

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

One-pot síntese de nanocápsulas multiparedes funcionalizadas com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL(-): otimização do processo e seleção de formulação.

Márcia Duarte Adorne

Porto Alegre, 2014.

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

One-pot síntese de nanocápsulas multiparedes funcionalizadas com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL(-): otimização do processo e seleção de formulação.

Dissertação apresentada por **Márcia Duarte Adorne** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Porto Alegre, 2014.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 09/06/2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profª. Dr. Elenara Lemos Sena

Universidade Federal de Santa Catarina

Profº. Dr. Ruy Beck

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª. Dr. Solange Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Adorne, Márcia Duarte

One-pot síntese de nanocápsulas multiparedes funcionalizadas com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL(-): otimização do processo e seleção de formulação. / Márcia Duarte Adorne. -- 2014. 115 f.

Orientadora: Adriana Raffin Pohlmann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. nanocápsulas multiparede. 2. quimiosorção. 3. scFv anti-LDL(-). 4. aterosclerose. I. Pohlmann, Adriana Raffin, orient. II. Título.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Síntese de Nano e Micropartículas Aplicadas à Terapêutica do Instituto de Química Orgânica (Laboratório K204) e na Faculdade de Farmácia (Laboratório 405) da UFRGS, com financiamento da CAPES, CNPq, FAPERGS e INCT. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Adriana R. Pohlmann pelas oportunidades concedidas, pela orientação dedicada e ensinamentos transmitidos ao longo da iniciação científica e durante o mestrado e, sobretudo, pela paciência e confiança.

Aos professores Ruy Beck e Sílvia Guterres pelas contribuições científicas durante os seminários e discussões do grupo de pesquisa.

Aos colegas e amigos dos laboratórios K204 e 405 pela amizade e companheirismo durante o mestrado, em especial às minhas amigas Catiúscia, pela colaboração durante o trabalho, à Luiza, pelas conversas de reflexão e descontração e pelo companheirismo durante o estágio docente e à Cecília, à Michelli e ao Willian pela alegria contagiante.

Aos amigos que fiz durante todo o período acadêmico, em especial à Meise e à Milânia, que moraram comigo ao longo desses anos.

Ao meu noivo Jorge, pela compreensão e apoio, principalmente na fase final desse trabalho.

À minha mãe, por todo o seu esforço em dar o melhor possível a mim e ao meu irmão, pelos seus ensinamentos ao longo das nossas vidas e por todo o carinho dedicado.

RESUMO

A utilização de fragmentos de anticorpo scFv anti-LDL(-) mostra-se uma estratégia promissora na intervenção e prevenção da aterosclerose, visto o papel desempenhado pela LDL(-) na progressão da doença. Nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) são sistemas versáteis que tem sido estudados nos últimos anos como carreadores de fármacos em seu interior, bem como plataforma para funcionalização de superfície com diferentes espécies moleculares ou macromoleculares. Este estudo objetivou a otimização do processo de síntese *one-pot* de nanocápsulas multiparede por meio da determinação da concentração de lecitina e quitosana para a formação de monocamadas completas, bem como determinar a eficiência de complexação de íons zinco e do scFv anti-LDL(-) na superfície das nanoestruturas. Para isso, na primeira e segunda etapas do estudo foram preparadas suspensões de LNC variando a concentração de lecitina de soja e quitosana, respectivamente. Na terceira etapa, foi avaliada a eficiência de ligação de íons zinco nas nanocápsulas revestidas com lecitina-quitosana por meio do estudo de adsorção do metal na superfície das partículas. Na última etapa, foi determinada a eficiência de ligação do scFv anti-LDL(-) à superfície das nanocápsulas multiparede otimizadas por meio da quantificação do fragmento de anticorpo. Como resultados, foi proposta a organização das moléculas de lecitina de soja em torno das nanocápsulas na forma de estruturas semelhantes a lipossomas e que a saturação da superfície das mesmas ocorre na concentração de 9 mg/mL desse tensoativo. Adicionalmente, a concentração ótima de quitosana para o revestimento das partículas foi igual a 0,7 mg/mL. Na terceira etapa, a complexação de zinco na superfície das partículas mostrou ser pH dependente, sendo a concentração ótima de metal para a ligação do fragmento de anticorpo igual a 25 µg/mL. Na última etapa, a complexação do scFv anti-LDL(-) à superfície das nanocápsulas multiparede foi dependente de sua concentração inicial no meio, sendo selecionada a formulação cuja razão molar de zinco:scFv anti-LDL(-) foi igual a 12,5:1.

Palavras-chave: nanocápsulas multiparede, quimiosorção, scFv anti-LDL(-), aterosclerose.

One-pot synthesis of multiwall nanocapsules functionalized with single-chain fragments variable of anti-LDL (-): process optimization and selection of formulation.

The use of antibody fragments scFv anti-LDL (-) appears to be a promising strategy for intervention and prevention of atherosclerosis, since the role of the LDL (-) on the disease progression. Lipid-core nanocapsules (LNC) are versatile systems that have been studied in recent years as drug carriers, as well as a platform for surface functionalization with different molecular or macromolecular species. This study aimed to optimize the synthesis process one-pot of multi-wall nanocapsules by determining the concentration of lecithin and chitosan to form complete monolayers and to determine the efficiency of complexation of zinc ions and scFv anti-LDL (-) on the nanostructures surface.

For this reason, in the first and second phases of this study LNC suspensions varying the concentration of soy lecithin and chitosan, respectively, were prepared. In the third step, the efficiency of binding of zinc ions in nanocapsules coated with lecithin-chitosan was evaluated by a study of the adsorption of the metal on the particles surface. In the last step, the binding efficiency of the scFv anti-LDL(-) on the optimized multi-wall nanocapsules surface was determined. As results, it was proposed that the organization of the molecules of soy lecithin around the nanocapsules in the form of liposome-like structures and that the saturation of the surface occurs at the concentration of 9 mg/mL of soy lecithin. Moreover the optimal concentration of chitosan for coating the particles was equal to 0.7 mg / ml. In the third step, the complex of zinc in the particle surface shown be pH dependent, with an optimal concentration of zinc for binding with the antibody fragment equal to 25 mg/mL. In the last step, the complexation of the scFv anti-LDL(-) on the surface of multi-wall nanocapsules was dependent of the its initial concentration at the medium, being selected formulation whose molar ratio of zinc:scFv anti-LDL (-) equal to 12,5:1.

Key words: multi-wall nanocapsules, chemisorption, scFv anti-LDL(-), atherosclerosis.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática dos principais fragmentos tipo de anticorpo e análise de purificação do scFv anti-LDL(-) em gel de poliacrilamida.

Figura 2. Representação esquemática da estrutura MCMN complexada a espécies metálicas.

Figura 3. Perfis granulométricos obtidos por difração de laser das LNCs com diferentes concentrações de lecitina de soja.

Figura 4. Valores de diâmetro médio $[D(4.3)_v]$, SPAN e diâmetro acumulado de 50% do número de partículas $[d(0.5)_n]$ em função da concentração de lecitina de soja das suspensões de nanocápsulas.

Figura 5. Potencial zeta em função da concentração de lecitina de soja nas suspensões de nanocápsulas.

Figura 6. Exemplos de Isotermas de Langmuir.

Figura 7. Inverso do potencial zeta (em módulo) em função do inverso da concentração de lecitina de soja nas suspensões de nanocápsulas.

Figura 8. Modelo ilustrativo da organização supramolecular das LNCs em função da concentração de lecitina de soja.

Figura 9. Perfis granulométricos obtidos por DLS das formulações LNC₃, LNC₅, LNC₈ e LNC₉.

Figura 10. Perfis granulométricos, obtidos por difração de laser, das formulações LNC₃, LNC₅, LNC₈ e LNC₉ durante o teste de estabilidade a $40 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.

Figura 11. Modelo ilustrativo das nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana.

Figura 12. Perfis granulométricos obtidos por difração de laser das nanocápsulas revestidas com diferentes concentrações de quitosana.

Figura 13. Potencial zeta em função da concentração de quitosana nas suspensões de nanocápsulas

Figura 14. Função de correlação das nanocápsulas revestidas com diferentes concentrações de quitosana.

Figura 15. Diâmetro médio, obtido por DLS, em função da concentração de quitosana nas nanocápsulas.

Figura 16. Perfis granulométricos, obtidos por difração de laser, das formulações revestidas com quitosana durante o teste de estabilidade a $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

Figura 17. Perfis granulométricos, obtidos por difração de laser, das formulações revestidas com quitosana durante o teste de estabilidade a $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

Figura 18. Modelo ilustrativo das nanocápsulas revestidas com quitosana e complexadas ao zinco e fenilalanina.

Figura 19. Perfil granulométrico, por difração de laser, da suspensão MCMN-Phe.

Figura 20. Complexo formado a partir da reação da ditizona e o íon Zn^{2+} .

Figura 21. Curva de calibração de íons Zn^{2+} em presença do agente complexante ditizona.

Figura 22. Perfil granulométrico da suspensão $\text{LNC}^{+}_{0,7(1\%)}$, obtido pela técnica de difração de laser.

Figura 23. Perfis granulométricos das formulações $\text{MCMN}^1\text{-Phe}$, $\text{MCMN}^2\text{-Phe}$ e $\text{MCMN}^3\text{-Phe}$, obtido pela técnica de difração de laser.

Figura 24. Distribuição de tamanho, obtido por NTA, das formulações $\text{LNC}^{+}_{0,7(1\%)}$, $\text{MCMN}^1\text{-Phe}$, $\text{MCMN}^2\text{-Phe}$ e $\text{MCMN}^3\text{-Phe}$.

Figura 25. Concentração de zinco associado às nanocápsulas em função da sua concentração total nas nanocápsulas multiparedes.

Figura 26. Modelo ilustrativo das nanocápsulas multiparedes contendo o scFv anti-LDL(-).

Figura 27. Função de correlação das nanocápsulas multiparede contendo diferentes concentrações do scFv anti-LDL(-).

Figura 28. Diâmetro médio, obtido pela técnica de DLS, em função da concentração de scFv anti-LDL(-) nas suspensões de nanocápsulas.

Figura 29. Perfis granulométricos, obtidos pela técnica de DLS, das formulações MCMN¹-A⁵⁰, MCMN¹-A¹⁰⁰, MCMN¹-A²⁰⁰ e MCMN¹-A³⁰⁰.

Figura 30. Curva de calibração do scFv anti-LDL(-) obtida por método de Lowry.

Figura 31. Concentração de scFv anti-LDL(-) associada às nanocápsulas em função da sua concentração total na formulação.

Figura 32. Fluxograma apresentando as principais etapas de construção das nanocápsulas multiparedes complexadas ao scFv ani-LDL(-).

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características físico-químicas das LNCs com diferentes concentrações de lecitina de soja.

Tabela 2. Valores de tamanho médio e PDI, obtidos por DLS, das formulações LNC₃, LNC₅, LNC₈ e LNC₉.

Tabela 3. Valores de $D[4,3]_v$ das formulações LNC₃, LNC₅, LNC₈ e LNC₉ durante o teste de estabilidade a $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

Tabela 4. Características físico-químicas das nanocápsulas após revestimento com quitosana.

