



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PAULO GEORGE CAVALCANTE DE FREITAS**

**NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE POLICAPROLACTONA CONTENDO  
RESVERATROL: EFEITO DO TPGS NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E  
BIOLÓGICAS EM DE CÂNCER DE MAMA *IN VITRO* E *IN VIVO***

**FORTALEZA**

**2023**

**PAULO GEORGE CAVALCANTE DE FREITAS**

**NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE POLICAPROLACTONA CONTENDO  
RESVERATROL: EFEITO DO TPGS NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E  
BIOLÓGICAS EM DE CÂNCER DE MAMA *IN VITRO* E *IN VIVO***

Orientador(a): Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy.

**FORTALEZA**

**023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- D32n de Freitas, Paulo George Cavalcante.  
Nanopartículas poliméricas de policaprolactona contendo resveratrol: efeito do TPGS nas propriedades físico-químicas e biológicas em de câncer de mama in vitro e in vivo / Paulo George Cavalcante de Freitas. – 2023.  
81 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy.
1. Resveratrol. 2. Nanopartículas. 3. Neoplasias. I. Título.

CDD 615

---

## AGRADECIMENTOS

Eu agradeço a minha mãe que sempre me apoiou pelas intempéries do meu curso, me dando força mesmo quando não sabia que eu precisava.

A minha família que esteve comigo por todo o caminho.

Ao Paulo Ricardo e ao Emilson, meus grandes amigos e amores que me aguentaram durante toda essa caminhada tornando tudo mais fácil.

Ao meu grande professor Josimar Eloy sem o qual nada disso seria possível. Foi através das portas abertas pelo CEDEFAR que eu o conheci junto com todo o grupo maravilhoso que me acolheu desde o primeiro momento, Marcia Hermínia, Ana Paula, Maria Karolina, Ana Carolina, Karina Nogueira, Luís Carlos, Bruno Rodrigues, Jéssica, Raquel Petrilli, Luiziana, Elias Santos e tantos outros. Melhor local para desenvolver meu trabalho eu não encontraria, e eu saio sabendo que posso chamar cada um deles de amigos.

Aos meus amigos da vida Bruno Gomes, Carlos Alisson, Iago Braga, Larissa Valentim, Danilo Paz, Breno Muniz, Julia Alves, Yana Dhara, Eduardo Menezes, Jose Ivan.

A todos os profissionais que compõem o curso de farmácia da UFC que permitiram que eu chegasse preparado até o mercado profissional.

A CAPES pela bolsa que me foi concedida para a minha atuação e segurança durante toda essa jornada.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo uso do aparelho *Zetasizer Nano ZS* e espectrômetro Varian, modelo FT-IR Spectrum 660-IR.

A Central analítica da farmácia, presente na UFC pelo uso do calorímetro da série DSC-60 Plus, Shimadzu;

A Central analítica da física, presente na UFC pelo uso do Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG – FEI e microscópio confocal de fluorescência Zeiss, LSM 710

Ao laboratório LAAC, presente na UFC pelo uso do citômetro de fluxo BD FACSCalibur

## LISTA DE FIGURAS

1.	Estrutura química do resveratrol.	18
2.	Estrutura química da unidade monomérica da poli- $\epsilon$ -caprolactona.	24
3.	Ilustração esquemática das fases do processo de formação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação	25
4.	Ilustração de parte do aparato usado na liberação <i>in vitro</i> do RSV.	38
5.	Curva de calibração do resveratrol em presença dos interferentes PCL e poloxamer 407.	43
6.	Curva de calibração do resveratrol em presença dos interferentes PCL, Poloxamer 407 e TPGS.	44
7.	Gráficos de distribuição de tamanho de partículas das formulações NP 04 e NP 15	49
8.	Gráficos de Tamanho de partícula (a), PDI (b) e Potencial Zeta (c) para as formulações NP 04 e NP 15 com e sem RSV em suas formas pré (NP) e pós-lioflização (L-NP).	52
9.	Imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura para NP04 RSV (a); NP15 RSV (b).	53
10.	Curvas do DSC das formulações NP 04 (a) e NP 15 (b) contendo 20 % de sacarose com e sem resveratrol, e resveratrol puro.	55
11.	FTIR das formulações NP04, NP 15, com sem fármaco, e RSV puro.	56
12.	Gráfico de liberação <i>in vitro</i> do RSV encapsulado.	58
13.	Viabilidade celular das formulações NP 15 e NP 04 com e sem o fármaco RSV, e RSV em solução.	60
14.	IC <sub>50</sub> das formulações testadas na linha celular 4T1. Teste t de Student entre NP15 RSV vs. RSV e NP04 RSV vs. RSV. * p < 0,05.	63
15.	Imagens por microscopia confocal da captação celular das nanopartículas no interior de células cancerígenas da linhagem 4T1 nos tempos de 1h, 4h e 24h, respectivamente das formulações NP 04 (sem TPGS) e NP 15 (com TPGS) contendo o marcador DIO.	64
16.	Gráficos da citometria de fluxo das formulações NP 04 e NP15 em concentrações diferentes 0,25 $\mu$ M; 0,75 $\mu$ M; 10 $\mu$ M e 50 $\mu$ M e suas respectivas porcentagens divididas pelos quadrantes.	66

- 17.** Gráficos gerais da fluorescência vs. concentração para a formulação NP 04 (a) e para a formulação NP 15 (b). **68**
- 18.** (a) Curva de crescimento tumoral para cada grupo. (b) Curva de peso corporal após as subseqüentes administrações. **69**
- 19.** Peso médio tumoral de cada grupo obtido no final do estudo (\*P<0,05). (b) Imagem dos tumores retirados dos camundongos de cada grupo. (c) Curva de sobrevivência dos diversos grupos ao longo do estudo. **70**
- 20.** Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos após tratamento com salina, docetaxel (DTX), resveratrol (RSV) e nanopartículas poliméricas NP04 e NP15. (a) Albumina, (b) alanina aminotransferase (ALT), (c) aspartato aminotransferase (AST), (d) bilirrubina indireta, (e) bilirrubina total, (f) bilirrubina direta, (g) gama-glutamil transferase (GGT). **72**

## LISTA DE TABELAS

1.	Diferentes composições de nanopartículas preparadas pela técnica de nanoprecipitação.	33
2.	Grupos utilizados no <i>in vivo</i> com as respectivas características do método	41
3.	Caracterização físico-química das formulações produzidas com relação à tamanho de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e eficiência de encapsulação (EE).	46
4.	Formulações com crioprotetor (10, 20 e 30%) e suas características físico-químicas	50
5.	Valores de coeficiente de determinação dos modelos de liberação das amostras testadas.	58
6.	IC <sub>50</sub> das formulações testadas com seus respectivos desvios padrões	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
HER2	Fator de crescimento epidérmico 2
RSV	Resveratrol
IGF- 2	Fator de crescimento insulina-like
NPs	Nanopartículas
EPR	Efeito de aumento de permeabilidade e retenção
TPGS	Succinato de D- $\alpha$ -tocoferil polietileno glicol
FDA	Administração Federal de Drogas
MDR	Resistência a multidrogas
P-gp	P-glicoproteína
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês reactive oxygen species)
PLGA-PEG-COOH	Ácido poli (D, L-lactídeo-co-glicolídeo) -b-poli (etileno glicol) - carboxílico
FTIR	Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
DMSO	Dimetilsulfóxido
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio
PDI	Índice de polidispersividade



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Câncer de mama: aspectos gerais e tratamento</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Resveratrol</b>	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Nanopartículas como sistema carreador de fármacos</b>	<b>19</b>
<b>2.3.1</b>	<i>Nanopartículas Poliméricas</i>	<b>21</b>
<b>2.3.2</b>	<i>D-<math>\alpha</math>-Tocoferil Polietilenoglicol 1000 Succinato (TPGS)</i>	<b>21</b>
<b>2.3.3</b>	<i>Poli-<math>\epsilon</math>-Caprolactona (PCL)</i>	<b>23</b>
<b>2.3.4</b>	<i>Técnica de preparo: nanoprecipitação</i>	<b>24</b>
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>28</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>30</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Materiais e equipamentos</b>	<b>32</b>
<b>5.1.1</b>	<i>Materiais</i>	<b>32</b>
<b>5.1.2</b>	<i>Equipamentos</i>	<b>32</b>
<b>5.2</b>	<b>Método analítico para quantificação de Resveratrol</b>	<b>32</b>
<b>5.3</b>	<b>Preparo de nanopartículas a base de PCL com e sem TPGS</b>	<b>33</b>
<b>5.4</b>	<b>Liofilização das nanopartículas</b>	<b>34</b>
<b>5.5</b>	<b>Caracterização físico-química dos sistemas desenvolvidos</b>	<b>34</b>
<b>5.5.1</b>	<i>Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta</i>	<b>34</b>
<b>5.5.2</b>	<i>Determinação da eficiência de encapsulação do fármaco resveratrol</i>	<b>35</b>
<b>5.5.3</b>	<i>Teste de estabilidade in vitro</i>	<b>36</b>
<b>5.5.4</b>	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	<b>36</b>
<b>5.5.5</b>	<i>Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	<b>36</b>
<b>5.5.6</b>	<i>Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama</i>	<b>36</b>
<b>5.5.7</b>	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	<b>37</b>
<b>5.5.8</b>	<i>Método analítico para quantificação de RSV em ensaio de liberação in vitro</i>	<b>37</b>
<b>5.5.9</b>	<i>Liberação in vitro de resveratrol</i>	<b>37</b>
<b>5.6</b>	<b>Avaliação de citotoxicidade em célula da linhagem 4T1</b>	<b>38</b>
<b>5.7</b>	<b>Avaliação da captação celular por citometria de fluxo</b>	<b>39</b>

