

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA
FARMACÊUTICA

Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanocápsulas multiparedes complexadas com zinco e funcionalizadas com RGD para reconhecimento por integrinas $\alpha_v\beta_3$ presentes em células tumorais

MICHELLI BARCELOS ANTONOW

PORTO ALEGRE, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA
FARMACÊUTICA

Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanocápsulas multiparedes complexadas com zinco e funcionalizadas com RGD para reconhecimento por integrinas $\alpha_v\beta_3$ presentes em células tumorais.

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

Orientadora: Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Co-orientador: Dr. Gustavo Pozza Silveira

Porto Alegre, 2016

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, em nível de doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 18 de março de 2016, pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dr. Adriana Raffin Pohlmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Irene Clemes Kulkamp Guerreiro

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Márcia Rosângela Wink

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dr. Nádyá Pesce da Silveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares

Universidade Federal de Pelotas

CIP - Catalogação na Publicação

Barcelos Antonow, Michelli
Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanocápsulas multiparedes complexadas com zinco e funcionalizadas com RGD para reconhecimento por integrinas presentes em células tumorais / Michelli Barcelos Antonow. -- 2016.
150 f.

Orientador: Adriana Raffin Pohlmann.
Coorientador: Gustavo Pozza Silveira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Nanotecnologia. 2. Câncer. 3. Doxorrubicina. 4. Nanocápsulas. 5. RGD. I. Raffin Pohlmann, Adriana, orient. II. Pozza Silveira, Gustavo, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Esta tese é dedicada aos meus pais, Herto e Glades, que mesmo longe me deram a força necessária para continuar, e ao meu irmão Wellington, que com sua companhia tornou tudo mais fácil. Sem o amor, incentivo e apoio incondicional de vocês eu não teria conseguido.

AGRADECIMENTOS

À prof Adriana Pohlmann pela orientação dedicada, paciência, confiança e, sobretudo pelas oportunidades concedidas.

Ao professor Gustavo Silveira pela co-orientação e auxílio durante o desenvolvimento do trabalho.

Às professora Andréia Buffon e Sílvia Guterres pelas contribuições científicas e pela dedicação a esta tese.

À professora Eliana Lima (Universidade Federal de Goiás) que gentilmente abriu seu laboratório para a missão de curta duração do Programa PPGNanoFarma.

Aos colegas dos laboratórios 405 e K204 pelo companheirismo, troca de conhecimentos e pela ajuda sempre que solicitada.

À Aline Beckemcamp pela amizade e enorme ajuda com os estudos biológicos.

Aos amigos que o doutorado me deu, em especial a Camila Franco, Ana Carolina Asbahr, Márcia Adorne, Willian Prado, Natalia Mendonça, Taíse Ceolin, Fernanda Vieira, Manoel Ortiz e Francyne Kubaski, ficou mais fácil com o apoio de vocês.

Aos amigos de Santo Augusto, em especial Ana Carla Koehler, Ana Maria Zakszeski, Ana Laura Pizolotto e Ricardo Lorenzoni, pela amizade, incentivo e apoio de sempre.

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

RESUMO

A funcionalização de superfície nas nanocápsulas contendo doxorrubicina com o peptídeo RGD é uma estratégia promissora devido a ligação preferencial na integrina $\alpha_v\beta_3$ expressa em células tumorais. Este estudo objetivou o desenvolvimento, caracterização e estudos biológicos de nanocápsulas multiparedes com doxorrubicina e funcionalizadas com RGD. Para isso, na primeira etapa do trabalho foi realizada a síntese do peptídeo RGD. Os produtos obtidos foram caracterizados por análises de infravermelho e RMN de ^1H . Na segunda etapa foram desenvolvidas formulações de nanocápsulas com doxorrubicina ou cloridrato de doxorrubicina, e, nanocápsulas multiparedes revestidas com quitosana, íons zinco, RGD ou fenilalanina. Essas suspensões foram caracterizadas através da determinação do pH, diâmetro de partícula por diferentes técnicas, potencial zeta, eficiência de encapsulação e eficiência de associação do RGD na superfície da nanopartícula. Na terceira etapa, foram realizados ensaios de viabilidade celular por MTT após 24 e 72h com as formulações desenvolvidas em células de câncer de mama (MCF7) e glioblastoma humano (U87MG). As formulações apresentaram diferentes valores de citotoxicidade e, utilizando o Gráfico de Pareto foi possível determinar os fatores que exercem maior influencia. Em células MCF7 foi a concentração de fármaco e tempo de tratamento e, nas células U87MG além desses fatores, a funcionalização mostrou-se determinante. Além disso, foi avaliada a captação das nanocápsulas funcionalizadas com RGD e fenilalanina após 24h nas células tumorais e células de queratinócitos humanos (HaCat), com diferentes níveis de expressão da integrina $\alpha_v\beta_3$. O estudo mostrou menores valores de captação nas células HaCat (sem expressão de integrina $\alpha_v\beta_3$) para as duas formulações testadas. Finalmente as nanocápsulas funcionalizadas com RGD apresentaram maior captação em células U87MG com maior expressão da integrina $\alpha_v\beta_3$.

PALAVRAS-CHAVE: RGD, nanocápsulas, doxorrubicina, integrina $\alpha_v\beta_3$.

ABSTRACT

The surface functionalization in nanocapsules containing doxorubicin with RGD peptide is a promising strategy due to preferential binding in the $\alpha_v\beta_3$ integrin expressed on tumor cells. This study aimed the development, characterization, and biological studies of multiwall nanocapsules containing doxorubicin and functionalized with RGD. For this reason, in the first stage of this study the synthesis of RGD peptide was performed and the products characterized by infrared analysis and ^1H NMR. Besides, nanocapsules formulations were developed containing doxorubicin or doxorubicin hydrochloride, and multiwall nanocapsules coated with chitosan, zinc ions, RGD or phenylalanine. These suspensions were characterized by pH determination, particle diameter by different techniques, zeta potential, encapsulation efficiency, and association efficiency of RGD on the surface of the nanoparticle. Additionally, it was performed cell viability assays by MTT after 24 and 72 hours with formulations developed in breast cancer (MCF7) and human glioblastoma cells (U87MG). Formulations showed different cytotoxicity values. The Pareto chart was possible to determine factors that have more influence.

In MCF7 cells was drug concentration and treatment time, and U87MG cells, besides these factors, the functionalization was decisive. Furthermore, it was performed the cellular uptake of nanocapsules functionalized with RGD or phenylalanine after 24 hours in tumor cells and human keratinocyte cells (HaCaT), with different levels of expression $\alpha_v\beta_3$ integrin. The study showed less uptake in HaCaT cells (without expression $\alpha_v\beta_3$ integrin) for the two formulations applied, and the nanocapsules functionalized with RGD showed more uptake in U87MG cells, with higher expression of integrin $\alpha_v\beta_3$.

KEY-WORDS: RGD, nanocapsules, doxorubicin, $\alpha_v\beta_3$ integrin.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3 REVISÃO.....	13
3.1 Câncer	13
3.2 RGD	15
3.3 Nanotecnologia	17
4 REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas 5 décadas dezenas de agentes quimioterápicos tem sido testados como agentes únicos e em diferentes combinações para prevenção e tratamento do câncer (JIANG et al., 2011). O câncer é um problema de saúde pública e a principal causa de morte no mundo. Significativo progresso foi feito, mas a melhoria do diagnóstico com a detecção precoce e precisa dos tumores, assim como o desenvolvimento de terapias direcionadas e inovadoras continuam a ser pesquisados intensamente (SANCEY et al., 2009).

A baixa penetração dos fármacos antitumorais no tecido extravascular do tumor é na maioria das vezes um importante fator de limitação da eficácia dos tratamentos antitumorais (ALBERICI, ROTH e SUGAHARA, 2013). A doxorubicina (dox) é um dos fármacos antineoplásicos mais eficazes atualmente conhecidos. No entanto, a sua utilização clínica é limitada pela toxicidade dependente da dose (mielossupressão e cardiotoxicidade). Além do aparecimento de resistência a múltiplas drogas e sua baixa especificidade contra células cancerosas (PRADOS et al., 2012).