Tabela 5. Valores de $D[4,3]_v$ das nanocápsulas revestidas com quitosana durante o teste de estabilidade a $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

Tabela 6. Valores de $D[4,3]_v$ das nanocápsulas revestidas com quitosana durante o teste de estabilidade a $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

Tabela 7. Caracterização físico-química pelas técnicas de DLS e NTA das formulações LNC₉, LNC⁺_{0,7} e MCMN-Phe.

Tabela 8. Características físico-químicas das formulações LNC⁺₇ e LNC⁺_{7(1%)}.

Tabela 9. Características físico-químicas das formulações LNC⁺_{0,7(1%)}, MCMN¹-Phe, MCMN²-Phe e MCMN³-Phe.

Tabela 10. Valores de teor e concentração de zinco associado ou não as formulações MCMN¹-Phe, MCMN²-Phe e MCMN³-Phe.

Tabela 11. Caracterização físico-química das nanocápsulas ligadas a diferentes concentrações de scFv anti-LDL(-).

Tabela 12. Valores de absorvância obtidos na quantificação do scFv anti-LDL(-) no meio receptor após experimento de diálise.

Tabela 13. Concentração de scFv anti-LDL(-) determinada por Método de Lowry após ultrafiltração-centrifugação (1844 x g por 5 min).

Tabela 14. Valores de absorbância obtidos a partir da análise do ultrafiltrado após ultrafiltração-centrifugação (5000 x g, 15 min) da suspensão MCMN¹-Phe.

Tabela 15. Concentração de scFv anti-LDL(-) no ultrafiltrado obtida após ultrafiltração-centrifugação (5000 xg, por 15 minutos) das formulações com diferentes concentrações do fragmento de anticorpo.

Tabela 16. Valores comparativos de concentração de scFv anti-LDL(-) no ultrafiltrado obtidos após aplicação de diferentes técnicas (diálise e ultrafiltração-centrifugação) e protocolos de ultrafiltração-centrifugação

Lista de Abreviaturas

BSA	Albumina sérica bovina
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico (<i>Dinamic Light Scattering</i>)
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento cristalizável
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL(-)	Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa
LNC	Nanocápsula de núcleo lipídico
MCMN	Nanocápsulas multiparede (<i>Metal Complex Multi-wall Nanocapsules</i>)
MCMN-scFv	Nanocápsulas multiparede ligada ao scFv anti-LDL(-)
NC	Nanocápsula
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas (<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>)
PDI	Índice de polidispersão
scFv	Fragmento variável de anticorpo de cadeia única (<i>Single-chain fragment variable</i>)

Sumário

1. Introdução	17
2. Objetivo	21
2.1 Objetivos Específicos	21
3. Revisão de Literatura	23
3.1 A Aterosclerose	23
3.2 Nanotecnologia como proposta para vetorização de agentes terapêuticos	26
3.3 Modificação superficial de nanocarreadores visando a obtenção de sistemas multifuncionais inteligentes.....	28
3.3.1 Conjugação de scFv à superfície de nanopartículas	31
3.3.2 Nanocápsulas de núcleo lipídico e sua funcionalização de superfície	33
4. Materiais e Métodos	37
4.1 Materiais	37
4.1.1 Matérias-primas	37
4.1.2 Aparelhos e Equipamentos	37
4.1.3 Solventes e Outros Materiais	37
4.2 Métodos	38
4.2.1 Otimização da síntese das nanocápsulas multiparedes	38
4.2.1.1 Preparação de nanocápsulas de núcleo lipídico com diferentes concentrações de lecitina	38
4.2.1.2 Revestimento das Nanocápsulas de Núcleo Lipídico com diferentes concentrações quitosana	39
4.2.1.3 Complexação de zinco à superfície das nanocápsulas revestidas com quitosana	40
4.2.1.4 Ligação do fragmento de anticorpo scFv anti-LDL(-) à superfície das nanocápsulas complexadas ao zinco	41
4.2.2 Caracterização Físico-química	41
4.2.2.1 Determinação do pH	41
4.2.2.2 Determinação do diâmetro de partícula e polidispersão	41

4.2.2.3	Potencial Zeta	42
4.2.2.4	Teste de estabilidade das suspensões de nanocápsulas	42
4.2.2.5	Determinação de Zn ²⁺ nas nanocápsulas multiparede	42
4.2.2.5.1	Teor de Zn ²⁺ nas Nanocápsulas Multiparede	43
4.2.2.5.2	Determinação de Zn ²⁺ complexado à superfície das nanocápsulas	43
4.2.2.6	Quantificação de scFv anti-LDL(-) ligado às nanopartículas	44
4.2.2.7	Análise Estatística	45
5.	Resultados e Discussão	47
5.1	Otimização da concentração de lecitina de soja para revestimento eficiente de nanocápsulas de núcleo lipídico	47
5.2	Otimização do revestimento de nanocápsulas de núcleo lipídico com o quitosana	62
5.3	Complexação de zinco à superfície das nanocápsulas revestidas com quitosana	76
5.4	Conjugação do fragmento de anticorpo scFv anti-LDL(-) à superfície do complexo MCMN ¹	90
6.	Conclusões	105
7.	Referências	107

1. Introdução

Doenças cardiovasculares são uma das maiores causas de mortalidade mundial e representam um grande impacto econômico para o sistema de saúde no Brasil (Azambuja *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). Entre os fatores de risco para desenvolvimento de aterosclerose, destacam-se os níveis séricos elevados de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Gleissner *et al.*, 2007). O evento inicial da aterogênese é marcado pela migração de LDL para a parede arterial. No interior das artérias a LDL sofre modificações, catalisadas por enzimas ou devido à ação de espécies reativas ao oxigênio, transformando-se em LDL eletronegativa [LDL(-)]. Essa partícula é responsável pela indução de células efetoras do sistema imune como os macrófagos que, devido à captação descontrolada da LDL(-), transformam-se em células espumosas, que secundariamente sofrem necrose, formando a lesão aterosclerótica (Gleissner *et al.*, 2007; Lundberg *et al.*, 2010; Fuhrman, 2012).

Tendo em vista que a aterosclerose é um processo imune-inflamatório crônico, torna-se importante a utilização de estratégias visando imunomodulação do processo (Siqueira *et al.*, 2006). Nesse sentido, a utilização de anticorpos e/ou fragmentos, em especial o fragmento variável de anticorpo de cadeia única anti-LDL(-), scFv anti-LDL(-), tem demonstrado efeito promissor na proteção contra aterosclerose (Grosso *et al.*, 2008; Kazuma, 2010; Cavalcante, 2012). Por outro lado, a aplicação dessa biomolécula como agente terapêutico é dificultada por fatores como o baixo tempo de circulação no meio biológico atribuído pela captação pelo sistema imune e pela rápida metabolização enzimática.

A nanomedicina envolve o estudo e manipulação de materiais que visam a obtenção de dispositivos com tamanho nanométrico com propriedades diferenciadas para aplicação na terapêutica (Jain *et al.*, 2005; Tansil & Gao, 2006). Esses sistemas têm sido amplamente estudados na área farmacêutica atuando na veiculação de fármacos e/ou também combinados a biomoléculas, como hormônios, DNA, anticorpos e fragmentos de anticorpos, formando sistemas híbridos, como uma estratégia visando o aumento da biodisponibilidade, a proteção contra a degradação enzimática, a redução da toxicidade de fármacos em diversas farmacoterapias (Dhar *et al.*, 2008; Biju, 2014), devido ao seu efeito protetor, a modulação da liberação, além de facilitar o transporte através de barreiras biológicas (Alonso *et al.*, 2004).

Na terapêutica, a conjugação de anticorpos e/ou fragmentos de anticorpos à superfície de nanocarreadores é utilizada como uma estratégia visando o direcionamento do nanocarreador para um tecido específico, bem como o aumento da eficiência dessas biomoléculas. Em especial, o desenvolvimento de nanopartículas conjugadas a fragmentos de anticorpo de cadeia simples (scFv) é especialmente desejável visando o aumento do tempo de meia-vida na circulação.

As nanocápsulas poliméricas representam uma ferramenta promissora na veiculação de peptídeos em sua superfície, como na encapsulação de diversos fármacos (Oliveira *et al.*, 2013; Pohlmann *et al.*, 2013; Tosi *et al.*, 2013; Bender *et al.*, 2014). Esses sistemas são constituídos por núcleo oleoso envolvido por uma parede polimérica biocompatível e biodegradável, sendo na maioria das vezes destinados para a administração sistêmica (Bender *et al.*, 2012; Vauther & Bouchemal, 2009; Schaffazick, *et al.*, 2003). Tais dispositivos podem ainda ter a sua superfície modificada pelo recobrimento de polissacarídeos catiônicos, como a quitosana, de forma a fornecer propriedades diferenciadas às nanocápsulas no meio biológico (Siqueira *et al.*, 2011; Bender *et al.*, 2012). Além disso, partículas construídas com esse polissacarídeo catiônico possuem a capacidade em ligar íons metálicos de forma a fornecer sítios de ligação para complexar com diferentes fármacos (Reynaud *et al.*, 2011) ou com biomoléculas.

Considerando as características inerentes à utilização de fragmentos de anticorpos na terapia da aterosclerose, Bender *et al.* (2014) desenvolveram novas nanocápsulas poliméricas, chamadas nanocápsulas multiparede, empregando nanocápsulas de núcleo lipídico de poli(ϵ -caprolactona) como núcleo. As nanocápsulas multiparede são revestidas com lecitina, seguida de quitosana e complexadas com íons metálicos, capazes de conjugar em sua superfície diferentes espécies moleculares e macromoleculares, como os fragmentos de anticorpo scFv anti-LDL(-). A grande vantagem desse processo de funcionalização de superfície das nanocápsulas poliméricas é a conjugação por ligação química não-covalente sem gerar resíduos e ao mesmo tempo preservando a capacidade do scFv anti-LDL(-) em se ligar ao seu receptor. Assim, o scFv anti-LDL(-) na superfície das nanocápsulas é capaz de capturar por reconhecimento molecular LDL(-) presente

no meio. Essa estratégia tem potencial inovador para que futuramente este tipo de sistema possa vir a ser usado na terapêutica da aterosclerose.

Tendo em vista os resultados obtidos previamente por Bender *et al.* (2014), e a importância de se conhecer o tipo de interação estabelecida entre moléculas e/ou biomoléculas farmacologicamente ativas com a superfície de nanocarreadores, torna-se importante a caracterização dos processos de adsorção, visando uma melhor compreensão das interações fármaco-partícula e, também, da capacidade de ligação dessas moléculas às nanoestruturas. Assim, o presente estudo tem como objetivo otimizar a síntese das nanocápsulas multiparede funcionalizadas determinando a concentração de cada componente para a formação de monocamadas completas de cada componente utilizado para o revestimento e funcionalização, bem como avaliar a capacidade de ligação do scFv anti-LDL(-) à superfície dessas nanocápsulas.

2. Objetivo

O presente trabalho tem por objetivo otimizar o processo "one pot" multicomponente de síntese das nanocápsulas multiparede funcionalizadas determinando a concentração ótima de lecitina e de quitosana para a formação de monocamadas completas e concêntricas de revestimento, determinar a eficiência de complexação de íons zinco, bem como avaliar a eficiência de ligação do scFv anti-LDL(-) à superfície dessas nanocápsulas.