<b>5.8</b>	<b>Captação celular por microscopia confocal</b>	<b>40</b>
<b>5.9</b>	<b>Teste <i>in vivo</i></b>	<b>40</b>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>
<b>6.1</b>	<b>Método analítico para quantificação do resveratrol</b>	<b>43</b>
<b>6.2</b>	<b>Caracterização físico-química das formulações</b>	<b>44</b>
<b>6.3</b>	<b>Liofilização das nanopartículas</b>	<b>50</b>
<b>6.4</b>	<b>Teste de estabilidade</b>	<b>51</b>
<b>6.5</b>	<b>Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama</b>	<b>53</b>
<b>6.6</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b>	<b>53</b>
<b>6.7</b>	<b>Análises térmicas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</b>	<b>54</b>
<b>6.8</b>	<b>Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b>	<b>56</b>
<b>6.9</b>	<b>Liberação <i>in vitro</i> de resveratrol</b>	<b>57</b>
<b>6.10</b>	<b>Citotoxicidade</b>	<b>59</b>
<b>6.11</b>	<b>Captação celular por microscopia confocal</b>	<b>63</b>
<b>6.12</b>	<b>Avaliação da captação celular por citometria de fluxo</b>	<b>65</b>
<b>6.13</b>	<b>Estudo de ação antitumoral <i>in vivo</i></b>	<b>68</b>
<b>6.14</b>	<b>Análises bioquímicas</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>77</b>

## RESUMO

Entre as moléculas com potencial antitumoral mais estudados atualmente destaca-se como promissora o resveratrol, uma fitoalexina que apresenta ação inibitória de expectativas e crescimentos de diversas linhagens de células cancerígenas. Nesse trabalho estuda-se a aplicação dessa molécula contra o câncer de mama. Com o intuito de sobrepor as características desfavoráveis apresentadas nesse fármaco, tais como sua solubilidade, optou-se pela encapsulação do resveratrol em nanopartículas poliméricas a base de poli- $\epsilon$ -caprolactona, já que as nanopartículas atuam como um ótimo sistema carreador de fármacos, melhorando a biodisponibilidade, tempo de circulação, e, potencialmente reduzindo a dose e os efeitos colaterais. Estudou-se também a ação do tensoativo peguilado TPGS (DL- $\alpha$ -tocoferol polietilenoglicol-1000), um derivado da vitamina E, que além de atuar na estabilização e longo tempo de circulação da nanopartícula, poderia reduzir a resistência ao tratamento com o fármaco. As nanopartículas foram produzidas pela técnica de nanoprecipitação, apresentando tamanho médio de 145 nm ou 129,5 nm e eficiência de encapsulamento média de 97,31% ou 93,21% para formulações funcionalizadas e não funcionalizadas, respectivamente. A microscopia eletrônica de varredura indicou a produção de nanopartículas esféricas e com baixa tendência de agregação. As técnicas de DSC e FTIR permitiram a identificação dos constituintes, além de indicar a encapsulação do fármaco no estado amorfo ou molecular. Análises de citometria de fluxo e microscopia confocal indicaram uma excelente captação celular das nanopartículas produzidas dependentes da concentração, e evidenciaram que o TPGS prejudica o processo de captação celular. Nos testes de citotoxicidade contra células de câncer de mama da linhagem 4T1, encontraram-se valores de IC 50 correspondendo a 0,12; 0,73; 4,06  $\mu$ M para a formulação sem TPGS, com TPGS e fármaco puro, respectivamente, evidenciando a potencialização do efeito citotóxico do resveratrol em nanopartículas poliméricas, também prejudicado pela adição do TPGS. Estudos *in vivo* em modelo animal corroboraram os dados anteriores, demonstrando melhor efeito da formulação sem TPGS sobre o crescimento tumoral, além de diminuir drasticamente a taxa de crescimento diário dos tumores frente os grupos com fármaco livre e com nanopartículas funcionalizadas, ainda mostrou-se menos tóxica que a formulação com TPGS que apresentou níveis elevados de bilirrubina direta, que marca dano aos hepatócitos. Sendo assim, esses resultados corroboram diversos estudos científicos, sendo de grande importância para a compreensão do efeito da encapsulação do resveratrol e da presença do TPGS efeito frente ao câncer de mama, *in vitro* e *in vivo*.

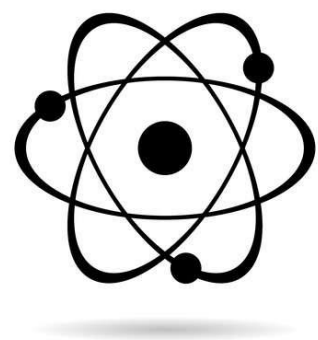
**Palavras-chave:** Resveratrol; TPGS; Nanopartícula; Poli- $\epsilon$ -caprolactona.

## ABSTRACT

Among the most studied molecules with antitumor potential currently, resveratrol stands out as a promising one, a phytoalexin that presents an inhibitory action of expectations and growths of several cancer cell lines. In this work, the application of this molecule against breast cancer is studied. In order to overcome the unfavorable characteristics presented by this drug, such as its solubility, it was decided to encapsulate resveratrol in polymeric nanoparticles based on poly- $\epsilon$ -caprolactone, since nanoparticles act as an excellent drug carrier system, improving bioavailability, circulation time, and potentially reducing dose and side effects. The action of the pegylated surfactant TPGS (DL- $\alpha$ -tocopherol polyethylene glycol-1000) was also studied, a vitamin E derivative, which, in addition to acting on the stabilization and long circulation time of the nanoparticle, could reduce resistance to treatment with the drug. The nanoparticles were produced by the nanoprecipitation technique, with an average size of 145 nm or 129.5 nm and an average encapsulation efficiency of 97.31% or 93.21% for functionalized and non-functionalized formulations, respectively. Scanning electron microscopy indicated the production of spherical nanoparticles with low aggregation tendency. The DSC and FTIR techniques allowed the identification of the constituents, in addition to indicating the encapsulation of the drug in the amorphous or molecular state. Flow cytometry and confocal microscopy analyzes indicated an excellent concentration-dependent cell uptake of the produced nanoparticles, and showed that TPGS impairs the cell uptake process. In the cytotoxicity tests against breast cancer cells of the 4T1 lineage, IC 50 values were found corresponding to 0.12; 0.73; 4.06  $\mu$ M for the formulation without TPGS, with TPGS and pure drug, respectively, showing the potentiation of the cytotoxic effect of resveratrol on polymeric nanoparticles, also impaired by the addition of TPGS. *In vivo* studies in an animal model corroborate previous data, demonstrating a better effect of the formulation without TPGS on tumor growth, in addition to drastically decreasing the daily growth rate of tumors compared to the groups with free drug and with functionalized nanoparticles, it was even less toxic than the formulation with TPGS that showed high levels of direct bilirubin, which marks damage to hepatocytes. Therefore, these results corroborate several scientific studies, being of great importance for understanding the effect of resveratrol encapsulation and the presence of TPGS effect against breast cancer, *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Resveratrol. TPGS. Nanoparticle. Poly-  $\epsilon$ -caprolactone.

# INTRODUÇÃO



## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é considerado a segunda principal causa de morte no mundo, excluindo o câncer de pele não melanoma (CHHIKARA; PARANG, 2023). Os tratamentos disponíveis dependem das características do câncer (tamanho do tumor, grau de diferenciação do tumor, presença de receptores específicos) e dos pacientes (obesidade, dieta, idade). Um alvo molecular estudado é o fator de crescimento epidérmico 2 (HER2) que também é encontrado com expressão anormal em 20% dos cânceres de mama (Grewal et al., 2021). Um exemplo de terapia direcionada é o uso do anticorpo monoclonal Trastuzumab®, que atua em cânceres de mama HER2-positivos (Lofterød et al., 2020). Existem diversas drogas utilizadas no tratamento do câncer de mama, porém, apresentam desvantagens importantes, como baixa biodisponibilidade, distribuição inespecífica, o que leva a uma gama de efeitos colaterais, além de baixa solubilidade em água, o que leva a uma diminuição da biodisponibilidade. Assim, considerando as estimativas de crescimento do número de casos em um futuro próximo, a busca por novas formas de tratamento é de extrema importância.

O resveratrol (RSV) é uma molécula lipofílica com solubilidade em água de apenas 0,03 g/L. Embora tenha baixa solubilidade em água, essa molécula possui excelente permeabilidade de membrana devido à sua alta lipofilicidade (Annaji et al., 2021). Estudos mostram a ação terapêutica dessa droga contra diversos tipos de câncer, inclusive o de mama, onde sua ação inibitória foi observada em 17 diferentes linhagens celulares de câncer, sendo eficaz tanto naquelas que possuem receptores para estrogênio e progesterona, quanto naquelas que não possuem ou expressam esses receptores.

O campo da nanotecnologia farmacêutica permite inúmeras possibilidades de aprimoramento de formulações, pois aumenta sua eficácia, associada à redução de seus efeitos colaterais. As nanopartículas poliméricas (NPs) têm maior bioafinidade do que outros materiais, têm baixa ou nenhuma toxicidade e são biodegradáveis. As NPs podem ser produzidas a partir de polímeros naturais ou sintéticos, sendo o primeiro geralmente abundante na natureza e de baixo custo, além de apresentar alta biocompatibilidade e baixa imunogenicidade. Dentre tantos polímeros, um que recebe destaque é a poli-ε-caprolactona (PCL), que foi aprovada pelo FDA para uso na produção de medicamentos humanos e materiais cirúrgicos (Abamor et al., 2018). Este polímero possui características físico-químicas que o tornam um excelente material para a produção de NPs para drug delivery. Possui alta versatilidade que advém do alto número de alterações que podem ser feitas em suas características químicas, físicas e mecânicas, que refletem na cristalinidade, solubilidade, características iônicas, entre outras. No entanto, as NPs apresentam pontos negativos como maior variação de características de lote para lote, menor

pureza e maior complexidade estrutural (Pulingam et al., 2022; Wong et al., 2020). O manejo das características superficiais das NPs é considerado um obstáculo, pois estão diretamente relacionados à suscetibilidade das NPs serem reconhecidos e eliminados pelo sistema imunológico.

