCC) EUA. Células não tumorais murinas NIH-3T3 (fibroblastos) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro, BCRJ, Brasil. As células MCF-10A (células epiderme mamário

não tumoral) foram gentilmente doadas pela profa. Dr. Maria Mitzi Brentani (Universidade de São Paulo - USP).

#### 4.5.2 Manutenção da cultura de células

Neste trabalho foram utilizadas alíquotas dessas células (tópico 5.5.1), as quais foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido no estoque de células do Laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília, UnB. Essas alíquotas foram descongeladas à temperatura ambiente e transferidas para garrafa de cultivo celular. A garrafa foi mantida em incubadora (Thermo Fisher Scientific, Inc., EUA) a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 80% de umidade. As células NIH-3T3, 4T1 e MCF-7 foram cultivadas em DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco), suplementadas com 10% (v:v) de SFB e 1% (v:v) de solução de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). As células MCF-10A foram cultivadas em meio DMEM -F12 (Meio Eagle modificado por Dulbecco e mistura de nutrientes F12), suplementado com uma concentração final de 5% de soro de cavalo (Introvigen, EUA), 20 ng/mL de fator de crescimento epidermal (Gibco, EUA), 100 ng/mL de toxina colérica (Gibco, EUA), 0,5 µg/mL de hidrocortisona (Gibco, EUA), 10µg/mL de insulina humana (Gibco, EUA), e 1% (v:v) da solução de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). Ambos meios de cultivo foram tamponados com bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), sendo o pH 7,3-7,4, ajustado pela adição de HCl. O cultivo celular foi observado e monitorado em microscópio de luz invertido (Leica DMil, Alemanha) com o objetivo de acompanhar o crescimento celular, identificar mudanças morfológicas assim como detectar possíveis contaminações.

#### 4.5.3 Tratamentos e análise de viabilidade celular

Todos os procedimentos *in vitro* foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Brasil) previamente esterilizada com luz ultravioleta por 20 minutos e utilizando materiais esterilizados. Uma vez atingida a confluência de 80-90%, as células foram tripsinizadas. O número de células para o experimento foi verificado por contagem em câmara de Neubauer e exclusão por

azul de tripan, sendo utilizado 10 µL da suspensão de células adicionados em 90 µL de solução de azul tripan (0,9%, p/v, diluídos em PBS).

As células foram semeadas em microplacas de poliestireno por 24 h e submetidas aos seguintes tratamentos:

- (a) NCR-DOX
- (b) NCR
- (c) DOX
- (d) meio de cultivo (controle).

As concentrações de cada tratamento foram obtidas por diluição seriada a partir de uma solução estoque. Cada tratamento foi realizado em triplicada e em 6 concentrações diferentes (equivalente à 0,03; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 e 9,0 µg de DOX/mL).

A nanopartícula branca foi preparada pelo mesmo método e com as mesmas concentrações dos componentes usados para a formulação NCR-DOX, porém sem DOX. As concentrações de PVM/MA foram equivalentes para todas as formulações que continham este polímero (equivalente a 50; 16,66; 5,5; 1,85; 0,61; 0,20 µg de PVM/MA/mL). As concentrações de óleo de rícino também foram equivalentes na NCR-DOX e NCR (sendo as concentrações de 1,48; 4,45; 13,4; 40,1; 120,3; e 361 µg/mL).

#### **4.5.4 Análise de viabilidade celular pelo método de MTT**

Para avaliar a viabilidade celular,  $1 \times 10^4$  células foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços e após 24 horas foram tratadas conforme descrito acima. Após 24 e 48 horas os tratamentos foram retirados e em seguida as células foram incubadas com 0,5 mg/mL da solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo) em meio de cultivo por 2,5 h a 37°C em atmosfera úmida (80%) e 5% CO<sub>2</sub>. O sal tetrazólio é reduzido a formazan apenas pelas células viáveis. Enzimas mitocondriais (desidrogenases) reduzem o substrato MTT formando cristais de formazan, de cor azulada (MOSMANN, 1983).

Após o tempo de incubação, a solução de MTT foi descartada e o formazan foi extraído das células com 200 µL de DMSO por poço. As placas foram analisadas em espectrofotômetro (Spectramax M2, Molecular Devices, EUA) e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 595 nm. A absorbância foi correlacionada ao índice de viabilidade celular e os resultados foram

expressos como porcentagens em relação ao grupo controle. Foram realizados três repetições do experimento em triplicada.

#### 4.5.5 Morfologia e confluência celular

Células 4T1, NIH-3T3, MCF-7 e MCF-10A foram analisadas quanto a morfologia e confluência utilizando corante de Giemsa. Foram semeadas em placas de cultivo de 12 poços em concentração de  $3 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas na incubadora úmida, receberam tratamento 1) NCR-DOX, 2) DOX e meio de cultivo (controle). A concentração de DOX foi de  $3 \mu\text{g/mL}$ , e a de óleo de rícino – NCR-DOX – foi de  $13,3 \mu\text{g/mL}$ . O tempo de tratamento foi de 48 horas e apenas as células aderidas ao fundo dos poços foram analisada. As análises foram feitas por meio de microscópio de luz invertido EVOS FL Auto (Life Technologies, Thermo Scientific, CA, EUA). As imagens foram obtidas utilizando aumento de 20x.

#### 4.5.6 Índice de adesão celular em tempo real

O experimento foi realizado para verificar em tempo real a adesão celular uma vez que esta é proporcional à viabilidade celular. A análise foi realizada pelo instrumento RTCA (do inglês Real-Time Cell Analysis) fabricado por xCelligence-Roche, Suíça. Para o monitoramento dinâmico, o equipamento foi colocado numa incubadora de  $37^\circ \text{C}$  na presença de 5% de  $\text{CO}_2$ . A concentração de  $3 \times 10^3$  célula/ poço das linhagens 4T1, NIH-3T3, MCF-7 e MCF-10A foi semeada em placas de cultivo contendo eletrodos. Esses eletrodos registram as variações na impedância elétrica gerada pela adesão celular. A magnitude desta impedância é dependente do número de células, da morfologia e da qualidade da adesão do substrato celular. O crescimento das células foi monitorado por 24 horas para verificação do sinal emitido pelos eletrodos. Após esse tempo foram realizados os seguintes tratamentos: 1) NCR-DOX; 2) NCR; 3) DOX e 4) meio de cultivo (controle). A concentração de DOX foi equivalente a  $1 \mu\text{g/mL}$  e a de óleo de rícino – para NCR-DOX – foi de  $40,1 \mu\text{g/mL}$ . Os índices de células aderidas no fundo do poço foram monitorados a cada 30 minutos por 100 horas.

### 5.5.7 Ensaio de interiorização

Com o intuito de analisar a o perfil de interiorização da DOX e NCR-DOX, as células 4T1 e MCF-7 foram semeadas em placas de 12 poços na concentração de  $6 \times 10^5$  de células/poço. Após 24h, as células foram tratadas com NCR-DOX, DOX e meio de cultivo usado como controle. A concentração foi de  $9 \mu\text{g/mL}$  de DOX e a concentração de óleo de rícino para NCR-DOX – foi de  $361 \mu\text{g/mL}$ . As células ficaram incubadas com os tratamentos por 0,25; 0,5; 1 e 3 horas. Após o tratamento, as células foram removidas dos poços com  $400 \mu\text{l}$  de tripsina-EDTA e incubação a  $37^\circ\text{C}$  por 3 minutos. A tripsina foi bloqueada com o meio armazenado anteriormente e em seguida o meio com células foi homogeneizado. Os tubos contendo as suspensões (meio de cultivo, tripsina e células) foram centrifugados por 5 minutos a 2500 rpm. As células passaram por três lavagens com PBS gelado e em seguida foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSVerse, BD, EUA). A fluorescência da DOX foi detectada em comprimento de onda de excitação e emissão de 488 e 590 nm respectivamente. Para cada amostra, 10.000 eventos foram analisados usando o *software* FlowJo® vX 0.7.

### 4.5.8 Mecanismos de endocitose

Este ensaio foi realizado em células 4T1 e MCF-7 para identificar e via endocítica da NCR-DOX e DOX. Para tal,  $6 \times 10^4$  células/poço foram semeadas em placas de cultivo de 12 poços. Após 24 horas de crescimento e proliferação, as células foram incubadas por 40 minutos com os seguintes inibidores de endocitose. Amilorida, citocalasina D, nistatina, filipina, óxido de de fenilarsina e azida sódica. Esses inibidores estão envolvidos em vias que são dependentes de ATP, vias mediadas por cavéolas e também por macropinocitose (SAHAY *et. al*, 2010).

Após esse tempo, os inibidores foram retirados e então adicionou-se os tratamentos. As células foram tratadas com NCR-DOX ( $9 \mu\text{g/mL}$  de DOX e  $361 \mu\text{g/mL}$  de óleo de rícino), DOX ( $9 \mu\text{g/mL}$ ) e meio de cultivo (controle) por 3 horas. Para cada tratamento, foram mantidos controles sem incubação com os inibidores. As células foram centrifugadas e lavadas com PBS gelado por três vezes e levadas para análise em citômetro (FACSVerse, BD, EUA). A fluorescência da DOX foi detectada em comprimento de onda de excitação e emissão de 488 e 590 nm respectivamente. Foram analisados 10.000 eventos amostra e os resultados foram analisados usando o *software* FlowJo® vX 0.7.

#### 4.5.9 Fragmentação de DNA

A análise da fragmentação de DNA foi realizada em células 4T1 e MCF-7. A concentração de  $6 \times 10^4$  células/poço foi semeada em placas de cultivo de 12 poços e após 24 horas foram incubadas com os tratamentos NCR-DOX (1  $\mu\text{g/mL}$  de DOX e 40,1  $\mu\text{g/mL}$  de óleo de rícino); DOX (1  $\mu\text{g/mL}$ ) e meio de cultivo (controle) por 24 e 48 horas.

Subsequentemente, as células foram lavadas com PBS gelado e incubadas com 50  $\mu\text{g/mL}$  de RNase por 30 minutos na estufa à 37 °C. Para marcação do material genético foi utilizado 7AAD na concentração de 2,5  $\mu\text{g/mL}$  por 15 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Foram contados 10.000 eventos por amostra e as células foram analisadas em citômetro (FACSVerse, BD, EUA). A fluorescência da DOX foi detectada em comprimento de onda de 590 nm e do 7AAD em 650 nm. Os resultados foram analisados no *software* FlowJo® vX 0.7.

#### 4.5.10 Análise de morte e morfologia celular por citometria de fluxo

Para a análise de morte celular, foram realizadas marcações com anexina V, uma proteína que apresenta alta afinidade e especificidade por fosfatidilserina presente em células apoptóticas. Com a finalidade de analisar o sinal de necrose decorrente da perda da integridade da membrana celular foi utilizado o marcador 7AAD. Células 4T1 e MCF-7 foram semeadas em concentração de  $6 \times 10^4$  células/poço em placas de 12 poços. Após 24 horas as células foram tratadas com NCR-DOX (1  $\mu\text{g/mL}$  de DOX e 40,1  $\mu\text{g/mL}$  de óleo de rícino); DOX (1  $\mu\text{g/mL}$ ) e meio de cultivo (controle). As células foram incubadas por 48 horas com os tratamentos. Para aumentar a afinidade da anexina V à fosfatidilserina as células foram incubadas com tampão de ligação (0,1 M de HEPES pH 7,4; 1,4 M de NaCl e 25 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados, 5  $\mu\text{L}$  de anexina V e 10  $\mu\text{L}$  de 7AAD nas células em suspensão que então ficaram incubadas com estes marcadores por 5 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Para evitar que o sinal de fluorescência da DOX não interferisse nos resultados, foram utilizadas controle negativo células tratadas apenas com DOX, sem incubação com os fluoróforos. A fluorescência da DOX, anexina V e 7AAD, foram detectadas em comprimento de onda de 590, 488 e 650 nm, respectivamente. As células foram analisadas em citômetro (FACSVerse, BD, EUA) e 10.000 eventos foram contados por amostra. Os resultados foram analisados com o *software* FlowJo® vX 0.7.

#### 4.5.11 Análise do potencial de membrana mitocondrial

A rodamina 123, uma molécula lipofílica, catiônica e fluorescente que marca especificamente as mitocôndrias em células vivas, foi utilizada para avaliar o potencial de membrana mitocondrial nas células 4T1 e MCF-7. Para isso, as células foram semeadas na concentração de  $6 \times 10^4$  células/poço em placas de 12 poços. Após 24 horas foram realizados os seguintes tratamentos: NCR-DOX (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DOX e 40,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de óleo de rícino; DOX (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), meio de cultivo (controle) e peróxido de hidrogênio, utilizado como controle positivo. As análises foram realizadas após 24 e 48 horas de exposição aos tratamentos. As células foram lavadas e então incubadas com 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de rodamina 123 por 15 minutos na ausência de luz e na temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas duas vezes com PBS gelado. As células foram então analisadas em citômetro (FACSVerse, BD, EUA), onde 10.000 eventos foram contados por amostra. A emissão de fluorescência da DOX, e rodamina 123 foram detectadas em comprimento de onda de 590 e 530 nm respectivamente. Os resultados foram analisados usando o *software* FlowJo® vX 0.7.

#### 4.5.12 Análise da interiorização das nanocápsulas por microscopia de fluorescência

Analisar o perfil de distribuição intracelular das nanocápsulas NCR-DOX e DOX, a densidade de  $5 \times 10^4$  de células 4T1 e MCF-7 foram semeadas em placas de cultivo de 12 poços, contendo lamínula redonda de 18 mm de diâmetro ao fundo. Após 24 horas de cultivo as células receberam os tratamentos NCR-DOX e DOX sendo a concentração de DOX de 9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e de óleo de rícino – para NCR-DOX – 361  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As células permaneceram incubadas em estufa de cultivo celular a 37 °C e atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$  umidificada. As análises foram realizadas após 3 horas de exposição com os tratamentos. As células foram lavadas com PBS gelado por duas vezes e fixadas com paraformaldeído 4% (m/v) por 15 minutos, lavadas por duas vezes com PBS, em seguida, as células expostas ao corante DAPI por 15 minutos a TA. O corante DAPI foi utilizado para marcação do núcleo das células, lavadas por mais duas vezes. As lamínulas foram retiradas com auxílio de um pinça e montadas em uma lâmina limpa. As lâminas prontas foram analisadas em microscópio de fluorescência automatizado EVOS FL Auto (Life Technologies, Thermo Scientific, CA, EUA) para verificação da emissão de fluorescência da DOX dos tratamentos em relação aos marcadores. Os

sinais de fluorescência da DOX e DAPI foram detectados no comprimento de onda de 590 e 461 nm, respectivamente.

#### **4.6 Análises estatísticas**

Foi utilizado software GraphPad Prisma® 6.0 para análise dos resultados, sendo submetidos a testes estatísticos específicos com confiança estatística de 95% ( $p < 0,05$ ). Diferenças estatísticas foram avaliadas pelos testes Anova, de uma ou de duas vias, aplicando pós-testes de múltiplas comparações de Tukey ou Sidak. Os resultados quantitativos foram descritos como média  $\pm$  erro padrão da média.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Desenvolvimento e caracterização das formulações de nanocápsulas

O diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ) e pH da NCR-DOX estão apresentados na Tabela 3. Somente a NCR-DOX, foi avaliada quanto à sua estabilidade temporal.

A NCR, nanocápsula sem DOX, foi utilizada como controle em determinados experimentos.

Tabela 3. O diâmetro hidrodinâmico (z-average) (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das formulações frescas NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e NCR (nanocápsula com invólucro polimérico e núcleo de óleo de rícino). Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

<b>Formulação</b>	<b>DH (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>PZ (mV)</b>	<b>pH</b>	<b>Separação de fase</b>
<b>NCR-DOX</b>	297,6 $\pm$ 0,92	0,07 $\pm$ 0,016	-46,13 $\pm$ 0,37	3,25	Não
<b>NCR</b>	295,12 $\pm$ 3,21	0,124 $\pm$ 0,016	-46,36 $\pm$ 1,13	3,25	Não

As nanocápsulas não apresentaram separação de fases após a centrifugação e mantiveram-se dispersas. Nesse procedimento não foi observada a formação de precipitados ou deposições decorrentes da centrifugação (Figura 6).

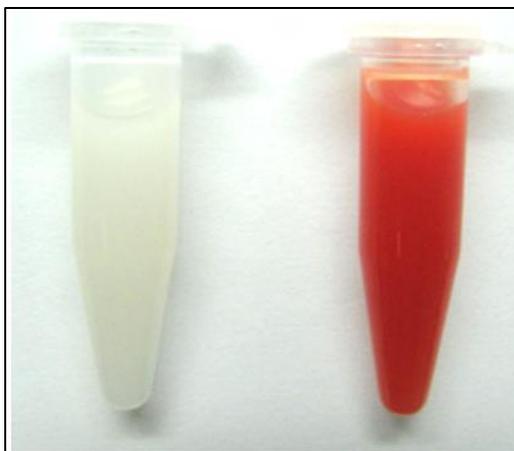


Figura 6. Amostras de NCR (nanocápsula com invólucro polimérico e núcleo de óleo de rícino) (à esquerda) e NCR-DOX (nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino contendo doxorubicina, a) (à direita) após centrifugação por 30 minutos.

A formulação NCR-DOX a 4°C apresentou DH de  $297,6 \pm 0,9$  nm no dia de preparo e  $295,2 \pm 0,3$  nm na última análise (120° dia), um resultado que evidencia estabilidade destas nanocápsulas ao longo dos 3 meses de análise (Figura 7). As nanocápsulas armazenadas sob temperatura ambiente (TA, ~25°C) também se mostraram estáveis, sendo que o DH variou de  $296 \pm 1,4$  nm a  $283,6 \pm 7,3$  entre o primeiro e último dia de análise (120° dia). A NCR-DOX armazenada a 37°C demonstrou DH de  $304,13 \pm 0,57$  nm no primeira análise e  $302,96 \pm 0,7$ nm no último dia de análise (120 ° dia). Nessa condição de armazenamento, a NCR-DOX apresentou um aumento no seu tamanho após uma semana de armazenamento, chegando a medir  $314,13 \pm 0,57$  nm. Após 20 dias de armazenamento a 37°C as nanocápsulas mantiveram seu tamanho estável. O PDI, para todas as condições, permaneceu abaixo de 0,1. O PZ das partículas armazenadas a 4°C e 37°C permaneceu estável (entre -42,6 e -47,3mV). A NCR-DOX armazenada em TA apresentou PZ variando entre -36 a -47 mV, demonstrando uma leve tendência no aumento da carga de superfície após 105 dias de preparo.

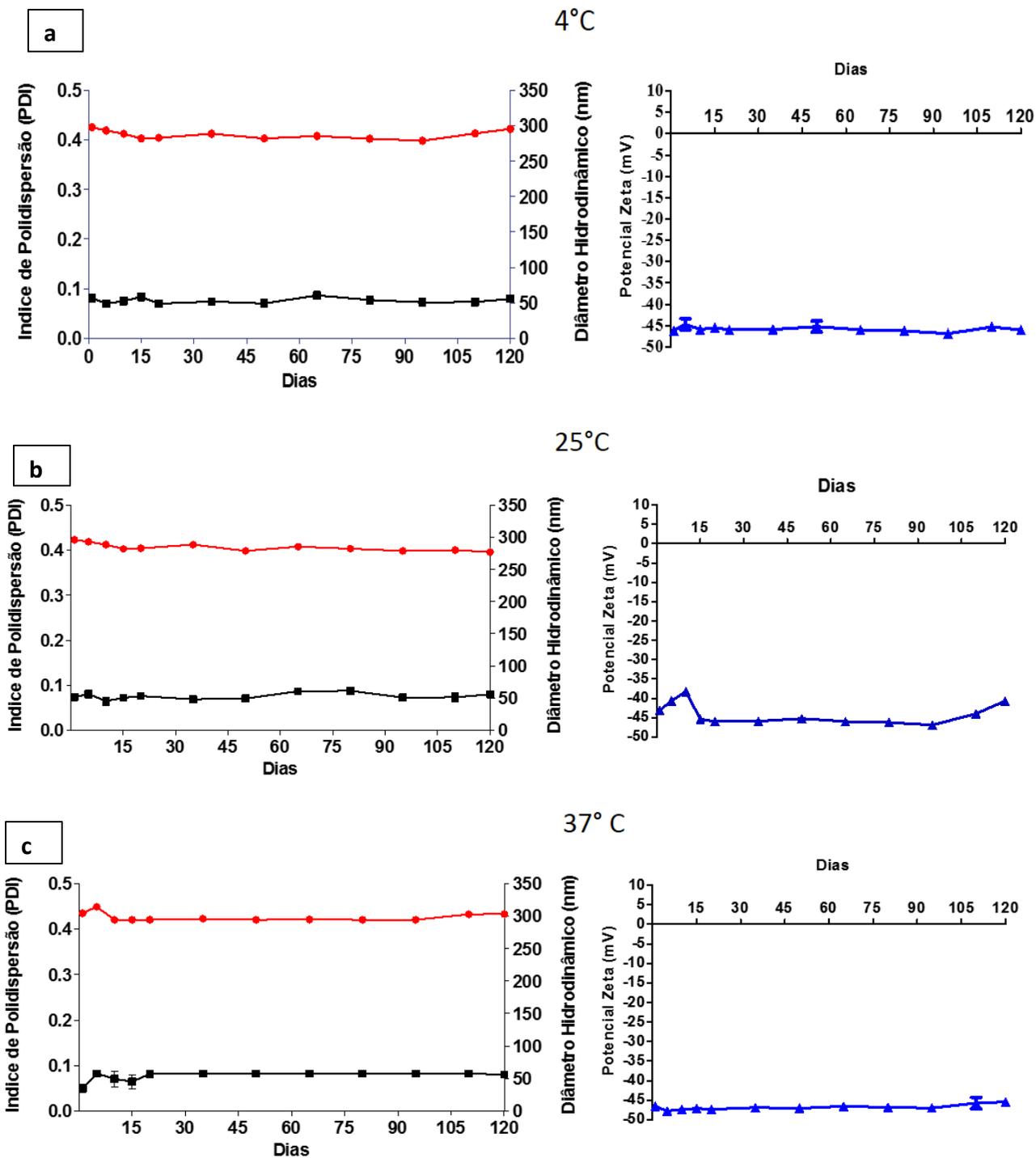


Figura 7. Diâmetro hidrodinâmico (DH em vermelho), índice de polidispersão (PDI –em preto) e potencial zeta (PZ – em azul) das nanocápsulas NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) a 4 °C em (a), temperatura ambiente (25°C) em (b) e estufa 37 °C em (c). Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média.