2.1 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração ótima de lecitina para obtenção de nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas pelo sistema lecitina-polissorbato 80;
- Determinar a concentração ótima de quitosana para o revestimento de nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas pelo sistema lecitina-polissorbato 80, empregando-se a estratégia *layer-by-layer*;
- Determinar a eficiência de complexação de íons zinco nas nanocápsulas revestidas com lecitina-quitosana e estabilizadas com polissorbato 80 pela quantificação de zinco e estudo de isotermas de adsorção;
- Avaliar a eficiência de ligação do scFv anti-LDL(-) à superfície das nanocápsulas multiparede pela quantificação do fragmento de anticorpo.

3. Revisão na Literatura

3.1 A Aterosclerose

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as doenças cardiovasculares são as principais causas de mortalidade mundial (WHO, 2013), sendo que em 2008 o número de mortes prematuras atribuídas a essa enfermidade ultrapassou os 17 milhões (WHO, 2011). No Brasil, a estimativa de prevalência de doenças do coração beira os 6 milhões representando grande impacto econômico para o sistema de saúde (Balbinotto et al., 2008; Azambuja et al., 2008).

O desenvolvimento da aterosclerose é complexo e multifatorial, envolvendo fatores genéticos e uma série de características que predispõe o seu desenvolvimento, como o tabagismo, sedentarismo, uso excessivo de álcool e má dieta, levando muitos anos para se desenvolver, sendo um dos principais processos patológicos que está relacionado diretamente com doenças coronarianas e com o acidente vascular cerebral (Sherer et al., 2006; WHO, 2011). A aterosclerose consiste em uma doença crônica da parede arterial envolvendo um intenso processo inflamatório, cujo quadro clínico é caracterizado pelo estreitamento do lúmen dos vasos sanguíneos, devido à formação de placas ateroscleróticas, passíveis de sofrer ruptura ou trombose, tendo como evento mais grave o infarto agudo do miocárdio (Sherer & Shoenfeld, 2006).

O evento inicial da formação da placa aterosclerótica consiste na migração de partículas de LDL para a parede arterial. Na íntima, a LDL sofre modificações decorrentes da ação de espécies reativas ao oxigênio ou de enzimas, transformando-se em LDL(-) (Gleissner et al., 2007). Essa partícula é responsável pelo recrutamento de células efectoras do sistema imune como os monócitos e linfócitos T. Na íntima, os monócitos se diferenciam em macrófagos e iniciam a captação descontrolada da LDL(-), transformam-se em células espumosas, que secundariamente sofrem necrose, culminando na formação da lesão aterosclerótica; ao mesmo tempo, células T também são recrutadas para o espaço subendotelial, produzindo quimiocinas promovendo uma resposta inflamatória sistêmica (Gleissner et al., 2007; Lundberg & Hansson, 2010; Furhrman et al., 2012; Sherer & Shoenfeld, 2006).

Entre os fatores de risco para desenvolvimento de aterosclerose, destacam-se os níveis séricos elevados de LDL (Gleissner et al., 2007). Esta lipoproteína

consiste em uma partícula de, aproximadamente, 25 nm, contendo um núcleo oleoso formado por triglicerídeos e ésteres de colesterol e uma parede formada por fosfolípidios, colesterol livre e a apolipoproteína B-100 (apo-B 100) (principal apolipoproteína), sendo responsável pelo transporte de colesterol para os tecidos periféricos que contêm receptores específicos para a apo-B 100 (Nelson & Cox, 2006; Gleissner *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos mostram que a LDL(-) é a forma de LDL mais pró-aterogênica, contribuindo para a formação das células espumosas (Sherer & Shoenfeld, 2006; Goyal *et al.*, 2012; Gleissner *et al.*, 2007). Diversos mecanismos tem sido propostos para o aumento do recrutamento dos monócitos, entre eles destacam-se a indução da expressão de moléculas de adesão, fatores de crescimento e espécies quimiotáticas nas células endoteliais e a ativação plaquetária, induzindo a formação de agregados entre plaquetas e monócitos, aumentando a aderência dos monócitos ao endotélio (Gleissner *et al.*, 2007).

A LDL(-) possui uma maior carga negativa em relação à LDL e uma menor afinidade de ligação ao receptor da LDL, resultando no aumento do seu tempo de circulação, tornando-a mais prejudicial em relação à LDL (Cavalcante, 2012). Essa modificação resulta em uma resposta imune direcionada contra os epítomos específicos dessa lipoproteína, levando à produção de autoanticorpos específicos para a LDL(-), culminando em um intenso processo inflamatório com a formação de imunocomplexos e células espumosas (Mello *et al.*, 2011; Faulin *et al.* 2012). Além disso, tem sido verificado que os níveis séricos de LDL(-) são elevados em pacientes com alto risco de doença cardiovascular (Oliveira *et al.*, 2006).

Tendo em vista o caráter imune-inflamatório crônico envolvido no processo de desenvolvimento da aterosclerose, estudos realizados pelo grupo de pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo tem investigado terapias baseadas na utilização de anticorpos ou fragmentos de anticorpos (Fab ou scFv) direcionados contra a LDL(-) (Grosso *et al.*, 2008; Kazuma, 2010; Shoenfeld *et al.*, 2012; Cavalcante, 2012). Em especial, a utilização de fragmentos variáveis de anticorpos de cadeia única (scFv) tem mostrado resultados interessantes devido à sua capacidade de difusão entre os tecidos, melhor eliminação dos imunocomplexos produzidos e menor imunogenicidade, atribuída à ausência da porção Fc (Kazuma, 2010; Cavalcante, 2012). O scFv é formado pela

união das frações variáveis das cadeias leve e pesada do fragmento de anticorpo unidas por um peptídeo hidrofílico, conferindo maior estabilidade a essa unidade estrutural que previne a sua dissociação (Figura 1A) (Kazuma, 2010). Além disso, como o scFv deriva dos locais de ligação do anticorpo intacto, não existe qualquer perda significativa de especificidade e de afinidade de ligação ao antígeno e sim apenas modificações referentes às propriedades farmacocinéticas.

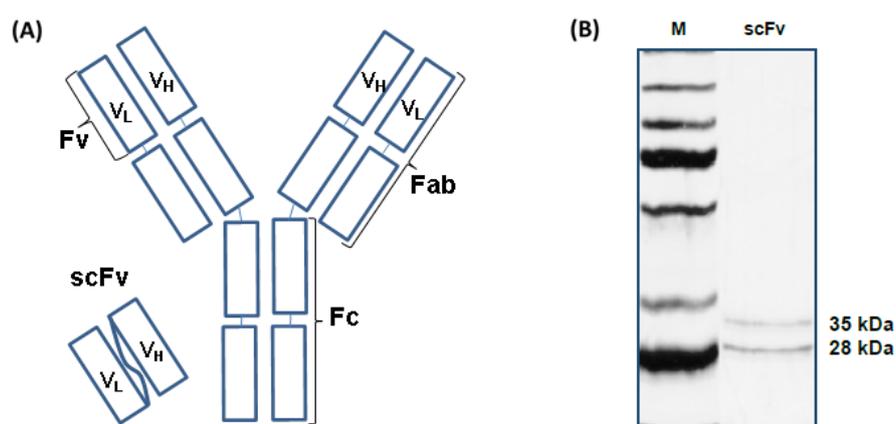


Figura 1. Em (A) representação esquemática dos principais fragmentos de um anticorpo. O fragmento scFv é formado por um peptídeo conector, responsável pela união da extremidade C-terminal da cadeia pesada (V_H) com a extremidade N-terminal da cadeia leve (V_L) e, em (B) análise da purificação do scFv anti-LDL(-) em gel de poliacrilamida 13% corado com prata (a banda de 28 kDa corresponde ao scFv anti-LDL(-) e a banda de 35 kDa refere-se ao scFv anti-LDL(-) glicosilado, ambos produzidos pela levedura *P. pastoris*) (Adaptado de Cavalcante, 2012).

Diante do papel exercido pela LDL(-) na progressão da aterogênese, Kazuma *et al.* (2013) realizaram a expressão de scFV anti-LDL(-), em leveduras da espécie *P. pastoris*, visando avaliar o seu efeito ateroprotetor. Tal fragmento contém um cauda de seis resíduos de histidina na sua porção C-terminal e peso molecular igual a 28 kDa (Figura 1B). Após a sua avaliação em cultura de macrófagos, foi demonstrado a capacidade dessa proteína em inibir a formação de células espumosas e a redução da expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios, encorajando a sua utilização no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas visando neutralizar os efeitos pró-aterogênicos da LDL(-).

Por outro lado, mesmo que tais resultados demonstrem a aplicabilidade do scFv anti-LDL(-) na prevenção do surgimento da lesão aterosclerótica e como uma

alternativa para o tratamento dessa doença, fatores relacionados a sua rápida eliminação do organismo, devido ao seu tamanho reduzido em relação anticorpo completo traz evidência da necessidade da utilização de tecnologias que promovam um maior tempo de circulação no organismo, de forma a aumentar a eficácia dessa biomolécula.

3.2 Nanotecnologia como proposta para vetorização de agentes terapêuticos

A nanotecnologia 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). Segundo a União Européia (2011), nanomaterial é todo aquele material cuja distribuição de tamanho de partícula, por número, apresente 50% ou mais partículas com diâmetro entre 1 e 100 nm, embora, em alguns casos, como na área da nanomedicina, tal limite pode ser substituído por um limiar entre 1% e 50% do número de partículas.

Os nanomateriais são desenvolvidos visando à obtenção de novas características, como aumento da reatividade, força ou condutividade química, em comparação ao mesmo material na sua forma *bulk*, devido ao tamanho de partícula reduzido. Embora esses materiais apresentem características diferenciadas, fatores relacionados à sua segurança, envolvendo aspectos como a exposição ambiental a estes materiais, ainda não estão completamente definidos pela ciência, devendo tal avaliação ser realizada caso a caso (União Européia, 2014).

A nanomedicina consiste em campo da ciência dentro da nanotecnologia que se desenvolveu devido à necessidade de estratégias buscando melhorar propriedades biofarmacêuticas de moléculas bioativas após a sua administração. Tais características podem ser representadas pela sua distribuição ampla e não específica no organismo, refletindo no aumento da toxicidade e na não aderência do paciente ao tratamento, e pela baixa capacidade dessas moléculas em transpor barreiras biológicas, dificultando a eficácia do tratamento (Alonso *et al.*, 2004; Tosi *et al.*, 2013).

Devido ao grande potencial dos sistemas nanoscópicos, nos últimos anos tem havido um crescente interesse na sua utilização para atuarem tanto como carreadores de agentes terapêuticos, como para sua aplicação em sistemas de diagnóstico (Jain *et al.*, 2005; Tansil & Gao, 2006; Torchilin, 2006). Entre as vantagens da utilização de nanopartículas na terapêutica, destacam-se *i)* a proteção

de moléculas contra a degradação enzimática no meio biológico, como é o caso de proteínas, que são facilmente metabolizadas e eliminadas do organismo; *ii*) a redução dos efeitos tóxicos provenientes de fármacos, exemplificado pela maioria dos quimioterápicos usados no tratamento contra o câncer, devido à liberação e sítio-específica promovida por tais sistemas e *iii*) o aumento do tempo de meia vida de fármacos no meio biológico, uma vez que o seu tempo de circulação no organismo será dependente das propriedades físico-químicas do carreador (Alonso *et al.*, 2004; Dhar *et al.*, 2008; Bernardi *et al.*, 2009).