Nesse sentido, destaca-se o succinato de D- $\alpha$ -tocoferil polietilenoglicol 1000 (TPGS), que é um surfactante que auxilia as NPs a melhorar a liberação do fármaco encapsulado e aumentar a eficiência de encapsulação (Gorain et al., 2018; Guo et al., 2013; Yang et al., 2018). O TPGS atua sinergicamente com outras drogas antitumorais, pois tem a capacidade de levar as células tumorais à apoptose, capacidade esta também correlacionada com sua ação nas mitocôndrias. Além de atuar via complexo mitocondrial, o TPGS também pode inibir a regulação de genes anti-apoptóticos, uma diminuição em tais genes permitirá retroalimentar a ativação de genes pró-apoptóticos que levam à morte celular (Guo et al., 2013; Z. Zhang et al., 2012).

Embora o RSV já tenha sido encapsulado em nanopartículas poliméricas, o papel do TPGS nas propriedades físico-químicas das nanopartículas e no comportamento biológico no câncer de mama ainda não está claro. Assim, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e caracterização de NPs baseadas em PCL para encapsulamento de RSV além de observar a influência do TPGS nas propriedades físico-químicas e biológicas das NPs, com o objetivo de gerar um fármaco potencialmente aplicável para o tratamento de Câncer.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Câncer de mama: aspectos gerais e tratamento**

Mundialmente o câncer tem alcançado níveis alarmantes, se tornando a segunda maior causa de morte em todo o mundo. Estima-se que em 2018 ocorreram 9.6 milhões de óbitos. Enquanto pulmão e próstata são os principais tipos de câncer a atingir os homens, câncer de mama e colorretal são os principais entre as mulheres (WHO, 2021). Segundo o Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), estima-se para o Brasil nos anos de 2023 a 2025 a ocorrência de 73.610 mil novos casos de câncer por ano, onde o câncer de mama, seguindo a incidência mundial, continua sendo o que mais atinge mulheres no Brasil, excetuando-se o câncer de pele não melanoma. Para o ano de 2020 foram estimados 66.280 novos casos de câncer de mama no Brasil (MS, 2023).

A incidência do câncer de mama, assim como de diversos outros, depende de diversos fatores, como a idade, com baixa incidência em mulheres abaixo dos 35, mas com incidência aumentada a partir dos 50 anos. Os tratamentos disponíveis para tal doença são diversos e também depende das características do câncer (tamanho tumoral, grau de diferenciação do tumor, presença de receptores específicos) e do paciente (obesidade, dieta, idade). A mastectomia, a radioterapia e a quimioterapia são exemplos dos tratamentos possíveis para essa doença, sendo esta a modalidade que possibilita a hormônio terapia e o uso de medicamentos alvo-direcionados. Um ponto muito relevante sobre o câncer de mama é a correlação da doença com receptores de estrogênio e progesterona, visto que em alguns casos o crescimento tumoral se dá pelo aumento da quantidade de tais receptores, de tal forma que a utilização de medicamentos que atuem sobre esses receptores se torna não só uma estratégia viável como importante. Grewal et al apontam que o receptor tipo alfa do estrogênio (ER $\alpha$ ) se encontra super expresso em 70% dos casos de câncer de mama invasivo. Outro alvo molecular estudado é o fator de crescimento epidermal 2 (HER2) que se encontra também com expressão anormal em 20% dos canceres de mama (GREWAL et al., 2021). Um exemplo de terapia alvo direcionada é a utilização do anticorpo monoclonal Trastuzumab® que atua em cânceres de mama que se apresentam positivos para HER2 (LOFTERØD et al., 2020).

Existem diversos medicamentos utilizados no tratamento do câncer de mama, comumente o tratamento é feito com a utilização de uma antraciclina e um taxano, por exemplo a utilização da doxirrubicina e ciclofosfamida por 4 ciclos seguido de outros 4 ciclos de paclitaxel, outra opção corriqueira é o uso do docetaxel com uma antraciclina, vale lembrar que o docetaxel apresenta uma toxicidade maior que o próprio paclitaxel levando a um maior número de casos de neutropenia febril (MOO et al., 2018).

Os fármacos antitumorais apresentam comumente algumas desvantagens importantes, como baixa biodisponibilidade, distribuição não específica, que leva a uma gama de efeitos colaterais, além da baixa solubilidade em água que leva a uma diminuição da biodisponibilidade. Por exemplo, o fármaco paclitaxel, que é empregado no tratamento de diversos tumores, incluindo mama, é uma molécula hidrofóbica que é comercializada na forma farmacêutica de solução injetável (Taxol®), que para solubilização do princípio ativo contém o tensoativo cremophor EL40® e etanol, compostos que estão associados a reações de hipersensibilidade. Logo, a busca por novas formulações mais seguras se faz necessária (WONG et al., 2020).

Levando em consideração as estratégias terapêuticas supracitadas, que embora possam levar a cura do paciente, diminuem também a qualidade de vida do mesmo durante o curso do



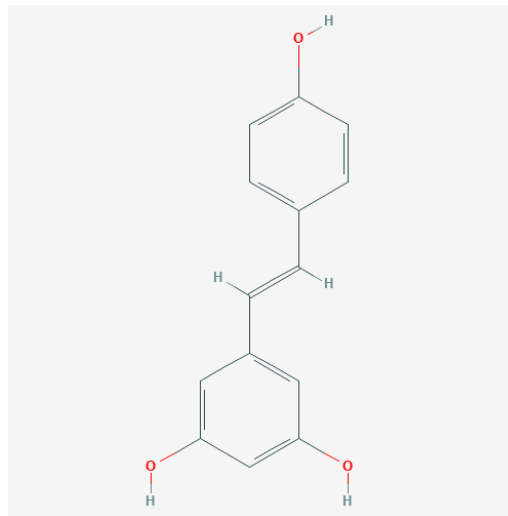
tratamento, já que, por exemplo, a grande parte dos tratamentos atuais causam uma deposição de fármaco nos órgãos viscerais até 20 vezes maior que no local alvo, o tumor. Outro aspecto importante é a possibilidade de desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas (MDR) que leva a impossibilidade de utilização de um grande número de fármacos, já que as proteínas que funcionam como bombas de efluxos para tais fármacos se encontram presentes em tumores que apresentam esse fenótipo (GREWAL et al., 2021). Dessa forma considerando as estimativas de crescimento do número de casos no futuro próximo, a busca por novas formas de tratamento, seja visando o carreamento de um fármaco já existente, ou a busca de novos alvos terapêuticos que consigam superar as barreiras supracitadas de forma mais efetivas se mostra extremamente importante.

## 2.2. Resveratrol

O resveratrol (RSV), representando na Figura 1, é uma fitoalexina polifenólica comumente encontrado em uvas, vinhos, amendoins e em mais de 70 outras plantas, produzido em resposta a ataques de fungos ou bactérias. Embora seja encontrado naturalmente a quantidade que pode ser adquirida por quilograma de matéria orgânica é muito pequena, o que leva a sua produção síntese química em sua forma pura para a utilização científica. O resveratrol apresenta uma ligação dupla entre os dois anéis aromáticos permitindo assim a formação de dois isômeros, o *cis* e o *trans*, onde o isômero *trans* é biologicamente mais ativo e a forma mais estável (ANNAJI et al., 2021; TALIB et al., 2020).

Trata-se de uma molécula muito lipofílica com solubilidade em água de apenas 0,03 g/L. Embora possua baixa solubilidade em água, essa molécula apresenta uma ótima permeabilidade por membranas que se deve à sua alta lipofilicidade (ANNAJI et al., 2021).

**Figura 1:** Estrutura química do resveratrol.



Fonte: PubChem

O resveratrol tem sido extensamente pesquisado devido ao grande número de atividades farmacológicas que ele apresenta, como seu papel de desagregador plaquetário, cardioprotetor, anti-inflamatório, antioxidante além de suas propriedades vasodilatadoras. Já a atividade antitumoral do resveratrol está correlacionada a diversos fatores, primeiramente, esse fármaco apresenta características quimiopreventivas, ou seja, atua na prevenção e supressão do surgimento do câncer, junto de suas atividades quimioterapêuticas. Essa molécula age através de diversos alvos celulares diferentes, sejam estes envolvidos com o microambiente tumoral ou com o tumor em si, tal ação vai desde atuação na suspensão do ciclo celular, indução de apoptose, inibição dos processos de adesão, invasão e metástase. Um dos principais mecanismos de ação do RSV ocorre pela sua produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no microambiente tumoral, embora em baixas concentrações as ROS desempenhem papéis homeostáticos, quando estão em grande quantidade são responsáveis por ativações de vias apoptóticas (ANNAJI et al., 2021).

Estudos mostram a ação terapêutica do resveratrol contra diversos tipos de câncer, dentre eles o de mama, onde foi observado a sua ação inibitória em linhagem celulares de câncer diferentes, sendo efetivo tanto naquelas que apresentam receptores para estrogênio (ER) e progesterona (PR), quanto naquelas que não apresentam tais receptores, além de mostrar resultados positivos nas linhagens celulares que são HER2 positivas e negativas, com inibição dose-dependente e diretamente proporcionais ao tempo de exposição. Tais respostas são decorrentes da ação do fármaco sobre diversos alvos não conhecidos inteiramente, mas alguns desses mecanismos são a inibição do receptor ER/ proteína quinase B; inibição dos precursores

do IGF- 2 (Fator de crescimento insulina-like) que ao ser suprimido leva a inibição do crescimento celular. Além disso, essa molécula pode atuar sobre as aromatasas que fazem parte da família do citocromo P450 que está diretamente relacionado com a produção de estrogênio em tumores ER positivos, logo sua inibição leva a diminuição do crescimento tumoral (ANNAJI et al., 2021; SINHA et al., 2016a). Outro ponto interessante é a ação inibitória causada pelo resveratrol sobre glicoproteína P causadora da resistência a multidroga (MDR), em seu trabalho Wang et al., observaram uma clara diminuição da ação dessa proteína na presença do fármaco na sua forma livre e na sua forma encapsulada, tal papel é importante já que a MDR é comumente observada em alguns tipos de linhagens de câncer de mama, como a MCF-7. Tal inibição é causada pela diminuição da expressão dessa proteína advinda da ação do resveratrol (WANG et al., 2015).