Em meio de cultivo foi observado que o DH das nanocápsulas sofreu aumento, variando de 301 a 307 nm. O PDI teve aumento no tempo de 48h e o PZ médio das análises foi  $24,6 \pm 1,46$  mV (Figura 8).

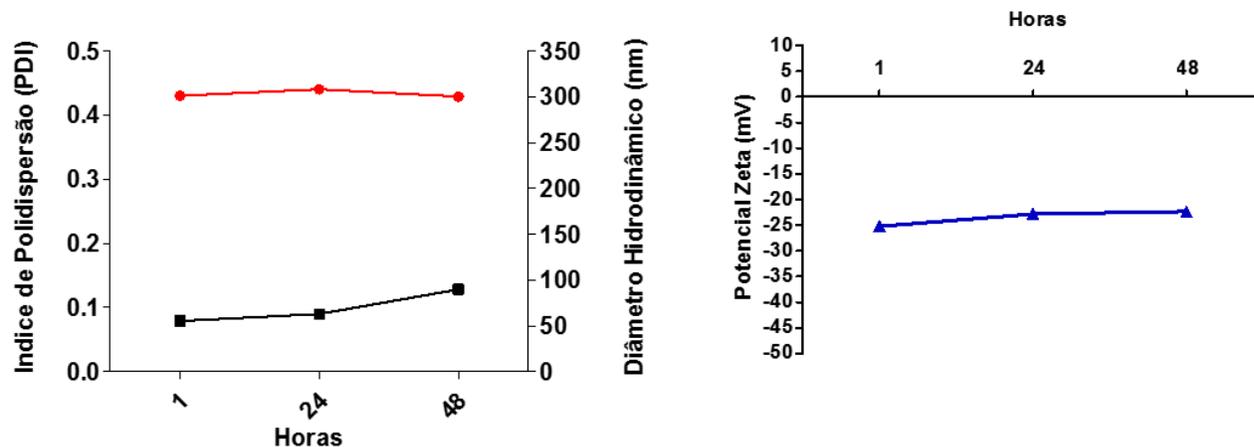


Figura 8. Diâmetro hidrodinâmico (DH – em vermelho), índice de polidispersão (PDI – em preto) e potencial zeta (PZ – em azul) das nanocápsulas NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) dispersas em meio de cultivo. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

### 5.1.1 Análise morfológica da NCR-DOX

As nanocápsulas NCR-DOX vistas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Figura 9) se apresentaram arredondadas possuindo contornos circunferenciais e demonstraram ser esferoides deformáveis, sendo possível observar mudanças no contorno onde as nanocápsulas estão em contato.

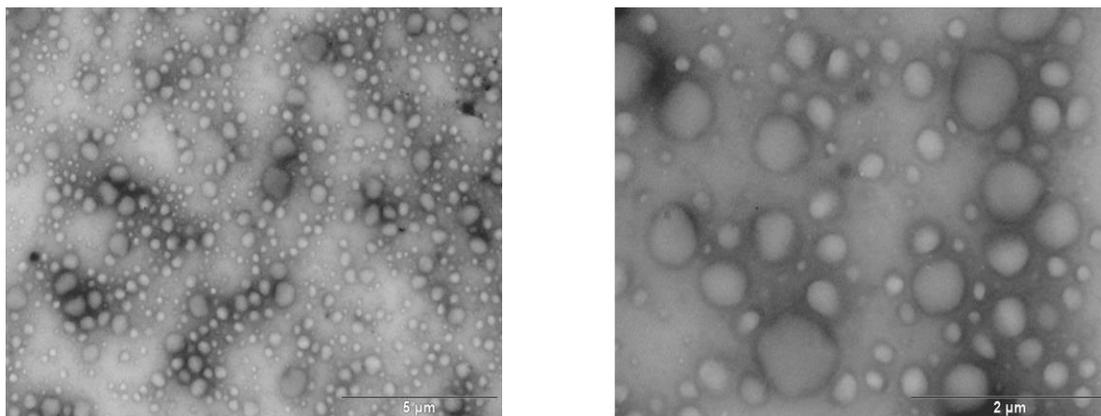


Figura 9. Eletrofotomicrografia da NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX). Morfologia avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

### 5.1.2 Perfil de liberação da doxorubicina em NCR-DOX

Foi preparada uma curva de calibração para quantificação de DOX utilizando o método de CLAE e pontos em triplicatas para cada concentração testada. A equação da reta foi obtida por análise de regressão linear e o coeficiente da curva analítica ( $r^2$ ) encontrado foi de 0,9990. A curva de calibração de DOX utilizada no presente estudo apresentou linearidade nas concentrações testadas e pode ser observada na Figura 10.

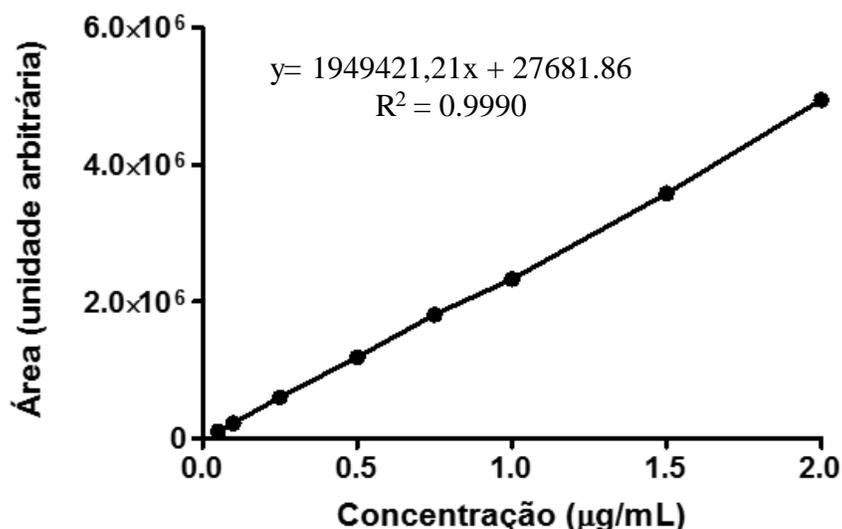


Figura 10. Curva de calibração de DOX obtida por cromatografia líquida de alta eficiência com pontos em triplicatas para cada concentração testada.

NCR-DOX e o controle de DOX não encapsulada foram dialisados por 24 horas em solução água: metanol Figura 11. A análise de liberação identificou que para DOX livre, em 180 minutos, 100% da quantidade desta molécula já se encontravam em solução. Já para NCR-DOX, após 7 horas aproximadamente, apenas 8% haviam sido liberados, e após as 25 horas totais do experimento, apenas 8,9% da DOX presente nas nanocápsulas haviam sido liberados das nanocápsulas.

A quantificação de DOX total em NCR-DOX resultou na identificação de concentração de 249 µg/mL. A análise de eficiência de encapsulação de DOX em NCR-DOX após a diálise resultou

na identificação de que menos que 0,01% da DOX presente em NCR-DOX é passível de remoção por unidade filtrante, mostrando que 99,99% da DOX estava associada fortemente às nanocápsulas. O controle deste experimento, feito com DOX livre separada por unidade filtrante, demonstrou adequação da técnica uma vez que 97% da DOX livre foram recuperados no tubo coletor.

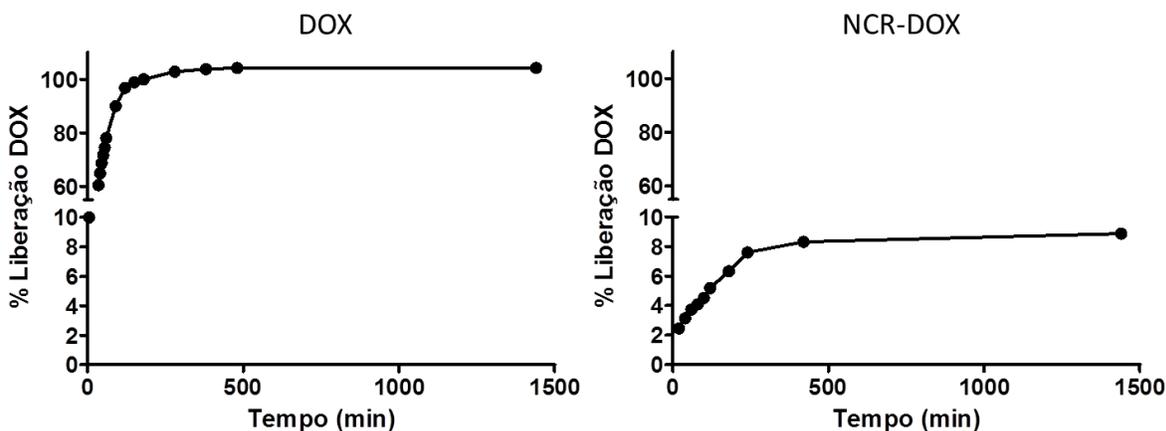


Figura 11. Perfil de liberação de doxorubicina (DOX) após diálise de doxorubicina livre (DOX); NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) em solução de metanol: água (50:50, v/v).

### 5.1.3 Estudo das características moleculares por espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS) e espectroscopia de transmitância na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

No espectro de SERS da DOX (Figura 12) observam-se as deformidades nas bandas em  $374\text{ cm}^{-1}$  correspondente à C-C-C, em  $450\text{ cm}^{-1}$  atribuído à  $\delta$  (C=O (anel B)), em  $984\text{ cm}^{-1}$  relacionado à  $\nu$  (C-C (anel A)). Há também as bandas em  $1210\text{ cm}^{-1}$  atribuída em  $\delta$  (C-O-H), em  $1249\text{ cm}^{-1}$  referente à  $\delta$  (C-O-H), em  $1268\text{ cm}^{-1}$  correspondente à  $\nu$  (C-C (anel)), em  $1308\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-O, em  $1334\text{ cm}^{-1}$  atribuída à ligação C-C, em  $1436\text{ cm}^{-1}$  correspondente à  $\nu$  (C-C (esqueleto do anel)), em  $1462\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C=C, em  $1545\text{ cm}^{-1}$  atribuída à ligação C=C do anel e em  $1576\text{ cm}^{-1}$  correspondente à  $\nu$  (C=O do anel B) atribuídas aos estiramentos do anel da DOX.

As principais bandas observadas no espectro SERS da NCR-DOX (figura12) estão em 374  $\text{cm}^{-1}$ , 450  $\text{cm}^{-1}$ , 1249  $\text{cm}^{-1}$ , 1334  $\text{cm}^{-1}$ , 1436  $\text{cm}^{-1}$ , 1576  $\text{cm}^{-1}$  e 1545  $\text{cm}^{-1}$ , indicando a presença da DOX nas nanopartículas.

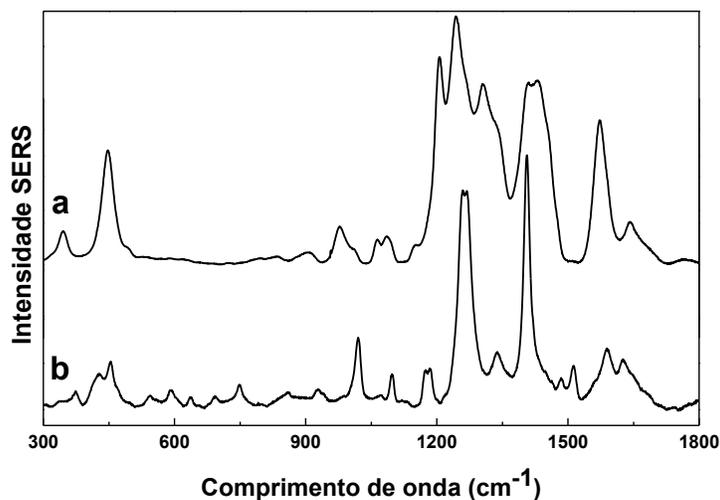


Figura 12. Espectro de Espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS) para: (a) DOX e (b) NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX).

No espectro de FTIR do PVM/MA (Figura 13a) observa-se um pico de absorção em 3427  $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento da ligação O-H, em 2943-2842  $\text{cm}^{-1}$  referente à ligação C-H alifáticos, em 1859-1780  $\text{cm}^{-1}$  referente ao grupo carbonila anidrido, em 1629  $\text{cm}^{-1}$  aparece o estiramento da ligação C=O, em 1442  $\text{cm}^{-1}$  referente à deformação angular do  $\text{CH}_2$ , em 1369-1224  $\text{cm}^{-1}$  há o estiramento da ligação C-O típica de ácidos carboxílicos, em 1093  $\text{cm}^{-1}$  aparece a banda típica do estiramento C-C-C atribuído a metil vinil éter e em 925  $\text{cm}^{-1}$  há o pico O-H característico dos grupos carboxílicos.

Conforme o esperado os espectros de FTIR da n-octadecilamina e do óleo de rícino (Figura 13b e c, respectivamente) apresentam bandas típicas de cadeias hidrocarbônicas alifáticas: entre 3163  $\text{cm}^{-1}$  e 2848  $\text{cm}^{-1}$  e em 719  $\text{cm}^{-1}$  relativas à presença da ligação CH alifática, em 1461  $\text{cm}^{-1}$  referente à deformação angular do  $\text{CH}_2$  e em 1377  $\text{cm}^{-1}$  referente à deformação angular do  $\text{CH}_3$ . Ainda, no espectro do óleo de rícino podem ser observadas as bandas referentes às duplas ligações C=C dos ácidos graxos insaturados do óleo em 3008  $\text{cm}^{-1}$  e à ligação C=O de grupo éster dos triacilglicerídeos do óleo de rícino em 1745  $\text{cm}^{-1}$ , em 1242-1097  $\text{cm}^{-1}$  há a ligação C-O, que pode

ser relativa da hidroxila presente nos resíduos de ácido ricinoleico e também do grupamento éster do óleo de rícino. No espectro da n-octadecilamina são observadas as bandas características de N-H de amina primária alifática em  $1610\text{ cm}^{-1}$  e  $3332\text{ cm}^{-1}$ .

As principais bandas observadas em DOX (Figura 13d) estão em  $1114\text{ cm}^{-1}$  relativa à ligação C-O de álcool terciário, em  $1072\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-O do álcool secundário e em  $1006\text{ cm}^{-1}$  do C-O de álcool primário. Ainda, são observadas as bandas em  $3330\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação O-H, em  $2977\text{-}2896\text{ cm}^{-1}$  atribuída à ligação C-H alifáticos, em  $1730\text{ cm}^{-1}$  correspondente à ligação C=O, em  $1618\text{-}1581\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação N-H de amida secundária, em  $1461\text{ cm}^{-1}$  relativa à deformação angular do  $\text{CH}_2$ , em  $1400\text{ cm}^{-1}$  e  $1234\text{ cm}^{-1}$  há as bandas atribuídas às ligações C-O e O-H de fenol, respectivamente e em  $761\text{-}721\text{ cm}^{-1}$  referente ao anel aromático.

No espectro da NCR (Figura 13e) observa-se uma banda em  $3421\text{ cm}^{-1}$  relativa a ligação O-H, em  $2977\text{-}2896\text{ cm}^{-1}$  atribuída à ligação C-H alifáticos, em  $1741\text{ cm}^{-1}$  correspondente à ligação C=O de grupos anidrido e carboxílico, em  $1649\text{ cm}^{-1}$  há o estiramento da ligação N-H de amina primária alifática proveniente da n-octadecilamina ou da ligação C=O presente no polímero e no óleo, em  $1463\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação angular do  $\text{CH}_2$ , em  $1382\text{-}1215\text{ cm}^{-1}$  há o estiramento da ligação C-O do ácidos carboxílicos e em  $1097\text{ cm}^{-1}$  aparece a banda típica do estiramento C-C-C atribuído a metil vinil éter proveniente do polímero ou da ligação C-O, que pode ser relativa da hidroxila presente nos resíduos de ácido ricinoleico e também do grupamento éster do óleo de rícino.

O espectro de FTIR da NCR-DOX (Figura 13f) apresenta uma banda larga em  $3411\text{ cm}^{-1}$  referente à hidroxila de ácido carboxílico, um grupamento presente em grande quantidade no PVM/MA. Esta banda ainda deve ter contribuição da ligação N-H de amida, a qual é formada entre o grupamento amino primário da n-octadecilamina ou da DOX durante o preparo da NCR-DOX. Também são características de grupamentos amida as duas bandas observadas no espectro da NCR-DOX em  $1649\text{ cm}^{-1}$  e  $1566\text{ cm}^{-1}$  relativas às ligações C=O e N-H de amida secundária, respectivamente. Em  $1741\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda referente à ligação C=O de grupos anidrido e carboxílico. Observam-se ainda as bandas características da DOX em  $1174\text{ cm}^{-1}$  relativa à ligação C-O de álcool terciário, em  $1095\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C-O do álcool secundário e em  $1020\text{ cm}^{-1}$  do C-O de álcool primário. Ainda, as bandas em  $1215\text{ cm}^{-1}$  e em  $1379\text{ cm}^{-1}$  observadas na NCR-DOX são relativas às ligações C-O e O-H de fenol, respectivamente, presentes na DOX. As bandas características do óleo de rícino podem ser facilmente identificadas no espectro da NCR-DOX, indicando a presença deste óleo nas nanocápsulas. Já as bandas da n-octadecilamina, por

serem facilmente sobrepostas pelas bandas do óleo, não puderam ser distinguidas no espectro de FTIR da NCR-DOX; porém, foram identificadas bandas de amida no espectro da NCR-DOX, as quais são indicativas de que a n-octadecilamina está ligada covalentemente ao PVM/MA que constitui o invólucro da NCR-DOX.

Desta maneira, conclui-se que, conforme o esperado, a DOX está presente na NCR-DOX, e que há a presença de ligações do tipo amida na NCR-DOX, as quais provavelmente são formadas durante a modificação do PVM/MA com a n-octadecilamina, ou mesmo durante a associação da DOX à NCR-DOX.