Os nanocarreadores podem variar de acordo com o tamanho, forma e química de superfície que, por consequência, influenciará na sua capacidade de encapsulação, taxa de liberação, estabilidade e distribuição no meio biológico (Haley & Frenkel, 2008). 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 & Frenkel, 2008).

Nanoemulsões e lipossomas, bem como nanopartículas poliméricas (exemplificadas pelas nanocápsulas e nanoesferas), são exemplos de estruturas automontáveis constituídas por materiais orgânicos, diferindo-se entre si de acordo com sua composição e organização a nível molecular. Como consequência, é conferida a cada uma delas a capacidade de carrear diferentes tipos de fármacos.

Nanocápsulas poliméricas são formadas por um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica estabilizada por um sistema tensoativo; enquanto as nanoesferas diferem das primeiras por não apresentarem óleo em sua composição, consistindo, dessa forma, em sistemas matriciais (Schaffazick *et al.*, 2003; Mora-Huertas *et al.*, 2010). Já as nanoemulsões são definidas por sistemas óleo/água no qual a fase interna (geralmente oleosa) é estabilizada por um sistema emulsionante; enquanto os lipossomas consistem em sistemas vesiculares aquosos envoltos por uma bicamada fosfolipídica (Bruxel *et al.*, 2012; Mertins *et al.*, 2009a).

Devido às características estruturais de cada um desses sistemas, nanopartículas poliméricas e nanoemulsões são, em geral, utilizadas para encapsular fármacos pobremente solúveis (Bruxel *et al.*, 2012; Souto *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013); enquanto lipossomas podem carrear tanto moléculas hidrossolúveis em seu interior aquoso, como substâncias pobremente solúveis

incorporadas no interior da bicamada lipídica (Gulati *et al.*, 1998; Mertins *et al.*, 2006). Além disso, tendo em vista que a utilização de nanocarreadores tem como um dos principais objetivos o aumento do seu tempo de circulação no organismo, promovendo a liberação na circulação sistêmica de um modo contínuo e controlado, tais sistemas devem evitar tanto a adsorção de proteínas plasmáticas, como seu reconhecimento por células fagocíticas, responsáveis pela rápida eliminação do organismo (Gref, *et al.*, 1995).

Nesse sentido, estudos tem focado na construção de sistemas furtivos utilizando-se polímeros sintéticos hidrofílicos não-iônicos, capazes de se adsorver na interface partícula/água promovendo a estabilização do sistema. Entre eles destacam-se poli(etilenoglicol) (PEG), copolímeros de óxido de polipropileno (exemplificado pelos Poloxamers), Poli(vinilpirrolidona) e o monooleato de sorbitano polietoxilado (polissorbato 80) (Torchilin, 2006; Bender *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2012). O mecanismo de estabilização no meio biológico promovido pela utilização de tais moléculas está relacionado ao aumento da hidrofilia da superfície da partícula e ao impedimento estérico promovido pelas cadeias hidrofílicas longas e flexíveis desses polímeros presentes na superfície das partículas, dificultando a ligação de proteínas plasmáticas (Gref *et al.*, 1995). Além do aumento da estabilidade e tempo de meia-vida das partículas na circulação, tal estratégia viabiliza vetorização passiva do sistema para o tecido alvo, permitindo a obtenção de uma menor biodistribuição do fármaco (Torchilin, 2006).

3.3 Modificação superficial de nanocarreadores visando a obtenção de sistemas multifuncionais inteligentes

Além de ser uma estratégia para aumentar o tempo de circulação do nanocarreador no organismo, a modificação da superfície desses sistemas também consiste em uma alternativa visando promover o direcionamento sítio-específico para o tecido alvo, atuando, dessa forma, como ferramenta para promover o controle das características físico-químicas e, por consequência, das propriedades farmacológicas e toxicológicas dos nanomateriais (Biju, 2014). A elevada razão superfície/volume faz desses sistemas materiais versáteis, pois permite a conjugação de uma ampla gama de moléculas em sua superfície, como peptídeos, anticorpos, fármacos e ácidos nucleicos, ou mesmo outros tipos de nanoestruturas,

visando o direcionamento para um sítio alvo (Qi *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2012; Biju, 2014; Caroni *et al.*, 2012; de Lima *et al.*, 2013).

Além disso, devido ao fato de alguns nanomateriais de apresentarem uma estrutura vesicular, surge também a possibilidade de incorporar em seu interior, moléculas farmacologicamente ativas, visando sua liberação controlada, obtendo-se dessa forma sistemas inteligentes capazes realizar, simultaneamente, funções terapêuticas e diagnósticas (Torchilin, 2006). Nesse sentido, estudos 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 & Frenkel, 2008; Biju, 2014).

Em trabalhos prévios, Su *et al.* (2012) desenvolveram lipossomas poliméricos multifuncionais com superfície modificada (PEG/RGD-lipossomas) pela incorporação do polímero PEG e do peptídeo RGD e com partículas paramagnéticas encapsuladas, visando a obtenção de um sistema estável no meio biológico, capaz de ser guiado para o tecido tumoral, sob a aplicação de um campo magnético, e com maior capacidade de internalização pelas células tumorais, pela presença do tripeptídeo acoplado em sua superfície, para a vetorização ativa do fármaco epidoxorrubicina. Em ensaios de captação celular em cultura de células MCF-7, foi verificado uma maior captação nas culturas onde foi adicionada a suspensão contendo RGD em sua superfície, em comparação aos lipossomas sem partículas paramagnéticas e o tripeptídeo, evidenciando a maior afinidade desses sistemas pelas células alvo.

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 do nanocarreador e 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).

Métodos baseados na conjugação covalente são caracterizados por permitir a formação de uma ligação mais estável, prevenindo a dissociação do sistema (Ranna *et al.*, 2010); no entanto alguns fatores, como o longo tempo experimental, a possibilidade de ligações não-específicas e a necessidade de etapas de purificação e a utilização de reagentes que podem levar à desnaturação proteica e consequente perda da atividade, são limitações associadas a essa técnica (Di Marco *et al.*, 2010). Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas mais efetivas e simples para a funcionalização superficial de nanopartículas baseando-se em interações específicas entre o nanocarreador e o ligante.

Nesse sentido, interações nanopartícula-ligante mediada por espécies metálicas tem mostrado ser eficaz na conjugação sítio específica, proporcionando a integridade do sistema. Tal fato pode ser exemplificado pela presença de uma cauda histidina, incorporada por técnicas de DNA recombinante, fusionada a estrutura de algumas proteínas (Abad *et al.*, 2005), a qual é atribuída a afinidade de algumas espécies metálicas (como o Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+}) devido à presença do nitrogênio aromático presente na cadeia lateral desse aminoácido (Bresolin *et al.*, 2009).

Outra abordagem para a funcionalização da superfície de nanocarreadores, a partir da ligação com biomoléculas, tem como objetivo o aumento do tempo de meia-vida do ligante na circulação, evitando a sua rápida degradação. Dessa forma, estudos tem focado no desenvolvimento de sistemas nanoscópicos formados por polímeros catiônicos capazes de carrear, em sua superfície, ácidos nucleicos por meio de interações eletrostáticas, de forma a proteger essas biomoléculas contra a degradação e, simultaneamente, servir como estratégia para aumentar a captação celular (Mao *et al.*, 2011; Lehner *et al.*, 2013).

Tendo em vista a importância da interação entre moléculas e/ou biomoléculas farmacologicamente ativas com a superfície de nanocarreadores para a construção dos sistemas multifuncionais, alguns estudos tem focado na caracterização dos processos de adsorção, visando uma melhor compreensão das interações fármaco-partícula, da capacidade de ligação dessas moléculas às nanoestruturas e, também, da cinética de liberação a partir desses carreadores. Dessa forma, a construção de isotermas de adsorção tem permitido obter modelos do processo adsorção, assim como identificar a natureza de tais interações (Caroni *et al.*, 2012). Em um estudo prévio, de Lima *et al.* (2013) verificaram, a partir de dados de cinética e equilíbrio de

adsorção, que a ligação do fármaco cromoglicato de sódio na superfície de partículas catiônicas de quitosana pode ocorrer tanto por interações eletrostáticas, como interações hidrofóbicas, as quais são dependentes da temperatura na qual o sistema é submetido, devido à possibilidade de rearranjo na superfície da nanoestrutura.

Em outro trabalho, Reynaud *et al.* (2011) estudaram sistemas microparticulados, sendo avaliada a capacidade de adsorção do fármaco ciprofloxacino na superfície de micropartículas de quitosana complexadas ou não a diferentes íons metálicos (Fe^{3+} , Fe^{2+} e Zn^{2+}) em função do tempo de contato, da concentração inicial de fármaco e da natureza da espécie metálica presente na formulação. A partir das isotermas de adsorção obtidas para cada sistema foi possível verificar a maior capacidade de adsorção de ciprofloxacino nas suspensões contendo os íons Fe^{3+} e Zn^{2+} em comparação aos demais sistemas.

3.3.1 Conjugação do scFv à superfície de nanopartículas

A construção de nanocarreadores conjugados a fragmentos variáveis de anticorpo de cadeia única, scFv, tem sido amplamente estudada nos últimos anos, visando a vetorização ativa desses sistemas de liberação controlada na terapia contra o câncer, tendo em vista que certos antígenos são super expressos, ou expressos unicamente, na superfície de células tumorais (Laginha *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010). Em geral, a utilização de scFv's é preferida em relação a outros tipos de fragmentos de anticorpos, devido à ausência do domínio Fc, fazendo dessas moléculas menos imunogênicas e, também, pela maior facilidade e viabilidade econômica de sua expressão em relação a anticorpos monoclonais, que são obtidos em culturas de células (Cheng & Allen, 2008).

Com o objetivo de verificar a qualidade nanotecnológica de sistemas obtidos a partir da conjugação dessas biomoléculas, trabalhos tem focado em estudar o perfil farmacocinético, biodistribuição *in vivo* e captação celular *in vitro* de nanoestruturas após conjugação de anticorpos monoclonais (mAb) e de diferentes tipos de fragmentos de anticorpos, como Fab e scFv, com afinidade de ligação ao mesmo epítipo, sendo observado diferenças significativas em função do tipo de ligante (Cheng & Allen, 2008).

A utilização de scFv's conjugados a nanocarreadores para aplicação diagnóstica também tem mostrado resultados promissores em comparação a conjugação de anticorpos monoclonais, devido ao fato de os primeiros mostrarem vantagens com relação a sua maior solubilidade, fácil preparação, maior afinidade de ligação ao antígeno (Liu *et al.*, 2009; Zdobnova *et al.*, 2012) e reduzida variação no diâmetro do nanocarreador após conjugação, devido ao pequeno tamanho desses polipeptídeos (Vigor *et al.*, 2010). Além disso, tem-se verificado que a interação direta entre quantum dots (QD) e anticorpos monoclonais resulta, muitas vezes, na formação irreversível de complexos, acarretando na diminuição funcionalidade desses sistemas. Em trabalhos prévios, Wang *et al.* (2008) desenvolveram QD covalentemente conjugados à extremidade C-terminal de um fragmento de anticorpo anticorpo scFv anti-PSA (*prostate-specific antigen*), sendo observada uma melhor capacidade de ligação ao antígeno do sistema scFv-QD em relação a utilização QD conjugados a anticorpos monoclonais, representando uma ferramenta promissora na construção de sistemas com melhores limites de detecção.