A nanotecnologia é uma alternativa promissora para superar as limitações na terapia do câncer, uma vez que foi demonstrada a redução nos efeitos secundários sistêmicos e o aumento da eficácia terapêutica dos fármacos. Ela consiste no estudo, criação e manipulação de materiais visando à obtenção de dispositivos com tamanho restrito à faixa nanométrica, conferindo propriedades diferenciadas (JAIN et al., 2005). A nanomedicina surgiu um campo da ciência dentro da nanotecnologia devido à necessidade de estratégias buscando melhorar propriedades biofarmacêuticas de moléculas bioativas após a sua administração (ALONSO et al., 2004).

De fato, os numerosos sistemas terapêuticos à base de nanocarreadores desenvolvidos nos últimos anos têm mostrado baixa toxicidade e a liberação sustentada do fármaco. Além disso, a grande variedade de sistemas de nanopartículas disponíveis pode proporcionar uma solução para os diferentes problemas encontrados durante o tratamento do câncer baseado em doxorubicina (PRADOS et al., 2012).

A maioria dos agentes antineoplásicos não diferenciam células cancerosas e normais, levando a toxicidade sistêmica e a diversos efeitos adversos. Assim, a geração de vetores específicos, capazes de levar um fármaco para o local do tumor e/ou metástase são, portanto, fundamentais para a terapia do câncer (SANCEY et al., 2009).

Estudos com nanopartículas tem focado na construção de sistemas multifuncionais, com elevado tempo de meia-vida no meio biológico, ao mesmo tempo, vetorizados ativamente para um sítio alvo, devido à presença, na superfície do nanocarreador, de um ligante específico contendo afinidade a um receptor super expresso na célula alvo (HALEY e FRENKEL, 2008; BIJU, 2014). O uso de peptídeos capazes de dirigir o fármaco para o tumor é um dos mais recentes sistemas desenvolvidos para melhorar o desempenho e segurança dos quimioterápicos (BIBBY et al., 2005).

Duas estratégias podem ser utilizadas para promover a construção do sistema conjugado peptídeo-nanocarreador. A primeira envolve a encapsulação da biomolécula em uma matriz polimérica biocompatível e biodegradável (KUBEK et al., 2009; WANG et al., 2008); enquanto que a segunda envolve a conjugação da proteína à superfície do nanocarreador (RANA et al., 2010). A construção desses sistemas traz consigo vantagens como a liberação controlada e sustentada de fármacos que evita tanto os efeitos colaterais, como a rápida depuração da substância e o aumento da concentração em tecidos específicos através da funcionalização do carreador para um órgão específico, por exemplo (ALLEN et al., 2004). A conjugação de peptídeos a superfície de nanopartículas pode, basicamente, ser desenvolvida por meio de duas abordagens: através da ligação covalente da proteína a superfície da nanopartícula ou ainda por interações não-covalentes entre a partícula e a proteína (DI MARCO et al., 2010).

O peptídeo RGD se liga preferencialmente a integrina $\alpha_v\beta_3$. Com isso tem sido investigado por mais de 15 anos conjugado a fármacos (BROOKS, CLARK e CHERESH, 1994). A integrina α_v (especialmente $\alpha_v\beta_3$) é um importante biomarcador conhecido por seu papel na progressão do câncer, pois são altamente expressos nas células endoteliais que revestem as células do tumor e mal expressas em células endoteliais e órgãos normais, tornando-se um potencial alvo para a estratégia anti-angiogênese (MURPHY e NAGASE, 2008). Assim, diversas nanopartículas poliméricas de doxorrubicina funcionalizadas com RGD foram desenvolvidas nos últimos anos (BIBBY et al., 2005; DANHIER et al., 2009; LOYER et al., 2013; QIAO et al., 2014; WANG et al., 2009; XU et al., 2011) projetadas para auxiliar o transporte de agentes de diagnóstico e/ou terapêutico para as células cancerosas.

Bender e colaboradores (2012; 2014) desenvolveram nanocápsulas multiparedes complexadas com íons metálicos que possibilitam a rápida e versátil funcionalização da

superfície de nanocápsulas. São compostas de um núcleo lipídico, uma parede de poliéster revestida com fosfolipídeos, que ligam uma segunda parede de quitosana, onde os íons metálicos são complexados, sendo assim capazes de conjugar em sua superfície diferentes espécies moleculares, como peptídeos RGD.

Nesse contexto, a realização do presente trabalho justifica-se através do desenvolvimento de nanopartículas multiparedes contendo doxorubicina e funcionalizadas com RGD para direcionamento em integrinas $\alpha_v\beta_3$ expressas em células tumorais.

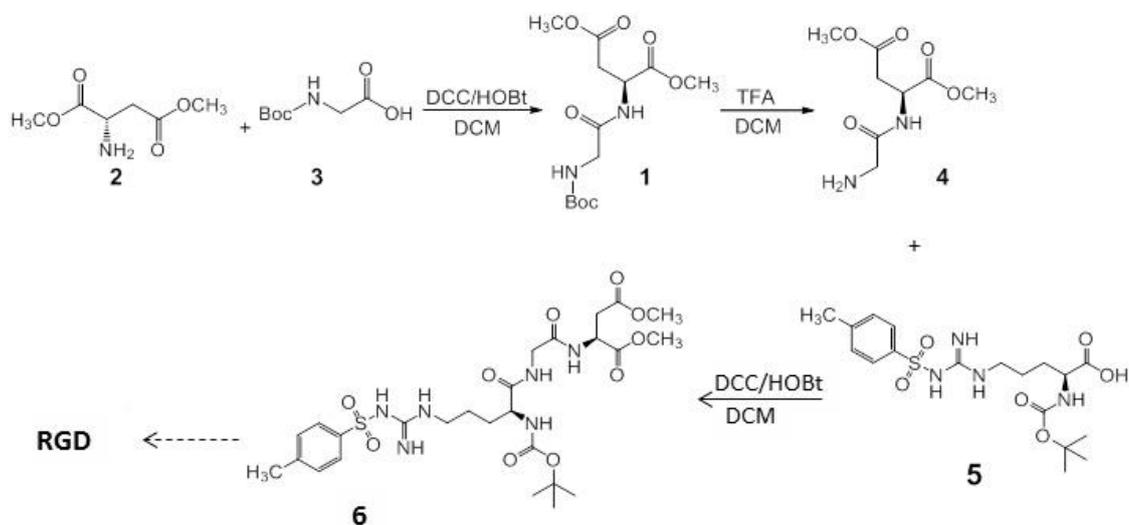
2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico contendo doxorrubicina revestidas com quitosana, íons zinco e funcionalizadas com o peptídeo RGD (RGD-MCMN(dox)), visando ao reconhecimento por integrinas $\alpha_v\beta_3$ presentes em células tumorais.

2.2 Objetivos específicos

- Obter a partir de síntese em solução o tripeptídeo RGD, que se liga preferencialmente em integrinas $\alpha_v\beta_3$ presentes em células tumorais. A rota sintética está descrita no Esquema 1.



Esquema 1: Rota sintética para obtenção do RGD

- Desenvolver nanocápsulas multiparedes contendo doxorrubicina e funcionalizadas com RGD (RGD-MCMN(dox)) para reconhecimento por integrinas $\alpha_v\beta_3$ presentes em células de câncer de mama (MCF-7) e glioma humano (U87MG).

3 REVISÃO

3.1 Câncer

Segundo dados da OMS, em 2012, o câncer esteve entre as principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 8,2 milhões de mortes. Espera-se para 2030 cerca de 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população. No Brasil, as estimativas para 2014, válidas também para o ano de 2015, apontam que ocorrerão mais de 576 mil novos casos de câncer. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira (182 mil casos novos), seguido pelos tumores de próstata (69 mil), de mama feminino (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e de colo do útero (15 mil) (INCA, 2014).

Uma célula normal passa por várias fases no seu ciclo celular, que é regulado de forma rígida por genes controladores do ciclo. Em uma célula que dará origem ao câncer, diferente de uma célula normal, ocorre a proliferação descontrolada de células decorrente de alterações no ácido desoxirribonucléico (DNA). O tumor é um aglomerado de células cancerosas, podendo ser de dois tipos: benigno e maligno. No primeiro caso, o câncer não atinge outros tecidos e no segundo caso, uma célula cancerosa se desprende do tumor atingindo a corrente sanguínea e, desta maneira, o tumor se torna capaz de invadir outros tecidos do corpo (LOPES, OLIVEIRA e PRADO, 2002).