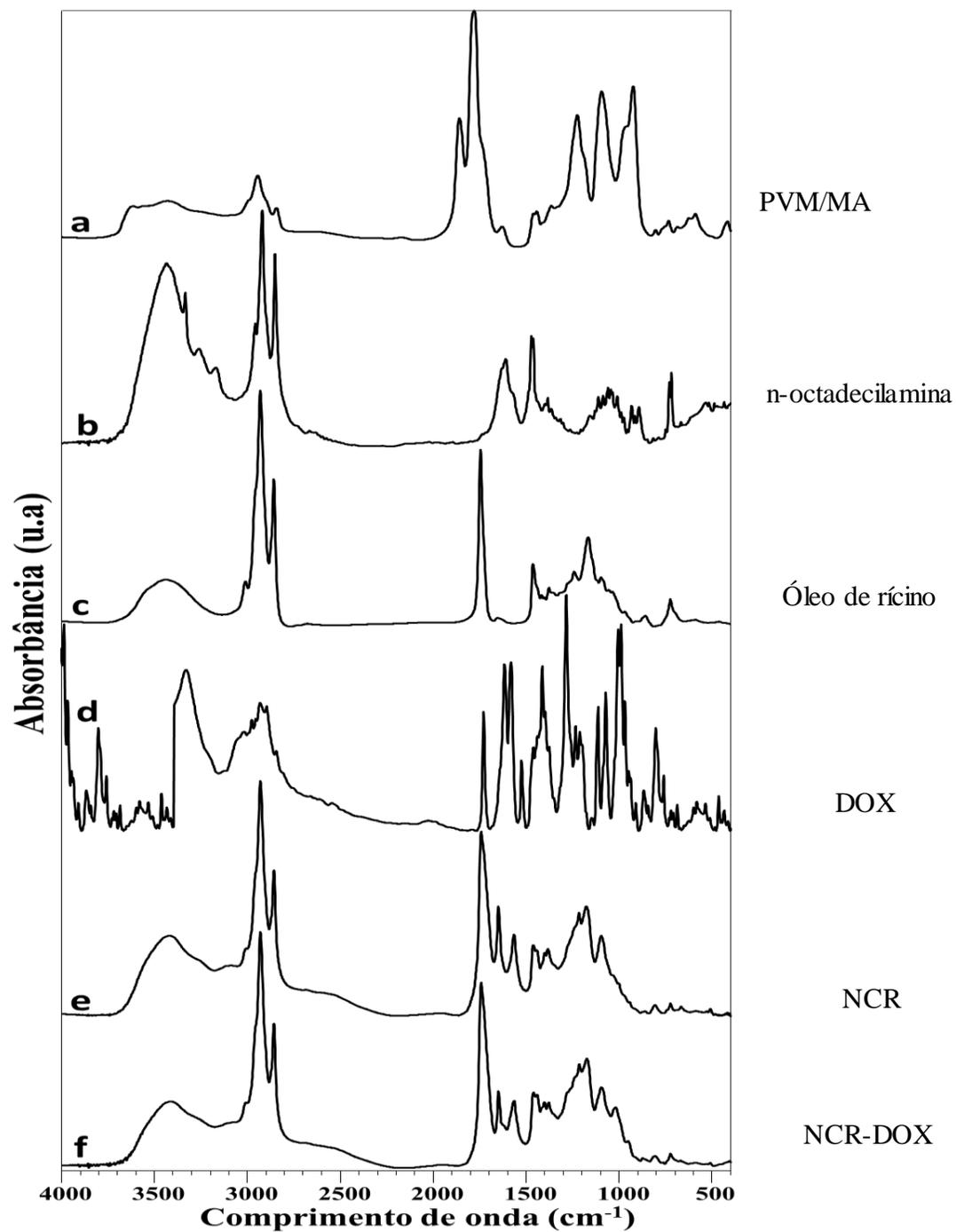


Figura 13. Espectroscopia de Transmitância na Região do Infravermelho (FTIR) para: (a) PVM/MA, (b) n-octadecilamina, (c) Óleo de Rícino, (d) DOX (e) NCR (f) NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX).

## 5.2 Estudos *in vitro*

### 5.2.1 Viabilidade celular é menor em células tumorais após tratamento com NCR-DOX

Na linhagem 4T1 (Figura 14), com 24 horas de exposição aos tratamentos observou-se que a NCR-DOX causou significativa redução na viabilidade celular a partir da concentração de 0,1  $\mu\text{g}$  DOX/mL ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, sendo que para a concentração de 1  $\mu\text{g}$  DOX/mL, a NCR-DOX causou maior redução na viabilidade celular ( $37,35 \pm 1,50$  %) quando comparados com DOX e NCR ( $45,63 \pm 1,22$  e  $87,48 \pm 1,54$  % respectivamente). Observou-se que as concentrações de 0,03 e 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (equivalentes à DOX) de NCR não causaram diferença significativa em relação ao controle. Também não houve diferença significativa entre NCR-DOX e DOX na menor concentração testada. Após 48 horas de tratamento a concentração de 9  $\mu\text{g}$  DOX/mL da NCR-DOX observou-se  $2,83 \pm 1,21$  % de células viáveis, enquanto células tratadas com DOX apresentaram  $17,03 \pm 2,9$  % de viabilidade celular; e o tratamento com NCR demonstrou  $80,19 \pm 2,6$  % de viabilidade celular. Ressalta-se que as células 4T1 tratadas com NCR apresentaram viabilidade acima de 80% em todos os tempos e concentrações testadas, indicando que o sistema nanoestruturado sem DOX apresenta baixa toxicidade contra células 4T1.

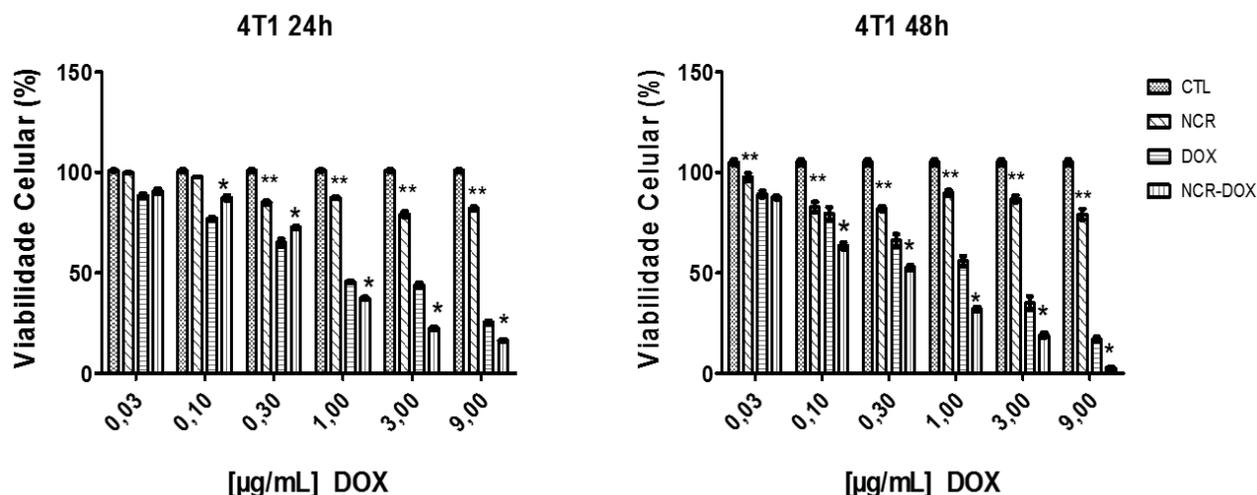


Figura 14. Viabilidade de células 4T1 após exposição à NCR-DOX, NCR, DOX e meio de cultivo (controle) por 24 e 48 horas. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \* representa valor estatisticamente significativo entre NCR-DOX e DOX ( $p < 0,05$ ). \*\* representa valor estatisticamente significativo entre NCR e controle ( $p < 0,05$ ). Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey.

Em fibroblastos murinos não tumorais (NIH-3T3) tratados por 24 horas, observou-se uma significativa redução de viabilidade a partir da concentração de 1 µg/mL para os tratamentos com DOX e NCR-DOX, (Figura 15) A partir dessa concentração (1 µg/mL), DOX demonstra ser mais citotóxica em relação a NCR-DOX. Pelo ensaio de MTT foi possível observar que DOX nas concentrações de 9, 3 e 0,1 µg/mL causaram maior redução na viabilidade celular em relação à NCR-DOX. A maior diferença estatística encontrada entre os grupos NCR-DOX e DOX foi na maior concentração testada (9 µg/mL de DOX), onde têm-se respectivamente  $43,6 \pm 0,57\%$  e  $19,51 \pm 2,75\%$  de viabilidade celular. A viabilidade de fibroblastos tratados com NCR manteve-se acima de 80% em todas as concentrações. Com 48 horas de exposição aos tratamentos, as células NIH-3T3 tiveram sua viabilidade celular reduzida de forma significativa com o tratamento feito por DOX na concentração de 3 µg/mL. Essa concentração de DOX reduziu a viabilidade para  $8,63 \pm 0,87\%$  ( $p < 0,05$ ), enquanto a NCR-DOX reduziu para  $31,31 \pm 0,48\%$  ( $p < 0,05$ ). O tratamento com NCR manteve o percentual de viabilidade dos fibroblastos maior que o de células tratadas com DOX e NCR-DOX em todas as concentrações testadas em relação ao controle. A linhagem NIH-3T3 demonstrou ser menos sensível à NCR-DOX do que as células tumorais 4T1.

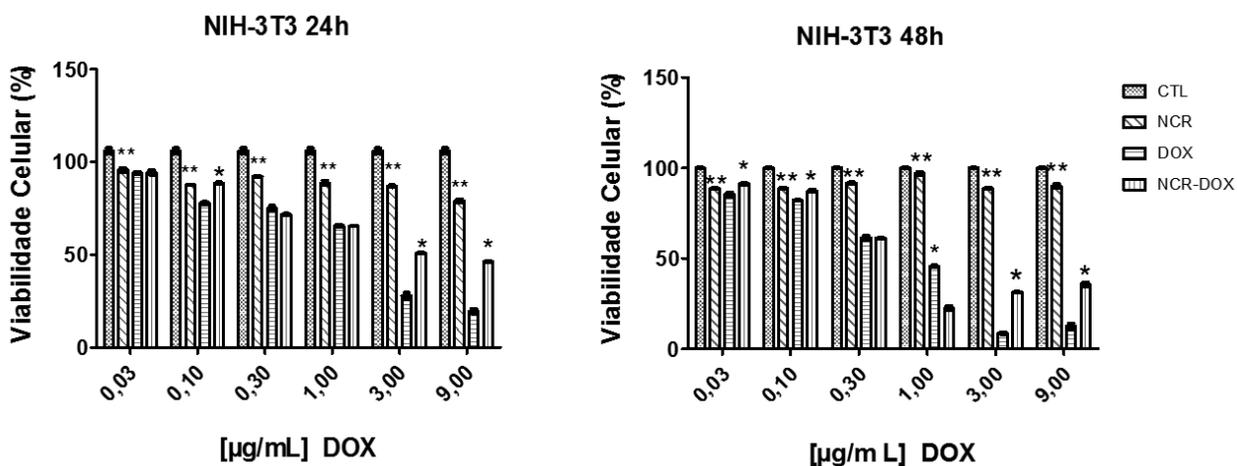


Figura 15. Viabilidade de células NIH-3T3 após exposição à NCR-DOX (nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino contendo DOX), NCR(nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino), doxorubicina e meio de cultivo (controle) por 24 e 48 horas. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.\* representa valor estatisticamente significativo entre NCR-DOX e DOX ( $p < 0,05$ ). \*\* representa valor estatisticamente significativo entre NCR e controle ( $p < 0,05$ ). Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey.

Nas células da linhagem MCF-7 (Figura 16), incubadas por 24 horas, apenas o grupo tratado com NCR não apresentou diferença estatística em relação ao controle na concentração de 0,03 µg/mL. O tratamento com NCR-DOX na maior concentração testada foi o que causou maior citotoxicidade, resultando em 21,49 ± 0,08% de viabilidade celular enquanto DOX apresentou 34,22 ± 0,08% ( $p < 0,05$ ). O teste de MTT demonstrou que a nanopartícula em questão causou maior redução na viabilidade quando comparada com DOX, sendo essa redução estatisticamente significativa em todas as concentrações. Após 48 horas de exposição aos tratamentos DOX e NCR-DOX foi possível observar uma redução mais intensa na viabilidade de células MCF-7 tratadas com concentrações a partir de 0,3 µg/mL, onde a NCR-DOX causou maior toxicidade celular do que DOX (50,49 ± 0,29% e 65,34 ± 1,78%). O tratamento com NCR resultou em viabilidade celular acima de 83,13 ± 0,75%.

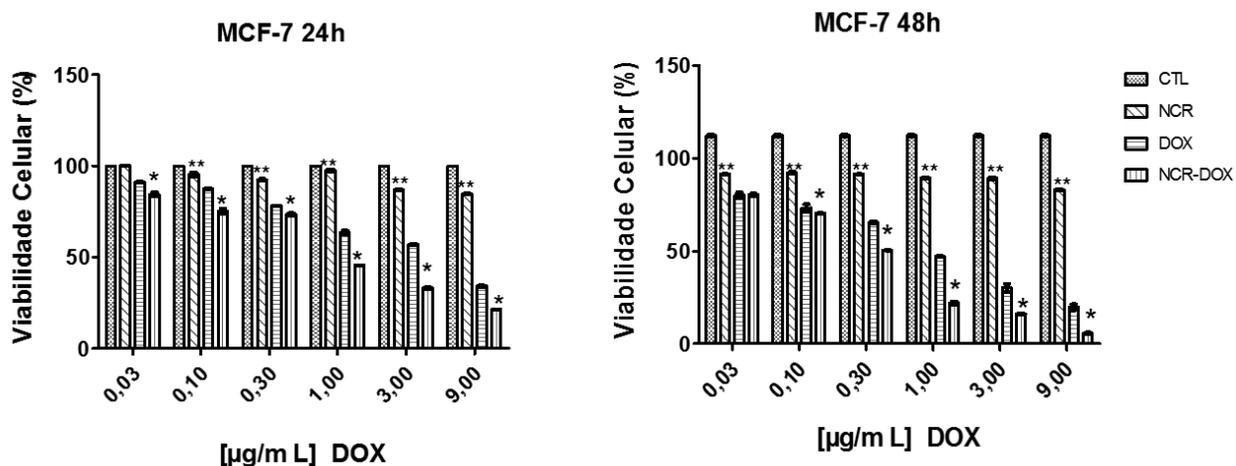


Figura 16. Viabilidade de células MCF-7 após exposição à NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX), NCR (nanocápsula com invólucro polimérico e núcleo de óleo de rícino), DOX (doxorubicina) e meio de cultivo (controle) por 24 e 48 horas. Dados expressos como média ± erro padrão da média, \* representa valor estatisticamente significativo entre NCR-DOX e DOX ( $p < 0,05$ ). \*\* representa valor estatisticamente significativo entre NCR e controle ( $p < 0,05$ ). Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey.

Na linhagem de células de epitélio mamário humano não tumoral, MCF-10A, o tratamento com DOX provocou redução da viabilidade celular, que se acentuou nas maiores concentrações e tempos de tratamento (Figura 17). Contrariamente, o tratamento dessas células com o a nanocápsula NCR-DOX foi menos tóxica. Os tratamentos com DOX e NCR-DOX por 24 horas resultaram em viabilidade celular de 34,22 ± 0,7 e 46,33 ± 0,5 % na maior concentração testada. Com 48 horas de

tratamento foi observado que a viabilidade decresceu gradativamente com o aumento das concentrações de DOX livre e da NCR-DOX. Na concentração de 9 µg DOX/mL, a NCR-DOX provocou redução da viabilidade celular para  $21,25 \pm 2,8\%$  e a DOX reduziu a viabilidade celular para  $7,11 \pm 1,1\%$ .

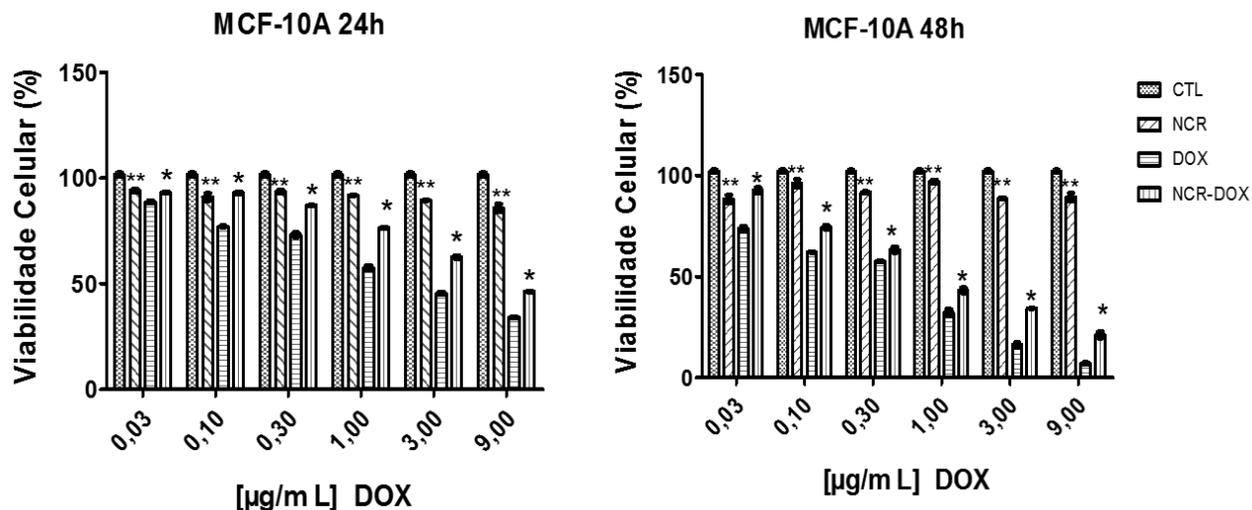


Figura 17. Viabilidade de células MCF-10A após exposição à NCR-DOX (nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino e DOX), NCR (nanocápsula com invólucro polimérico e núcleo de óleo de rícino), DOX e meio de cultivo (controle) por 24 e 48 horas. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* representa valor estatisticamente significativo entre NCR-DOX e DOX ( $p < 0,05$ ). \*\* representa valor estatisticamente significativo entre NCR e controle ( $p < 0,05$ ). Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey.

O ensaio do MTT demonstrou que as NCR não afetaram significativamente as viabilidades das células estudadas. Os valores de CC50 de DOX e NCR-DOX de todas as linhagens testadas estão representadas na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração citotóxica de 50% (CC50) dos diferentes tratamentos em células 4T1, NIH-3T3, MCF-7 e MCF-10A conforme observado pelo ensaio de MTT. Os valores foram expressos em µg/mL e os dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Linhagem celular	NCR-DOX(24h)	NCR-DOX(48h)	DOX (24h)	DOX (48h)
4T1	0,73	0,31	1,12	1,05
NIH-3T3	4,40	0,68	1,31	0,54
MCF-7	0,92	0,26	3,44	0,72
MCF-10 <sup>a</sup>	7,20	0,80	2,09	0,20

### 5.2.2 NCR-DOX reduz a adesão de células tumorais *in vitro*

Tendo em vista os resultados apresentados pelo teste de MTT, as células 4T1, NIH-3T3, MCF-7 e MCF-10A foram monitoradas pelo ensaio de impedância celular afim de verificar o índice celular (IC) em tempo real, que reflete a quantidade de células aderidas ao fundo da microplaca de cultivo *in vitro*. A adesão das células diminui geralmente em decorrência de sua morte.

Em células 4T1 (Figura18) foi observada uma redução na adesão poucas horas após o tratamento com DOX e NCR-DOX. Cerca de 6 horas após os tratamentos observa-se uma redução expressiva na adesão das células com diminuição gradativa ao longo do tempo. É observada redução da adesão de células 4T1 após o tratamento com a NCR-DOX e DOX em relação às células controle.

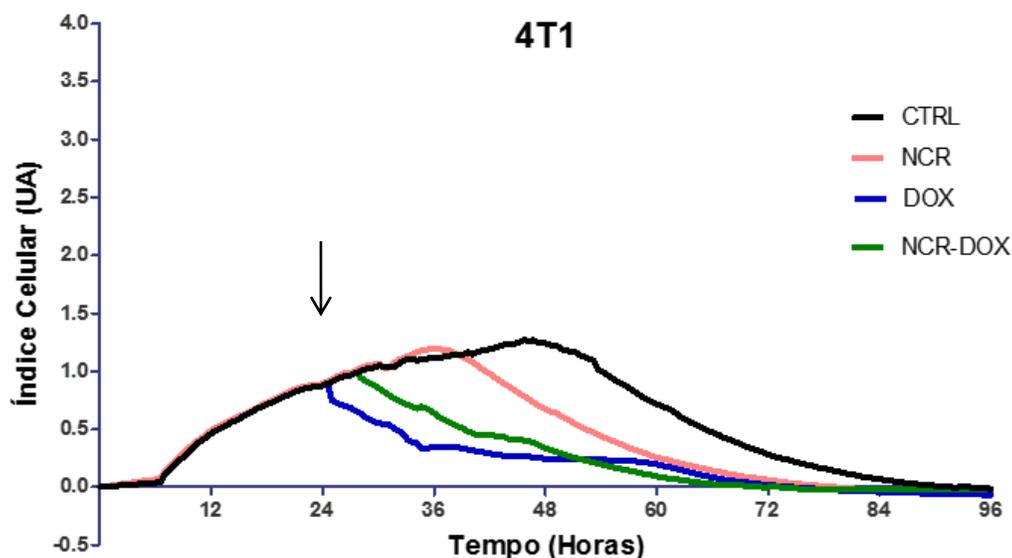


Figura 18. Índices de adesão celular em tempo real das células 4T1. Grupos: controle (meio de cultivo), tratadas com NCR (nanocápsula com invólucro polimérico e núcleo de óleo de rícino), NCR-(nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e DOX (doxorubicina) nas concentrações equivalentes a 1 $\mu$ g DOX/mL durante 96 horas de monitoramento. Seta indica o tempo em que foi adicionado o tratamento. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Nas células NIH-3T3(Figura 19) observa-se que os tratamentos com NCR-DOX e DOX provocam um declínio na adesão celular. NIH-3T3 tratada com DOX e NCR-DOX sofreram decréscimo na adesão após 12 e 24h de tratamento respectivamente.