A conjugação de scFv's à superfície dos nanocarreadores pode ser realizada diretamente através da ligação covalente à nanoestrutura (Wang *et al.*, 2008), por meio da modificação do fragmento de anticorpo, a partir da sua ligação prévia a polímeros hidrofílicos, como o PEG quimicamente modificados, e posterior associação à superfície das nanopartículas (Cheng & Allen, 2008; Lu *et al.*, 2011), ou pela ligação a espaçadores presentes na superfície do nanocarreador, capazes de interagir especificamente com sequências de aminoácidos presentes na extremidade C-terminal do scFv, como a sequência de poli-histidina (Mazzucchelli *et al.*, 2011).

Outra abordagem para nanoestruturação de scFv's consiste em promover o aumento da estabilidade e da eficiência dessas biomoléculas após sua administração por meio da sua encapsulação em sistemas matriciais, formados por polímeros biodegradáveis, como PLGA [poli(ácido-lático-co-ácido-glicólico)], capazes de promover a sua liberação intracelular e de maneira controlada (Son *et al.*, 2009). Devido ao seu tamanho reduzido, como discutido no item **3.1**, esses fragmentos de anticorpos são rapidamente metabolizados pelo organismo, sendo

necessária a utilização de abordagens que permitam o aumento do seu tempo de circulação no organismo.

3.3.2 Nanocápsulas de núcleo lipídico e sua funcionalização de superfície

Nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) 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, visando a encapsulação de fármacos pobremente solúveis, buscando obter a liberação controlada, o aumento da estabilidade e biodisponibilidade dessas substâncias (Pohlmann *et al.*, 2013). Nesse sentido, trabalhos tem mostrado efeitos biológicos promissores, que podem ser exemplificados pelo aumento da eficácia anti-inflamatória após a encapsulação de fármacos antiinflamatórios não esteroidais, devido à capacidade das LNCs em transportar o fármaco para o tecido inflamado (Bernardi *et al.*, 2009) e, também, pela capacidade desses sistemas em transpor barreiras biológicas, permitindo a liberação de espécies farmacologicamente ativas diretamente no cérebro após administração via oral desses nanocreadores (Frezza *et al.*, 2010).

A capacidade das LNCs em transpor barreiras biológicas tem sido relacionada à sua distribuição de tamanho, forma e química de superfície. Dessa forma, trabalhos tem focado na base para o controle da granulometria desses sistemas, sendo estabelecido que a formação de tais estruturas consiste em um mecanismo espontâneo de auto-montagem, promovido pelo contato de uma solução orgânica contendo os materiais constituintes das LNCs com um não-solvente, cujo tamanho é reduzido após a evaporação do solvente, e que a estreita distribuição de tamanho é dependente da concentração dos componentes da solução orgânica abaixo da concentração de agregação crítica (Jornada *et al.*, 2012).

Tendo em vista que a utilização diferentes tipos de tensoativos na estabilização de sistemas nanoscópicos influencia diretamente nas características físico-químicas desses sistemas. A combinação de tensoativos não iônicos, como o polissorbato 80, com tensoativos aniônicos, como a lecitina de soja, leva a formação de nanocápsulas contendo potencial zeta negativo devido à presença na interface

partícula/água do ácido fosfatídico (Mosqueira *et al.*, 2000). Lançando mão dessa estratégia, Bender *et al.* (2012) desenvolveram LNCs com superfície modificada, a partir do revestimento desses nanocarreadores com o polímero catiônico quitosana, por meio de interações eletrostáticas, obtendo-se nanocápsulas com superfície catiônica, nesse mesmo estudo foi verificada a manutenção da compatibilidade sanguínea *in vitro* do novo sistema formado.

Com o objetivo de construir um sistema multifuncional, formado por um carreador biodegradável revestido com diferentes camadas de materiais, formadas através de interações eletrostáticas, interações de Van der Waals e por meio da complexação com íons metálicos, servindo como base para a ligação em sua superfície de moléculas e/ou biomoléculas farmacologicamente ativas e, tendo em vista a capacidade da quitosana em complexar íons metálicos (Reynaud *et al.*, 2011). Bender *et al.* (2014) desenvolveram um sistema nomeado “*Metal Complex Multi-wall Nanocapsules*” (MCMN), esse novo nanocarreador consistiu em LNCs revestidas com quitosana, complexadas com íons ferro ou zinco visando a ligação do fragmento de anticorpo scFv anti-LDL(-) (Figura 2).

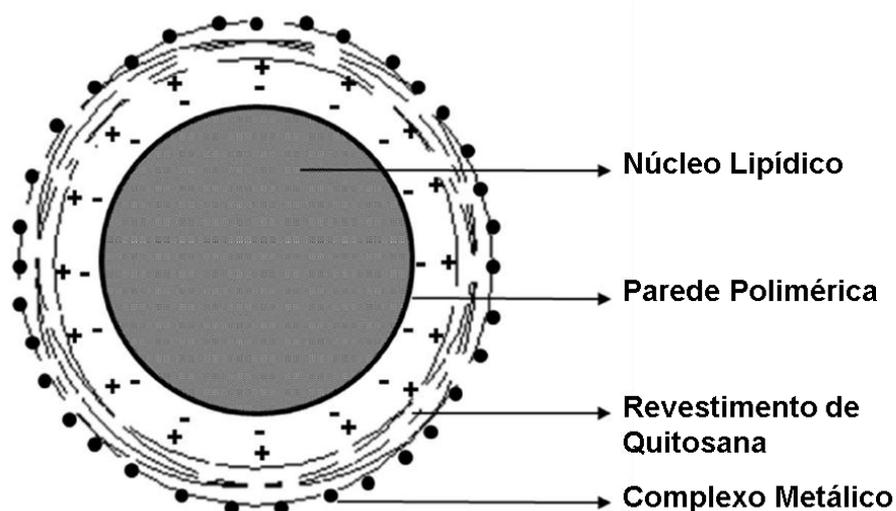


Figura 2. Representação esquemática da estrutura MCMN revestida pelo complexo metálico contendo zinco ou ferro (Adaptado de Bender *et al.*, 2014).

Para validar a prova de conceito da funcionalidade do fragmento de anticorpo após a conjugação ao nanocarreador, em ensaio de reconhecimento molecular *in vitro* foi demonstrada a manutenção do sítio ativo do fragmento de anticorpo após sua nanoestruturação. Em seu trabalho Cavalcante (2012) verificou, em ensaios *in*

vitro, uma redução da captação de LDL(-) em macrófagos tratados scFv anti-LDL(-) em solução; por outro lado, na cultura celular contendo o scFv anti-LDL(-) conjugados à superfície do sistema MCMN (MCMN-scFv), foi verificado um aumento na internalização de LDL(-), o qual foi atribuído ao mecanismo de endocitose mediado por receptor específico. Além disso, em estudos *in vivo*, foi verificada, em camundongos LDLR^{-/-} com 3 a 4 meses de idade, uma tendência a redução na área da lesão aterosclerótica, após tratamento com a suspensão de MCMN-scFv, evidenciando a eficácia dessa formulação e abrindo a possibilidade de sua utilização futura na intervenção e prevenção da aterosclerose (Cavalcante, 2012).

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas

- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) $M_n = 10000$ g/mol $M_w = 14000$ g/mol (Sigma-Aldrich, França);
- Quitosana de baixo peso molecular (Sigma-Aldrich, França);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (Delaware, Brasil);
- Monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) (Sigma-Aldrich, França);
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]) (Delaware, Brasil);
- Lecitina de soja (Lipoid S75[®]) (Lipoid, Alemanha);
- Acetato de zinco (Sigma-Aldrich, França);
- Fenilalanina (Sigma-Aldrich, França);
- Fragmento de anticorpo scFv anti-LDL(-) sintetizados e purificados na Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

4.1.2 Aparelhos e Equipamentos

- Evaporador rotatório (Büchi, Alemanha);
 - Bomba de vácuo V-500 (Büchi Vac[®], Alemanha);
 - Agitador Certomat MV (Vitaris, Alemanha);
 - Potenciômetro B474 (Micronal, Brasil);
 - Banho termostatizado (Ika – EH4, Brasil);
 - Malvern Mastersizer[®] 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido);
 - Zeta Sizer[®] Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido);
 - ZetaPlus[®] (Zeta Potential Analyser, Brookhaven Instrutmens Corporations, EUA);
 - NanoSight LM10 (NanoSight, Reino Unido);
 - Microcentrífuga Sigma 1-14 (Sigma, Alemanha);
 - Espectrofotômetro com leitor de microplacas (SpectraMax M2 Molecular Devices, Tecan Group Ltd.,);
- #### 4.1.3 Solventes e Outros Materiais
- Acetona (Nuclear, Brasil);
 - Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milli-Q[®] - Millipore, EUA);

- Alcool etílico (Nuclear, Brasil);
- Alcool metílico (Synth, Brasil);
- Ácido acético glacial (Nuclear, Brasil);
- Ditizona (Merck, Alemanha);
- Unidade de ultrafiltrante de 30 KDa (Milipore[®], Amicon[®] Ultra, EUA).

4.2 Métodos

4.2.1 Otimização da síntese das nanocápsulas multiparedes

A otimização dos componentes utilizados na construção das nanocápsulas multiparedes foi realizada em quatro etapas: *i*) avaliação das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo concentração variada de lecitina de soja, *ii*) revestimento das nanocápsulas de núcleo lipídico com diferentes concentrações do polímero catiônico quitosana; *iii*) formação do complexo metálico a partir da ligação das nanocápsulas revestidas com quitosana com zinco e *iiii*) ligação do fragmento de anticorpo scFv anti-LDL(-) ao complexo metálico.

4.2.1.1 Preparação de nanocápsulas de núcleo lipídico com diferentes concentrações de lecitina de soja

As suspensões de nanocápsulas contendo diferentes concentrações de lecitina de soja (Lipoid S75[®]) foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, como descrito previamente (Bender *et. al.*, 2012). Para isso, a fase orgânica contendo o polímero PCL (0,1 g), monoesterato de sorbitano (0,04 g), triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (0,120 g) em acetona (25 ml) foi mantida sob agitação magnética à 40 °C até a solubilização de todos os componentes. Diferentes quantidades de Lipoid S75[®] (0,030 g, 0,050 g, 0,080 g, 0,090 g, 0,10 g, 0,120 g e 0,140 g) foram solubilizadas em etanol (10 ml). A fase aquosa foi preparada em um frasco separadamente, por meio da dispersão do tensoativo de elevado EHL (polissorbato 80) (0,08 g) em água. Após a dissolução de todos os componentes de ambas as fases, a solução etanólica de lecitina (3 a 9 mg/ml) foi vertida na fase orgânica, e esta, por sua vez, foi injetada continuamente através de um funil na fase aquosa. A suspensão resultante foi mantida sob agitação e, após 10 min, o solvente orgânico foi removido e a suspensão concentrada sob pressão reduzida a fim de ajustar o volume final para 10,0 mL. As suspensões de LNC foram nomeadas de acordo com a concentração final do tensoativo aniônico

lecitina de soja : 3 mg/ml (LNC₃), 5 mg/ml (LNC₅), 8 mg/ml (LNC₈), 9 mg/ml (LNC₉), 10 mg/ml (LNC₁₀), 12 mg/ml (LNC₁₂) e 14 mg/ml (LNC₁₄).