Quando os tumores atingem cerca de 2 mm^3 , o aumento da pressão intersticial dentro do tumor inibe a difusão dos metabolitos e nutrientes necessários para o crescimento tumoral. Inicia-se então a angiogênese, um processo crítico que envolve a formação de novos vasos sanguíneos (DANHIER e BRETON, 2012).

O tumor vascularizado é estruturado, morfológicamente, de células bem oxigenadas próximas aos vasos sanguíneos e em constante proliferação, células necróticas situadas no centro do tumor e distantes da vascularização e por células em hipóxia que são localizadas entre as células oxigenadas e necróticas (OLIVEIRA e ALVES, 2002).

A integrina $\alpha_v\beta_3$ tem um papel importante na angiogênese, é expressa em células tumorais em padrões que podem ser alterados nos tumores, participando da adesão e da migração celular, processos envolvidos na metástase (HOOD e CHERESH, 2002). Podem influenciar o desenvolvimento celular em diversas condições biológicas e patológicas tais como embriogênese e diferenciação, morfogênese, crescimento tumoral e metástase, apoptose e cicatrização de ferimentos (YAMADA et al., 2003).

No câncer de mama, a superexpressão de integrina $\alpha_v\beta_3$ está associada com metástase óssea e induz ao aumento do crescimento tumoral; está também envolvida na regulação da resposta das células para quimioterapia, sendo um marcador de quimiosensibilidade. Em glioblastoma, essa integrina é super expressa na superfície do tumor, está associada com o aumento da motilidade celular e resistência a apoptose. (DANHIER e BRETON, 2012).

A quimioterapia é um tratamento a base de fármacos citotóxicos e sua eficácia é limitada pela toxicidade desses fármacos que não apresentam seletividade total para as células tumorais. Um dos fatores da resistência dos tumores sólidos a quimioterapia é a dificuldade do fármaco em alcançar as células em hipóxia. Para que isto aconteça o fármaco precisa atingir os vasos do tumor, atravessar a parede destes vasos em direção ao interstício e finalmente, se difundir pelo interstício em direção as células em hipóxia (OLIVEIRA e ALVES, 2002).

A doxorubicina é um antibiótico antraciclina, utilizado como fármaco citostático na quimioterapia. O fármaco é absorvido pelas células devido à difusão passiva através da membrana e, finalmente, se intercala nas cadeias de DNA, onde provoca a condensação da cromatina e inicia a apoptose (WEBER, WAGNER e SCHNECKENBURGER, 2013).

Amplamente utilizado para o tratamento de vários tipos de câncer, no entanto, seu uso é limitado devido aos efeitos tóxicos como mielossupressão e cardiotoxicidade que ocorrem com a utilização de doses cumulativas elevadas (YEZHELYEV et al., 2006). Com objetivo de melhorar a farmacocinética, farmacodinâmica e diminuir a toxicidades esse fármaco foi reformulado. As formulações MyocetTM (Elan Pharmaceuticals) e Doxil® (Ortho Biotech) com sistemas de liberação modificada foram aprovados para uso clínico e têm eficácias semelhantes com perfis de toxicidade melhorados em comparação com a doxorubicina (HARRIS et al., 2002).

3.2 RGD

Peptídeos RGD (Figura 1) são bem conhecidos por se ligarem preferencialmente a integrina $\alpha_v\beta_3$. Foi descoberto por Pierschbacher e Ruoslahti (1987) como a sequência peptídica mais eficiente para estimular a adesão celular sobre superfícies sintéticas através de mediadores como as integrinas (HERSEL, DAHMEN e KESSLER, 2003).

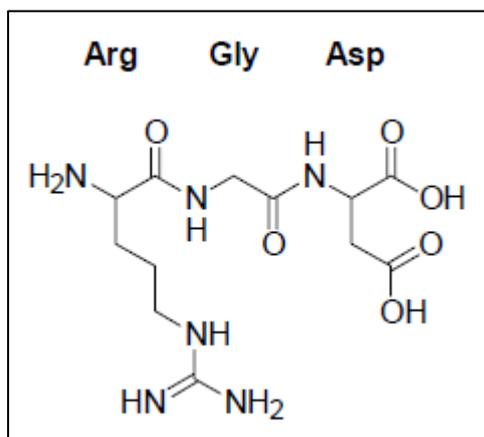


Figura 1: Estrutura química do peptídeo RGD (COLOMBO e BIANCHI, 2010)

Os peptídeos são compostos formados por aminoácidos que se unem através da ligação entre o grupamento α -carboxila de um aminoácido e o grupamento α -amino de outro para a formação de uma ligação amida (Figura 2).

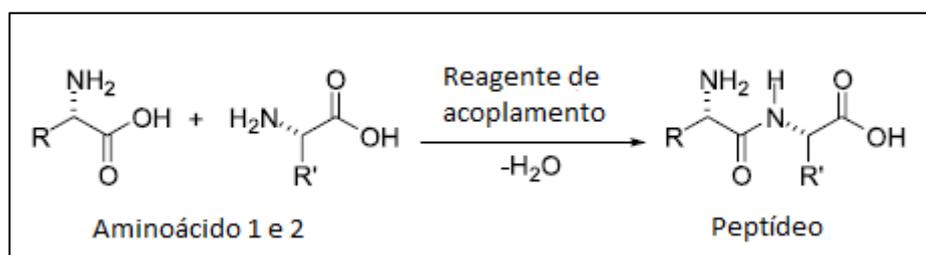


Figura 2: Formação da ligação peptídica (HAN e KIM, 2004).

Nessas reações de acoplamento, o grupamento α -carboxila é ativado por um reagente de acoplamento peptídico apropriado para posteriormente reagir com o grupamento α -amino do outro (HAN e KIM, 2004). No carbono α estão ligadas as cadeias laterais dos aminoácidos, que diferenciam-se em estrutura, tamanho e carga

elétrica, conferindo assim características distintas, influenciando na solubilidade e reatividade química dos peptídeos (NELSON e COX, 2006).

O RGD pode ser obtido de forma sintética ou adquirido comercialmente. São encontradas 3 metodologias de síntese distintas: síntese química, síntese enzimática (ou biocatalisada) e síntese via DNA (recombinante) (MACHADO et al., 2004). A síntese química pode ocorrer em solução (síntese clássica) ou na presença de um suporte polimérico (fase sólida).

Na síntese química somente um sítio ativo específico em cada um dos aminoácidos envolvidos na formação de uma nova ligação peptídica deve estar disponível para a reação de formação de produto desejado. Os grupos funcionais passíveis de sofrer reações laterais devem ser devidamente protegidos (MACHADO et al., 2004).

Um número bastante elevado de peptídeos biologicamente ativos foi sintetizado nos últimos anos, sendo a maioria referente a peptídeos obtidos pelo método de síntese química, seja em fase sólida ou solução (PINA, 2011).

A técnica de fase sólida é mais rápida que o método clássico em solução; contudo, são obtidas quantidades muito pequenas dos peptídeos (ABO-GHALIA et al., 2003). Outra desvantagem dessa técnica é a possibilidade de racemização do doador acila, agregação de cadeias peptídicas em reações secundárias (acúmulo de produtos laterais no peptídeo final cuja remoção é difícil, ou seja, baixa eficácia de purificação) e baixos rendimentos para peptídeos longos (MACHADO et al., 2004; SAKAKIBARA, 1999).