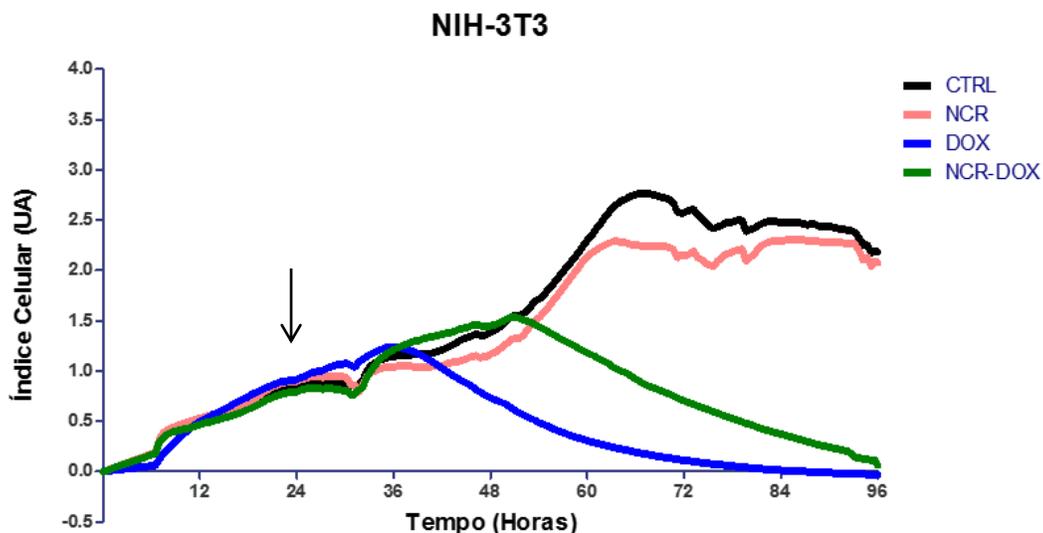


Figura 19. Índices de adesão celular em tempo real das células NIH-3T3. Grupos: controle (meio de cultivo) e tratadas com NCR (nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino) NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e DOX (doxorubicina) nas concentrações equivalentes a  $1\mu\text{g DOX/mL}$  durante 96 horas de monitoramento. Seta indica tempo em que foi adicionado o tratamento. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Nas células MCF-7, verifica-se uma redução na adesão das células após 12 horas de tratamento com NCR-DOX, a qual se mostra mais expressiva ao longo do tempo (Figura 20). O efeito do tratamento com DOX foi semelhante ao observado com NCR-DOX até às 36 horas de monitoramento, a partir desse ponto a NCR-DOX provoca índices de adesão gradativamente menores.

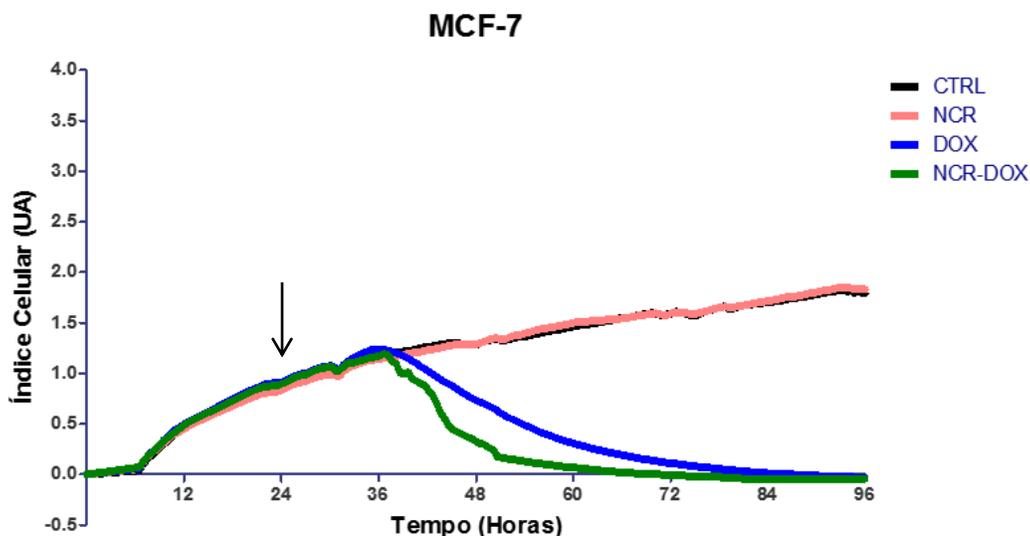


Figura 20. Índices de adesão celular em tempo real das células MCF-7. Grupos: controle (meio de cultivo) e tratadas com NCR (nanocápsula com invólucro polimérico e núcleo de óleo de rícino) e NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e DOX (doxorubicina) nas concentrações equivalentes a 1µg DOX/mL durante 96 horas de monitoramento. Seta indica tempo em que foi adicionado o tratamento. Dados expressos como média ± erro padrão da média.

Em células MCF-10<sup>a</sup>, os tratamentos com NCR-DOX e DOX reduziram a adesão celular, sendo que a DOX causou menor adesão celular em relação à nanocápsulas (Figura 21).

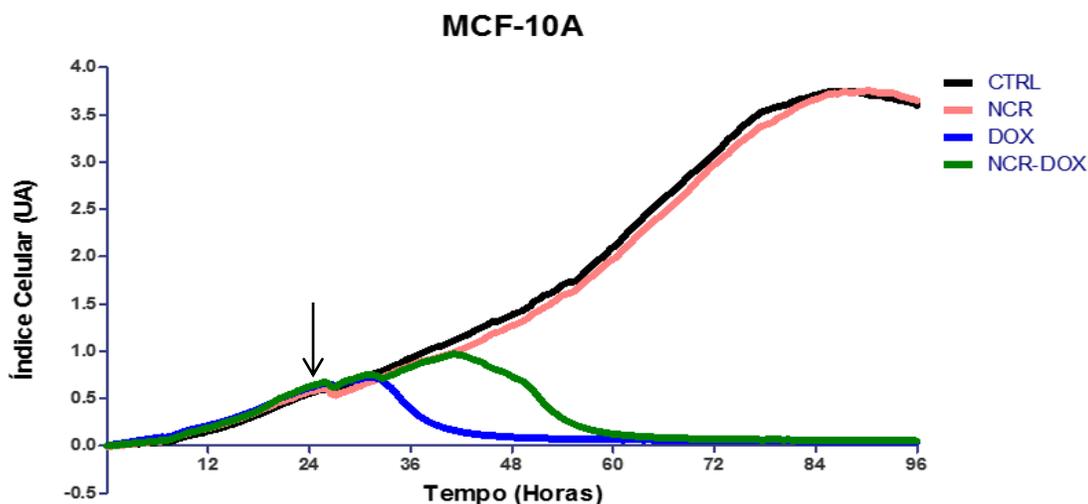


Figura 21. Índices de adesão celular em tempo real das células MCF-10A. Grupos: controle (meio de cultivo) e tratadas com NCR (nanocápsula com invólucro polimérico e núcleo de óleo de rícino) NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e DOX (doxorubicina) nas concentrações equivalentes a 1µg DOX/mL durante 96 horas de

monitoramento. Seta indica tempo em que foi adicionado o tratamento. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Não foi possível identificar total perda de adesão nos grupos controle (meio de cultivo) e NCR, nas células MCF-7, MCF-10A e NIH-3T3 em 96 horas de análise. Foi observado que a adesão em células tumorais foi maior do que nas células não tumorais.

### **5.2.3 Padrão morfológico e confluência celular são alteradas por NCR-DOX e DOX**

Observou-se por microscopia de luz que a confluência e a morfologia das células tratadas com NCR-DOX e DOX sofreram alterações quando comparadas com seus controles.

Em células 4T1 (Figura 22) é possível observar que o tratamento com NCR-DOX provocou retrações citoplasmáticas com mudança da morfologia e diminuição significativa da confluência celular quando comparada com o tratamento controle. Nota-se que as células NIH-3T3 tratadas com NCR-DOX apresentaram pequena redução na confluência com diminuição do número de prolongamentos citoplasmáticos.

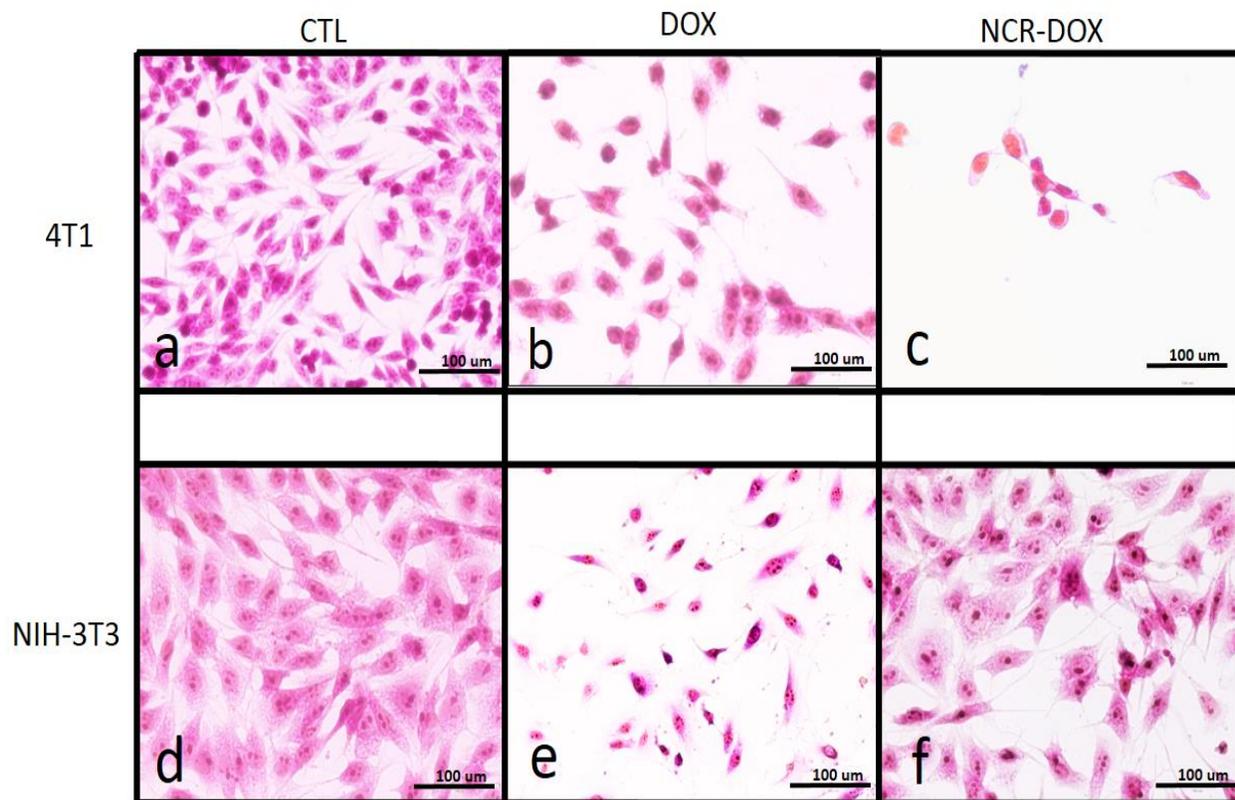


Figura 22. Fotomicrografias de células 4T1 e NIH-3T3 coradas com Giemsa. Controle (meio de cultivo) (A e D), doxorubicina 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B e E), NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (C e F).

O tratamento com NCR-DOX também influenciou na confluência de células da linhagem MCF-7. Foi observado que houve alterações morfológicas com reduções citoplasmáticas nessas células quando comparadas com o controle. MCF-10A parece manter sua estrutura mais íntegra com poucas mudanças morfológicas, porém nota-se a redução na concentração de células. Células tumorais sofreram mais efeitos com o NCR-DOX do que DOX, isso corrobora com os resultados de MTT e adesão celular. As alterações induzidas pelos tratamentos NCR-DOX e DOX podem ser visualizadas na Figura 23.

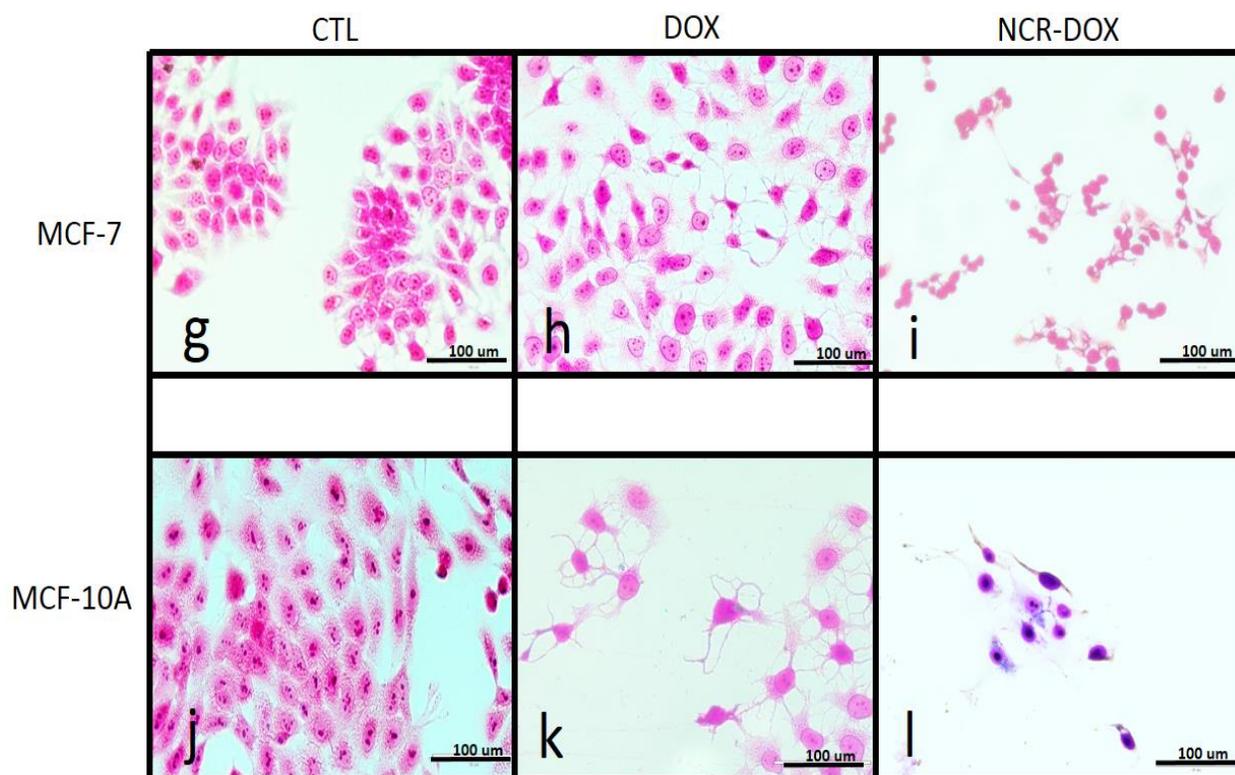


Figura 23. Fotomicrografias de células MCF-7 e MCF-10A coradas com Giemsa. Controle (meio de cultivo) (G e J), doxorubicina 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (H e K), NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (I e L).

#### 5.2.4 Localização intracelular de NCR-DOX

Tanto em células 4T1 quanto em células MCF-7 tratadas com NCR-DOX, a DOX está distribuída difusamente por toda a célula (Figuras 24 e 25). Já nas células tratadas apenas com DOX, observa-se uma maior concentração de DOX no núcleo.

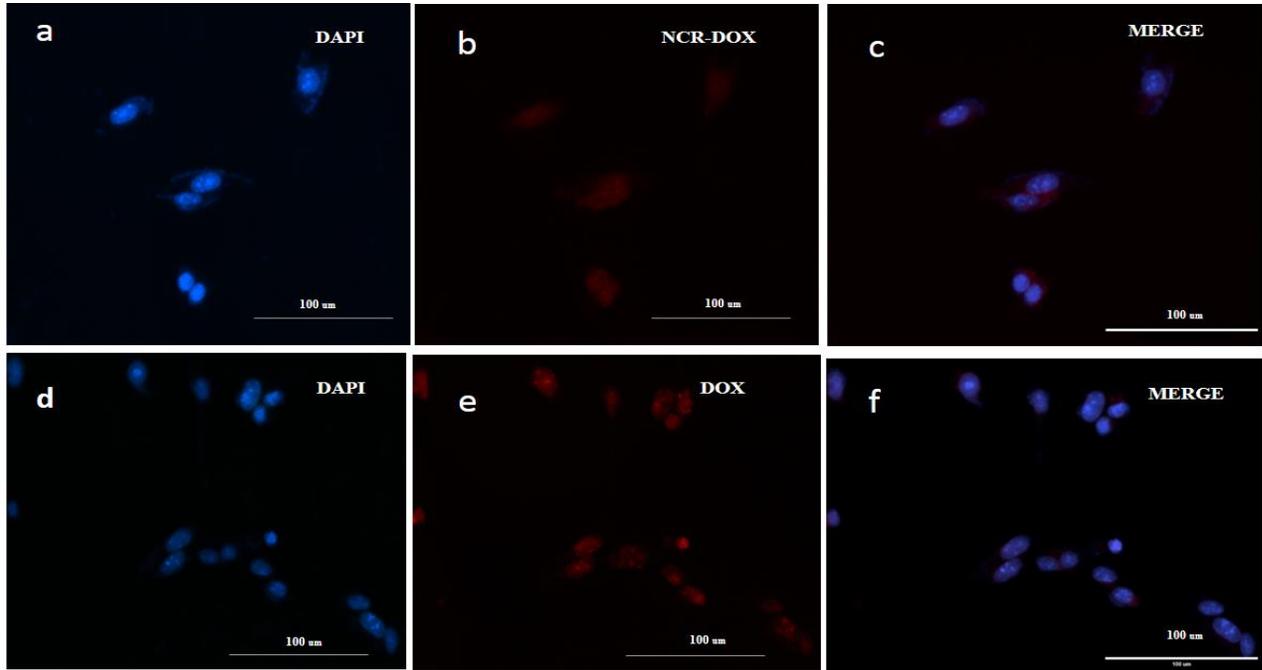


Figura 24. Visualização por microscopia de fluorescência da incorporação intracelular pelas células 4T1 expostas por 3 horas a NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) em concentração de 9  $\mu\text{g}$  DOX/mL. As imagens de fluorescência específica do marcador de núcleo DAPI e da DOX, tanto nos tratamentos com DOX ou NCR-DOX, são exibidas acima e devidamente identificadas em cada quadro. As imagens de sobreposição da fluorescência do DAPI e da DOX são mostradas em c (células tratadas com NCR-DOX) e em f (DOX).