4.2.1.2 Revestimento das nanocápsulas de núcleo lipídico com diferentes concentrações quitosana

O revestimento das nanocápsulas de núcleo lipídico com quitosana foi realizado como descrito previamente (Siqueira *et. al.*, 2011; Bender *et. al.*, 2012). Foram preparadas nove suspensões de com diferentes concentrações de quitosana. Para isso, foram primeiramente obtidas soluções de quitosanas com concentrações de 5 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13mg/ml e 14mg/ml em solução de ácido acético à 2% (v/v). Após a solubilização, as diferentes soluções foram filtradas utilizando-se unidade filtrante com diâmetro de poro de 0,45µm (Millipore®). Um ml dessas soluções foram adicionadas, gota a gota, em 9 ml da suspensão LNC₉, sob agitação magnética elevada e assim permanecendo durante 2 horas. As formulações recobertas com quitosana foram nomeadas segundo a concentração da solução do polímero catiônico utilizada para o revestimento de cada suspensão; por exemplo, a formulação LNC₉ revestida com solução de quitosana 5mg/ml é referenciada como LNC⁺_{0,5}.

Uma suspensão de nanocápsulas revestidas com quitosana com menor concentração de ácido acético também foi preparada. Essa formulação foi obtida pela adição de 1 mL de uma solução de quitosana 7 mg/mL em solução de ácido acético 1% (v/v) em 9 mL da formulação LNC₉, sob agitação magnética. A suspensão e nanocápsulas resultando foi nomeada LNC⁺_{0,7(1%)}.

4.2.1.3 Complexação de zinco à superfície das nanocápsulas revestidas com quitosana

A formação do complexo metálico na superfície das nanocápsulas revestidas com quitosana foi realizada como descrito previamente (Bender *et al.*, 2014) com algumas modificações. Dessa forma, foi preparada uma solução de acetato de zinco com concentração final de zinco igual a 1mg/ml em água MiliQ[®]. Em 9,75 mL das suspensões LNC⁺_{0,7} e LNC⁺_{0,7(1%)}, sob agitação magnética, foram adicionados 250 µL da solução zinco 1mg/mL, visando obter uma concentração final de 25 µg/mL do metal na formulação, após a formação do complexo, as formulações foram nomeadas MCMN e MCMN¹, respectivamente. Para passivar a superfície das partículas e assim evitar a formação de complexos interpartícula, devido a elevada reatividade após a ligação do zinco, cerca de um minuto após a adição dos íons metálicos sob agitação magnética elevada, foram adicionados 250µL de uma solução de fenilalanina 7,6mg/mL (equivalente à proporção 3:1 molar em relação aos íons Zn²⁺), tais formulações foram nomeadas MCMN-Ph e MCMN¹-Ph, respectivamente.

Também foi avaliada a formação do complexo metálico a partir da ligação LNC⁺_{0,7(1%)} a maiores concentrações de zinco. Assim, como mencionado anteriormente, foram adicionadas soluções de acetato de zinco com concentrações de 2 mg/mL e 4 mg/mL zinco à suspensão LNC⁺_{0,7(1%)}, obtendo-se formulações com concentração final de 50 µg/mL (MCMN²-Phe) e 100 µg/mL (MCMN³-Phe) de zinco. Após a ligação do metal, foram adicionadas 250 µL de solução de fenilalanina com concentração necessária para obtenção de proporções molares 3:1 e 3:2, respectivamente, em relação ao Zn²⁺. Como as formulações contendo zinco nas concentrações finais de 25, 50 e 100 µg/mL sofreram diluição após a adição das soluções de fenilalanina, as concentrações finais do metal em suspensão foram reduzidas para 24,4 µg/mL, 48,8 µg/mL, e 97,5 µg/mL, respectivamente.

4.2.1.4 Ligação do fragmento de anticorpo scFv anti-LDL(-) à superfície das nanocápsulas complexadas ao zinco

Foi avaliada a ligação de diferentes concentrações de scFv anti-LDL(-) à superfície da formulação MCMN¹. Nesta etapa, foi utilizada uma solução de scFv anti-LDL(-) 462,39 µg/mL, gentilmente cedida pela Universidade de São Paulo (USP). Em 351,21 µL de formulação MCMN¹, sob agitação magnética moderada, foram adicionados 648,79 µL de solução de scFv anti-LDL(-) nas concentrações de 77,07 µg/mL, 154,13 µg/mL, 308,25 µg/mL e 462,39 µg/mL, e assim permanecendo por 10 minutos. As formulações foram nomeadas segundo a concentração final de scFv anti-LDL(-) (MCMN¹-A⁵⁰; MCMN¹-A¹⁰⁰; MCMN¹-A²⁰⁰ e MCMN¹-A³⁰⁰); assim, uma suspensão com concentração final de anticorpo de 50 µg/mL foi nomeada como MCMN¹-A⁵⁰.

4.2.2 Caracterização Físico-química

4.2.2.1 Determinação do pH

O pH das suspensões de nanocápsulas foi determinado sem diluição prévia mediante utilização potenciômetro calibrado com soluções-tampão de valores de pH 4,0 e 7,0. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata de lote.

4.2.2.2 Determinação do diâmetro de partícula e polidispersão

Os valores de diâmetro médio baseado no volume das partículas, expresso como D[4,3]_v, distribuição de tamanho (expresso como SPAN) e o diâmetro de 50% da população baseando-se no número de partículas [d(0.5_n)], foram determinados primeiramente pela técnica de difratometria de laser, utilizando o equipamento Mastersizer[®] 2000 (Malvern Instruments) para verificar a qualidade nanotecnológica das suspensões de nanopartículas. As formulações também foram analisadas quanto ao seu diâmetro médio (*Z-Average*, calculado pelo método de cumulantes) e índice de polidispersão (PDI) pela técnica de espalhamento luz dinâmico (DLS, *Dinamic Light Scattering*) (Zetasizer[®] nano-ZS, Malvern Instruments), após diluição

de 500x das dispersões em água MilliQ[®]. A distribuição de tamanho e contagem do número de partículas também foram analisadas através do Analisador de Imagens de Nanopartículas (NTA, *Nanoparticle Tracking Analysis*) (Nanosight LM10 – NanoSight – Reino Unido), que utiliza uma fonte de luz de laser para iluminar as partículas em nanoescala, assim, cada partícula presente na suspensão aparece individualmente como ponto de espalhamentos que circulam com o movimento Browniano.

4.2.2.3 Potencial Zeta

O potencial zeta das formulações foi determinado pela técnica de mobilidade eletroforética mediante a utilização do equipamento ZetaPlus (Zeta Potential Analyser, Broolhaven Instrutmens Corporations), após diluição de 500x das dispersões em solução de NaCl 10 mM previamente filtrada através de membrana 0,45 µm. As determinações foram realizadas a partir de triplicatas de lote.

4.2.2.4 Teste de estabilidade das suspensões de nanocápsulas

As formulações de LNC contendo diferentes concentrações de lecitina e as formulações revestidas com diferentes concentrações de quitosana foram submetidas a testes de estabilidade acelerada utilizando metodologias preconizadas pela ANVISA (RE n^o1, de 29 de julho de 2005, D.O.U. de 01/08/2005;). Cada amostra foi armazenada em câmara climática e submetida à temperatura de 40 °C ± 2 °C, sendo a distribuição granulométrica das formulações verificada em função do tempo por difratometria de laser. Um segundo teste de estabilidade foi realizado para as suspensões de nanocápsulas LNC⁺₅ LNC⁺₇ e LNC⁺₁₄ estocando as formulações a temperatura de 5 °C ± 3 °C; assim como as demais amostras, o perfil granulométrico das suspensões LNC⁺₅ LNC⁺₇ e LNC⁺₁₄ também foi acompanhado em função do tempo pela técnica de difração de laser.

4.2.2.5 Determinação de zinco nas Nanocápsulas Multiparedes

O teor e a concentração de íons zinco associada à superfície das partículas LNC⁺₇ (suspensão MCMN-Phe) ou LNC⁺_{7(1%)} (suspensões MCMN¹-Phe, MCMN²-

Phe e MCMN³-Phe) foram determinados por metodologia espectrofotométrica indireta previamente validada¹, que consistiu na quantificação do Zn²⁺ utilizando ditizona como agente complexante, formando um complexo colorido com absorção máxima em 514 nm. Para isso, foi preparada uma curva obtida a partir de uma solução mãe de acetato de zinco contendo 100 µg/mL de íons Zn²⁺. Para formação do complexo Zn²⁺-ditizona, em um balão de 10 mL foram adicionados 1,3 mL de uma solução metanólica de ditizona (resultando em uma concentração final de 13 ng/mL), seguida pela adição de diferentes quantidades da solução mãe resultando nas concentrações finais de 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 ng/mL de íon metálico, o volume foi completado com metanol.

4.2.2.5.1 Teor de Zn²⁺ nas Nanocápsulas Multiparedes

O teor de íons zinco nas formulações MCMN-Phe, MCMN¹-Phe, MCMN²-Phe e MCMN³-Phe foi determinado por meio da diluição de cada suspensão, em balão volumétrico de 10 mL, para atingir a concentração final de 400 ng/mL, seguida pela da solução de ditizona, como descrito no item **4.2.2.5**.

4.2.2.5.2 Determinação de Zn²⁺ complexado à superfície das nanocápsulas

A determinação de íons Zn²⁺ ligado à superfície das nanocápsulas LNC⁺₇ e LNC⁺_{7-1%} foi realizada pela técnica de diálise, utilizando tubos de diálise de celulose com *cut-off* de 14 kDa (Sigma-Aldrich). Dessa forma, 4 mL de cada formulação (MCMN-Phe, MCMN¹-Phe, MCMN²-Phe e MCMN³-Phe) foram adicionados em sacos de diálise previamente hidratados. Após, os sacos contendo as formulações foram colocados em 40 mL de meio receptor, que consistiu de água ultrapura (MilliQ[®]). O experimento foi realizado, sob agitação, à 25 °C, por 6 h. A cada 2 h, foi realizado a remoção de todo o meio receptor, seguida pela reposição de mais 40 mL de água ultrapura. As porções coletadas após 2, 4 e 6 horas de experimento foram analisadas por espectrofotometria, pela adição de um volume de, no máximo, 3 mL em balão volumétrico de 10 mL, seguida pela adição da solução de ditizona e o volume completado com metanol (como descrito o item **4.2.2.5**). A concentração de íons Zn²⁺ ligada às nanopartículas ($[Zn^{2+}]_{Ligado}$, µg/mL) foi determinada pela Equação 1.

$$[\text{Zn}^{2+}]_{\text{Ligado}} = \frac{Q_T - (Q_{2h} + Q_{4h} + Q_{6h})}{4}$$

Equação 1

Onde Q_T , Q_{2h} , Q_{4h} e Q_{6h} são as quantidades Zn^{2+} no saco de diálise e quantificadas nos meios receptores após 2, 4 e 6 horas de experimento, respectivamente. O valor 4 na equação é o volume (em mL) de formulação (MCMN, MCMN^I, MCMN^{II} e MCMN^{III}) ou solução de íons Zn^{2+} contida no saco de diálise.