Na síntese em solução a desvantagem é o baixo rendimento final, decorrente do surgimento de produtos secundários, que são resultados de reações paralelas ou degradação dos reagentes. Além disso, a purificação dos produtos empregando evaporação, extração, cromatografia em coluna entre outras técnicas, conduzem também a diminuição do rendimento. Possuindo ainda como agravante as várias etapas reacionais necessárias (MARQUARDT e EIFLER-LIMA, 2001; MERRIFIELD, 1963)

Boisbrun e colaboradores (2008) desenvolveram procedimentos de síntese para RGD em solução com os C-terminais protegidos e em fase sólida com os C-terminais desprotegidos com objetivo de comparar as propriedades fotofísicas para uso na terapia fotodinâmica. Segundo eles, a proteção do C-terminal seria uma maneira de melhorar a afinidade a integrina $\alpha_v\beta_3$. Abo-Ghalia e colaboradores (2003) optaram por utilizar somente o método em solução e obtiveram rendimentos de 76% utilizando como

agentes de acoplamento DCCI/HOBt. Assim, descreveram um protocolo sintético simplificado e melhorado para este peptídeo, além de rendimento prático interessante para testes biológicos. Bem como, He e colaboradores (2006) que utilizaram como agentes de acoplamento DCC/HOBt, e Mel'nik e colaboradores (2006) que obtiveram rendimento de 65% com esses reagentes de síntese.

O crescente interesse nas aplicações biológicas do RGD é frequentemente prejudicada pela dificuldade de obtenção de uma conveniente sequencia de reações (ABO-GHALIA et al., 2003). Também já foram feitas várias modificações, incluindo polimerização, substituição por peptídeos miméticos e acoplamento com diversos tipos de carreadores, com objetivo de melhorar as propriedades anti-tumorais e alongar o tempo de degradação *in vivo* desse peptídeo (OKRÓJ et al., 2003).

Os peptídeos compõem proteínas biológicas, possuem função de reconhecimento celular e de controle de adesão, regulação (envolvendo a proliferação, diferenciação, sobrevivência ou apoptose), migração e a sinalização celular, influenciando atividades bioquímicas e enzimáticas. Ainda, agem na identificação de sítios biológicos ativos e na transdução de sinais celulares como fluxo iônico ou ativação de cascatas enzimáticas (MIN e MRKSICH, 2004).

Estratégias baseadas na sua entrega em células tumorais ou na vasculatura tumoral a partir da utilização do RGD apresenta-se como uma abordagem promissora para a entrega de medicamentos antineoplásicos ou agentes de contraste para o diagnóstico e terapia do câncer (DANHIER e BRETON, 2012). Segundo Broxterman e Hoekman (1999) o conjugado doxorubicina-RGD induz a morte celular via danos ao DNA e através da ativação da caspase-3 mediado diretamente pelo RGD.

3.3 Nanotecnologia

Nos últimos anos, várias abordagens para a melhoria da quimioterapia têm sido utilizados, incluindo a encapsulação de fármacos quimioterapêuticos em nanopartículas (NP) ou a terapia de combinação com substâncias sensibilizantes para apoptose (WEBER, WAGNER e SCHNECKENBURGER, 2013). O crescimento atual da nanotecnologia, especialmente o uso de NP se deve principalmente a melhora tanto na detecção precoce quanto no tratamento de inúmeras patologias como o câncer. O encapsulamento de fármacos em NP pode resultar no aumento da biodisponibilidade

dentro de tumores sólidos, resultante da diminuição do seu reconhecimento pelo sistema reticulo-endotelial e melhora da biodistribuição, bem como redução da toxicidade em órgão e tecidos saudáveis (LOYER et al., 2013).

Assim, um sistema de nanocarreadores adequado pode transportar fármaco ativos para as células cancerosas usando o fisiopatologia dos tumores, especialmente a sua permeabilidade aumentada e o microambiente do tumor (PRADOS et al., 2012). No entanto, apesar do resultados encorajadores, vários desafios precisam ser superados a fim de se obter NP com alta eficiência sitio-específica para a entrega de fármacos (LOYER et al., 2013).

Murphy e colaboradores (2008) demonstraram a partir do direcionamento de fármaco na vasculatura tumoral mediada por $\alpha_v\beta_3$ aumento de 15 vezes na atividade antimetastática com a utilização de nanopartículas de doxorrubicina funcionalizadas com RGD, sem a perda de peso associada a administração sistêmica da doxorrubicina livre. Demonstrando, assim, que o sistema de direcionamento de fármaco envolvendo NP associadas a ligantes para a integrina $\alpha_v\beta_3$ representa uma abordagem promissora para o tratamento de doenças metastáticas. Schiffelers e colaboradores (2003) também demonstraram a melhora na eficácia anti-tumoral com a utilização de lipossomas contendo doxorrubicina e funcionalizados com RGD para a vasculatura do câncer de cólon em ratos submetidos a xenotransplante.

No estudo de biosdistribuição e farmacocinética de NP poliméricas contendo doxorrubicina e RGD em ratos com modelo de tumor mamário foi verificado diminuição nas concentrações do fármaco no coração, pulmão, rim e plasma e níveis mais elevados do metabólito do fármaco no tumor, demonstrando, assim, a especificidade da NP (BIBBY et al., 2005).

As nanopartículas podem variar de acordo com o tamanho, a forma e a composição superficial que, por consequência, influenciará na sua capacidade de encapsulação, taxa de liberação, estabilidade e distribuição no meio biológico. Além disso, por se tratar de um veículo para a liberação de fármacos, é desejável que um nanocarreador seja construído por materiais biocompatíveis e biodegradáveis e que seus produtos de degradação não desencadeiem efeitos tóxicos no organismo (HALEY e FRENKEL, 2008).

A conjugação de um ligante à superfície de um nanocarreador pode ser estabelecida tanto por ligação covalente, como por interação eletrostática ou por forças de Van der Waals. É importante ressaltar que a construção desses sistemas híbridos deve ser realizada, preferencialmente, por métodos que não comprometam a estrutura da nanopartícula, a funcionalidade e afinidade do ligante por seu receptor. Além disso, é necessário que os componentes presentes na superfície da partícula não interfiram na atividade do ligante, devido ao impedimento estérico que pode ser causado, por exemplo, pela presença das cadeias hidrofílicas do polímero utilizado para a estabilização da partícula (TORCHILIN et al., 2006). Nesse sentido, interações nanopartícula-ligante mediada por espécies metálicas tem mostrado ser eficaz na conjugação sítio específica, proporcionando a integridade do sistema (ABAD et al., 2005; BRESOLIN et al., 2009).

Entre os nanocarreadores citados na literatura destacamos as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) que consistem em sistemas vesiculares submicrométricos, compostos por um núcleo formado pela dispersão de monoestearato de sorbitano e triglicerídeos de cadeia média, rodeados por uma parede polimérica de poli(ϵ -caprolactona) e estabilizados por um sistema tensoativo, previamente desenvolvido por Jäger *et al.* (2009). A aplicação desses sistemas na terapêutica tem sido extensivamente estudada e mostrado efeitos biológicos promissores como transporte de fármacos para tecidos inflamados, transpor barreiras biológicas com a liberação de fármaco diretamente no cérebro, bem como, redução na viabilidade de células tumorais (BERNARDI et al., 2009; FROZZA et al., 2010; POHLMANN et al., 2013; BERNARDI et al., 2013; YURGEL et al., 2015).

Bender e colaboradores (2012) desenvolveram LNCs com superfície modificada. Primeiramente foram combinados tensoativos não iônicos, como o polissorbato 80, com tensoativos aniônicos, como a lecitina de soja, levando a formação de nanocápsulas contendo potencial zeta negativo devido à presença na interface partícula/água do ácido fosfatídico. Assim, foi possível o revestimento desses nanocarreadores com o polímero catiônico quitosana, por meio de interações eletrostáticas, obtendo-se nanocápsulas com superfície catiônica. Tendo em vista a capacidade da quitosana em complexar íons metálicos (REYNAUD et al., 2011) foi possível construir um sistema multifuncional com íons metálicos servindo como base para a ligação em sua superfície de moléculas e/ou biomoléculas farmacologicamente ativas. Esse novo sistema nanocarreador foi

nomeado “*Metal Complex Multi-wall Nanocapsules*” (MCMN) (BENDER et al., 2012; 2014).

Neste contexto, este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento e a caracterização físico-química de nanocápsulas multiparede de doxorrubicina complexadas com zinco e funcionalizadas com RGD para reconhecimento por integrinas $\alpha_v\beta_3$ presentes nas células tumorais. A eficiência do sistema nanotecnológico desenvolvido será demonstrada a partir de testes biológicos de viabilidade celular em linhagens tumorais com diferentes expressões da integrina $\alpha_v\beta_3$. Serão utilizadas células MCF7 (câncer de mama) e U87MG (glioma humano), bem como, serão realizados estudos de captação celular com células não tumorais (células de queratinócitos humano – HaCat)

4 REFERÊNCIAS

ABAD, J.M.; MERTENS, S.F.L.; PITA, M.; FERNANDEZ, V.M.; SCHIFFRIN, D.J. Functionalization of thioctic acid-capped gold nanoparticles for specific immobilization of histidine-tagged proteins. **Journal of the American Chemical Society**. v. 127, p. 5689-5694, 2005.