Embora o RSV se mostre como um promissor agente anticancerígeno, algumas barreiras para o seu uso devem ser ultrapassadas, como a sua característica hidrofóbica, e como principal problema tem-se sua baixa biodisponibilidade, uma vez que sua metabolização ocorre rapidamente impedindo que grande parte da forma livre consiga chegar ao local de ação, sendo que a metabolização da forma *cis* chega a ser dez vezes mais rápida que a forma *trans* diminuindo, assim, grande parte da biodisponibilidade do isômero *cis* em detrimento do *trans* (TALIB et al., 2020).

### **2.3. Nanopartículas como sistemas carreadores de fármacos**

Nanopartículas são descritas como sistemas sintetizados a base de materiais orgânicos ou inorgânicos que se apresentam em tamanhos que vão de 1 a 1000 nm. Já o FDA (Food and Drug Administration) descreve nanopartículas como materiais que apresentam pelo menos uma dimensão na escala de 1 a 100 nm que tendem a apresentar características físico-químicas ou biológicas diferentes daquelas em apresentadas em sua escala normal. Comumente ao se considerar sua utilização de nanopartículas como sistemas carreadores de fármacos esse tamanho tende a variar entre 100 a 200 nm, que vão carrear seja em seu interior ou em sua superfície um fármaco ou ativo que terá ação importante no tratamento da condição do paciente. O grande interesse no estudo desse material advém das diversas características físico-químicas, óticas, mecânicas e magnéticas presentes no material em escala nanométrica que não são vistas no mesmo material em escala maior (ANNAJI et al., 2021; FDA, 2014; PULINGAM et al., 2022).

Dado os diversos problemas físico-químicos, de estabilidade, e de farmacocinética e existentes na administração de diversos fármacos como os quimioterápicos em sua maioria apresentam, a busca de novas formas de carreamento dessas moléculas tem sido extensivamente pesquisada. Nesse contexto, as nanopartículas se mostram como um eficiente sistema carreador de fármacos, visto que com sua utilização o carreamento de fármacos lipofílicos, com baixa biodisponibilidade, facilmente metabolizáveis podem ser facilmente carreados até locais específicos e desejados. Outro ponto muito importante é que ao se utilizar nanopartículas como sistema de liberação de fármacos diversas qualidades são adquiridas como um aumento no tempo de circulação do fármaco pelo organismo, aumento da biodisponibilidade, diminuição da metabolização, características estas que levam a uma diminuição da dose administrada, além de permitir a liberação controlada do fármaco em questão .

Uma vantagem importante para a qualidade de vida do paciente ao se carrear fármacos através de nanopartículas é o fato de que uma vez que o fármaco se encontra encapsulado a sua interação com tecidos e órgãos sadios diminuem, levando, assim, a uma menor taxa de efeitos adversos, irritações causadas pelo fármaco e demais interações negativas que poderiam dificultar a continuidade do tratamento pelo paciente (ANNAJI et al., 2021).

Um fenômeno muito comum observado em tumores sólidos que afeta a entrega de fármaco ao sítio tumoral é o efeito EPR (efeito de aumento de permeabilidade e retenção) que é gerado pelo tumor e que causa um aumento da vascularização, angiogênese e baixa recaptção linfática comum a tumores desse tipo. Devido ao processo de angiogênese produzido por fatores liberados pelo próprio tumor os vasos produzidos para sua irrigação, que não são perfeitos, possuem poros nanométricos, e é graças a esse fenômeno, que de forma passiva as nanopartículas podem atravessar a vasculatura tumoral, levando a um acúmulo destas no local alvo em detrimento de demais órgãos (HOBBS et al., 1998). O acúmulo de nanopartículas próximo a membrana celular leva a um aumento do gradiente de concentração do fármaco, o que leva a um aumento da absorção celular das NPs e do próprio fármaco (SANNA et al., 2012).

Poucos foram os medicamentos à base de nanopartículas que conseguiram chegar ao mercado até os dias atuais para o tratamento do câncer de mama, por exemplo o Doxil® que foi o primeiro nanossistema aprovado pelo órgão fiscal americano FDA em 1995, sendo um lipossoma PEGlado que encapsula o fármaco doxirrubicina permitindo um grande aumento da meia vida do fármaco frente a sua forma livre, já que o Doxil® apresenta uma meia vida de distribuição de 72h enquanto a doxirrubicina apresenta uma meia vida de distribuição de apenas 5 minutos (com meia-vida terminal de 20-48h). Outro avanço importante desse medicamento foi a diminuição do grande número de casos de cardiotoxicidade relacionados a utilização da

doxirrubicina na sua forma livre. Abraxane® foi outro nanofármaco aprovado em 2005 pelo FDA, utilizando nanopartículas a base de albumina para o carregamento do fármaco paclitaxel, utilizado com ótimos resultados no tratamento de casos de câncer de mama metastático (BARENHOLZ, 2012; TANG; LOC; DONG, 2017).

É importante notar que embora se considerem as características gerais advindas do uso de nanopartículas como carreadores, as características intrínsecas de cada nanopartícula tais como as características físico-químicas, tamanho, absorção celular, características de superfície e demais dependem não só do material que as compõe, mas da técnica usada para seu preparo, aspectos considerados no presente trabalho.

### ***2.3.1 Nanopartículas Poliméricas***

Com o propósito da busca por novas formas de carrear fármacos, diversos tipos de nanopartículas já foram estudadas, mas um ponto muito importante que impede o uso de muitos NPs é a toxicidade do material base, dentro desse contexto nanopartículas poliméricas se mostram como uma solução, uma vez que apresentam bioafinidade superior a outros materiais, baixa ou nula toxicidade, além de serem biodegradáveis. A síntese dessas NPs pode ser feita a partir de polímeros naturais ou sintéticos, os primeiros são geralmente abundantes na natureza e de baixo custo, além de apresentarem alta biocompatibilidade e baixa imunogenicidade, mas por outro lado apresenta pontos negativos como uma maior variação das características de um lote para outro, menor grau de pureza, e maior complexidade estrutural (PULINGAM et al., 2022; WONG et al., 2020). Polímeros sintéticos, por outro lado tem uma composição química conhecida e controlável, levando a produção de nanopartículas com características físico-químicas previsíveis e reproduzíveis, além disso, devido polímeros sintéticos possuem uma estrutura mais simples e bem definida, eles apresentam um menor risco relacionado a imunogenicidade e infecções por bactérias e vírus (CRUCHO; BARROS, 2017; SONG et al., 2018)

### ***2.3.2 D- $\alpha$ -Tocoferil Polietilenoglicol 1000 Succinato (TPGS)***

Um dos obstáculos que devem ser enfrentados ao se utilizar algumas nanopartículas como sistemas carreadores de fármacos é o manejo de suas características superficiais, uma vez que estão diretamente relacionada com a susceptibilidade da NP de ser reconhecida pelo sistema imune e depurada, isso acontece por que nanopartículas hidrofóbicas apresentam uma maior ligação com opsoninas, que são componentes sanguíneos que atuam como marcadores sobre

corpos que devem ser fagocitados, logo quanto mais NP fagocitadas, maior o *clearance* da mesma, diminuindo o seu tempo de meia vida e a quantidade de fármaco que chegará ao local de ação (KOU et al., 2013). Assim o desenvolvimento de formas que impeçam a fagocitose das NPs é de suma importância, dentre os métodos existentes um que se mostra muito efetivo é a funcionalização da superfície das nanopartículas com substâncias que as tornem mais hidrofílicas, de forma que a opsonização das mesmas seja dificultada e, assim, não haja uma detecção das mesmas pelo sistema imune do paciente. A funcionalização mais efetiva para atingir tal efeito é com a utilização de PEG ou seus derivados que irão criar uma blindagem estérica que irá impedir a ligação das opsoninas com a nanopartícula, concedendo a característica de longo tempo de circulação, o que resulta em alteração de parâmetros farmacocinéticos.

Uma das moléculas que atende tais requisitos, por exemplo, é o tensoativo D- $\alpha$ -tocoferil polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS) (ARAÚJO; LÖBENBERG; KREUTER, 1999; MOZAR; CHOWDHURY, 2018; RIZVI; SALEH, 2018). Derivado da vitamina E esterificada com PEG 1000, o TPGS é um tensoativo não-iônico que apresenta uma cabeça hidrofílica e uma calda alquil lipofílica. Com uma LD 50 de  $> 7\text{g/kg}$  em ratos adultos o TPGS foi aprovado em 2005 pelo FDA como um adjuvante farmacêutico seguro. Dentro do seu papel de adjuvante farmacêutico essa molécula pode desempenhar diversos papéis, uma vez que melhora a liberação do fármaco encapsulado, aumenta a eficiência de encapsulação, atua como agente formador de poros na produção de nanopartículas, diminuindo o seu tamanho (GORAIN et al., 2018; GUO et al., 2013; YANG et al., 2018).