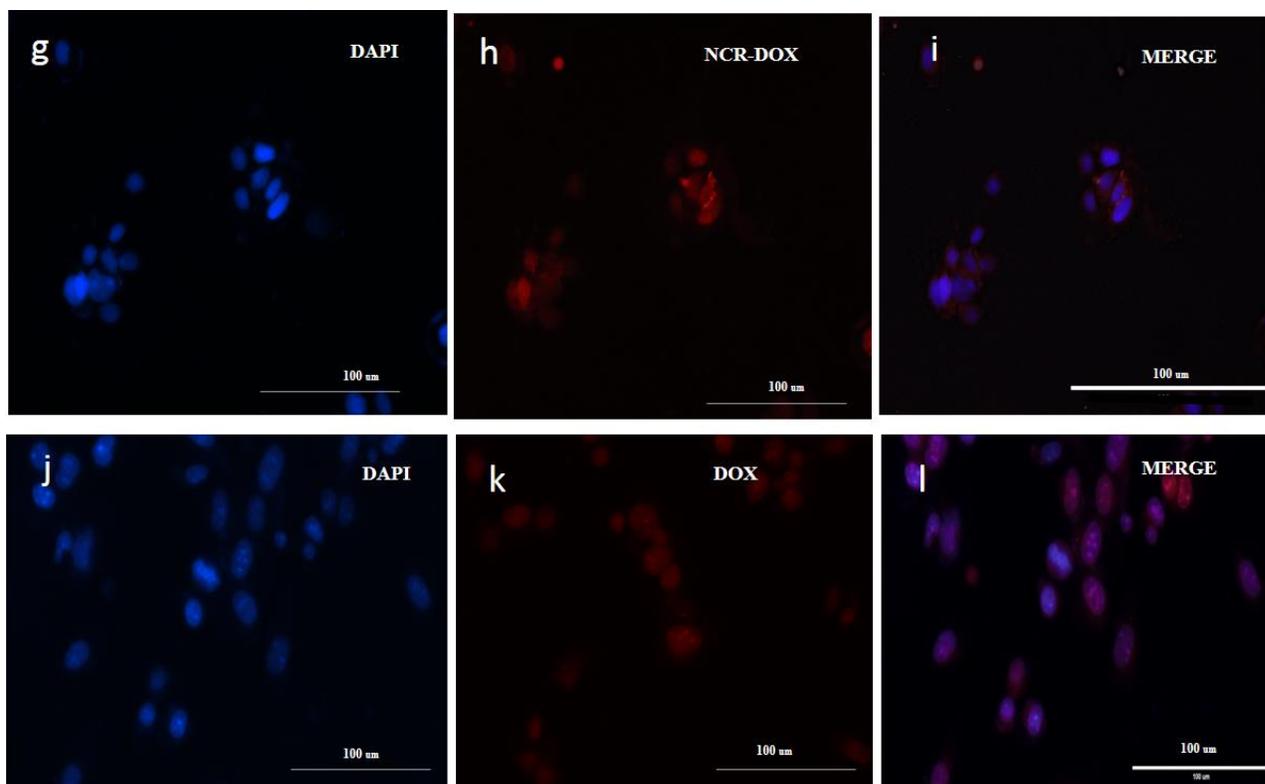


Figura 25. Visualização por microscopia de fluorescência da incorporação intracelular pelas células MCF-7 expostas por 3 horas a NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e doxorubicina livre (DOX) em concentração de 9  $\mu\text{g}$  DOX/mL. As imagens de fluorescência específica do marcador de núcleo DAPI e da DOX, tanto nos tratamentos com DOX ou NCR-DOX, são exibidas acima e devidamente identificadas em cada quadro. As imagens de sobreposição da fluorescência do DAPI e da DOX são mostradas em i (células tratadas com NCR-DOX) e em l (DOX).

### 5.2.5 A NCR-DOX é interiorizada mais intensamente que a DOX por células 4T1 e MCF-7

A interiorização de NCR-DOX e DOX por células 4T1 e MCF-7 foi analisada após incubação por 0,25; 0,5; 1 e 3 horas (Figura 26). Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na interiorização de NCR-DOX e DOX em células 4T1 e MCF-7 em todos os tempos, onde a nanocápsula foi mais intensamente interiorizada que a DOX por ambas as células.

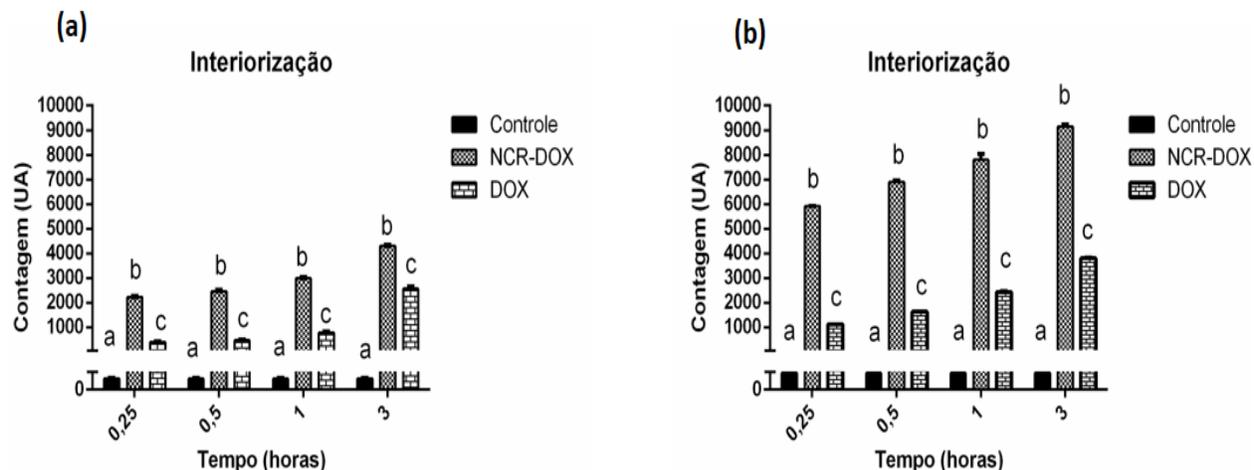


Figura 26. Interiorização de NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e DOX (doxorubicina) por células 4T1(a) e MCF-7 (b) em diferentes tempos de exposição. O meio de cultivo (controle) foi usado como controle negativo (sem DOX). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes entre os grupos em um mesmo tempo indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey.

### 5.2.6 NCR-DOX é interiorizada ao menos parcialmente por vias ativas

Diferentes inibidores de vias endocíticas foram utilizados para análise dos mecanismos de endocitose de NCR-DOX nas células 4T1 e MCF-7 (Figuras 27 e 28). Para os dois diferentes tipos de tratamentos – NCR-DOX e DOX – foram usados os respectivos controles sem inibidores. Em células 4T1 verificou-se que a interiorização de NCR-DOX foi inibida por amilorida e citocalasina D, inibidoras específicas de macropinocitose, e também foi inibida por filipina e nistatina, inibidoras de vias mediadas por cavéolas. Este resultado não foi observado para a DOX. A azida sódica, que inibe a produção de ATP e, portanto, vias ativas de endocitose, inibiu a interiorização de ambas, NCR-DOX e DOX. A interiorização de NCR-DOX e DOX foi também inibida por óxido fenilarsina, um inibidor específico de vias mediadas por clatrina.

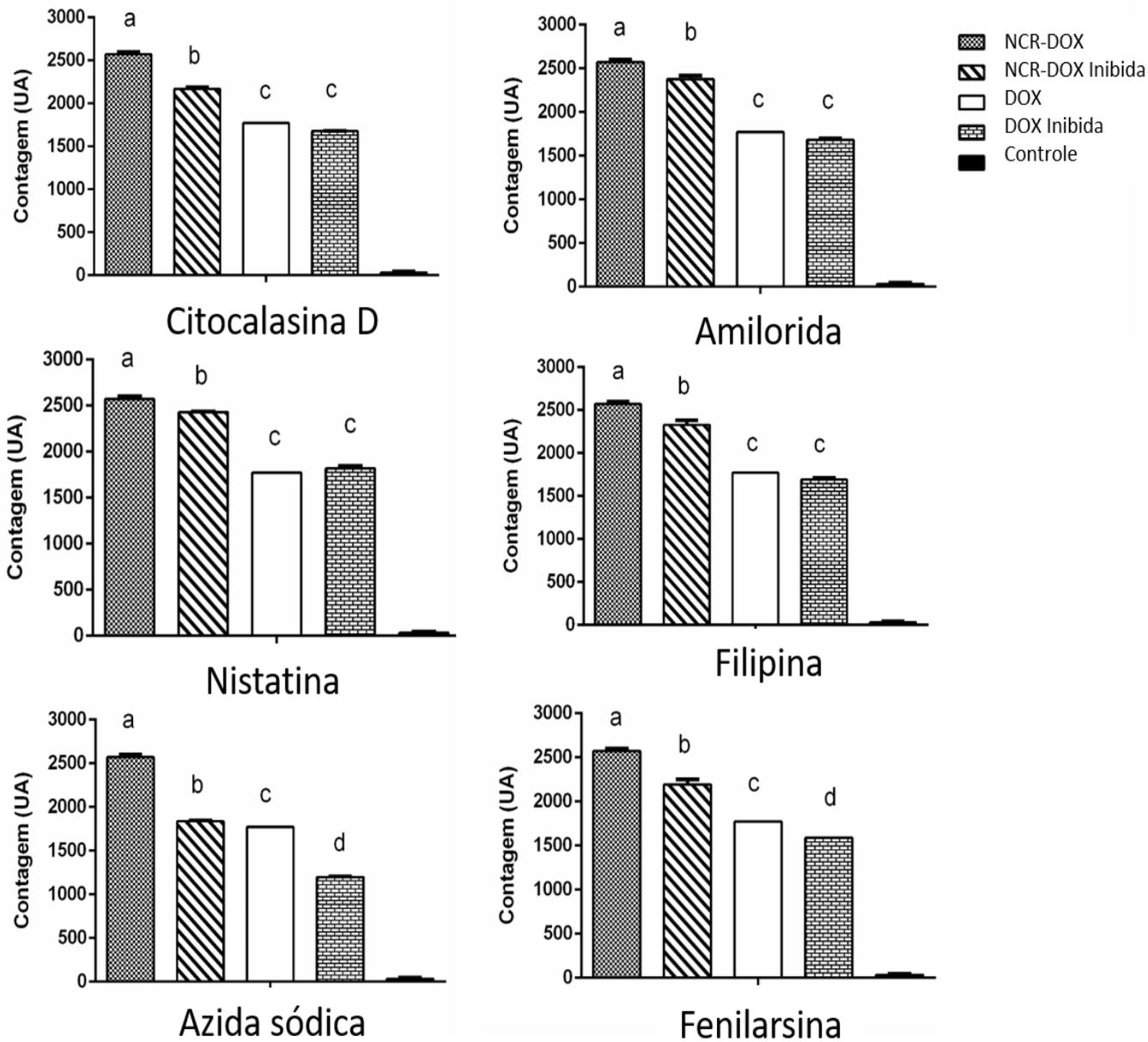


Figura 27. Efeito da inibição de vias de endocitose em células 4T1 sobre a interiorização de NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e DOX (doxorubicina) por 3 horas. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Sendo  $a = p < 0,05$  na comparação entre os controles de cada um dos tratamentos. Análise estatística: ANOVA em uma via e teste de múltiplas comparações de Tukey.

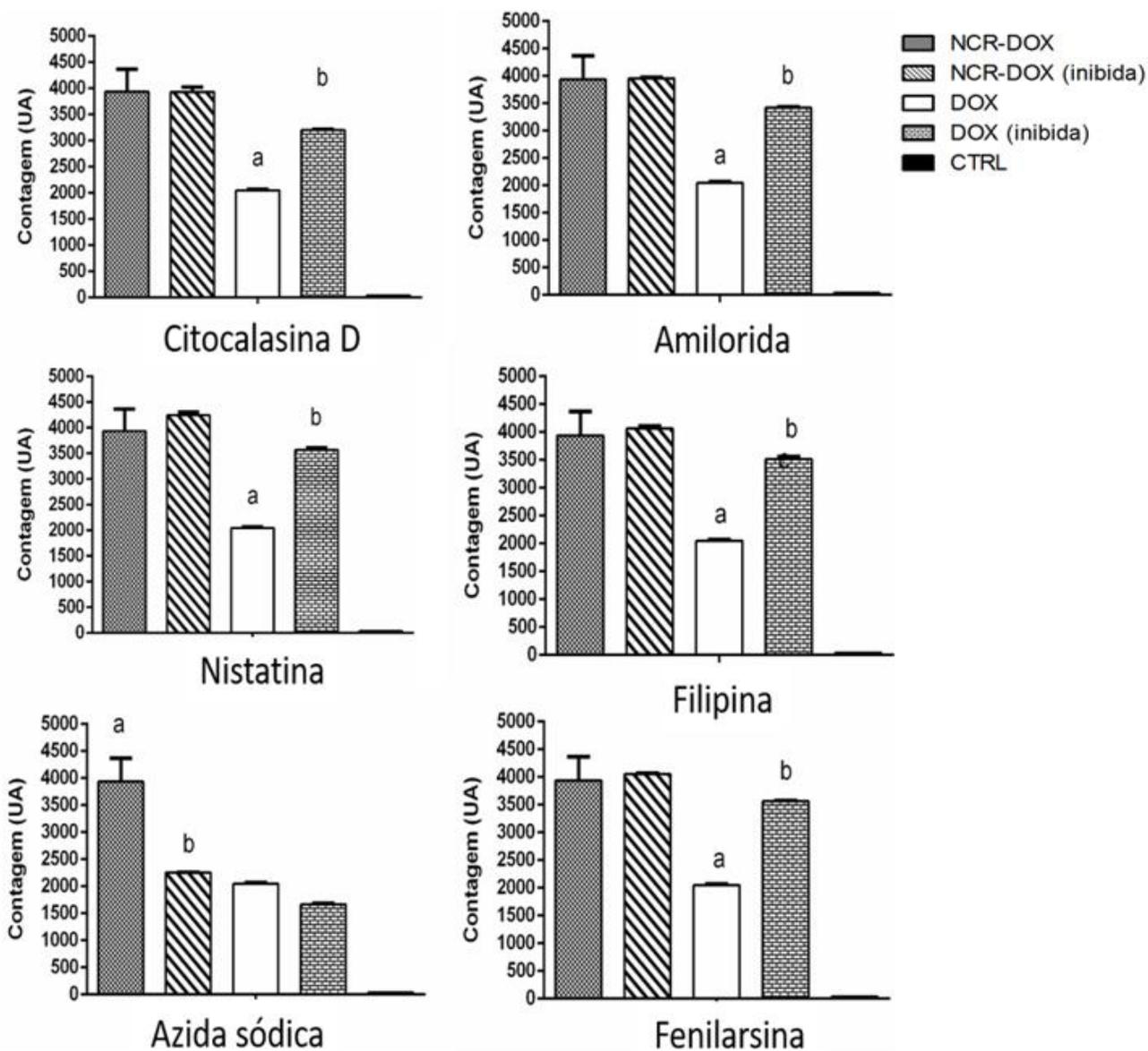


Figura 28. Efeito da inibição de vias de endocitose em células MCF-7 sobre a interiorização de NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e DOX (doxorubicina) por 3 horas. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. a =  $p < 0,05$  na comparação entre os controles de cada um dos tratamentos. Análise estatística: ANOVA em uma via e teste de múltiplas comparações de Tukey.

### 5.2.7 NCR-DOX causa menos fragmentação de DNA do que DOX

Em 24 horas, as diferenças nos valores de fragmentação de DNA entre os grupos não foram estatisticamente significativas nas células MCF-7 (Figura 29). Nas células 4T1, a fragmentação de DNA provocada pela DOX foi maior, em todos os tempos de tratamento, do que a provocada pela NCR-DOX ( $p < 0,05$ ).

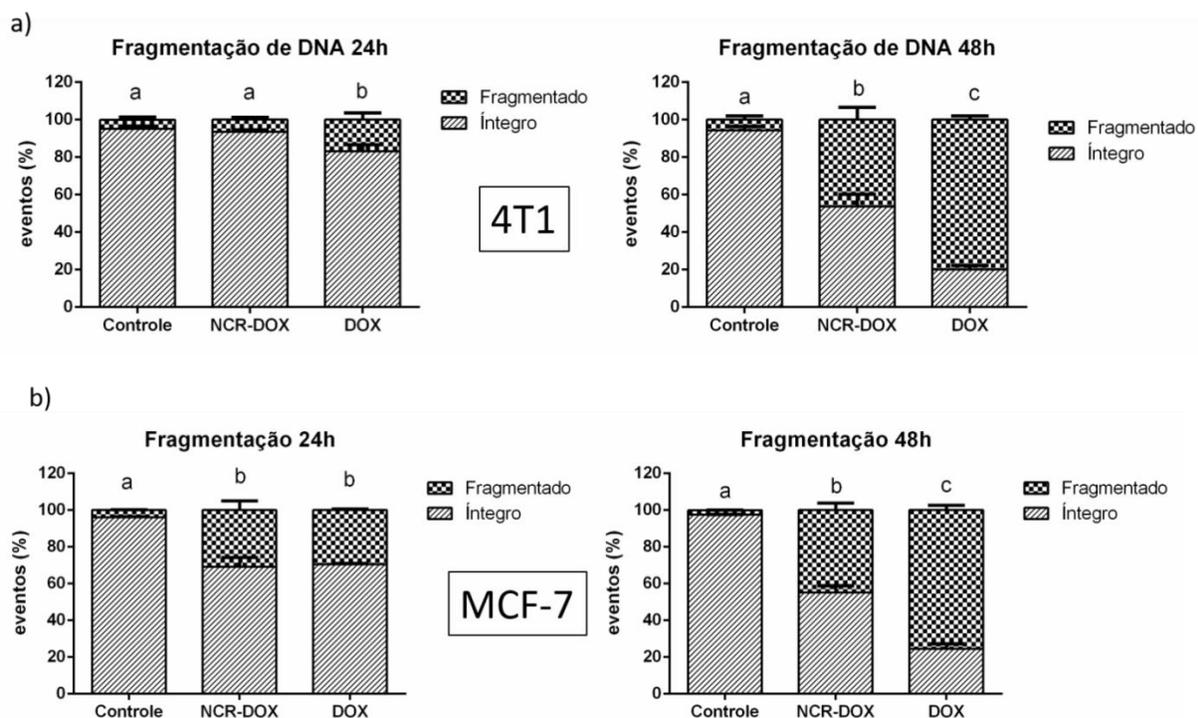


Figura 29. Fragmentação de DNA, em (a) células 4T1 após exposição à DOX (doxorubicina), NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e controle (meio de cultivo), por 24 ou 48 horas. Fragmentação de DNA em (b) células MCF-7 após exposição à DOX (doxorubicina), NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e controle (meio de cultivo), por 24 ou 48 horas. “Fragmentado” representa fração de DNA fragmentado em cada tratamento. “Íntegro” representa a fração de DNA íntegro após cada tratamento. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo gráfico indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey.

### 5.2.8 NCR-DOX e DOX causaram necrose e apoptose tardia em células 4T1 e MCF-7

Populações de células expostas a DOX ou NCR-DOX foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à porcentagem de eventos de necrose ou apoptose em 6, 24 e 48 horas de tratamento. A externalização de fosfatidilserina e a perda de integridade de membrana foram usadas como indicadores de apoptose e necrose, respectivamente. Marcação positiva com anexina-V representa a externalização de fosfatidilserina enquanto que marcação com 7-AAD indica perda de integridade de membrana.

No tempo de seis horas de tratamento da célula 4T1 com NCR-DOX ou DOX, foi observado que enquanto a NCR-DOX levou principalmente a um aumento da ocorrência de apoptose tardia/necrose inicial, DOX levou principalmente ao aumento da ocorrência apoptose em relação às células não tratadas (controle) (Figura 30).

#### 4T1 – 6 h

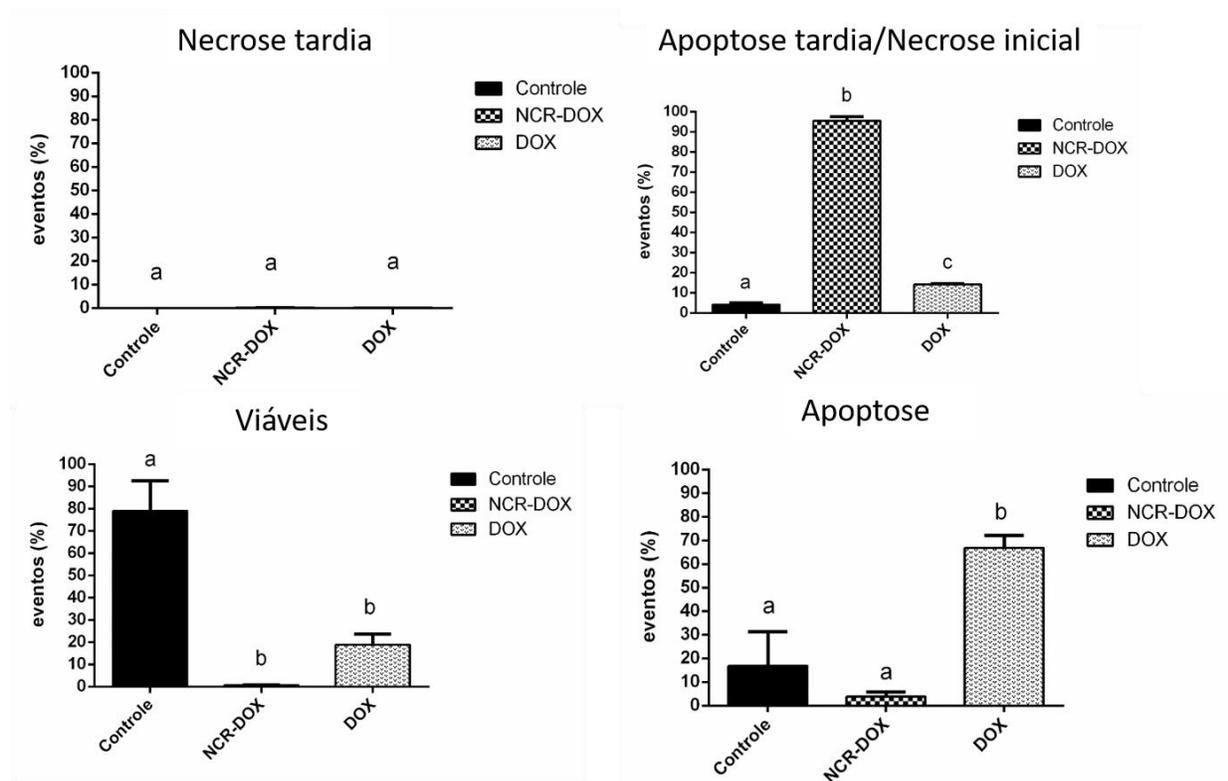


Figura 30. Influência dos tratamentos com DOX (doxorubicina), NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e meio de cultivo (controle) por 6 horas, em células 4T1, sobre a integridade de membrana plasmática (necrose tardia, quadrante Q1 – 7AAD+), indução de apoptose tardia (quadrante Q2 – anexina V+/7AAD+), exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática (apoptose, quadrante Q3 – anexina V+); e

células que não sofreram estes eventos (células viáveis, quadrante Q4 – duplo negativo). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo gráfico indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Análise estatística: ANOVA em uma via e teste de múltiplas comparações de Tukey.