ABO-GHALIA, M.; ABD EL-RAHMAN, S.; EL-KAFRAWY, A.; KALOMUCH, A. Optimized conventional synthesis of “RGD” and “RGDS” peptides and their sarcosine mimics as integrin GP IIb/IIIa antagonists. **Amino acids**, v. 24, n. 4, p. 405–11, 2003.

ADDERLEY, S. R.; Desmond, J.; Fitzgerald, D. J. Glycoprotein IIb / IIIa Antagonists Induce Apoptosis in Rat Cardiomyocytes by Caspase-3 Activation Glycoprotein IIb / IIIa Antagonists Induce Apoptosis in Rat Cardiomyocytes by Caspase-3 Activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n.8, p. 5760-5766, 2000.

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

ALIBOLANDI, M.; RAMEZANI, M.; SADEGHI, F.; ABNOUS, K.; HADIZADEH, F. **Epithelial cell adhesion molecule aptamer conjugated PEG-PLGA nanopolymerosomes for target delivery of doxorubicin to human breast adenocarcinoma cell line *in vitro***. *Pharmaceutical Nanotechnology*, v. 479, p. 241-251, 2015.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**.v. 303, p. 1818-1822, 2004.

ALBERICI, L.; ROTH, L.; SUGAHARA, K. N. De Novo Design of a Tumor-Penetrating Peptide. **Cancer Research**, p. 804-812, 2013.

ALMEIDA, V. L. D.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, D. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

ALONSO, M. J. D. Nanomedicines for overcoming biological barriers, **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 58, p. 168–172, 2004.

ALTREUTER, D. H.; DORDICK, J. S.; CLARK, D. S. Nonaqueous Biocatalytic Synthesis of New Cytotoxic Doxorubicin Derivatives: Exploiting Unexpected Differences in the Regioselectivity of Salt-Activated and Solubilized Subtilisin. **Journal of American Chemical Society**, v. 124, n. 9, p. 1871–1876, 2002.

ARAP, W.; PASQUALINI, R.; RUOSLAHTI, E. Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model. **Science**, v. 279, p. 377–380, 1998.

AROUI, S.; BRAHIM, S.; WAARD, M.D.; et al. Cytotoxicity, intracellular distribution and uptake of doxorubicin and doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides in different cell lines: A comparative study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 391, p. 419-425, 2010.

BENDER, E. A.; ADORNE, M. D.; COLOMÉ, L. M.; ABDALLA, D. S. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, n. 1-2, p. 271–279, 2012.

BENDER, E. A.; CAVALCANTE, M. F.; ADORNE, M. D.; COLOMÉ, L. M.; GUTERRES, S. S.; ABDALLA, D. S. P.; POHLMANN, A. R. New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles : one-pot synthesis of scFv anti-LDL (-) - functionalized nanocapsules. **Pharmaceutical research**, 2014.

BERNARDI, A.; ZILBERSTEIN, A.C.C.V; JÄGER, E.; CAMPOS, M. M.; MORRONE, F. B.; CALIXTO, J. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. **British Journal of Pharmacology**. v.158, p. 1104-1111, 2009.

BERNARDI, A.; FROZZA, R.L.; HOPPE, J.B; et al. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 711-729, 2013.

BIBBY, D. C.; TALMADGE, J. E.; DALAL, M. K.; KURZ, S. G.; CHYTIL, K. M.; BARRY, S. E.; SHAND, D. G.; STEIERT, M. Pharmacokinetics and biodistribution of RGD-targeted doxorubicin-loaded nanoparticles in tumor-bearing mice. **International journal of pharmaceutics**, v. 293, n. 1-2, p. 281–90, 2005.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos (IMAC) de biomoléculas: Aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**. v. 32(5), p. 1288-1296, 2009.

BOISBRUN, M.; VANDERESSE, R.; ENGRAND, P.; OLIÉ, A.; HUPONT, S.; REGNOUF-DE-VAINS, J.; FROCHOT, C. Design and photophysical properties of new RGD targeted tetraphenylchlorins and porphyrins. **Tetrahedron**, v. 64, n. 16, p. 3494–3504, 2008.

BROOKS, P. C., CLARK, R. A., CHERESH, D. A. Requirement of vascular integrin α v β 3 for angiogenesis. **Science**, 264, p. 569–71, 1994.

BROXTERMAN, H. J.; HOEKMAN, K. Direct activation of caspases by RGD-peptides may increase drug sensitivity of tumor cells. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 2, p. 139–141, 1999.

BUCKLEY, C. D.; PILLING, D.; HENRIQUEZ, N. V.; PARSONAGE, G.; THRELFALL, K.; SCHEEL-TOELLNER, D.; SIMMONS, D. L.; AKBAR, A. N.; LORD, J. M.; SALMON, M. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. **Nature**, v. 397, n. 6719, p. 534–9, 1999.

COLOMBO, M. e BIANCHI, A. Click chemistry for the synthesis of RGD-containing integrin ligands. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 1, p. 178–97, 2010.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L.B.; FRAGA, M.; KOESTER, L.S.; TEIXEIRA, H.F. Nanoemulsoes como sistemas de liberaç o parenteral de f armacos. **Qu mica Nova**. v. 35(9), p. 1827-1840, 2012.

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences** , v. 85, n. 5, p. 530-536 , 1996.

CASTEL, S.; PAGAN, R.; MITJANS, F.; PIULATS, J.; GOODMAN, S.; JONCZYK, A.; HUBER, F.; VILAR O, S.; REINA, M. RGD Peptides and Monoclonal Antibodies , Antagonists of α_v -Integrin , Enter the Cells by Independent Endocytic Pathways. **Laboratory Investigation**, v. 81, n. 12, p. 1615–1626, 2001.

CARONI, A. L. P. F.; DE LIMA, C. R. M.; PEREIRA, M. R.; FONSECA, J. L. C. Tetracycline adsorption on chitosan: A mechanistic description based on mass uptake and zeta potential measurements. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 100, p. 222– 228, 2012.

CHAR O, M.F.; SOUTO, C.; BRUCKER, N.; et al. Caenorhabditis elegans as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid core nanocapsules on paraquat damage. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5093-5106, 2015.

CHEN, R.; KHORMAEE, S.; ECCLESTON, M.E. et al. The role of hydrophobic amino acid grafts in the enhancement of membrane-disruptive activity of pH-responsive pseudo-peptide. **Biomaterials**, v. 30, p.1954-1961, 2009.

CHEN, J.; XU, X.; CHEN, W.; ZHANG, X. Multi-Functional Envelope-Type Nanoparticles Assembled from Amphiphilic Peptidic Prodrug with Improved Anti-Tumor Activity. **American Chemical Society**, v. 6, p. 593-598, 2014.

CHUEHA P. J., RUEI-YUE LIANGA, YI-HUI LEEA, ZIH-MING ZENGA, SHOW-MEI CHUANGA, Differential cytotoxic effects of gold nanoparticles in different mammalian cell lines. **Journal of Hazardous Materials** v.264,p. 303,312, 2014.

CROMMELIN, D. J. A.; BLOOIS, L. V. Preparation and characterization of doxorubicin-containing liposomes . II . Loading capacity , long-term stability and doxorubicin-bilayer interaction mechanism. **International journal of pharmaceutics**, v. 17, p. 135–144, 1983.

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; COSTA, T. D.; MEZZALIRA, G.; DA SILVEIRA, N. P.;

GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198–205, 2006.

DANHIER, F.; BRETON, A. L.; PRÉAT, V. RGD-Based Strategies To Target Alpha (v) Beta (3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9 p. 2961-2973, 2012.

DANHIER, F.; VROMAN, B.; LECOUTURIER, N.; CROKART, N.; POURCELLE, V.; FREICHELS, H.; JÉRÔME, C.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; FERON, O.; PRÉAT, V. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with paclitaxel. **Journal of controlled release**, v. 140, p. 166-170, 2009.