Estudos mostram que além da melhora das características farmacocinéticas e físico-químicas advindas do uso do TPGS, este tensoativo apresenta intrinsecamente uma ação antitumoral relevante, uma vez que inibe a ação da P-glicoproteína. Um dos grandes problemas que os pacientes enfrentam durante o tratamento de um câncer é a resistência a multidrogas (MDR) existente em alguns tumores, um dos principais causadores dessa MDR é a P-glicoproteína, uma proteína transportadora dependente de ATP que atua como uma bomba de efluxo na célula tumoral, pois tem a capacidade de se ligar a moléculas hidrofóbicas, característica comum de grande parte dos quimioterápicos, e as bombeá-las para o meio extracelular. A partir da ação dessa proteína transportadora a concentração dos fármacos utilizados diminui impedindo, assim, a eficácia do tratamento aplicado. Nesse contexto o TPGS atuará não sobre a proteína em si, mas sobre as mitocôndrias das células tumorais impedindo a produção de ATP, uma vez que os níveis de ATP diminuem, a P-glicoproteína que é ATP

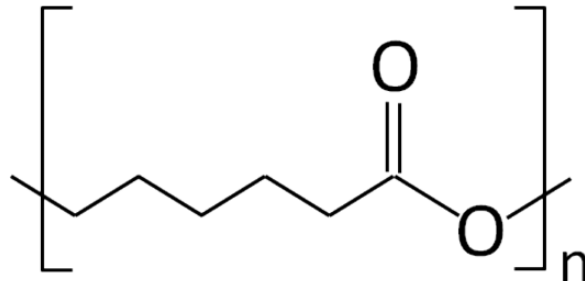
dependente cessará seu funcionamento, logo o efluxo de fármacos não ocorrerá (YANG et al., 2018)

Além de sua ação sobre a P-glicoproteína, o TPGS atua de forma sinérgica com outros fármacos antitumorais, uma vez que também possui a capacidade de levar células tumorais a apoptose, tal capacidade se correlaciona também com sua atuação sobre mitocôndrias, neste caso o TPGS tem a capacidade de inibir o complexo respiratório mitocondrial II causando, assim, a produção de ROS que levarão a danos na camada lipídica, destruição de proteínas citoplasmáticas e do próprio DNA culminando na morte celular. Além de atuar pela via do complexo mitocondrial, o TPGS também pode inibir a regulação de genes anti-apoptóticos, uma diminuição de tais genes irá por feedback permitir a ativação de genes pró-apoptóticos que levaram a morte celular (GUO et al., 2013; ZHANG; TAN; FENG, 2012). É interessante notar que tanto o TPGS quanto o resveratrol apresentam ação sobre a P-glicoproteína de tal forma uma ação sinérgica entre os dois componentes é esperada, tal ação é corroborada pelo trabalho de Wang et al., que mostra uma diminuição do crescimento de linhagens de câncer mama e elevada morte celular ao serem expostas a nanopartículas a base de policaprolactona contendo TPGS e encapsulando RSV frente ao fármaco livre na ausência do TPGS (WANG et al., 2015; YANG et al., 2018).

### ***2.3.3 Poli- $\epsilon$ -Caprolactona (PCL)***

A poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), representada na Figura 2, é um polímero hidrofóbico e biodegradável composto por uma porção polar advinda de um éster e de cinco grupos metilenos responsáveis pela porção apolar. Este polímero apresenta diversas qualidades que o faz largamente utilizado em diversas áreas tais como em microeletrônica, adesivos e sistemas carreadores de fármacos de longa duração, como na entrega de contraceptivos, um exemplo é o Capronor® que é um sistema polimérico a base de PCL com aplicação subdérmica de liberação de levonorgestrel. Como carreador algumas das razões para a utilização desse polímero em detrimento de outros são: sua alta permeabilidade, biodisponibilidade, biodegradabilidade, além da degradação mais lenta que outros polímeros como PGA (3-ácido fosfoglicérico) e PLA (poli(ácido láctico)), a elevada resistência a hidrólise química, a alta compatibilidade com diversos fármacos, tais qualidades o fizeram ser aprovado pelo FDA para uso na produção de medicamentos de uso humano e materiais cirúrgicos, como o Monocryl, que é uma sutura absorvível produzida com os polímeros PCL e PGA utilizada para a sutura de tecidos moles (ABAMOR et al., 2018).

**Figura 2:** Estrutura química da unidade monomérica da poli- $\epsilon$ -caprolactona.



Fonte: PubChem

Este polímero apresenta características físico-químicas que o torna um ótimo material para a produção de nanopartículas poliméricas para o transporte de fármacos, já que apresenta uma alta versatilidade, que advém justamente do grande número de mudanças que podem ser feitas em suas características químicas, físicas e mecânicas de tal forma que modificações da cristalinidade, solubilidade, características iônicas e demais podem ser moldadas para aquilo que se deseja produzir. Por exemplo, Sanna et al, que em 2014 encapsularam o fármaco resveratrol em uma nanopartículas a base de PCL e PLGA-PEG-COOH (Ácido poli (D, L-lactídeo-co-glicolídeo)-b-poli (etileno glicol) -carboxílico) de forma que o processo de copolimerização criou uma nanopartícula capaz de carrear o fármaco e os resultados físico-químicos e citotóxicos mostraram resultados interessantes, entre eles destaca-se o efeito antitumoral relevante observado por Sanna et al., por exemplo contra diversas linhagens de células de câncer de próstata (SANNA et al., 2013). Já Carletto et al, em 2016 desenvolveram, pelo método de nanoprecipitação, nanopartículas de PCL contendo RSV que foram testadas contra linhagens de melanoma murino e os testes *in vitro* indicaram uma diminuição da viabilidade celular e da proliferação celular do melanoma, já os resultados dos testes *in vivo* mostraram que as nanopartículas causaram diminuição do volume tumoral estatisticamente significativos quando comparadas com o resveratrol na sua forma livre (CARLETTO et al., 2016).

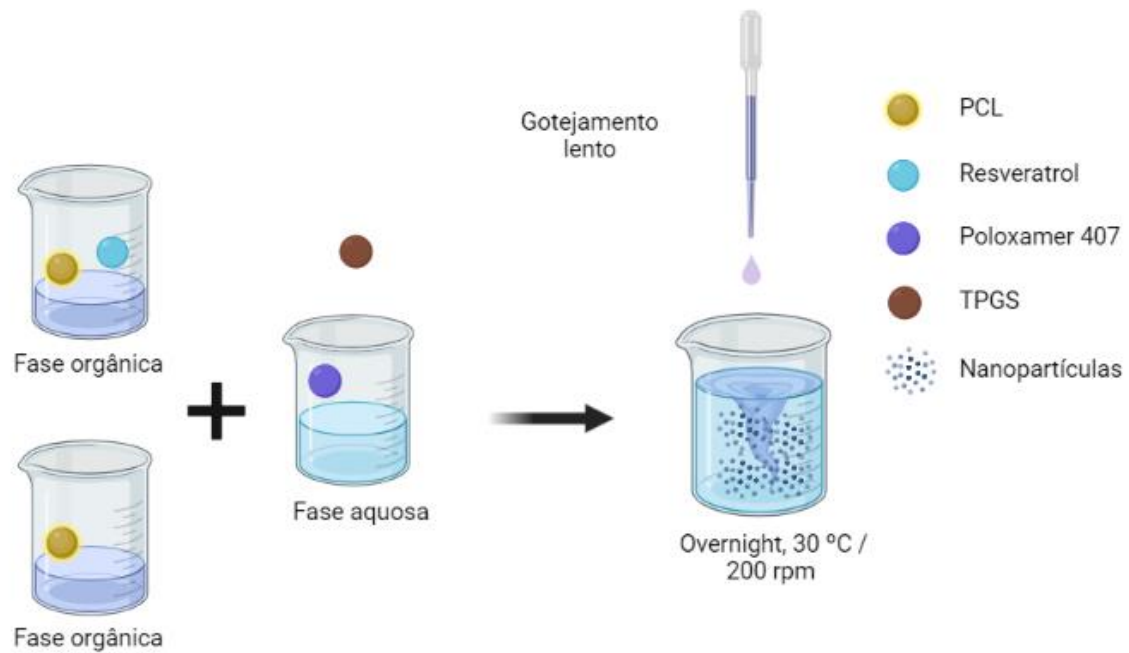
#### **2.3.4 Técnica de preparo: nanoprecipitação**



Dentre os diversos métodos existentes para a síntese de nanopartículas poliméricas tem-se destaque a nanoprecipitação (figura 3). Esse método foi criado por Fessi et al. em 1989, e se tornou conhecido e frequentemente usado por se tratar de uma técnica simples, reprodutível, rápida a qual produz partículas com baixo índice de polidispersão e de tamanho nanométrico, além de não demandar muita energia, sendo um método que pode ser escalonado para produção industrial facilmente. A técnica baseia-se na produção de duas fases uma orgânica e outra aquosa. O polímero é dissolvido no solvente orgânico, que deve ser miscível no meio aquoso, formando assim a fase orgânica. A precipitação das nanopartículas poliméricas ocorre, graças a dispersão da fase orgânica de forma lenta e constante na fase aquosa, como ocorre uma rápida difusão do polímero na fase aquosa as nanopartículas tendem a se formar instantaneamente para evitar as moléculas de água, já que o polímero usado não é solúvel na fase aquosa, logo precipitando, para melhor estabilizar a suspensão coloidal formada um tensoativo deve ser adicionado a fase aquosa. Assim como o polímero se encontra na fase orgânica, o fármaco lipofílico que se deseja encapsular também deverá ser adicionado nessa fase. Uma vez que o solvente orgânico evapore, as nanopartículas tomam a forma de nanocápsulas ou nanoesferas as quais por serem insolúveis no meio aquoso podem ser facilmente retiradas, por simples centrifugação (FESSI et al., 1989; PULINGAM et al., 2022; ZIELINSKA et al., 2020).

A técnica de nanoprecipitação é comumente usada para a encapsulação de moléculas hidrofóbicas, embora existam estudos onde se utilizou essa técnica para a encapsulação de fármacos hidrofílicos, mostrando bons resultados (MILADI et al., 2016).

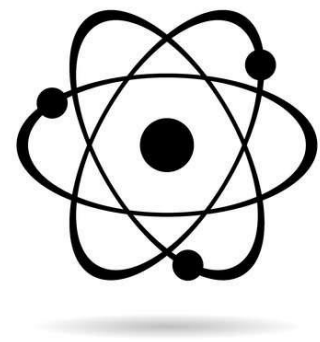
**Figura 3:** Ilustração esquemática das fases do processo de formação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação. Fonte: Mora-Huertas et al. (2010), Adaptado.