4.2.2.6 Quantificação de scFv anti-LDL(-) ligado às nanopartículas

A concentração de scFv anti-LDL(-) nas suspensões de nanopartículas foi determinada pela quantificação de proteínas totais empregando-se o método de Lowry (1951). Para isso, foi preparada a solução A, composta por uma solução aquosa de sulfato de cobre 5 mg/mL; a solução B, constituída por uma solução aquosa de carbonato de sódio, tartarato de sódio e potássio e hidróxido de sódio a 40 mg/mL, 1 mg/mL e 10 mg/mL, respectivamente; a solução C, formada pela mistura da solução B e solução A na proporção 9:1 (v/v), e a solução D, que consistiu no reagente de Follin 0,666 N. As medidas foram realizadas em placas de 48 poços. Dessa forma, em cada poço foram adicionados 500 μL da solução C e 40 μL de amostra; após 15 minutos, foi adicionado ao meio de reação 100 μL a solução D. As amostras foram incubadas a 25 °C, por 30 minutos e protegidas da luz; após transcorrido esse tempo, a medição da absorbância foi efetuada a 620 nm. Foram preparadas duas curvas: uma a partir de uma solução mãe de BSA (albumina sérica bovina) 2 mg/mL, com faixa de concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ a 1000 $\mu\text{g/mL}$; e uma segunda curva preparada a partir de uma solução de scFv anti-LDL(-) 107,88 $\mu\text{g/mL}$, com faixa de concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ a 70 $\mu\text{g/mL}$.

A determinação da concentração total de scFv anti-LDL(-) nas nanocápsulas foi realizada de duas formas: *i*) através da adição de 40 μL formulação contendo o fragmento de anticorpo no meio reacional (nesta metodologia, o valor de absorbância da amostra foi descontada da absorbância

de uma suspensão de nanocápsulas MCMN¹-Phe, com a mesma concentração de partículas em relação as nanocápsulas contendo o scFv anti-LDL(-), obtida após sua adição ao meio reacional como realizado para as amostras); e *ii*) por quantificação de scFv anti-LDL(-) contido no ultrafiltrado, após separação pela técnica de ultrafiltração-centrifugação de 200 µL da formulação a 5000 × g, por 15 minutos a 20 °C em centrífuga (Sigma 1-14, Sigma, Alemanha), utilizando unidades ultrafiltrantes de 30KDa (Milipore[®], Amicon[®] Ultra).

A determinação de scFv anti-LDL(-) não adsorvido à superfície das nanocápsulas também foi realizado por ultrafiltração-centrifugação, empregando-se as mesmas condições conforme metodologia previamente descrita por Oliveira *et al.*, (2013). Dessa forma, as suspensões contendo o fragmento de anticorpo (400 µL) foram transferidas para unidade ultrafiltrante de 30KDa (Milipore[®], Amicon[®] Ultra) e ultracentrifugadas (Sigma 1-14, Sigma, Alemanha) a 1870 × g por 5 minutos a 20 °C. Os valores de absorbância de cada um dos pontos das curvas e das amostras ultrafiltradas foram descontados da absorbância do meio reacional, no qual foi adicionado 40 µL de água ultrapura. A concentração de scFv anti-LDL(-) foi expressa como Eficiência de Ligação (EL(%)), calculada por meio da Equação 2.

$$EL (\%) = \frac{C_{AT} - C_{AL}}{C_{AT}} \times 100$$

Equação 2

Onde C_{AT} é a concentração total de scFv anti-LDL(-) (em µg/mL) na formulação e C_{AL} é a concentração de scFv (em µg/mL) no ultrafiltrado.

4.3 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como valores médios ± desvios-padrão. O método estatístico utilizado para analisar os resultados foi o ANOVA, seguido pelo teste Tukey, quando as diferenças foram consideradas significativas ($p < 0,05$).

As seções Resultados e Discussão e Conclusão (páginas 47 a 106) estão ocultas, pois o presente estudo será submetido a um periódico científico da área. Dessa forma será mostrada apenas uma breve descrição dos principais resultados e conclusões obtidas.

Com o desenvolvimento do presente estudo foi proposta na primeira etapa de revestimento das nanocápsulas a organização diferenciada das moléculas de lecitina de soja (na forma de estruturas semelhantes a lipossomas) em torno das nanocápsulas de núcleo lipídico, sendo verificada a completa saturação da superfície na concentração de 9 mg/mL do tensoativo aniônico, suspensão LNC₉; além disso, tal suspensão mostrou ser mais estável em comparação às formulações com menores concentração desse tensoativo.

Na segunda etapa foram obtidas formulações revestidas com diferentes concentrações do polímero catiônico, quitosana, a partir do revestimento da suspensão LNC₉. Ao relacionar os valores de potencial zeta em função da concentração desse polímero, verificou-se que a obtenção de uma monocamada completa de quitosana revestindo as partículas foi alcançada na formulação LNC⁺_{0,7}, a qual também mostrou ser mais estável em comparação às demais nanoestruturas revestidas com o polímero catiônico.

Na terceira etapa foi realizada a complexação dos íons zinco na superfície da suspensão de nanocápsulas contendo concentração de quitosana igual a 0,7 mg/mL; nesse estágio foi verificado que a complexação da espécie metálica é dependente do pH do meio, sendo necessário promover o aumento do pH da formulação a partir da redução da concentração de ácido acético da formulação com concentração otimizada de quitosana. Além disso, foi observada que a concentração ótima de zinco visando a conjugação do scFv anti-LDL(-) equivale a 25 µg/mL, de forma a obter uma menor concentração de íons metálicos livres na solução, não associados às nanoestruturas.

Na última etapa foi realizada a conjugação do scFv anti-LDL(-) à superfície da suspensão MCMN^I. A partir dos valores de raio hidrodinâmico verificou-se que uma menor concentração do fragmento de anticorpo no meio acarreta a formação de estruturas maiores devido à formação de agregados, decorrente do baixo número de moléculas de scFv anti-LDL(-) necessárias para

a completa passivação da superfície do complexo metálico. Além disso, verificou-se que a concentração de moléculas scFv anti-LDL(-) associadas à superfície das nanocápsulas multiparedes é dependente da sua concentração inicial no meio. Dessa forma, a formulação selecionada foi preparada na proporção molar de Zinco:scFv anti-LDL(-) de 12,5:1, a qual mostrou uma maior concentração de fragmento de anticorpo associado às nanoestruturas.

Por fim, o presente estudo permitiu a obtenção de um sistema mais estável contendo uma maior concentração de scFv anti-LDL(-) associada; abrindo, dessa forma, a perspectiva da utilização de um sistema mais eficaz no tratamento e prevenção da aterosclerose.

7. 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.

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

Azambuja, M.I.R.; Foppa, M.; Maranhão, M.F.C.; Achutti, A.C. Impacto Econômico dos Casos de Doença Cardiovascular Grave no Brasil: uma Estimativa Baseada em Dados Secundários. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 91, p.163-171, 2008.

Ball, D.W. **Físico-Química Vol. 2**. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, p. 836-838, 2006.

Bender, E.A. Desenvolvimento de nanocápsulas multiparede complexadas com metais (MCMN) e conjugadas a fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL minimamente oxidado [scFv anti-LDL(-)]. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, *UFRGS*. 2012.

Bender, E.A.; Adorne, M.D.; Colomé, L.M.; Abdalla, D.S.P.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.A. 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, 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. Artigo aceito.

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.

Biju, V. Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. **Chemical Society Reviews**. v. 43, p. 744—764, 2014.

Bruxel, F.; Laux, M.; Wild, L.B.; Fraga, M.; Koester, L.S.; Teixeira, H.F. Nanoemulsoes como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química Nova*. v. 35(9), p. 1827-1840, 2012.

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.

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.

Cavalcante, M.F. Efeito da imunização passiva com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL eletronegativa na aterosclerose experimental.

Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, *USP*. 2012.

Chen, Y.; Zhu, X.; Zhang, X.; Liu, B.; Huang, L. Nanoparticles Modified With Tumor-targeting scFv Deliver siRNA and miRNA for Cancer Therapy.

Molecular Therapy. v. 18 (9), p. 1650–1656, 2010.

Cheng, W.W.K. & Allen, T.M. Targeted delivery of anti-CD19 liposomal doxorubicin in B-cell lymphoma: A comparison of whole monoclonal antibody, Fab' fragments and single chain Fv. **Journal of Controlled Release**. v. 126 , p. 50–58, 2008.

Chuah, A.M.; Kuroiva, T.; Ichikawa, S.; Kobayashi, I.; Nakajuma, M. Formation of Biocompatible Nanoparticles via the Self-Assembly of Chitosan and Modified Lecithin. **Journal of Food Science**. v. 74(1), p. N1-N8, 2009.

Cromwell, M.E.; Hilario, E.; Jacobson, F. Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS Journal*. v. 8 (3), p. E572–E579, 2006.

Dalagnol, A. Desenvolvimento de sistemas de liberação nano- e microestruturados constituídos de complexos de lecitina e quitosana para liberação colônica da narigenina. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, *UFCS*. 2011.

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

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. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 109, p. 52-58, 2013.

Dhar, S.; Gu, F. X.; Langer, R.; Firoozfar, O. C.; Lippard, S. J. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105(105) 17356-17361, 2008.

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.

Dinu, M.V.; Dragan, E.S. Evaluation of Cu^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} ions removal from aqueous solution using a novel chitosan/clinoptilolite composite: Kinetics and isotherms. **Chemical Engineering Journal**. v. 160, p. 157–163, 2010.

Faulin, T.E.S.; Sena-Evangelista, K.C.M.; Pacheco, D.B.; Augusto, E.M.; Abdalla, D.S.P. Development of immunoassays for anti-electronegative LDL autoantibodies and immune complexes. **Clinica Chimica Acta**. v. 413, p. 291-297, 2012.

European Union. Nanomaterials.

http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/nanomaterials/en/. Acesso em: 29 de junho de 2014.

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.

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.

Fuhrman, B. The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis. **Atherosclerosis**. v.222, p. 8-14, 2012.

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.

Gleissner, C.A.; Leitinger, N.; Ley, K. Effects of Native and Modified Low-Density Lipoproteins on Monocyte Recruitment in Atherosclerosis. **Hypertension**. v.50, p. 276-283, 2007.

Goyal, T.; Mitra, S.; Khaidakov, M.; Wang, X.; Singla, S.; Ding, Z.; Liu, S.; Mehta, L.J. Current concepts of the role of oxidized LDL receptors in atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Report**. v.14, p.150-159, 2012.

Gref, R.; Domb, A.; Quellec, P.; Blunk, T.; Müller, R.H.; Verbavatz, J.M.; Langer, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 16, p. 215-233, 1995.

Grosso, D.M.; Ferderbar, S.; Wanschel, A.C.B.; Krieger, M.H.; Higushi, M.L.; Abdalla, D.S.P. Antibodies against electronegative LDL inhibit atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.41, p. 1086-1092, 2008.

Gulati, M.; Grover, M.; Singh, S.; Singh, M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 165, p. 129-168, 1998.
Hafner, A.; Lovrić, J.; Voinovich, D.; Filipović-Grčić, J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and

permeability through Caco-2 cell monolayers. **International Journal of Pharmaceutics**. v.381, p.205-213, 2009.

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.