DE LIMA, C.R.M; PEREIRA, M.R.; FONSECA, J.L.C. Equilibrium and kinetic aspects of sodium cromoglycate adsorption on chitosan: Mass uptake and surface charging considerations. **Coloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 109, p. 52-58, 2013.

DEDHAR, S.; RUOSLAHTI, E. e PIERSCHBACHER, M. D. A cell surface receptor complex for collagen type I recognizes the Arg-Gly-Asp sequence. **The Journal of cell biology**, v. 104, n. 3, p. 585–93, 1987.

DELAVI, D.G.G. **Defloculação de suspensões aquosas de argila e sua correlação com caracterizações químicas e de superfície**. Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado, 2011.

DI MARCO, M.; SHAMSUDDIN, S.; RAZAK, K.A.; AZIZ, A. A.; DEVAUX, C.; BORGHI, E.; LEVY, L.; SADUN, C. Overview of the main methods used to combine proteins with nanosystems: absorption, bioconjugation, and encapsulation. **International Journal of Nanomedicine**. v. 5, p. 37-49, 2010.

DOMB, ABRAHAM J.; TABATA, YASUHIKO; KUMAR, M. N. V. RAVI; FARBER, SHIMON. **Nanoparticles for pharmaceutical applications**. 1. ed. Stevenson Ranch: American Scientific Publishers, p. 92-93, 2007.

ELSAESSER, A.; TAYLOR, A.; DE YANES, G.S.; MCKERR, G.; KIM, E.M.; O'HARE, E.; HOWARD. C.V. Quantification of nanoparticle uptake by cells using microscopical and analytical techniques. **Nanomedicine**, v.5, p.1447–1457, 2010.

FESSI, H.; PUISIUEX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formulation by interfacial deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FIEL, L.A.; REBÊLO, L.M.; SANTIAGO, T.M.; ADORNE, M.D.; GUTERRES, S.S.; SOUSA, J.S.; POHLMANN, A.R. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. **Soft Matter**. v.7, p. 7240-7247, 2011.

FIEL, L. A. ; ADORNE, MÁRCIA D. ; GUTERRES, SÍLVIA S. ; NETZ, PAULO A. ; POHLMANN, A. R. ; POHLMANN, ADRIANA R. . Variable temperature multiple light scattering analysis to determine the enthalpic term of a reversible agglomeration in

submicrometric colloidal formulations: A quick quantitative comparison of the relative physical stability. **Colloids and Surfaces. A**, v. 431, p. 93-104, 2013.

FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**. v. 27(5), p. 796-810, 2010.

FIGUEIRA, F. A. S. **Novos Complexos Organometálicos de Re(I)/^{99m}Tc(I) Contendo derivados da L-Arginina: Síntese, Caracterização e Avaliação da Actividade Enzimática.** Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências Departamento de Química e Bioquímica (Mestrado em Química Inorgânica Médica), 2008.

FURLÁN, R. L. E.; MATA, E. G.; MASEARETTI, O. A. Selective Detachment of Boc-Protected Amino Acids and Peptides from Merrifield , PAM and Wang Resins by Trimethyltin Hydroxide. **Tetrahedron**, v. 54, p. 13023–13034, 1998.

FRISCH, S. M. e FRANCIS, H. Disruption of Epithelial Cell-Matrix Interactions Induces Apoptosis. **The Journal of cell biology**, v. 124, n. 4, p. 619–626, 1994.

FROZZA, R. L.; BERNARDI, A.; PAESE, K.; HOPPE, J. B.; SILVA, T.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; SALBEGO, C. Characterization of trans-Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules and Tissue Distribution Studies in Rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 6, p. 1–10, 2010.

GREULICH, C.; DIENDORF, J.; SIMON, T.; EGGELER, G.; EPPLE, M.; KOLLER, M. Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. **Acta Biomaterialia**, v.7, p.347–354, 2011.

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J.-P.; PUISIEUX, F. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 1, p. 57-63, 1995.

HALEY, B.M.D. & FRENKEL, E.M.D. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. v. 26, p. 57–64, 2008.

HAO, G.; SUN, X.; DO, Q. N.; OCAMPO-GARCIA, B.; VILCHIS-JUÁREZ, A.; FERRO-FLORES, G.; LÉON-RODRÍGUEZ, L. M. D. Cyclization of RGD peptide sequences via the macrocyclic chelator DOTA for integrin imaging. **Dalton Trans**, v. 41, p. 14051–14054, 2012.

HARRIS, L.; BATIST, G.; BELT, R.; ROVIRA, D.; NAVARI, R.; AZARNIA, N.; WELLES, L.; WINER, E. Liposome-Encapsulated Doxorubicin Compared with Conventional Doxorubicin in a Randomized Multicenter Trial as First-Line Therapy of Metastatic Breast Carcinoma. **American Cancer Society**, v. 1, p. 26-36, 2002.

HAN, S. e KIM, Y. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. **Tetrahedron**, v. 60, n. 672, p. 2447–2467, 2004.

HE, G.; GUO, L.; MA, L. F. Synthesis of Novel Dendrimers Containing Amino Acids and Peptides. **Chinese Chemical Letters**, v. 17, n. 3, p. 289–292, 2006.

HERSEL, U.; DAHMEN, C. e KESSLER, H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4385–4415, 2003.

HOUEN, G.; STRUVE, C.; SØNDERGAARD, R.; FRIIS, T.; ANTHONI, U.; NIELSEN, P. H.; CHRISTOPHERSEN, C.; PETERSEN, B. O.; DUUS, J. Substrate specificity of the bovine serum amine oxidase and in situ characterisation of aminoaldehydes by NMR spectroscopy. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 11, p. 3783–96, 2005.

HO, V.H.B; SLATER, N.K.H.; CHEN, R. pH-responsive endosomolytic pseudo-peptides for drug-delivery to multicellular spheroids tumour models. **Biomaterials**, v. 32, p. 2953-2958, 2011.

HOOD, J. D.; CHERESH, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. **Nature Reviews**, v. 2, p. 1–10, 2002.

HOOLER, F. JAMES; SKOOG, A. DOUGLAS; CROUCH, R. STANLEY. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HUANG, F.; WU, X.; CHEN, J. I. E.; WANG, W. LU, Z. Resveratrol reverses multidrug resistance in human breast cancer doxorubicin-resistant cells. **Experimental and therapeutic medicine**, p. 1611–1616, 2014.

HUANG, T.; HUANG, H.; CHANG, C.; CHANG, H.; OU, C.; HSU, C.; CHEN, S.; JUAN, H. An apoptosis-related gene network induced by novel compound-cRGD in human breast cancer cells. **FEBS letters**, v. 581, n. 18, p. 3517–22, 2007.

ICH – INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1), 2005.

JÄGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Sustained Release from Lipid-Core Nanocapsules by Varying the Core Viscosity and the Particle Surface Area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 130–140, 2009.

JAIN, K.K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. **Clinica Chimica Acta**. v. 358 (1-2), p. 37-54, 2005.

JANES, K.; FRESNEAU, M. P.; MARAZUELA, A.; FABRA, A.; ALONSO, M. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. **Journal of controlled release**, v. 73, n. 2-3, p. 255–67, 2001.

JONES, C.; GRAINGER, D. W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.61, p.438-456, 2009.

JULIANO, L. Química de peptídeos: Uma breve revisão dos processos de síntese. **Química Nova**, v. 13, n. 3, p. 176–190, 1990.

KANE, B. E.; GRANT, M. K. O.; EL-FAKAHANY, E. E.; FERGUSON, D. M. Synthesis and evaluation of xanomeline analogs--probing the wash-resistant phenomenon at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 3, p. 1376–92, 2008.

KIM, D.; LEE, E. S.; OH, K. T.; GAO, Z. G.; BAE, Y. H. Doxorubicin-loaded polymeric micelle overcomes multidrug resistance of cancer by double-targeting folate receptor and early endosomal pH. **Small**, v. 4, n. 11, p. 2043–50, 2008.