Embora a literatura demonstre que o RSV tem uma ação antineoplásica potencial que torne seu estudo importante, devido a algumas características como sua lipofilicidade que já foi supracitada, além da sua curta meia vida e elevada metabolização, resultando em baixa biodisponibilidade, se faz necessário adotar estratégias para contornar essas limitações, nesse contexto, destaca-se a utilização de tecnologias de encapsulação e carreamento desta molécula até o seu alvo, sendo as nanopartículas poliméricas a base de PCL uma das formas eficazes de se alcançar esse objetivo (TALIB et al., 2020). Estudos prévios mostraram o aumento da citotoxicidade de RSV quando encapsulado em nanopartículas de PCL em células de glioma, melanoma, próstata (CARLETTO et al., 2016; JOSE et al., 2014; SANNA et al., 2013; SHAO et al., 2009). Deste modo, o presente projeto se torna importante devido à escassez de trabalhos científicos para encapsulação de RSV em nanopartículas baseadas PCLs e funcionalizadas com TPGS, um aspecto inovador, com potencial ação contra linhagens de câncer.



# JUSTIFICATIVA



## 3. JUSTIFICATIVA

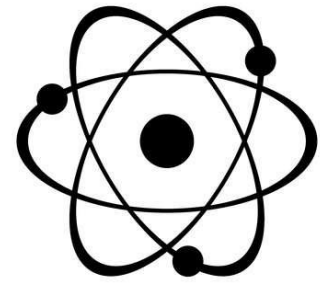
A busca por melhoramentos dos medicamentos existentes e as novas tecnologias desenvolvidas tem alavancado os incentivos a pesquisas em tecnologia farmacêutica, no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, com o propósito de aumentar a eficácia, associado à diminuição os efeitos colaterais dos mesmos. Com isso em mente, o campo da nanotecnologia farmacêutica se mostra muito promissor devido as inúmeras possibilidades de melhoramento de formulações.

Embora a utilização de nanotecnologia mostre vantagens evidentes, o número de fármacos anticâncer que usam essa tecnologia é muito escasso. O resveratrol, devido aos estudos prévios que evidenciaram sua atividade antitumoral, tem grande potencial para ser incorporado em sistemas de liberação e avaliado *in vitro* e *in vivo*. A encapsulação dessa molécula por nanopartículas se torna interessante por permitir a ação mais eficaz do fármaco, logo o presente projeto tem grande relevância no desenvolvimento de novos medicamentos para tratamento do câncer.

O presente trabalho tem como proposito a geração de um medicamento potencialmente aplicável para o tratamento do câncer. As etapas contempladas na presente proposta referem-se ao desenvolvimento, caracterização físico-química, a avaliação em cultura celular e também

*in vivo*, com enfoque comparativo entre formulações com e sem TPGS, para que se torne possível a compreensão do seu papel na funcionalização da nanopartícula. Destaca-se a realização de estudos pré-clínico em modelo xenográfico para câncer, visando à futura aplicação do produto gerado como medicamento. Portanto, o trabalho apresentado aborda temas muito relevantes nas ciências farmacêuticas, e apresenta significativo impacto positivo no meio acadêmico

# OBJETIVOS



## 4. OBJETIVO

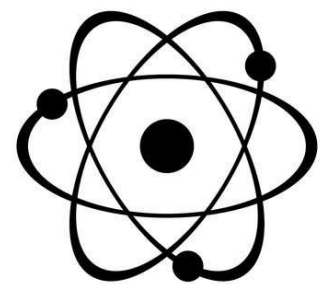
O projeto tem como objetivo o desenvolvimento e comparação de nanopartículas poliméricas a base de PCL e TPGS contendo resveratrol, a caracterização físico-química, e avaliação de citotoxicidade, captação celular, e atividade antitumoral *in vivo* em modelo animal de câncer de mama.

### 4.1. Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de nanopartículas a base de PCL com e sem TPGS, para a encapsulação de resveratrol;
- Caracterização por tamanho de partícula, PDI e potencial zeta por *dynamic light scattering* e microeletroforese Doppler a laser;
- Caracterização de eficiência de encapsulação de resveratrol por espectrofotometria UV-Vis;

- Liofilização das formulações e caracterização do estado sólido por espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Caracterização morfológica nas nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliação biológica *in vitro*: citotoxicidade das nanopartículas em células de mama, pelo método do MTT e captação celular por microscopia confocal e citometria de fluxo;
- Determinação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo animal.
- Avaliar toxicidade através de análises bioquímicas

# **MATERIAL E METODOS**





## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1. Materiais e equipamentos**

#### ***5.1.1. Materiais***

Resveratrol (RSV) foi fornecido por Suzhou Vitajoy (China). O Succinato de D- $\alpha$ -tocopheril polietilenoglicol (TGPS) foi obtido da BASF Chemicals (Mississauga, ON, Canada). Tripsina (0,25%), soro bovino fetal, dimetilsulfóxido (DMSO), perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina (DiO), brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). O iodeto de propídio foi adquirido da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). Precision Plus Dual Color Protein foi obtido da Biorad (São Paulo, SP, Brasil). Poloxamer 407 (Synperonic™ PE/F68 pharma) foi obtido da CRODA (Campinas, SP, Brasil). Cloreto de sódio, cloreto de potássio e fosfato de potássio monobásico foram adquiridos da Merck (São Paulo, SP, Brasil). Os solventes acetona e acetonitrila foram obtidos da Merck (São Paulo, SP, Brasil) e J.T. Baker® (Phillipsburg, NJ, EUA), respectivamente.

#### ***5.1.2. Equipamentos***

Os equipamentos espectrofotômetro UV-Visível de Feixe Duplo U-2910 Hitachi®, liofilizador (FreeZone 4.5 Liter Freeze Dry Systems-Labconco), cromatógrafo gasoso da Young Lin Instruments, modelo YL6100 acoplado a um detector de ionização de chama (GC-FID), cromatógrafo Hitachi® LACHRON ULTRA, dissolutor Erweka, modelo DT 80; aparelho *Zetasizer Nano ZS* foi utilizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa); calorímetro da série DSC-60 Plus, Shimadzu foi utilizado pela central analítica da farmácia, presente na UFC; espectrômetro Varian, modelo FT-IR Spectrum 660-IR e aparelho *Zetasizer Nano ZS* foram utilizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa); Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG – FEI e microscópio confocal de fluorescência Zeiss, LSM 710 foram feitas na Central analítica da física, presente na UFC, citômetro de fluxo BD FACSCalibur foi utilizado no laboratório LAAC, presente na UFC.

### **5.2. Método analítico para quantificação de Resveratrol**

O resveratrol foi quantificado pela técnica de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis em 325 nm (SANNA et al., 2013). A curva de calibração foi feita a partir de uma solução mãe de resveratrol de 1 mg/mL. A partir dessa solução, foram preparados seis pontos

da curva sendo eles: 0,5 µg/mL; 2,0 µg/mL; 2,5 µg/mL; 5,0µg/mL; 10,0 µg/mL; 15,0 µg/mL, diluídos em acetonitrila e filtrados em PTFE (0,45 µm). A linearidade foi avaliada pela análise de regressão linear, calculada pelo método de quadrados mínimos.

### 5.3. Preparo de nanopartículas a base de PCL com e sem TPGS

Para a produção das nanopartículas poliméricas foi utilizada a técnica de nanoprecipitação descrita por (FESSI et al., 1989). A fase orgânica baseada em acetona foi testada em dois volumes distintos, ou 5mL, ou 10mL, na qual foi solubilizado o RSV em diferentes quantidades, 1, 5 ou 10mg. Nessa mesma fase também deve ser dissolvido 10 mg do polímero PCL. Já na fase aquosa (20 mL) solubilizou-se 0,15% de Poloxamer 407 com ou sem TPGS em diferentes razões 0,005%; 0,01%; 0,015%; 0,03% e 0,05% m/m em relação a quantidade de PCL em tampão PBS, pH 7.4. O passo seguinte da técnica se dá pelo gotejamento lento da fase orgânica sob a fase aquosa que se encontra em agitação constante de 200 rpm a 30 °C, *overnight* (MILADI et al., 2016). As formulações que seguiram para as etapas de caracterizações físico-químicas foram aquelas que apresentaram os melhores valores dos seguintes parâmetros: polidispersividade, tamanho, eficiência de encapsulação do RSV e potencial zeta. As formulações que foram preparadas estão relacionadas na tabela 1.