No tempo de 24 horas de tratamento da célula 4T1 com NCR-DOX ou DOX, foi observado que NCR-DOX levou principalmente a um aumento de apoptose tardia/necrose inicial nas células em relação ao controle, enquanto que a DOX levou a um aumento tanto de necrose tardia, quanto de apoptose inicial/necrose inicial em relação às células não tratadas (controle) (Figura 31).

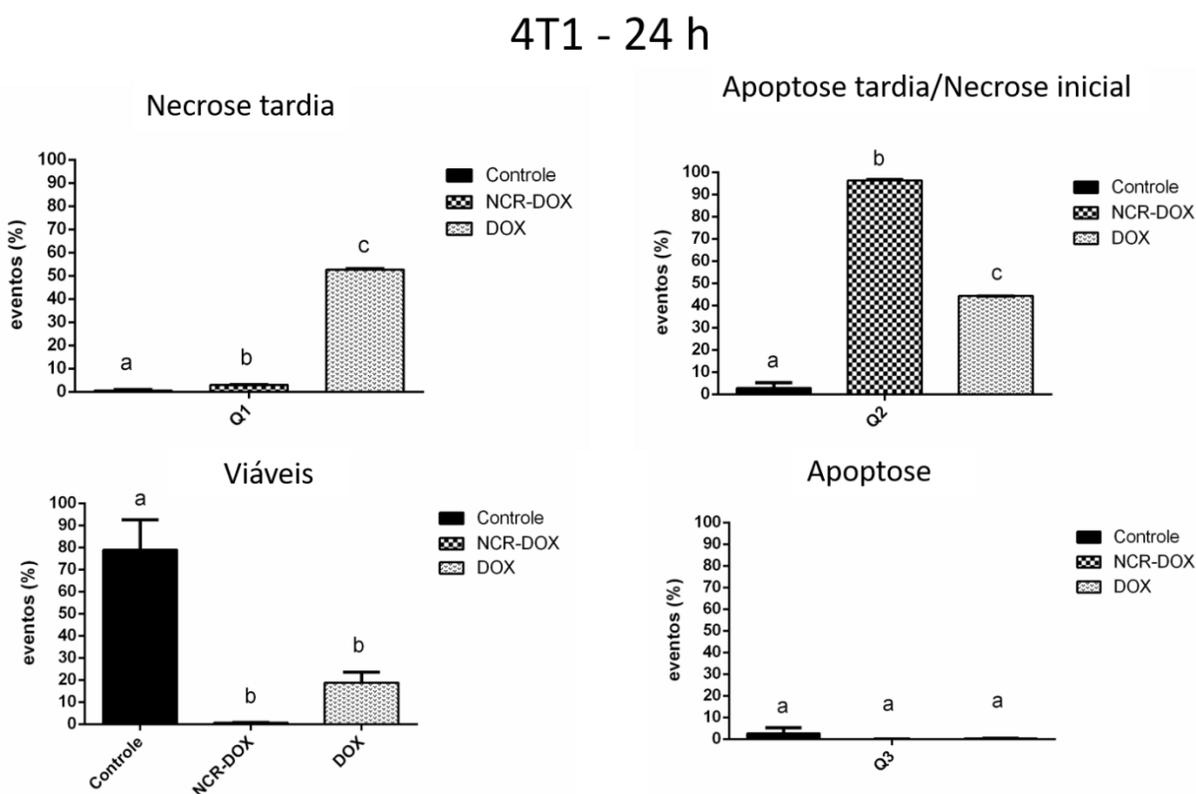


Figura 31. Influência dos tratamentos com DOX (doxorubicina), NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de ricino e DOX) e meio de cultivo (controle) por 24 horas, em células 4T1, sobre a integridade de membrana plasmática (necrose tardia, quadrante Q1 – 7AAD+), indução de apoptose tardia (quadrante Q2 – anexina V+/7AAD+), exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática (apoptose, quadrante Q3 – anexina V+); e células que não sofreram estes eventos (células viáveis, quadrante Q4 – duplo negativo). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo gráfico indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Análise estatística: ANOVA em uma via e teste de múltiplas comparações de Tukey.

Já no tempo de 48 horas de tratamento das células 4T1 com NCR-DOX e DOX, foi observada semelhança entre os resultados obtidos com NCR-DOX e DOX, com predominância de apoptose tardia/necrose inicial após ambos os tratamentos em relação às células controle (Figura 32).

### 4T1 - 48 h

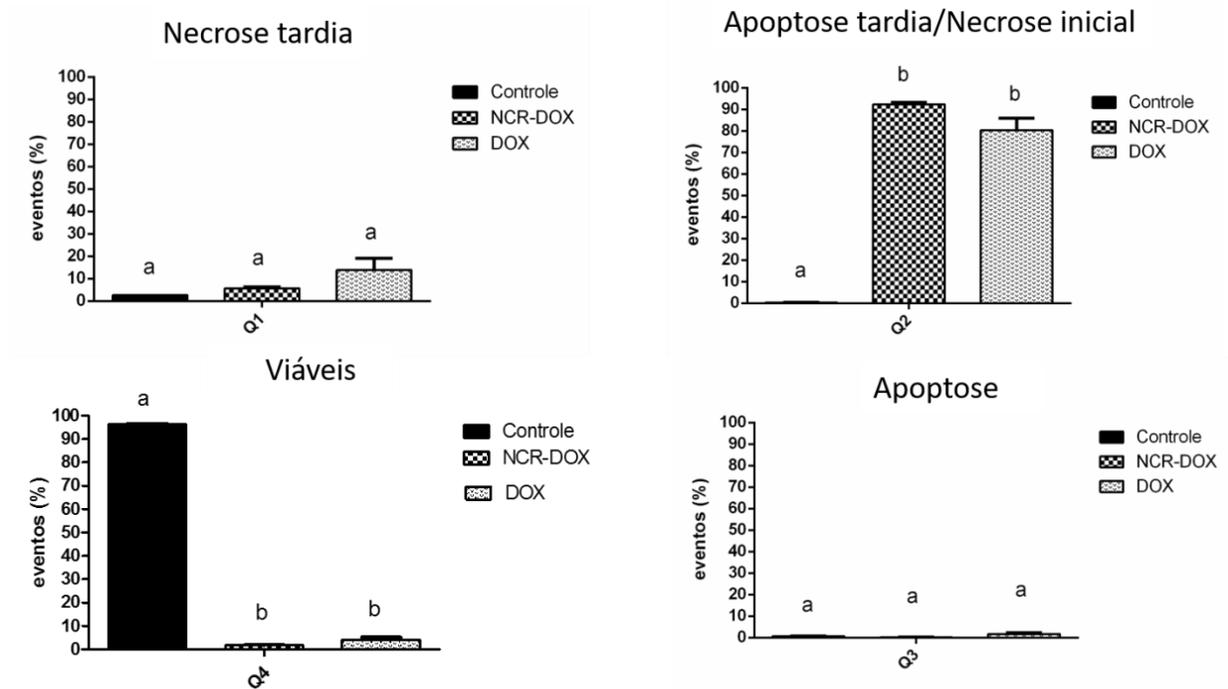


Figura 32. Influência dos tratamentos com DOX (doxorubicina), NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e meio de cultivo (controle) por 48 horas, em células 4T1, sobre a integridade de membrana plasmática (necrose tardia, quadrante Q1 – 7AAD+), indução de apoptose tardia (quadrante Q2 – anexina V+/7AAD+), exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática (apoptose, quadrante Q3 – anexina V+); e células que não sofreram estes eventos (células viáveis, quadrante Q4 – duplo negativo). Dados expressos como média ± erro padrão da média. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo gráfico indicam diferença estatisticamente significativa (p<0,05). Análise estatística: ANOVA em uma via e teste de múltiplas comparações de Tukey.

Para as células MCF-7 tratadas com NCR-DOX e DOX no tempo de seis horas, também foi observado que o tratamento com NCR-DOX resultou em predominância de apoptose tardia/necrose inicial enquanto que DOX resultou tanto em apoptose quanto apoptose tardia/necrose inicial (Figura 33).

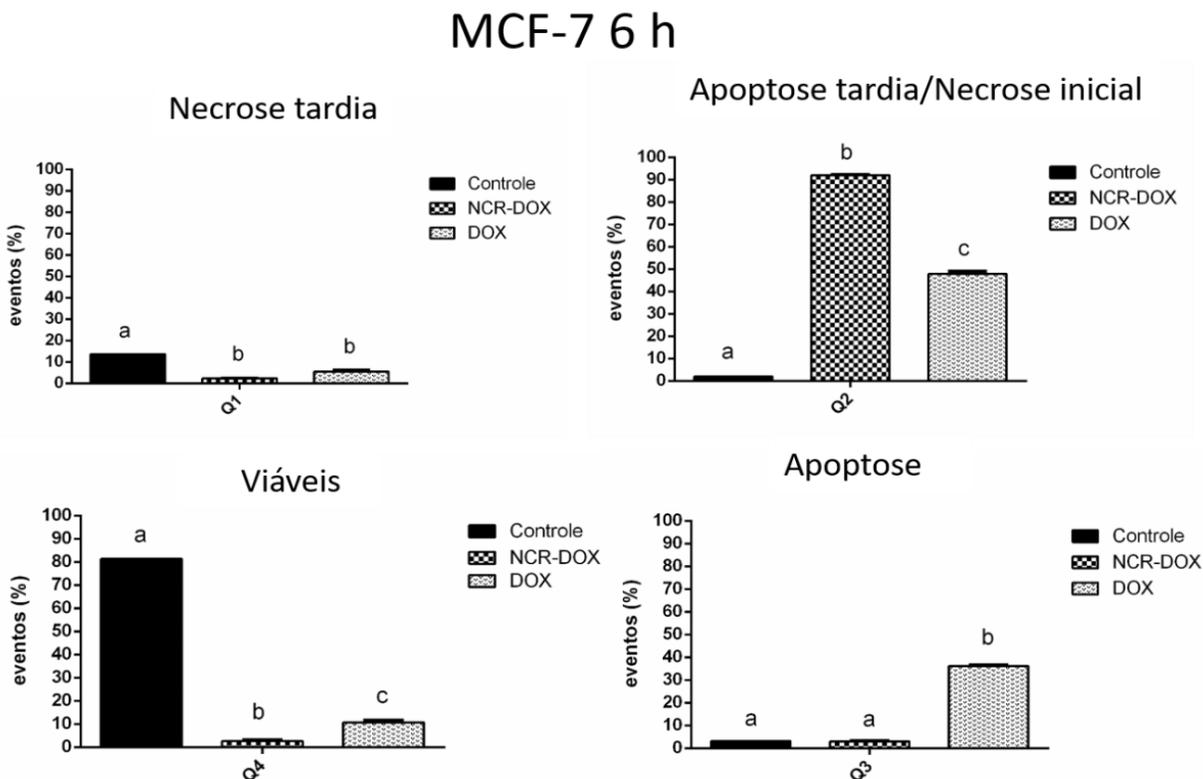


Figura 33. Influência dos tratamentos com DOX (doxorubicina), NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e meio de cultivo (controle) por 6 horas, em células MCF-7, sobre a integridade de membrana plasmática (necrose tardia, quadrante Q1 – 7AAD+), indução de apoptose tardia (quadrante Q2 – anexina V+/7AAD+), exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática (apoptose, quadrante Q3 – anexina V+); e células que não sofreram estes eventos (células viáveis, quadrante Q4 – duplo negativo). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo gráfico indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Análise estatística: ANOVA em uma via e teste de múltiplas comparações de Tukey.

No tempo de 24 horas de tratamento de MCF-7 com NCR-DOX e DOX, foi observada uma semelhança nos eventos induzidos entre os tratamentos, ambos resultando em aumento do número de células em apoptose tardia/necrose inicial, diferentemente do observado para a célula 4T1 no mesmo tempo de tratamento (Figura 34).

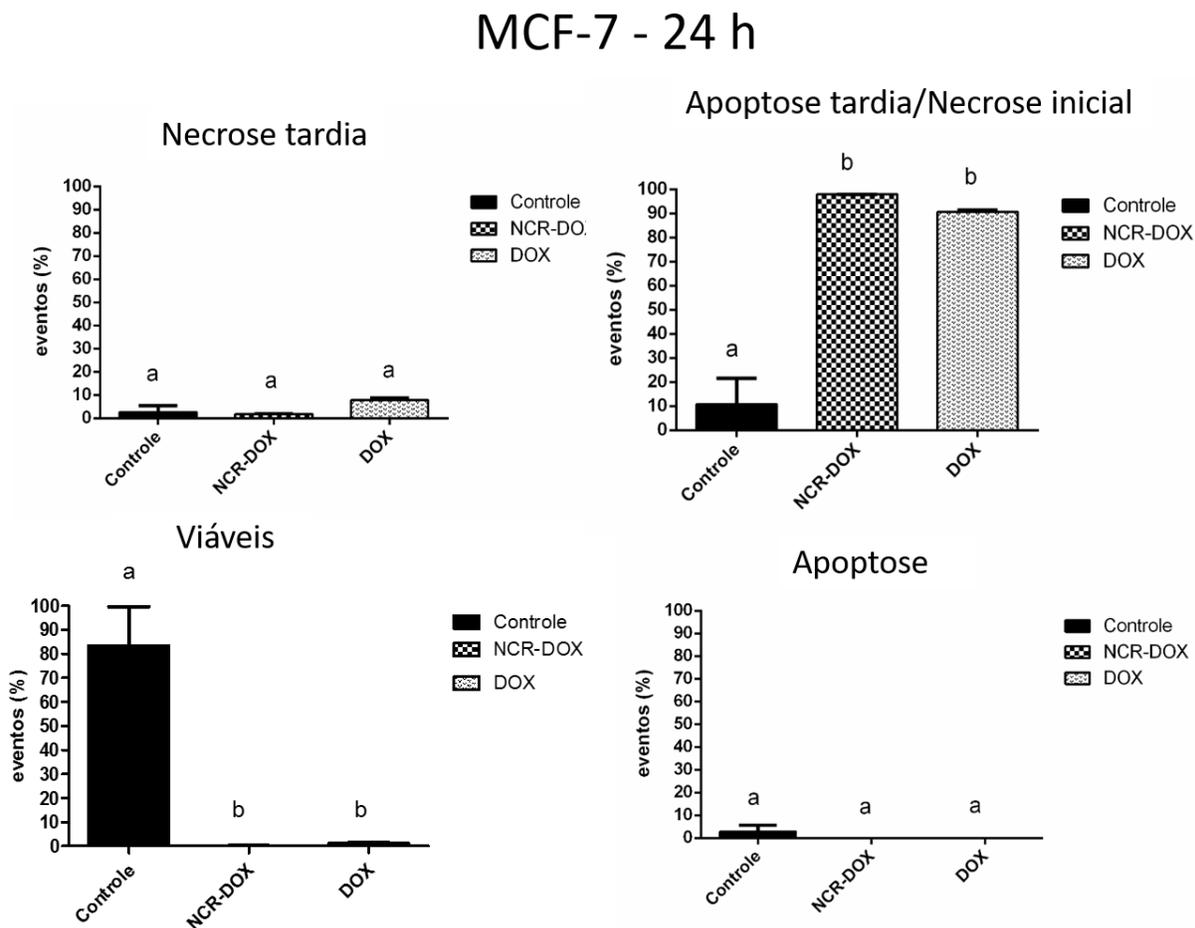


Figura 34. Influência dos tratamentos com DOX (doxorubicina), NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e meio de cultivo (controle) por 24 horas, em células MCF-7, sobre a integridade de membrana plasmática (necrose tardia, quadrante Q1 – 7AAD+), indução de apoptose tardia (quadrante Q2 – anexina V+/7AAD+), exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática (apoptose, quadrante Q3 – anexina V+); e células que não sofreram estes eventos (células viáveis, quadrante Q4 – duplo negativo). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo gráfico indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Análise estatística: ANOVA em uma via e teste de múltiplas comparações de Tukey.

### 5.2.9 Alterações na morfologia celular de 4T1 e MCF-7 após tratamento com NCR-DOX e DOX

A morfologia das células 4T1 e MCF-7, antes e após o tratamento com NCR-DOX ou DOX, foi analisada quanto ao tamanho e granulosidade analisadas por citômetro de fluxo. Nos tempos de 6 e 24 horas, não foram observadas mudanças significativas na morfologia das células 4T1 e MCF-7 após os tratamentos (dados não mostrados). Já para o tempo de 48 horas foi observada modificação significativa na morfologia como pode ser observado na Figura 35.

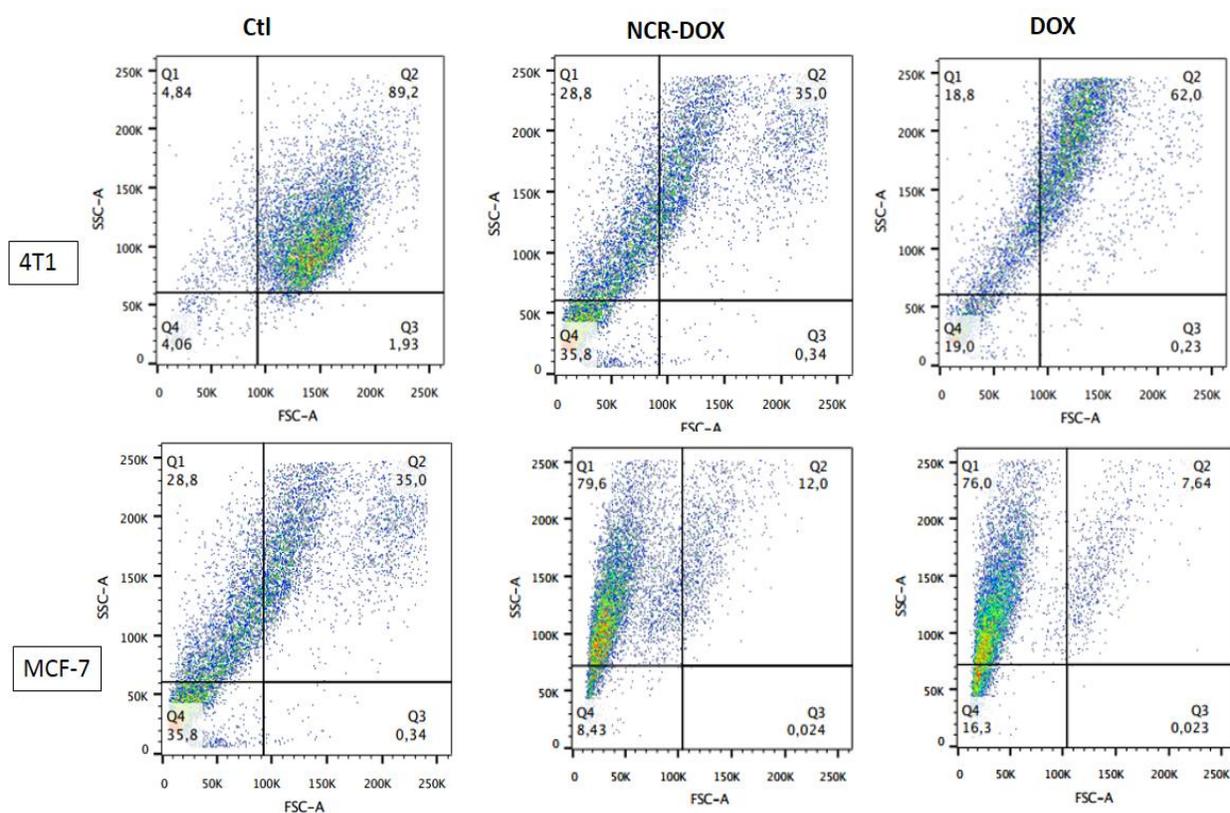


Figura 35. Relação entre tamanho (SSC) e granulosidade (FSC) das células 4T1 e MCF-7 não tratadas (controle), tratadas com NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e tratadas com DOX (doxorrubicina), por 48 horas.