KOIVISTO, L.; LARJAVA, K.; HÄKKINEN, L. et. al. Different integrins mediate cell spreading and lateral migration of HaCat keratinocytes on fibronectin. *Cell Adhesion and Communication*, v. 7, n. 3, p. 245-257, 1999.

KONO K, AKIYAMA H, TAKAHASHI T, TAKAGISHI T, HARADA A. Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery. **Bioconjugate Chemistry**, v. 16, p. 208-214, 2005.

KUBEK, M.J.; DOMB, A.J.; VERONESI, M.C. Attenuation of kindled seizures by intranasal delivery of neuropeptide-loaded nanoparticles. **The American Society for Experimental NeuroTherapeutics**. v. 6, pg. 359-371, 2009.

LAMPRECHT, A.; BENOIT, J. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *Journal of Controlled Release*, v. 112, p. 208-213, 2006.

LIECHTY WB, CHEN R, FARZANEH F, TAVASSOLI M, SLATER NK. Synthetic pH-responsive polymers for protein transduction. **Advanced Materials**, v. 21, 2009.

LIN, R.; DAYANANDA, K.; CHEN, T.; CHEN, C.; LIU, G.; LIN, K.; WANG, Y. Targeted RGD nanoparticles for highly sensitive in vivo integrin receptor imaging. **Contrast media & molecular imaging**, v. 7, n. 1, p. 7–18, 2012.

LINCE, F.; BOLOGNESI, S.; STELLA, B.; MARCHISIO, D. L.; DOSIO, F. Preparation of polymer nanoparticles loaded with doxorubicin for controlled drug delivery. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 11, p. 2410–2419, 2011.

LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M.; PRADO, C. B. C. Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 2, n. 2, 2002.

LOYER, P.; BEDHOUCHE, W.; WEI, Z.; CAMMAS-MARION, S. Degradable and biocompatible nanoparticles decorated with cyclic RGD peptide for efficient drug delivery to hepatoma cells in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 2, p. 727–737, 2013.

- LOZANO, M.V.; TORRECILLA, D.; TORRES, D. et al. Highly efficient system to deliver taxanes into tumor cells: docetaxel-loaded chitosan oligomer colloidal carriers. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2186-2193, 2008.
- LI, J. e SHA, Y. A Convenient Synthesis of Amino Acid Methyl Esters. **Molecules**, v. 13, n. 5, p. 1111–1119, 2008.
- MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Sínteses Química e Enzimática de Peptídeos: Princípios Básicos e Aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781–789, 2004.
- MARQUARDT, M. e EIFLER-LIMA, V. L. A Síntese Orgânica em Fase Sólida e seus Suportes Poliméricos mais Empregados. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 846–855, 2001.
- MEL'NIK, O. V.; MARTINOVICH, V. P. e GOLUBOVICH, V. P. The structure-antiaggregative activity relationship in a series of Arg-Gly-Asp analogues. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 122–128, 2006.
- MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Synthesis of a Tetrapeptide**, v. 85, p. 2149–2154, 1963.
- MIN, D. e MRKSICH, M. Peptide arrays : towards routine implementation. **Current opinion in cell biology**, v. 8, p. 554–558, 2004.
- MENG, H.; LIONG, M.; XIA, T.; LI, Z.; JI, Z.; ZINK, J. I.; NEL, A. E. Engineered Design of Mesoporous Silica Nanoparticles to Deliver Doxorubicin and P-Glycoprotein siRNA to Overcome Drug Resistance in a Cancer Cell Line. **ACS nano**, v. 4, n. 8, p. 4539–4550, 2010.
- MEHNERT, W.; MÂDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47 , n. 2-3, p. 165-196 , 2001.
- MILLER, I.S.; LYNCH, I.; DOWLING, D.; DAWSON, K.A.; GALLAGHER, W.M. Surface-induced cell signaling events control actin rearrangements and motility. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.93, p.493 – 504, 2010.
- MISSIRLIS, D.; KAWAMURA, R.; TIRELLI, N.; HUBBELL, J. A. Doxorubicin encapsulation and diffusional release from state, polymeric, hydrogel nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 120-129, 2006.
- MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDRAY, H.; PUISIEUX, F.; BARRAT, G. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 614–626, 2000.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MURPHY, E. A.; MAJETI, B. K.; BARNES, L. A.; MAKALE, M.; WEIS, S. M.; LUTU-FUGA, K.; WRASIDLO, W.; CHERESH, D. A. Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor vasculature suppresses metastasis. **PNAS**, v. 105, n. 27, p. 9343–9348, 2008.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, p. 290-308, 2008.

NIGAM, S.; BARICK, K. C.; BAHADUR, D. Journal of Magnetism and Magnetic Materials Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles : Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 323, n. 2, p. 237–243, 2011.

NELSON, D. L. e COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 4^a ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, 2006.

OKRÓJ, M.; DOBRZANSKA-PAPROCKA, Z.; ROLKA, K.; BIGDA, J. In vitro and in vivo analyses of the biological activity of RGD peptides towards AB Bomirski Melanoma. **Cellular e Molecular Biology Letters**, v. 8, p. 873–884, 2003.

Official Journal of the European Union. ISSN 1977-0677. 54 (2011) L 275.

OLIVEIRA, R. B. De e ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 976–984, 2002.

OLIVEIRA, C.P.; VENTURINI, C.G.; DONIDA, B.; POLETTO, F.S.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN A.R. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**. v. 9, p. 1141-1150, 2013.

PIETKIEWICZ, J. ; ZIELIŃSKA, K.; SACZKO, J.; KULBACKA, J.; MAJKOWSKI, M.; WILK, K. New approach to hydrophobic cyanine-type photosensitizer delivery using polymeric oil-cored nanocarriers: hemolytic activity, in vitro cytotoxicity and localization in cancer cells. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 39, n. 5, p. 322–35, 2010.

PISANIC, T.R.; BLACKWELL, J.D.; SHUBAYEV, V.I.; FIÑONES, R.R.; JIN, S. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. **Biomaterials**, v.28, p.2572 - 2581, 2007.

PLANK, C.; OBERHAUSER, B.; MECHTLER, K.; et al. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 17, p. 12918-12924, 1994.

POHLMANN, A. R.; FONSECA, F. N.; PAESE, K.; DETONI, C. B.; CORADINI, K.; BECK, R. C. R; GUTERRES, S. S. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**. v. 10, p. 623-638, 2013.

PATRA, P.; MITRA, S.; GUPTA, A.D; et al. Simple synthesis of biocompatible biotinylated porous hexagonal ZnO nanodisc for target doxorubicin delivery against

breast cancer cell: *in vitro* and *in vivo* cytotoxic potential. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 133, p. 88-98, 2015.

PRADOS, J.; MELGUIZO, C.; ORTIZ, R.; VÉLEZ, C.; ALVAREZ, P. J.; ARIAS, J. L.; RUÍZ, M. A.; GALLARDO, V.; ARANEGA, A. Doxorubicin-Loaded Nanoparticles: New Advances in Breast Cancer Therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, n. 1, p. 1058–1070, 2012.

PIERSCHBACHER, M. D. e RUOSLAHTI, E. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 36, p. 17294–8, 1987.

PINA, M. S. **Imobilização de Sequência Peptídica RGD na Superfície de Filmes de PHBV por Síntese Orgânica em Fase Sólida**. Universidade Federal do Rio de Janeiro (Mestrado em Ciências e Engenharia Metalúrgica e de Materiais), 2011.

QIAO, Z.; QIAO, S.; FAN, G.; FAN, Y.; CHEN, Y.; WANG, H. One-pot synthesis of pH-sensitive poly(RGD-co- β -amino ester)s for targeted intracellular drug delivery. **Polymer Chemistry**, v. 5, p. 844–853, 2014.

RANA, S.; YEH, Y. C.; ROTELLO, V. M. Engineering the nanoparticle–protein interface: applications and possibilities. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 14, p. 828–834, 2010.

REYNAUD, F.; TSAPIS, N.; DEYME, M.; VASCONCELOS, T.G.; GUEUTINN, C.; GUTERRES S.S.; POHLMANN, A.R.; FATTAL, E. Spray-dried chitosan-metal microparticles for ciprofloxacin adsorption: Kinetic and equilibrium studies. **Soft Matter**. v. 7, p. 7304-7312, 2011.