**Tabela 1:** Diferentes composições de nanopartículas preparadas pela técnica de nanoprecipitação.

	<i>Fase aquosa</i>	<i>Fase orgânica</i>
<b>NP 01</b>	20 ml de PBS + Poloxamer 407 0,15%	10 mg RSV + 10 ml acetona
<b>NP 02</b>	20 ml de PBS + Poloxamer 407 0,15%	01 mg RSV + 10 ml acetona
<b>NP 03</b>	20 ml de PBS + Poloxamer 407 0,15%	05 mg RSV + 10 ml acetona
<b>NP 04</b>	20 ml de PBS + Poloxamer 407 0,15%	10 mg RSV + 05 ml acetona
<b>NP 05</b>	20 ml de PBS + Poloxamer 407 0,15%	05 mg RSV + 05 ml acetona
<b>NP 06</b>	20 ml de PBS + Poloxamer 407 0,15%	01 mg RSV + 05 ml acetona
<b>NP 07</b>	20 ml de PBS + TPGS 0,005%	10 mg RSV + 10 ml acetona
<b>NP 08</b>	20 ml de PBS + TPGS 0,01%	10 mg RSV + 10 ml acetona

<b>NP 09</b>	20 ml de PBS + TPGS 0,015%	10 mg RSV + 10 ml acetona
<b>NP 10</b>	20 ml de PBS + TPGS 0,03%	10 mg RSV + 10 ml acetona
<b>NP 11</b>	20 ml de PBS + TPGS 0,05%	10 mg RSV + 10 ml acetona
<b>NP 12</b>	20 ml de PBS + Poloxamer 407 0,15% + TPGS 0,001%	10 mg RSV + 10 ml acetona
<b>NP 13</b>	20 ml de PBS + Poloxamer 407 0,15% + TPGS 0,005%	10 mg RSV + 10 ml acetona
<b>NP 14</b>	20 ml de PBS + Poloxamer 407 0,15% + TPGS 0,01%	10 mg RSV + 10 ml acetona
<b>NP 15</b>	20 ml de PBS + Poloxamer 407 0,15% + TPGS 0,015%	10 mg RSV + 10 ml acetona

#### 5.4. Liofilização das nanopartículas

Para a caracterização de estado sólido do nanomaterial produzido e para o estudo de estabilidade, o mesmo passou pelo processo de liofilização utilizando-se razões de 10%, 20% e 30% de crioprotetor, sacarose, em relação a quantidade de polímero PCL presente. O processo se iniciou com o congelamento das amostras a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24h, após o material congelado foi acondicionado no liofilizador (FreeZone 4.5 Liter Freeze Dry Systems-Labconco). O processo de liofilização ocorreu entre 24h a 48h. As amostras liofilizadas foram armazenadas em tubos falcons selados e acondicionados à temperatura ambiente.

#### 5.5. Caracterização físico-química dos sistemas desenvolvidos

##### 5.5.1. Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta

O diâmetro hidrodinâmico calculado pelo aparelho *Zetasizer Nano ZS* permite que se avalie o tamanho de partícula das formulações analisadas, além disso, o índice de polidispersividade das formulações escolhidas também foi analisado através da técnica de espalhamento dinâmico da luz no mesmo aparelho.

A análise foi feita a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  usando-se uma lâmpada de HeNe de 4 mW no comprimento de onda de 633 nm em ângulo de  $90^{\circ}$ . Cada amostra foi devidamente diluída em água Milli Q

(10 vezes) sendo introduzidas em cubetas com 1 cm de caminho óptico. O equipamento faz as medições em triplicata sendo feita em cada medição uma média de 12 leituras.

A análise das cargas superficiais das formulações foi feita pelo princípio da microeletroforese Doppler a laser, que avalia o Potencial Zeta, no aparelho *Zetasizer Nano ZS*.

### **5.5.2. Determinação da eficiência de encapsulação do fármaco resveratrol**

Para a determinação da eficiência de encapsulação do resveratrol, foi utilizada o método de ultrafiltração que foi descrito por Mussi et al., com algumas modificações. De cada uma das formulações testadas foi retirado 1ml e transferido para um balão volumétrico de 10 ml que foi então completado com acetonitrila, para a quebra das nanopartículas. O balão foi agitado em vortex, submetido a banho ultrassônico por 10 minutos e em seguida o conteúdo foi filtrado em filtro PTFE de 0,45 µm, dando origem a amostra nomeada de “Resveratrol total”. Para a formação da amostra “Resveratrol ultrafiltrado” uma nova alíquota de 2,5 ml das formulações foi retirada e filtrada e então transferido para um tubo Amicon de 50 KDa. O tubo Amicon foi então centrifugado por 20 min a 4500 rpm e desse filtrado foi transferido 1ml para um balão volumétrico de 10 ml e completado com acetonitrila, seguido de agitação em vortex e finalmente a solução foi filtrada em filtro PTFE 0,45 µm (MUSSI et al., 2013). Além dessas amostras também foram preparadas amostras branco, ou seja, sem RSV. O ensaio foi realizado em triplicata.

As amostras foram quantificadas pela técnica de espectrofotometria Uv-Vis, empregando comprimento de onda de 325 nm, como consta no item 4.1. A eficiência de encapsulação (EE%) foi calculada de acordo à equação 1.

Equação 1.

$$EE\% = \left\{ \frac{[Rsv\ total] - [Rsv\ ultrafiltrado]}{[Rsv\ total]} \right\} \times 100$$

### **5.5.3. *Teste de estabilidade in vitro***

O teste de estabilidade ocorreu durante 90 dias, nos quais as amostras líquidas e liofilizadas foram armazenadas a 4 °C por 0, 7, 14, 30, 60 e 90 e caracterizadas por tamanho de partícula, PDI e potencial zeta em aparelho *Zetasizer Nano ZS* (SHIN et al., 2021).

### **5.5.4. *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)***

As nanopartículas previamente liofilizadas com sacarose como crioprotetor foram as utilizadas na caracterização. As amostras foram acondicionadas em cadinhos de alumínio com tampa e aquecidas de 30 °C a 350 °C a uma taxa de 10 °C/min, sob pressão de nitrogênio de 3 kgf/cm<sup>2</sup>, para caracterização de eventos endotérmicos e exotérmicos no calorímetro da série DSC-60 Plus, Shimadzu (CHAWLA; AMIJI, 2002).

### **5.5.5. *Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)***

Para a análise de FTIR, as nanopartículas liofilizadas com sacarose foram misturadas com brometo de potássio e comprimidas em prensa hidráulica. A varredura foi realizada em resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup> no espectrômetro Varian, modelo FT-IR Spectrum 660-IR (SANNA et al., 2013).

### **5.5.6. *Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama***

Foi utilizado um Cromatógrafo gasoso da Young Lin Instrument, modelo YL6100 acoplado a um detector de ionização de chama (GC-FID), com sistema de injeção split-mode (relação 1:20) e 0,25 mm (diâmetro interno) x 30 mm (L) coluna de sílica fundida revestida com filme de 0,25 µm de espessura 5% fenil - 95% dimetilpolissiloxano da marca Zebron para determinação do teor de acetona. O nitrogênio foi o gás de arraste com 4 mL/min de vazão. O programa do método seguiu: uma temperatura inicial de 38°C por três minutos. Em seguida, aumento de 1°C/min até atingir 40°C, seguido de aumento de 10°C/min até atingir 120°C. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250 °C e 300 °C, respectivamente.

Volumes iguais (aproximadamente 1 µL) de solução (formulações diluídas 1:10 em água ultra purificada) e soluções padrão de acetona em concentrações crescentes foram injetados para preparação da curva de calibração (0,5% - 10%). A determinação do teor de acetona foi realizada pelo cálculo das áreas dos picos correspondentes com as respectivas diluições das amostras e pela equação da curva de calibração elaborada.

### **5.5.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A morfologia das nanopartículas foi examinada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (CHAWLA; AMIJI, 2002). As amostras foram colocadas sobre um montador de amostras de alumínio, sobre uma fita de carbono, secas a temperatura ambiente e revestidas por aspersão com ouro, com o objetivo de aumentar a condutividade da superfície. A análise foi feita a uma tensão de aceleração de 10 kV em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG – FEI, com resolução nominal de 1 nm.

### **5.5.8. Método analítico para quantificação de RSV em ensaio de liberação *in vitro***

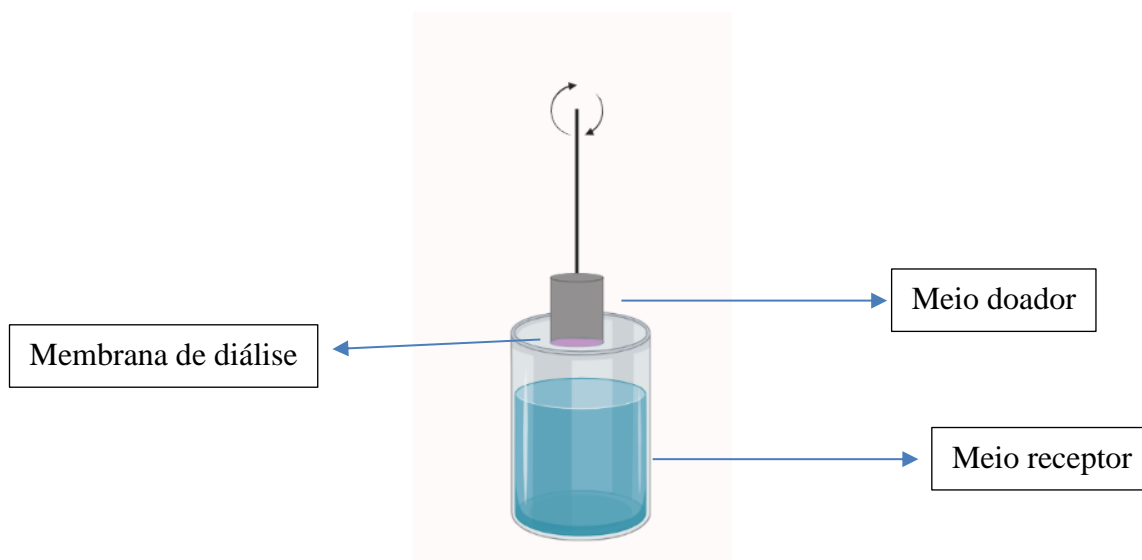
Nos estudos para a quantificação de RSV e nos subsequentes estudos de liberação *in vitro*, foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O cromatógrafo utilizado foi um Hitachi® LACHRON ULTRA, com emprego de uma coluna SunFire C18, 3.5 µm, 4.6 mm x 150 mm. As condições cromatográficas utilizadas foram derivadas daquelas descritas no estudo de Yin et al., com modificações necessárias para uma melhor performance das análises, assim o método possui uma fase móvel isocrática composta de acetonitrila:água (60:40 v/v), um volume de injeção de 20 µL, uma vazão de 0,75 mL.min<sup>-1</sup>, uma temperatura de forno de 25 °C e leitura em comprimento de onda de 306 nm. A curva de calibração foi feita a partir de uma solução mãe de resveratrol de 1 mg/mL. A partir dessa solução, foram preparados cinco pontos da curva sendo eles: 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 2,0 µg/mL; 15,0 µg/mL; 30,0 µg/mL, diluídos em acetonitrila e filtrados em PTFE (0,45 µm) (YIN et al., 2014). Os dados coletados foram analisados pelo software Prisma®.