Jäger, E.; Venturini, C.G.; Poletto, F.S.; Colomé, L.M.; João P. U. 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.

Jornada, D.S.; Fiel, L.A.; Bueno, K.; Gerent, J.F.; Petzhold, C.L.; Beck, R.C.R.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**. v. 8, p. 6646- 6655 , 2012.

Kazuma, S.M. Expressão de fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL eletronegativa (scFv) em *Pichia pastoris* e seu efeito sobre a formação de células espumosas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, USP, 2010.

Kazuma, S.M.; Cavalcante, M.F.; Telles, A.E.R.; Maranhão, A.Q.; Abdalla, D.S.P. Cloning and expression of an anti-LDL(-) single-chain variable fragment, and its inhibitory effect on experimental atherosclerosis. **mAbs**. v. 5, p. 763-775, 2013.

Laginha, K.M.; Moase, E.H.; Yu, N.; Huang, A.; Allen, T. M. Bioavailability and therapeutic efficacy of HER2 scFv-targeted liposomal doxorubicin in a murine model of HER2-overexpressing breast cancer. **Journal of Drug Targetin**. v. 16, p. 605–610, 2008.

Lehner, R.; Wang, W.; Marsch, S.; Hunziker, P. Intelligent nanomaterials for medicine: Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 9, p. 742–757, 2013.

Li, Y. e Vekilov P.G. The use of dynamic light scattering and Brownian microscopy to characterize protein aggregation. **Review of Scientific Instruments**. v. 82, nº artigo 053106, 2011. DOI:10.1063/1.3592581

Liu, Y.; Liu, Y.; Mernaugh, R.L.; Zeng, X. Single chain fragment variable recombinant antibody functionalized gold nanoparticles for a highly sensitive colorimetric immunoassay. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 24, p. 2853–2857, 2009.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 193(1), p. 265-75, 1951.

Lundberg, A.M. & Hansson, G.K. Innate immune signals in atherosclerosis. **Clinical Immunology**. v.134, p. 5–24, 2010.

Lu, R-M.; Chang, Y-L.; Chen, M-S.; Wu, H-C. Single chain anti-c-Met antibody conjugated nanoparticles for *in vivo* tumor-targeted imaging and drug delivery. **Biomaterials**. v. 32, p. 3265-3274, 2011.

Mao, C-Q.; Du, J-Z.; Sun, T-M.; Yao, Y-D.; Zhang, P-Z.; Song, E-W.; Wang, J. A biodegradable amphiphilic and cationic triblock copolymer for the delivery of siRNA targeting the acid ceramidase gene for cancer therapy. **Biomaterials**. v. 32, p. 3124-3133, 2011.

Mazzucchelli, S.; Verderio, P.; Sommaruga, S.; Colombo, M.; Salvadè, A.; Corsi, F.; Galeffi, P.; Tortora, P.; Prosperi, D. Multiple Presentation of Scfv800E6 on Silica Nanospheres Enhances Targeting Efficiency Toward HER-2 Receptor in Breast Cancer Cells. **Bioconjugate Chemistry**. v. 22, p. 2296–2303, 2011.

Mello, A.P.Q.; da Silva, I.T.; Abdalla, D.S.P.; Damasceno, N.R.T. Electronegative low-density lipoprotein: Origin and impact on health and disease. **Atherosclerosis**. v. 215, p. 257-265, 2011.

Melo .M.A. Jr., Santos, L.S.S.; Gonçalves, M.C.; Nogueira, A.F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**. v. 35(9), p. 1872-1878, 2012.

Mertins, O.; Cardoso, M.B.; Pohlmann, A.R.; Silveira, N.P. Structural Evaluation of Phospholipidic Nanovesicles Containing Small Amounts of Chitosan. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 6, p. 2425-2431, 2006.

Mertins, O; Lionzo, M.I.Z.; Micheletto, Y.M.S.; Pohlmann, A.R.; da Silveira, N.P. Chitosan effect on the mesophase behavior of phosphatidylcholine supramolecular systems. **Materials Science and Engineering C**. v. 29, p. 463–469, 2009a.

Mertins, O.; Silveira, N.P.; Pohlmann, A.R.; Schröder, A.P.; Marques, C.M. Electroformation of Giant Vesicles from an Inverse Phase Precursor. **Biophysical Journal**. v. 96, p. 2719–2726, 2009b.

Michalowski, C.B.; Guterres, S.S.; Dalla Costa T. Microdialysis for evaluating the entrapment and release of a lipophilic drug from nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 35, p. 1093–1100, 2004.

Mora-Huertas, C.E.; Fessi, E.; Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 385, p. 113–142, 2010.

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.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. Biossíntese de Lipídios, em: Nelson, D.L.; Cox, M.M. (Eds.) **Princípios de bioquímica de Lehninger**, Sarvier, São Paulo, 2006, pp. 812-815.

Neto, G.B.; da Silva, E.N. Os Custos da Doença Cardiovascular no Brasil: um Breve Comentário Econômico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v.91(4), p. 217-218, 2008.

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

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.

Oliveira, J.A.; Sevanian, A.; Rodrigues, R.J.; Apolinario, E. Abdalla, D.S. Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. **Clinical Biochemistry**. v. 39, p. 708-714, 2006.

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.

Pohlmann, A.R.; Soares, L.U.; Cruz, L.; da Silveira, N.P.; Guterres, S.S. Alkaline hydrolysis as a tool to determinethe association form of indomethacin in nanocapsules prepared with poly(3-caprolactone). **Current. Drug Delivery**. v. 1, p. 103–110, 2004.

Porpino, K.K.P. Biossorção de ferro (II) por casca de caranguejo *Ucides cordatus*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal da Paraíba, UFPB. 2009.

Qi, X.; Gao, H.; Zhang, Y.; Wang, X.; Chen, Y.; Sun, W. Electrochemical DNA biosensor with chitosan-Co₃O₄ nanorod-graphene composite for the sensitive detection of *staphylococcus aureus nuc* gene sequence. **Bioelectrochemistry**. v. 88, p. 42–47, 2012.

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.

Reddy, D.H.K.; Lee, S. Synthesis and Characterization of a Chitosan Ligand for the Removal of Copper from Aqueous Media. **Applied Polymer Science**. DOI: 10.1002/app.39578, p. 4542- 4550, 2013.

Reynaud, F.; Tsapis, N.; Deyme, M.; Vasconcelos, T.G.; Gueutin, 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.

Schaffazick, S.R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. v. 26, p. 726–737, 2003.

Shoenfeld, Y.; Wu, R.; Dearing, L.D.; Matsuura, E. Are Anti-Oxidized Low-Density Lipoprotein Antibodies Pathogenic or Protective? **American Heart Association**. p. 2551-2558, 2012. Disponível em: <http://circ.ahajournals.org/content/110/17/2552>, acesso em Janeiro de 2014.

Sherer, Y. & Shoenfeld, Y. Mechanisms of Disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. **Nature Clinical Practice Rheumatology**. v.2, n.2, p.99-106, 2006.

Silva, A.C.; Santos, D.; Ferreira, D.; Lopes, C.M. Lipid-based Nanocarriers As An Alternative for Oral Delivery of Poorly Water- Soluble Drugs: Peroral and Mucosal Routes. **Current Medicinal Chemistry**. v. 19, p. 4495-4510, 2012.

Siqueira, A. F. A; Abdalla, D. S. P; Ferreira, S. R. G. LDL: da Síndrome Metabólica à Instabilização da Placa Aterosclerótica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 334-343, 2006.

Siqueira, N.M.; Contri, R.V.; Paese, K.; Beck, R.C.R.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S. Innovative Sunscreen Formulation Based on Benzophenone-3-Coated Polymeric Nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**. v. 24, p. 166-174, 2011.

Son, S.; Lee, W.R.; Joung, Y.K.; Kwon, M.H.; Kim, Y.S.; Park, K.D. Optimized stability retention of a monoclonal antibody in the PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 368, p. 178–185, 2009.

Sonvico, F.; Cagnani, A.; Rossi, A.; Motta, S.; Di Bari M.T.; Cavatorta F.; Alonso, M.J.; Deriu, A.; Colombo, P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics**. v.324, p. 67–73, 2006.

Souto, E.B.; Severino, P.; Santana, M.H.A. Preparation of Polymeric Nanoparticles from Pre-Formed Polymers – Part II. **Polímeros-Ciência e Tecnologia**. v. 22, p. 101-106, 2012.

- Spadiut, O; Capone, S.; Krainer, F.; Glieder, A.; Herwig, C. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. **Trends in Biotechnology**. v. 32(1), 2014.
- Su, W.; Wang, H.; Wang, S.; Liao, Z.; Kang, S.; Peng, Y.; Han, L.; Chang, J. PEG/RGD-modified magnetic polymeric liposomes for controlled drug release and tumor cell targeting. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 426, p. 170–181, 2012.
- Tansil, N. C. & Gao, Z. Nanoparticles in biomolecular detection. **Nanotoday**. v. 1(1), 28-37, 2006.
- Torchilin, V.P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 58, p. 1532–1555, 2006.
- Tosi, G.; Bortot, B.; Ruozi, B.; Dolcetta, D.; Vandellia, M.A.; Forni, F.; Severini, G.M. Potential Use of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier. **Current Medicinal Chemistry**. v. 20 p. 2212-2225, 2013.
- Vauthier, C. & Bouchemal, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**. v. 26, p. 1025-1058, 2009.
- Vigor, K.L.; Kyrtatos, P.G.; Minogue, S.; Al-Jama, K.T.; Kogelberg, H.; Tolner, B.; Kostarelos, K.; Begent, R.H.; Pankhurst, Q.A.; Lythgoe, M.F.; Chester, K.A. Nanoparticles functionalised with recombinant single chain Fv antibody fragments (scFv) for the magnetic resonance imaging of cancer cells. **Biomaterials**. v. 31, p. 1307–1315, 2010.
- Villari, V. e Micali, N. Light Scattering as Spectroscopic Tool for the Study of Disperse Systems Useful in Pharmaceutical Sciences. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 97 (5), 1703-1730, 2008.
- Wang, Y.; Dossey, A.M.; Froude 2nd, J.W.; Lubitz, S.; Tzur, D.; Semenchenko, V.; Wishart, D.S. PSA fluorimmunoassays using anti-PSA ScFv and quantum-dot conjugates. **Nanomedicine**. v. 3(4), p. 475-483, 2008.
- Wang, H.; Yang, Y.; Qiam, H.; Zhang, Q.; Xu, H.; Li, J. Resveratrol in cardiovascular disease: what is known from current research? **Heart Failure Reviews**. v.17, p. 437–448, 2012.
- World Health Organization. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control, 2011, http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564373_eng.pdf?ua=1, acesso em: Janeiro de 2014.
- World Health Organization. WHO methods and data sources for global causes of death 2000-2011. Department of Health Statistics and Information Systems WHO. Geneva, 2013.

Zaia, D.A.M. Determinação de proteínas totais via espectrometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**. v. 21(6), p. 787-793, 1998.

Zdobnova, T.A.; Stremovskiy, O.A.; Lebedenko, E.N.; Deyev, S.M. Self-Assembling Complexes of Quantum Dots and scFv Antibodies for Cancer Cell Targeting and Imaging. **PLOS ONE**. v. 7(10), e48248. doi:10.1371/journal.pone.0048248, 2012.