RIBANI, M.. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RUOSLAHTI, E. RGD and other recognition sequences for integrins. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 12, p. 697–715, 1996.

SANCEY, L.; DUFORT, S.; JOSSERAND, V.; KERAMIDAS, M.; RIGHINI, C.; ROME, C.; FAURE, A. C.; FOILLARD, S.; ROUX, S.; BOTURYN, D.; TILLEMENT, O.; KOENIG, A.; BOUTET, J.; RIZO, P.; DUMY, P.; COLL, J. L. Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, p. 309–16, 2009

SCHIFFELERS, R. M.; KONING, G. A.; TIMO, L. M.; JANSSEN, P. C. A.; KOK, R. J.; MOLEMA, G.; STORM, G. A nti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. **Journal of Controlled Release**, v. 91, p. 115–122, 2003.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; DE LUCCA FREITAS, L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SINGH, N.; MANSHIAN, B.; JENKINS, G.J.S.; GRIFFITHS, S.M; WILLIAMS, P.M.; MAFFEIS, T.G.G.; WRIGHT, C.J.; DOAK, S.H. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, v.30, p.3891–3914, 2009.

SOENEN, S.J.; DE CUYPER, M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v.4, p.207 - 219, 2009.

SUN, H.; CHENG, R.; DENG, C.; MENG, F.; DIAS, A.A.; HENDRIKS, M.; FEIJEN, J.; ZHONG, Z. Enzymatically and reductively degradable α -amino acid-based poly(ester amide)s: Synthesis, cell compatibility, and intracellular anticancer drug delivery. **Biomacromolecules**, v. 16, p. 597-605, 2015.

SAKAKIBARA, S. Chemical Synthesis of Proteins in Solution. **Biopolymers**, v. 51, p. 279–296, 1999.

SAMANEN, J.; ALI, F.; ROMOFF, T.; CALVO, R.; SORENSON, E.; VASKO, J.; STORER, B.; BERRY, D.; BENNETT, D.; STROHSACKER, M.; POWERS, D.; STADEL, J.; NICHOLS, A. Development of a small RGD peptide fibrinogen receptor antagonist with potent antiaggregatory activity in vitro. **Journal of medicinal chemistry**, v. 34, n. 10, p. 3114–25, 1991.

TAVARES-VALENTE, D.; BALTAZAR, F.; MOREIRA, R.; QUEIRÓS, O. Cancer cell bioenergetics and pH regulation influence breast cancer cell resistance to paclitaxel and doxorubicin. **Journal Bioenergetics Biomembranes**, 2013.

THIELE L, MERKLE HP, WALTER E. Phagocytosis and phagosomal fate of surface-modified microparticles in dendritic cells and macrophages. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 221–228, 2003.

TORCHILIN, V.P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 58, p. 1532–1555, 2006.

TOMANKOVA, K.; POLAKOVA, K.; PIZOVA, K., et al. In vitro cytotoxicity analysis of doxorubicin-loaded/superparamagnetic iron oxide colloidal nanossemblies on MCF and NIH3T3 cell lines. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 949-961, 2015.

VASIR, J.K.; LABHASETWAR, V. Quantification of the force of nanoparticle–cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles. **Biomaterials**, v.29, p.4244–4252, 2008.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1-3, p. 200–208, 2011.

VIGOROV, A. Y.; VIGOROV, A. Y.; DEMIN, A. M.; NIZOVA, I. A.; KRASNOV, V. P. Synthesis of Derivatives of the RGD Peptide with the Residues of Glutaric and Adipic Acids. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 157–165, 2014.

WALKER, L. ; PERKINS, E.; KRATZ, F.; RAUCHER, D. Cell penetrating peptides fused to a thermally targeted biopolymer drug carrier improve the delivery and antitumor efficacy of an acid-sensitive doxorubicin derivative. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 825–832, 2012.

WANG, Y.C.; WU, H. Y.; HUANG, H.Y.; LIN, H.; LO, L.W.; TZENG, S.F.; YANG, C.S. Sustained intraspinal delivery of neurotrophic factor encapsulated in biodegradable nanoparticles following contusive spinal cord injury. **Biomaterials**. v. 29, p. 4546–53. 2008.

WANG, Z.; CHUI, W.; HO, P. C. Design of a Multifunctional PLGA Nanoparticulate Drug Delivery System : Evaluation of its Physicochemical Properties and Anticancer Activity to Malignant Cancer Cells. v. 26, n. 5, p. 1162–1171, **Pharmaceutical Research**, 2009.

WANG, J., MA, W., TU, P. Synergistically Improved Anti-tumor efficacy by co-delivery doxorubicin and curcumin polymeric micelles. *Macromolecular Bioscience*, v.15, p. 1252-1261, 2015.

WEBER, P.; WAGNER, M. e SCHNECKENBURGER, H. Cholesterol Dependent Uptake and Interaction of Doxorubicin in MCF-7 Breast Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 8358–8366, 2013.

WEISS, V. **Avaliação tecnológica de suspensões e nebulizados de nanocápsulas e nanoesferas contendo indometacina**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2001.

XIE, J.; LI, Y.; CAO, Y.; XU, C.; XIA, M.; QIN, M.; WEI, J.; WANG, W. Photo synthesis of protein-based drug-delivery nanoparticles for active tumor targeting. **Biomaterials Science**, v. 1, p. 1216–1222, 2013.

XINYI, J.; XIANYI, S.; HONGLIANG, X.; LIANGCEN, C.; XIHUI, G.; XIAO, W.; KITKI, L.; JIJIN, G.; YANZUO, C.; YE, J.; XIAOQING, R.; QIUYUE, R.; XIAOLING, F. Self-aggregated pegylated poly (trimethylene carbonate) nanoparticles decorated with c(RGDyK) peptide for targeted paclitaxel delivery to integrin-rich tumors. **Biomaterials**, v. 32, p. 9457-9469, 2011.

XU, R.; FISHER, M.; JULIANO, R. L. Targeted Albumin-Based Nanoparticles for Delivery of Amphipathic Drugs. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, p. 870-878, 2011.

YACOBI, N. R.; PHULEIRA, H. C.; DEMAIO, L.; LIANG, C. H.; PENG, C.; SIOUTAS, C.; BOROK, Z.; KIM, K.; CRANDALL, E. D. Nanoparticle effects on rat alveolar epithelial cell monolayer barrier properties. **Toxicology in vitro**, v.21, p.1373–1381, 2007.

YAMADA, K. M.; PANKOV, R.; CUKIERMAN, E. Dimensions and dynamics in integrin function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 959–966, 2003.

YAMASHIRO, D.; BLAKE, J. e LI, C. H. The Use of N^ε,N^{im}-Bi(s tert-butylloxycarbonyl) histidine and N^γ-2- (p-Biphenyl) isopropylloxycarbonyl-Ni-tert-butylloxycarbonylhistidine in the Solid-Phase Synthesis of Histidine-Containing Peptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 94, n. 8, p. 2855–2859, 1971.

YEZHELYEV, M. V.; GAO, X.; XING, Y.; AL-HAJJ, A.; NIE, S.; REGAN, R. M. O. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. **Lancet Oncology**, v. 6, p. 657-6677, 2006.

YU, M. K.; PARK, J.; JEONG, Y. Y.; MOON, W. K.; JON, S. Integrin-targeting thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined cancer imaging and drug delivery. **Nanotechnology**, v. 21, p. 1–9, 2010.

YURGEL, V.; OLIVEIRA, C.P; BEGNINI, K.R.; et al. Methotrexate diethyl ester-loaded lipid-core nanocapsules in aqueous solution increased antineoplastic effects in resistant **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1583-1591, 2014.

ZAKO, T.; NAGATA, H.; TERADA, N.; UTSUMI, A.; SAKONO, M.; YOHDA, M.; UEDA, H.; SOGA, K.; MAEDA, M. Cyclic RGD peptide-labeled upconversion nanophosphors for tumor cell-targeted imaging. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 381, n. 1, p. 54–8, 2009.

ZHAO, Z.; HUANG, D.; YIN, Z.; CHI, X.; WANG, X.; GAO, J. Magnetite nanoparticles as smart carriers to manipulate the cytotoxicity of anticancer drugs: magnetic control and pH-responsive release. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 15717–15725, 2012.