Para a célula 4T1 após 48 horas de tratamento com NCR-DOX foi observado maior variação na granulosidade, com predominância de células menores e menos granulosas, do que as não tratadas. Já para o tratamento de 4T1 com DOX, foi observado também maior diversidade no

tamanho e granulosidade, porem há predominância de células com maior tamanho e mais granulosas.

Nas células MCF-7, ambos os tratamentos renderam modificações semelhantes na morfologia: houve significativo aumento da granulosidade das células após os tratamentos em relação às células não tratadas.

### 5.2.10 NCR-DOX leva à despolarização da membrana de células 4T1 e MCF-7

O efeito dos tratamentos NCR-DOX e DOX na polaridade da membrana plasmática das células 4T1 (Figura 36) e MCF-7 (Figura 37) foi analisado por citometria de fluxo.

#### 4T1

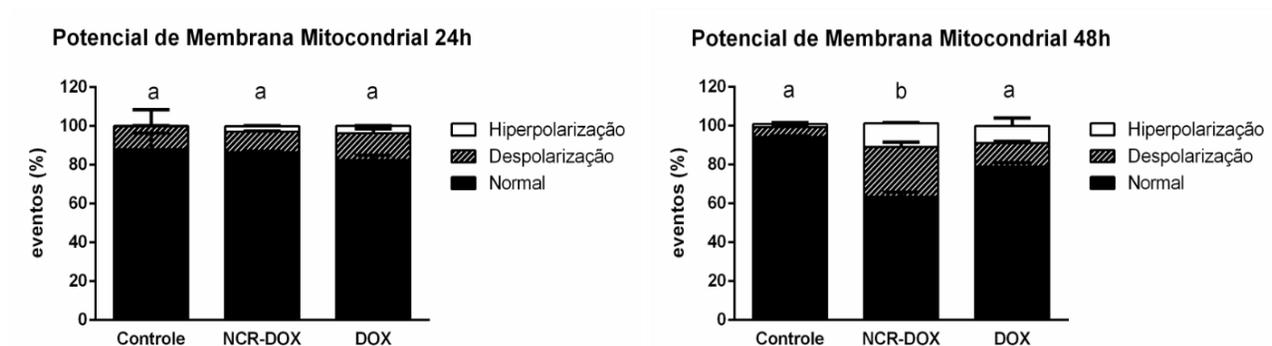


Figura 36, Representação da porcentagem de células 4T1 com polaridade normal, aumentada (hiperpolarizada) ou diminuída (despolarizada) da membrana mitocondrial após tratamento com NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e DOX (doxorubicina) nos tempos de 24 e 48 horas.

Foi observado que no tempo de 24 horas, não existe diferença entre a proporção de células com polarização de membrana normal, despolarizada ou hiperpolarizada em relação ao controle após ambos os tratamentos. Já no tempo de 48 horas foi observado que o tratamento com NCR-DOX levou à significativo aumento do número de células com membrana hiperpolarizada em relação às células controle.

## MCF-7

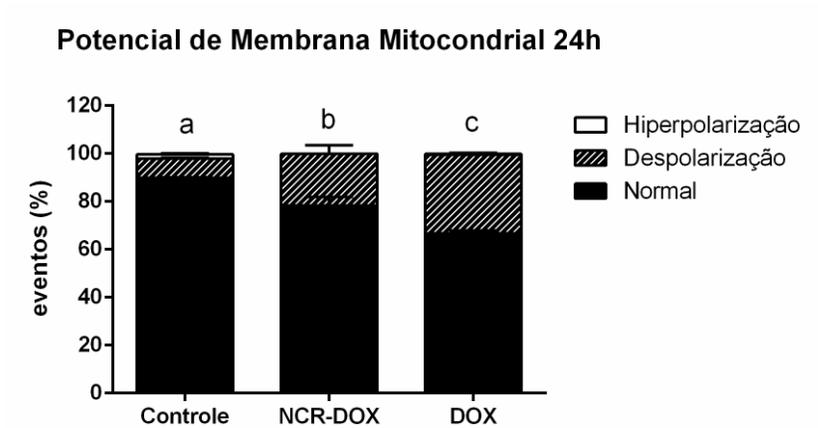


Figura 37. Representação da porcentagem de células MCF-7 com polaridade normal, aumentada (hiperpolarizada) ou diminuída (despolarizada) da membrana plasmática após 24 horas tratamento com NCR-DOX (nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX) e DOX (doxorubicina).

Na célula MCF-7 foi observado que no tempo de 24 horas de tratamento com NCR-DOX e DOX, ambos os tratamentos levaram ao aumento do número de células que sofreram despolarização da membrana, mas o número foi mais expressivo nas células tratadas com DOX.

## 6. DISCUSSÃO

Dentre os desafios da quimioterapia atual podem ser citados a melhoria da biodistribuição dos fármacos anticâncer, a redução da toxicidade contra tecidos e células não alvos e a evasão de mecanismos de resistência eventualmente apresentados por células cancerosas (MITRY; EDWARDS, 2016; INCA 2016). Nesse contexto as nanopartículas vêm sendo utilizadas com uma alternativa para aumentar o índice terapêutico de fármacos anticâncer convencionais, e ainda eventualmente para serem eficazes contra células cancerosas resistentes.

Nesse sentido, as nanoestruturas as poliméricas destacam-se e estão entre as mais estudadas para o carregamento de diversos tipos de moléculas terapêuticas, devido à suas possíveis biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de serem muitas vezes atóxicas e toleradas pelo sistema imunitário (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; RONG *et al.*, 2011; FANUN, 2010). As suas propriedades de liberação de fármaco e degradação dependem largamente da composição e estrutura polimérica. Em combinação com procedimentos de preparo eficientes, as dispersões de nanocápsulas permitem abordagens novas e promissoras em muitos tipos de terapias para o câncer (MORA-HUERTAS *et al.* 2010; WIN *et al.* 2015).

Várias abordagens utilizando nanocarreadores para entrega do quimioterápico DOX em tumores sólidos têm sido consideradas, uma vez que seu uso apresenta várias limitações como cardiotoxicidade e resistência a múltiplos fármacos (PÉREZ-HERRERO, *et al.*, 2015; MITRY, 2016). Nanoestruturas tais como micelas, nanoemulsões, lipossomas, nanoesferas, nanocápsulas e polimersomas, foram desenvolvidos para tentar superar essas limitações (CHEN *et al.* 2016; YOO *et al.*, 2001; SEZGIN, YÜKSEL, AND BAYKARA, 2006; RAO; 2011) e, apesar de melhorarem muitas das características da DOX, principalmente reduzindo a cardiotoxicidade, até o momento todos eles apresentam desvantagens. O lipossoma contendo PEG, Doxil<sup>®</sup>, aprovado pelo FDA para uso em humanos, apresenta dentre seus efeitos adversos, o intenso acúmulo na pele, desencadeando vermelhidão, inchaço e dor nas mãos e nos pés (eritrodisestesia palmoplantar) (RAFIYATH *et al.*, 2012). Lipo-Dox, lipossoma com alta estabilidade devido ao uso de fosfocolina na sua composição, também, apresenta efeitos adversos como estomatite e toxicidade cutânea ainda não superados clinicamente (FAN; ZHANG, 2013).

No presente estudo, foi desenvolvida uma dispersão de nanocápsulas, cuja estrutura consiste de um núcleo oleoso revestido por uma trama polimérica para carrear o quimioterápico DOX (Figura 5). Diversos métodos de obtenção de nanocápsulas foram testados, entretanto somente com

o uso dos componentes n-octadecilamina, óleo de rícino e o polímero PVM/MA se obteve um nanossistema estável e monodisperso. A n-octadecilamina é uma amina primária com uma cadeia hidrocarbônica de 18 átomos de carbono que a torna hidrofóbica. Em estudos recentes, a n-octadecilamina foi utilizada com sucesso em nanoemulsões para entrega gênica, nas quais a estearilamina teve papel chave no empacotamento de DNA (SILVA et al., 2016) e também para estabilizar nanopartículas de prata atuando tanto como um redutor da prata superficial, quanto um estabilizador do coloide em soluções aquosas (NEELGUND et al., 2015). No presente estudo, a n-octadecilamina foi utilizada como uma âncora hidrofóbica ligada covalentemente ao polímero PVM/MA por meio de grupos amida. Este grupo amida é formado pela reação do grupamento amina da n-octadecilamina e os grupos carboxílicos do PVM/MA e, como não é espontânea, foi necessário ativar o grupo carboxílico como descrito nos métodos e representado esquematicamente (figura 38) (VALEUR; BRADLEY, 2009). A presença de grupos amida nas nanocápsulas foi evidenciada nos espectros de FTIR descritos anteriormente (Figura 13).

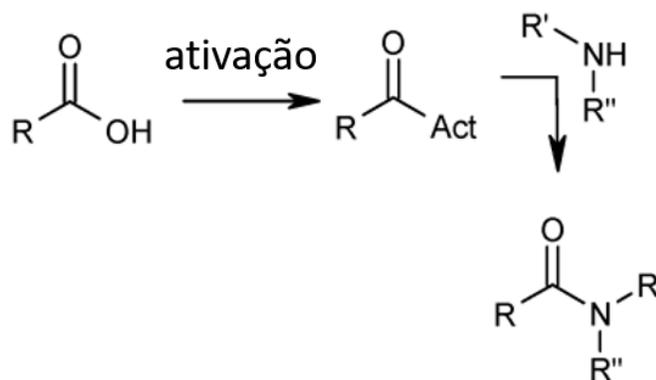


Figura 38. Representação da ativação de ácidos carboxílicos para ligação de amina à molécula.

As porções hidrofóbicas adicionadas ao polímero possibilitaram associar firmemente o óleo de rícino às nanocápsulas (Figura 6), conferindo ao coloide a estabilidade descrita nos resultados (Figura 7). Os grupamentos carboxílicos do PVM/MA, que em pH 7 estão sob a forma de carboxilato (base conjugada do ácido carboxílico), funcionam como estabilizantes do coloide, pois conferem uma carga negativa à superfície das nanocápsulas (Figura 7). O valor negativo de potencial zeta identificado para NCR-DOX(-46 mV em água, -25 mV em meio de cultivo), além de evitar agregação pela repulsão entre as partículas e por aumentar a camada de solvatação da nanoestrutura em meio aquoso, aumenta a interação das nanocápsulas com membranas celulares

por meio de ligações de hidrogênio, e confere menos toxicidade inespecífica em relação às nanopartículas com superfícies catiônicas (CLOGSTON; PATRI, 2011). Centrifugação de nanoemulsões e nanocápsulas é utilizada para verificar a estabilidade coloidal, sendo a ausência da formação de fase ou decantação de material um indicativo de alta estabilidade (TCHOLAKOVA et al., 2004). Após centrifugação da suspensão de nanocápsulas, descrita no presente estudo, não foi observada a formação de fases ou decantação de material, sugerindo a eficiência do uso dos componentes descritos para a formação de nanocápsula estável.

O diâmetro hidrodinâmico da NCR-DOX (Tabela 3) demonstra que esta nanocápsula possui tamanho parecido ao já encontrado para partículas com PVM/MA com eficiência terapêutica comprovada (CAMACHO et al., 2011; DE SOUZA et al., 2015; GANASSIN, 2016). O baixo índice de polidispersão encontrado (Tabela 3) indica alta monodispersividade, almejada no presente estudo uma vez que nanopartículas monodispersas demonstram melhor desempenho em relação a nanopartículas polidispersas correspondentes (CUI et al., 2009), principalmente quando sua via de administração é intravenosa. No presente estudo houve pouca variação de diâmetro após exposição ao rico ambiente proteico do meio de cultivo utilizado nos ensaios *in vitro*, sugerindo que houve pouca adsorção de moléculas do meio pelas nanocápsulas. A exposição de nanopartículas a meio biológico resulta na associação de uma rica malha de proteínas à sua superfície, chamada muitas vezes de coroa proteica, e esta coroa confere uma nova identidade a nanopartículas e afeta a sua dinâmica biológica. Para isso estudos incubam nanopartículas com plasma ou soro para entender a absorção proteica e modificações de tamanho e carga decorrentes da associação (MONOPOLI et al., 2012). Ainda, as nanocápsulas se apresentaram como esferoides deformáveis nas imagens obtidas por MET, já que possuem contornos circunferenciais e sua superfície mostra-se deformada nos campos onde as nanocápsulas estão em contato (Figura 9).

Este trabalho propôs o desenvolvimento de uma nanopartícula capaz de incorporar fármacos hidrofóbicos, esse estudo também faz uma abordagem diferente de um estudo prévio desenvolvido no grupo (GANASSIN, 2016) substituindo o selol, que consiste em uma mistura de selenitrotriálcool cítricos, pelo óleo de rícino, um produto natural extraído da mamona. O uso do óleo de rícino suprime o uso de surfactante fazendo uso da n-octadecilamina ligada ao PVM/MA. Em GANASSIN (2016), a DOX foi associada ao polímero do invólucro da nanocápsula, o que limitava sobremaneira a quantidade de DOX que poderia ser associada à nanoestrutura. Além disso, em estudos *in vivo* foi observado que, apesar de haver redução da cardiotoxicidade da DOX

pela sua associação à nanoestrutura, a associação do selol à DOX não aumentou a eficácia deste último fármaco contra câncer de mama experimentalmente induzido em camundongos BALB/c. Assim, neste trabalho, um objetivo foi desenvolver uma nanocápsula contendo DOX em seu núcleo, com associação ao óleo de rícino.

O óleo de rícino, óleo vegetal não comestível, tem tido crescente uso e aplicações em diversas áreas, em grande parte devido a ser de origem renovável, ser biodegradável, ter baixo custo e ser bio sustentável (MUBOFU, 2016), e no presente estudo foi utilizado para dissolver a DOX em núcleo hidrofóbico. Vantagens do seu uso em nanopartículas já foram demonstradas (MUEHLMANN et al., 2015; SHOMBE et al., 2016) e no presente estudo foi confirmado o seu potencial uma vez que somente com seu uso, foi possível estabilizar as nanocápsulas NCR e NCR-DOX. O óleo de rícino apresenta balanço hidrofílico-lipofílico relativamente alto para um óleo (HLB = 14), caracterizando-o como um óleo menos hidrofóbico que a maioria dos outros óleos naturais, que geralmente apresentam HLB de 7, o que possivelmente facilitou o desenvolvimento da nanocápsula NCR-DOX sem o uso de cossurfactantes para estabilizar a fase oleosa. A ausência de cossurfactante para estabilizar a fase oleosa é uma grande vantagem uma vez que a toxicidade de surfactantes é bem descrita na literatura e evitar seu uso é relevante para aplicações biológicas (INÁCIO et al., 2011; TACHON et al., 1989). Para a produção da NCR-DOX, o cloridrato de DOX foi previamente neutralizado, gerando a base livre da DOX, a qual é lipossolúvel. Sob esta forma, a DOX ficou então dissolvida no núcleo oleoso da NCR-DOX.

Para verificar a concentração de DOX em meios de diálise e para a mensuração da eficiência de associação da DOX às nanocápsulas, foi utilizado um método de CLAE. A linearidade da curva de calibração utilizada estava de acordo com o esperado para este método analítico (KADAVIL, 2013). A extração de DOX presente na NCR-DOX pelo método utilizado se mostrou eficiente de forma semelhante ao apresentado em trabalho prévio realizado com o mesmo polímero (GANASSIN, 2016). O método de remoção de subprodutos de síntese e de fármaco não associado às nanopartículas foi a diálise, o qual é descrito como útil à remoção de moléculas livres sem danificar o estado coloidal inicial das nanopartículas (URATA et al., 2009). A diálise foi realizada em uma condição em que DOX é solúvel (metanol: água, 50:50, v:v) e permitiu que a DOX livre, não associada às nanocápsulas, fosse removida após 25 horas de diálise, indicando que apenas 8,9% da DOX não estavam associados à nanocápsula. A presença de DOX nas nanocápsulas NCR-DOX

foi comprovada também pelos espectros de SERS e FTIR, conforme previamente descrito (Figuras 12 e 13).

A NCR e NCR-DOX foram utilizadas em diferentes ensaios de toxicidade utilizando células tumorais e não tumorais, sendo que a escolha das concentrações utilizadas foi baseada em estudos anteriores (KAMINSKAS et al., 2012; PARK et al., 2009, GANASSIN, 2016). A NCR-DOX foi o tratamento que causou maior redução na viabilidade de células cancerosas, tanto da 4T1 quanto da MCF-7. Infere-se assim que a nanopartícula NCR-DOX demonstrou ter atividade antiproliferativa *in vitro* superior à da DOX na sua forma livre, apresentando efeito citotóxico dose e tempo-dependente nas linhagens tumorais estudadas. O menor efeito citotóxico por parte do composto NCR-DOX entre as linhagens tumorais foi na linhagem MCF-7 isso pode estar relacionada à maior resistência intrínseca por parte das células do epitélio mamário humano.

Muitos dos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer são pouco seletivos, isto é, afetam tanto as células tumorais como as não tumorais. Assim, também foram realizados ensaios de citotoxicidade em linhagens celulares não tumorais de epitélio mamário humano (MCF-10A) e fibroblastos murinos (NIH-3T3). As taxas de viabilidade celular obtidas para MCF-10A e NIH-3T3 após os tratamentos foram maiores do que as encontradas nas células tumorais. Isso se explica uma vez que células tumorais apresentam alta atividade metabólica (DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016). O tratamento com NCR manteve a viabilidade acima de 80% em todos os tempos e concentrações testadas. Esse resultado mostra que a matriz da NCR-DOX é pouco tóxica. Estudo feito por Ganassin (2016) demonstrou a ausência de toxicidade em células 4T1 tratadas por PVM/MA.

Os resultados obtidos por MTT em células 4T1, NIH-3T3, MCF-7 e MCF-10A podem ser correlacionados à redução da adesão das células tumorais observada através do monitoramento em tempo real. Sabe-se que a adesão celular é crucial para a união de células nos tecidos animais e a ligação de células com a matriz extracelular é fundamental para a manutenção da integridade dos tecidos (HOLM *et al.*, 2015). Além disso, as células com capacidade de aderirem à placa de cultivo, tais como as células usadas neste trabalho, perdem a adesão à placa quando morrem, de maneira que o índice de adesão reflete a quantidade de células viáveis em cultivo. Células NIH-3T3 e de MCF-10A registraram índice celular superior ao de MCF-7 e 4T1. Os resultados utilizando RTCA demonstraram proliferação reduzida para todas as células tratadas com NCR-DOX e DOX, sendo que células as cancerosas foram mais sensíveis aos tratamentos. Cerca de 6 horas após os tratamentos

foi observada uma redução expressiva na adesão das células 4T1 com diminuição gradativa ao longo do tempo. Essa redução também foi observada nas células MCF-7. Não foi possível identificar perda de adesão nas células tratadas com NCR em relação ao controle no tempo de monitoramento, resultado que indica que o tratamento com NCR mantém a adesão celular por mais tempo, reforçando os resultados de MTT.

Uma vez que foi demonstrada redução de viabilidade e de adesão celular, buscou-se elucidar qual o mecanismo de citotoxicidade da NCR-DOX em células cancerosas. Para tal, a análise de interiorização de DOX após os tratamentos identificou que nas células 4T1, a intensidade da fluorescência foi menor em relação à célula MCF-7, corroborando o identificado pela técnica de microscopia de fluorescência. Em ambas as células, a interiorização de NCR-DOX foi maior do que a de DOX na forma livre, um resultado que se alinha ao observado em diversos estudos publicados com nanopartículas contendo DOX (SHAHABI et al., 2015; WONG et al., 2006; ZENG; MORGENSTERN; NYSTRÖM, 2014). Uma justificativa para esse resultado se relaciona aos sistemas de entrega coloidais, que podem diminuir a resistência de células a fármacos pela prevenção da ação de bombas de efluxo do tipo glicoproteínas P, que removem da célula o fármaco livre (DE VERDIÈRE et al., 1994). Na célula MCF-7, conhecida por possuir grande quantidade de bombas de efluxo (ABUHAMMAD; ZIHLIF, 2013), foi observada uma maior diferença entre interiorização da NCR-DOX e da DOX livre, possivelmente devido ao papel das bombas de efluxo.

O estudo do papel das diferentes vias de endocitose na internalização de NCR-DOX e DOX indicou diferenças entre as suas de interiorização (Figura 27). A diminuição da interiorização de NCR-DOX nas células 4T1 por todos os inibidores de distintas vias de endocitose indica que a entrada destas nanocápsulas é mediada por diversas vias endocíticas nas células. Já na célula MCF-7 foi observado que somente a azida sódica inibiu a entrada de NCR-DOX nas células, indicando o envolvimento de vias dependes de ATP neste processo. Estudo realizado por CAO *et al.*, (2014) relatou que micelas de 130 nm contendo DOX foram endocitadas pelas vias mediadas por clatrina, cavéola e macropinocitose, sendo que a via mediada por cavéola foi a principal via de interiorização destas micelas em células Hela. Já em estudo com dendrímeros lineares hiper-ramificados conjugados à DOX, foi observado que sua endocitose foi mediada por clatrina e macropinocitose, o que é esperado para este tipo de estrutura, ao contrário da DOX livre que se difunde através da membrana plasmática (ZENG; MORGENSTERN; NYSTRÖM, 2014).

Em decorrência dos resultados mencionados anteriormente, complementou-se a análise com visualização das mudanças morfológicas através da coloração de Giemsa, onde observou-se que tanto células 4T1 quanto MCF-7 sofreram modificações estruturais após o tratamentos com NCR-DOX, sendo possível visualizar retração do volume celular com perda citoplasmática, seguida de redução de confluência celular reforçando os resultados de RTCA, onde viu-se diminuição da adesão celular. Essas alterações morfológicas são corroboradas pelas mudanças no tamanho e granulidade vistas por citometria de fluxo. Os resultados de fragmentação de DNA, potencial de membrana mitocondrial e tipo de morte celular após exposição das células a NCR-DOX e DOX se complementam para descrever a consequência do dano sofrido pelas células após exposição aos tratamentos. Os resultados sugerem que ambos os tratamentos causam danos celulares capazes de ativar o mecanismo de apoptose. A atividade citotóxica da DOX advém principalmente da sua capacidade em estabelecer ligação e estabilização do complexo de clivagem DNA-topoisomerase II $\alpha$ , que por sua vez resulta na inibição da função normal da enzima. Desta forma, o complexo é incapaz de religar as quebras produzidas na molécula de DNA e, conseqüentemente ocorre a indução do processo apoptótico (AGHAEE et al., 2013).

De fato, tanto NCR-DOX quanto DOX induziram apoptose nas células cancerosas. A fragmentação de DNA foi mais intensa com DOX, porém também foi expressiva com NCR-DOX, o que foi esperado uma vez que a fragmentação de DNA causada pela DOX é principalmente decorrente da indução de apoptose e já é bem estabelecida na literatura (MIZUTANI et al., 2005; SYNOWIEC et al., 2015).

Nas células 4T1, houve alteração do potencial de membrana mitocondrial somente no tempo de 48 horas e mais expressivamente nas células tratadas com NCR-DOX do que nas tratadas com DOX, indicando maior toxicidade dos tratamentos, corroborando o observado pela técnica de viabilidade celular. Já nas células MCF-7 no tempo de 24 horas já foi possível observar alteração do potencial de membrana, com o efeito de DOX sendo maior do que o de NCR-DOX, também de acordo com o observado pelo ensaio de viabilidade celular. Em estudo de KUZNETSOV *et al.*, (2011), o efeito de DOX em mitocôndrias de células tumorais após 48 horas foi estimado como decorrente da inibição da respiração, depleção de ATP e modificação das atividades das enzimas mitocondriais, resultando na parada do ciclo celular e morte, de acordo com o observado no presente estudo.

Todos os resultados expostos e discutidos neste trabalho mostram que a NCR-DOX possui atividade citotóxica superior à da DOX e de maneira mais específica às células cancerosas mesmo em cultivo *in vitro*. Em estudos futuros, a NCR-DOX deve ser testada em modelos animais de câncer de mama, nos quais poderá ser investigada a biodistribuição destas nanocápsulas. Devido ao diâmetro nanométrico da NCR-DOX, é possível que haja melhora da biodistribuição com eventual aumento do índice terapêutico da DOX, como já demonstrado previamente pelo grupo para outro tipo de nanocápsula com DOX (GANASSIN, 2016). Além disso, foi estabelecido neste trabalho um modelo de nanocápsula inédito na literatura, que pode ser usado para a incorporação de diversos fármacos hidrofóbicos sendo promissora para aplicações biológicas.

## 8. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho permitiram concluir que as nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino com invólucro de PVM/MA conjugado à DOX (NCR-DOX) são estáveis e monodispersas. A viabilidade celular e a adesão é menor em células tumorais após tratamento com NCR-DOX. Além disso o padrão morfológico e a confluência foram alterados por NCR-DOX e DOX. Observou-se que NCR-DOX foi mais interiorizada pelas células tumorais do que a DOX e que a NCR-DOX distribuiu-se no núcleo e no citoplasma. As linhagens tumorais testadas sofreram mais despolarização da membrana pela NCR-DOX. Foi visto também que NCR-DOX causa menos fragmentação de DNA do que DOX. As linhagens 4T1 e MCF-7 sofreram necrose e apoptose tardia por NCR-DOX e DOX. Assim os resultados deste trabalho sugerem que as nanocápsulas com invólucro de PVM/MA e núcleo contendo óleo de rícino e DOX- NCR-DOX – possui efeito citotóxico contra o adenocarcinoma mamário (4T1) e adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) e além disso esse modelo de nanocápsula permite a incorporação de fármacos hidrofóbicos para aplicações biológicas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUHAMMAD, S.; ZIHLIF, M. Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. **Genomics**, v. 101, n. 4, p. 213–220, 2013.

AGUILAR-ROSAS, I. et al. Preparation and characterization of mucoadhesive nanoparticles of poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) containing glycyrrhizic acid intended for vaginal administration. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 10, p. 1632–1639, 2015.

ALJABALI, A. A. A. et al. CPMV-DOX Delivers. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 1959–1973, 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **American Cancer Society**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

APTE, A. et al. Doxorubicin in TAT peptide-modified multifunctional immunoliposomes demonstrates increased activity against both drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer models. **Cancer Biology and Therapy**, v. 15, n. 1, p. 69–80, 2014.

BRYANT, J. et al. Cardioprotection against the toxic effects of anthracyclines given to children with cancer: a systematic review. **Health technology assessment (Winchester, England)**, v. 11, n. 27, p. 226–230, 2007.

CAMPANERO, M. A. et al. Influence of the surface characteristics of PVM / MA nanoparticles on their bioadhesive properties. v. 89, p. 19–30, 2003.

CALÓ, E. et al. Antimicrobial hydrogels based on autoclaved poly(vinyl alcohol) and poly(methyl vinyl ether-alt-maleic anhydride) mixtures for wound care applications. **RSC Adv.**, v. 6, n. 60, p. 55211–55219, 2016.

CAMACHO, A. I. et al. Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as innate immune system activators. **Vaccine**, v. 29, n. 41, p. 7130–7135, 2011.

CAO, J. et al. Cellular internalization of doxorubicin loaded star-shaped micelles with hydrophilic zwitterionic sulfobetaine segments. **Biomaterials**, v. 35, n. 15, p. 4517–4524, maio 2014.

CHEN, C.-L.; THOEN, K. K.; UCKUN, F. M. **High-performance liquid chromatographic methods for the determination of topoisomerase II inhibitors**. [s.l: s.n.]. v. 764, 2001.

CHEN, G. et al. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. **Chemical Reviews**, p. acs.chemrev.5b00148, 2016.

CHEN, F.-H. et al. Synthesis of a novel magnetic drug delivery system composed of doxorubicin-conjugated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle cores and a PEG-functionalized porous silica shell. **Chemical Communications**, v. 46, n. 45, p. 8633, dez. 2010.

CHEN, G. Q. et al. Rapid development of a castor cultivar with increased oil content. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 586–588, 2016b.

CHONG, D. C. et al. Clathrin-dependent trafficking of subtilase cytotoxin, a novel AB5 toxin that targets the endoplasmic reticulum chaperone BiP. **Cell Microbiol**, p. 795–806, 2008.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta Potential Measurement. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l: s.n.]. v. 697p. 63–70.

CUI, H. et al. Strategies of large scale synthesis of monodisperse nanoparticles. **Recent patents on nanotechnology**, v. 3, n. 1, p. 32–41, 2009.

DE VERDIÈRE, A. C. et al. Uptake of doxorubicin from loaded nanoparticles in multidrug-resistant leukemic murine cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 33, n. 6, p. 504–508, nov. 1994.

DEBERARDINIS, R. J.; CHANDEL, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. **Science Advances**, v. 2, n. 5, 2016.

DE SOUZA, L. R. et al. PVM/MA-shelled selol nanocapsules promote cell cycle arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. **Journal of nanobiotechnology**, v. 12, p. 32, 2014.

DE SOUZA, L. R. et al. Antitumor activity and systemic effects of PVM/MA-shelled selol nanocapsules in lung adenocarcinoma-bearing mice. **Nanotechnology**, v. 26, n. 50, p. 505101, dez. 2015.

DELPLACE, V.; COUVREUR, P.; NICOLAS, J. Recent trends in the design of anticancer polymer prodrug nanocarriers. **Polym. Chem.**, v. 5, n. 5, p. 1529–1544, 2014.

ERYILMAZ, M. et al. Rapid quantification of total protein with surface-enhanced Raman spectroscopy using *o*-phthalaldehyde. **Journal of Raman Spectroscopy**, 2017.

FAN, Y.; ZHANG, Q. Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 81–87, 2013.

FAROKHZAD, O. C. Self-Assembled Targeted Nanoparticles: Evolution of Technologies and Bench to Bedside Translation. p. 1123–1134, 2011

FANUN, M. **Colloids in drug delivery**. [s.l.] CRC Press/Taylor & Francis, 2010.

FENG, X. Polymeric Conjugates for Anti-cancer Drug Delivery. **Polymer**, p. 50–52, 2010.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161–171, 2005.

FORREST, R. A. et al. Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 12, p. 1602–1612, 2012.

GANASSIN, R. **Dissertação de mestrado: Nanocápsulas de selol com invólucro de poli(metil vinil-éter co-anidrido maléico) conjugado à doxorubicina: Desenvolvimento e avaliação de seu potencial anticâncer in vitro e in vivo.** [s.l.] Universidade de Brasília, 2016.

GAUTIER, J. et al. SERS spectroscopic approach to study doxorubicin complexes with Fe<sup>2+</sup> ions and drug release from SPION-based nanocarriers. **The Analyst**, v. 138, n. 24, p. 7354, 2013.

GARCÍA-MANERO, M. et al. Pregnancy associated breast cancer. **European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology**, v. 35, n. 2, p. 215–8, 2009.

GLOBOCAN WHO. No Title. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)>. Acesso em: 12 jan. 2017.

HANAHAN, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of câncer. *Cell*, v.100, p. 57-70, 2011.

HARVEY, J.; HARDY, S. C.; ASHFORD, M. L. Dual actions of the metabolic inhibitor, sodium azide on K(ATP) channel currents in the rat CRI-G1 insulinoma cell line. **British journal of pharmacology**, v. 126, n. 1, p. 51–60, jan. 1999.

HOLM, J. B. et al. *ToxSci Advance Access published August 10, 2015.*

INÁCIO, Â. S. et al. In Vitro Surfactant Structure-Toxicity Relationships: Implications for Surfactant Use in Sexually Transmitted Infection Prophylaxis and Contraception. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e19850, maio 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016.**

JOANITTI, G. A. et al. Nanostructured Systems for the Organelle-specific Delivery of Anticancer Drugs. 2016.

JOHNSTON, S. R. D. The role of chemotherapy and targeted agents in patients with metastatic breast cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 47 Suppl 3, p. S38–47, 2011.

KADAVIL, J. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Center for Veterinary Medicine (CVM) Contains Nonbinding Recommendations. **Communications Staff**, v. 20855, p. 240–276, 2013.

KAMINSKAS, L. M. et al. A comparison of changes to doxorubicin pharmacokinetics , antitumor activity , and toxicity mediated by PEGylated dendrimer and PEGylated liposome drug delivery systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 103–111, 2012.

KANLAYA, R. et al. Macropinocytosis is the Major Mechanism for Endocytosis of Calcium Oxalate Crystals into Renal Tubular Cells. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 67, n. 3, p. 1171–1179, dez. 2013.

KUZNETSOV, A. V. et al. Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 6, p. 1144–1152, jun. 2011

KNOP, K. et al. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 36, p. 6288–6308, 2010.

KUNJACHAN, S. et al. Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13-14, p. 1852–1865, 2013.

MAEDA, H. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 65, n. 1-2, p. 271–284, 2000.

MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; MINOTTI, G. Cardiotoxicity of antitumor drugs. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 5, p. 978–989, 2008.

MERLO, L. M. F. et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. December, p. 924–935, 2006.

MONOPOLI, M. P. et al. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 12, p. 779–786, dez. 2012.

MILLER, K. D. et al. Cancer Treatment and Survivorship Statistics , 2016. v. 66, n. 4, p. 271–289, 2016.

MITRY, M. A.; EDWARDS, J. G. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. **IJC Heart and Vasculature**, v. 10, p. 17–24, 2016.

MIZUTANI, H. et al. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sciences**, v. 76, n. 13, p. 1439–1453, fev. 2005.

MOHAN, P.; RAPOPORT, N. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: Effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 1959–1973, 2010.

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

MOUSA, S. A.; BHARALI, D. J. Nanotechnology-based detection and targeted therapy in cancer: Nano-bio paradigms and applications. **Cancers**, v. 3, n. 3, p. 2888–2903, 2011.

MUBOFU, E. B. Castor oil as a potential renewable resource for the production of functional materials. **Sustainable Chemical Processes**, v. 4, n. 1, p. 11, dez. 2016.

MUEHLMANN, L. A. et al. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1199–1213, 2014.

MUEHLMANN, L. A. et al. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **J Nanobiotechnology**, v. 13, p. 36, 2015.

NEELGUND, G. M. et al. Single-step, size-controlled synthesis of colloidal silver nanoparticles stabilized by octadecylamine. **Applied Surface Science**, v. 356, p. 726–731, 2015.

OCTAVIA, Y. et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 6, p. 1213–1225, 2012.

OGUNNIYI, D. et al. Castor oil: A vital industrial raw material. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 9, p. 1086–1091, jun. 2006.

OHNO, S. Tolerability of Therapies Recommended for the Treatment of Hormone Receptor-positive Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, 2016.

ONODERA, R. et al. Potential use of folate-appended methyl- $\beta$ -cyclodextrin as an anticancer agent. **Scientific reports**, v. 3, p. 1104, 2013.

PARK, J. et al. PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 5, n. 4, p. 410–418, 2009.

PASUT, G. et al. Polyethylene glycol (PEG)-dendron phospholipids as innovative constructs for the preparation of super stealth liposomes for anticancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 199, p. 106–113, 2015.

PAULO, J. et al. Prevention of Distant Lung Metastasis After Photodynamic Therapy Application in a Breast Cancer Tumor Model. p. 689–699, 2016.

PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 52–79, 2015.

POZZI, D. et al. The biomolecular corona of nanoparticles in circulating biological media. **Nanoscale**, v. 7, n. 33, p. 13958–13966, 2015.

PURDIE, L.; MAGNUSSON, J. P.; SPAIN, SEBASTIAN G. ALEXANDER, C. Influence of polymer size on uptake and cytotoxicity of DOX@DNA-PEG conjugates. **Bioconjugate chemistry**, v. XX, n. XX, p. XX, 2016.

QIU, L.; ZHENG, C.; ZHAO, Q. Mechanisms of drug resistance reversal in Dox-resistant MCF-7

cells by pH-responsive amphiphilic polyphosphazene containing diisopropylamino side groups. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 5, p. 1109–1117, 2012.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

RAFIYATH, S. M. et al. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis. **Experimental hematology & oncology**, v. 1, n. 1, p. 10, 23 abr. 2012.

RONG, X. et al. Applications of polymeric nanocapsules in field of drug delivery systems. **Current drug discovery technologies**, v. 8, n. 3, p. 173–87, 2011.

SAHAY, G.; ALAKHOVA, D. Y.; KABANOV, A. V. Endocytosis of nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 3, p. 182–195, 2010.

SEZGIN, Z.; YÜKSEL, N.; BAYKARA, T. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 3, p. 261–268, 2006.

SENKUS, E.; CARDOSO, F.; PAGANI, O. Time for more optimism in metastatic breast cancer? **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 2, p. 220–228, 2014.

SHAHABI, S. et al. Enhancing Cellular Uptake and Doxorubicin Delivery of Mesoporous Silica Nanoparticles via Surface Functionalization: Effects of Serum. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 48, p. 26880–26891, dez. 2015.

SHOMBE, G. B. et al. Synthesis and characterization of castor oil and ricinoleic acid capped CdS nanoparticles using single source precursors. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 43, p. 230–237, 2016.

SINHA, R. et al. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery Review Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. p. 1909–1917, 2006.

SILVA, A. L. et al. Stearylamine-Containing Cationic Nanoemulsion as a Promising Carrier for Gene Delivery. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 16, n. 2, p. 1339–45, fev. 2016.

SONG, Y.-F. et al. Dual subcellular compartment delivery of doxorubicin to overcome drug resistant and enhance antitumor activity. **Nature Publishing Group**, n. November, p. 1–19, 2015.

SOUZA, L. R. DE et al. Antitumor activity and systemic effects of PVM / MA-shelled selol nanocapsules in lung adenocarcinoma-bearing mice. v. 505101, [s.d.].

SOUZA, L. R. DE et al. PVM / MA-shelled selol nanocapsules promote cell cycle arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. p. 1–17, 2014.

SIMSTEIN, R., M. BUROW, et al. "Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system." *Experimental biology and medicine* 228(9): 995-1003. (2003)

SYNOWIEC, E. et al. Doxorubicin Differentially Induces Apoptosis, Expression of Mitochondrial Apoptosis-Related Genes, and Mitochondrial Potential in BCR-ABL1-Expressing Cells Sensitive and Resistant to Imatinib. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

TACHON, P. et al. Assessment of surfactant cytotoxicity: comparison with the Draize eye test. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 11, n. 5, p. 233–243, out. 1989.

TCHOLAKOVA, S. et al. Evaluation of short-term and long-term stability of emulsions by centrifugation and NMR. **Bulgarian Journal of Physics**, v. 31, n. 3–4, p. 96–110, 2004.

URATA, C. et al. Dialysis process for the removal of surfactants to form colloidal mesoporous silica nanoparticles. **Chemical Communications**, n. 34, p. 5094, set. 2009.

VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, n. 2, p. 606–631, 2009.

WIN, K. Y. et al. Evaluation of polymeric nanoparticle formulations by effective imaging and quantitation of cellular uptake for controlled delivery of doxorubicin. **Small**, v. 11, n. 9–10, p. 1197–1204, 2015.

WONG, H. L. et al. A Mechanistic Study of Enhanced Doxorubicin Uptake and Retention in Multidrug Resistant Breast Cancer Cells Using a Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticle System. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 317, n. 3, 2006.

YOO, H. S.; PARK, T. G. Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1–2, p. 63–70, 2001.

YUSUF, A. K. et al. Extraction and characterization of castor seed oil from wild ricinus communis linn.. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 5, p. 1392–1404, 2015.

YU, Q. et al. Polymer-Doxorubicin Conjugate Micelles Based on Poly(ethylene glycol) and Poly(N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide): Effect of Negative Charge and Molecular Weight on Biodistribution and Blood Clearance. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 9, p. 2645–2655, 2015.

ZENG, X.; MORGENSTERN, R.; NYSTRÖM, A. M. Nanoparticle-directed sub-cellular localization of doxorubicin and the sensitization breast cancer cells by circumventing GST-Mediated drug resistance. **Biomaterials**, v. 35, n. 4, p. 1227–1239, 2014.

ZHANG, C. et al. Quantification of DOX bioavailability in biological samples of mice by sensitive and precise HPLC assay. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 55–61, 2016a.

ZHANG, Y. et al. Co-delivery of doxorubicin and curcumin by pH-sensitive prodrug nanoparticle for combination therapy of cancer. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 21225, 2016b.

ZWICKE, G. L.; MANSOORI, G. A.; JEFFERY, C. J. Targeting of Cancer Nanotherapeutics. **Nano Reviews**, v. 1, p. 1–11, 2012.