### **5.5.9. Liberação *in vitro* de resveratrol**

Foi utilizado o método de diálise para o estudo de liberação *in vitro* do RSV (SUBEDI; KANG; CHOI, 2009). No método foi utilizado um dissolutor Erweka, modelo DT 80 com hastes acopladas em agitação de 150 rpm, nas hastes foram presos cilindros contendo o meio doador composto da formulação estudada dispersa em tampão PBS com 1% do tensoativo lauril sulfato de sódio como representado na figura 4. Esses cilindros foram separados do meio receptor por meio de uma membrana de diálise a base de nitrato de celulose com limite de peso molecular de 12 kDa. Os cilindros foram imergidos no meio receptor (50mL) composto de

tampão PBS e 1% do tensoativo lauril sulfato de sódio com pH ajustado em 7.4 com o intuito de mimetizar o pH fisiológico (SANNA et al., 2013). Por 48h foram feitas coletas de 1 ml do meio receptor em intervalos predefinidos sendo repostos em cada uma das coletas a alicota retirada com tampão, já o volume coletado deve ser diluído em acetonitrila e analisado por CLAE utilizando o método descrito anteriormente (JOSE et al., 2014). Ao final os dados foram levados ao programa de modelagem Ddsolver para a busca do melhor modelo de liberação dentre os testados, ordem zero ( $Dt = D_0 + K_0t$ ), primeira ordem ( $\log C = \log C_0 - Kt/2.303$ , Peppas ( $M_t/M_\infty = Kt^n$ ), Higuchi ( $Q_t = \sqrt{D(2C - C_s)Ct}$ ) (ELOY et al., 2016).

**Figura 4:** Ilustração de parte do aparato usado na liberação *in vitro* do RSV feita no software biorender.



## 5.6. Avaliação de citotoxicidade em célula da linhagem 4T1

O teste de citotoxicidade do RSV empregou a linhagem de carcinoma mamário murino, 4T1, cultivada em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de FBS e 1% de solução de antibiótico/antimicótico, a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, de acordo a recomendações da ATCC. Somente após terem atingido uma confluência de 90% que as células passaram pelo processo de tripsinização e transferência para placa de fundo chato de 96 poços (1 x 10<sup>4</sup> células por poço) onde foram incubadas por 24h a 37 °C. Uma vez incubadas o meio foi removido, os poços foram lavados com salina e então houve a adição dos grupos experimentais diluídos em meio incompleto, tais grupos se dividiram em controles positivos e negativos, RSV na sua forma

livre, a partir de uma solução mãe preparada em DMSO 1000  $\mu\text{M}$ , diluída nas concentrações 0,001  $\mu\text{M}$ ; 0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 0,25  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ; 0,75  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , RSV encapsulado em nanopartículas que continham ou não TPGS e as nanopartículas sem RSV. As placas com os grupos experimentais foram incubadas por 72h a 37 °C (GORMLEY et al., 2012). Após as 72h os poços foram esvaziados, lavados com solução salina e uma solução de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio - MTT (2,5 mg mL<sup>-1</sup>) em meio incompleto foi adicionada aos poços que foram novamente incubados por 4h. Ao final do processo a solução contendo o MTT presente nos poços foi descartada e DMSO foi adicionado, seguido de homogeneização para dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas a 570 nm, e a partir dela foi calculado o IC50 (concentração necessária para a morte de 50% das células) que leva em consideração a curva de concentração-efeito, nesse caso levando em consideração a densidade óptica do controle negativo como 100% (KULHARI et al., 2015). Foi utilizado o teste T de student ( $p < 0,05$ ) nos estudos estatísticos.

### **5.7. Avaliação da captação celular por citometria de fluxo**

A fim de avaliar a captação celular das nanopartículas pelas células da linhagem 4T1 foram utilizadas as formulações sem fármaco que apresentavam ou não TPGS, seguindo um protocolo semelhante ao do item 4.4, as células foram transferidas para uma placa de 6 poços de fundo chato (1 x 10<sup>4</sup> células por poço) e incubadas por 24h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> com o intuito da formação da monocamada celular aderida ao fundo do poço.

Uma vez formada a monocamada, foi feito o processo de lavagem já descrito no item 4.4 e adição das formulações contendo as nanopartículas contendo o agente fluorescente DIO (3,3 Dioctadeciloxacarbocianina perclorato), a placa foi novamente incubada por 24h seguindo as mesmas condições supracitadas. Após o processo de tratamento as células já lavadas passaram pelo processo de tripsinização, onde foi usado 1ml de tripsina diluída por 10 min que foi posteriormente neutralizada com 1 mL de meio completo, a solução contendo as células suspensas foi centrifugada e o pellet ressuspendido em 1mL de PBS. Ao final do método foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídio (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em cada amostra, para a análise em citômetro de fluxo BD FACSCalibur com comprimentos de onda de 488 nm para a excitação do DIO e 530 nm para emissão do mesmo, já para o iodeto de propídio se utilizou 488 e 670 nm para a excitação e emissão, respectivamente (ABRIATA et al., 2019).



## 5.8. Captação celular por microscopia confocal

Nessa técnica foram obtidas as imagens da captação celular das nanopartículas contendo DIO pela linhagem celular 4T1. Dessa forma em uma placa de seis poços foram acondicionadas lamínulas esterilizadas e sobre essas lamínulas foi adicionado o meio contendo as células para sua adesão sobre a lamínula ( $5 \times 10^5$  células por poço) incubadas por 24 h nas mesmas condições já citadas anteriormente. Após adesão celular o meio de cultivo completo foi retirado para a aplicação do tratamento com 2 mL das formulações contendo o agente fluorescente, sendo as placas incubadas por 24h a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>

Seguindo o protocolo, após incubação os poços foram lavados com 2 mL de PBS, e então as células foram fixadas com 1 mL da solução de paraformaldeído 2% (m/v) por 10 minutos, após posterior lavagem com PBS foram adicionados 30 µL de uma solução de DAPI (0,3 µg/mL) para marcação de núcleo.

As lamínulas foram lavadas novamente e a fim de manter a fluorescência as mesmas foram postas sobre uma lâmina histológica contendo o meio de montagem Fluoromount®. As lâminas montadas foram então analisadas em microscópio confocal de fluorescência Zeiss, LSM 710 em aumento de 40 vezes, os comprimentos de onda utilizados foram 488 nm e 530 nm para DIO excitação e emissão, respectivamente, para o DAPI se utilizaram os comprimentos de 405 nm e 457 nm (ABRIATA et al., 2019).

## 5.9. Teste *in vivo*

O teste *in vivo* visa comparar a ação terapêutica entre as formulações NP04, sem TPGS, NP15, com TGPS, o resveratrol livre em solução, empregando docetaxel e solução salina, respectivamente como controle positivo e negativo, ao câncer de mama induzido com a linhagem de câncer de mama 4T1. O estudo animal foi aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (protocolo número n° 5367011220) de acordo com as Diretrizes dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. Os animais foram mantidos em sala com temperatura (25°C) e umidade controladas, expostos a ciclos claro/escuro de 12 horas e receberam comida/água ad libitum

Foram empregados 42 camundongos Balb/c fêmeas com peso inicial de 20g e os tumores intramamários foram então desenvolvidos pela inoculação de células murinas de câncer de mama (4T1), na quantidade de  $5 \times 10^4$ , na parte axial esquerda. Os 42 animais foram divididos em 7 grupos com 6 animais em cada como indicado na tabela 2 (Eloy et al., 2016).

**Tabela 2:** Grupos utilizados no *in vivo* com as respectivas características do método.

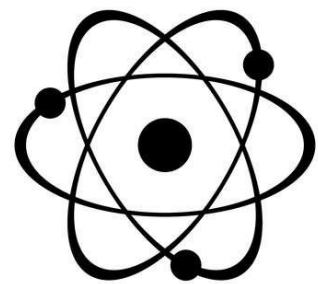
<i>Grupos testados</i>	<i>Quantidade de animais</i>	<i>Concentração utilizada (mg/Kg)</i>	<i>Recorrência das aplicações (dias)</i>
<i>Salina</i>	6	-	2
<i>NP 04 branco</i>	6	10	2
<i>NP 04 RSV</i>	6	10	2
<i>NP 15 branco</i>	6	10	2
<i>NP 15 RSV</i>	6	10	2
<i>RSV livre</i>	6	10	2
<i>Docetaxel</i>	6	15	7

Após a injeção, o tempo para o aparecimento de tumores foi monitorado até volume tumoral atingir 100 mm<sup>3</sup>, a partir de quando o tratamento se iniciou (10-14 dias) (MERAZ et al., 2014; ZHAO et al., 2019). As doses administradas de resveratrol foram de 10 mg/kg, a cada 2 dias, por 14 dias (ZHAO et al., 2019). Ao longo do tratamento, o peso dos animais foi monitorado, e o volume tumoral foi avaliado por meio de medições com paquímetro digital. A volume tumoral foi calculado a partir da seguinte equação (ELOY et al., 2016):

$$\text{Volume tumoral} = \frac{\text{diâmetro maior} \times \text{diâmetro menor}^2}{2}$$

Dezesseis dias após o início do tratamento, os animais foram sacrificados, os tumores retirados, fotografados e pesados. Amostras de sangue também foram coletadas por punção venosa e centrifugadas a 1500 g para obtenção de soro para análises bioquímicas. As análises de albumina sérica, bilirrubina total e frações e atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamil transferase (GGT) foram realizadas por meio de ensaios colorimétricos utilizando kits comerciais (Labtest, Brasil). Os resultados das reações foram medidos usando o analisador espectrofotométrico automático Mindray BS200 (Starlab, Brasil). Os resultados foram comparados usando One-way ANOVA com post-hoc de Bonferroni. Para todas as análises, um critério de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

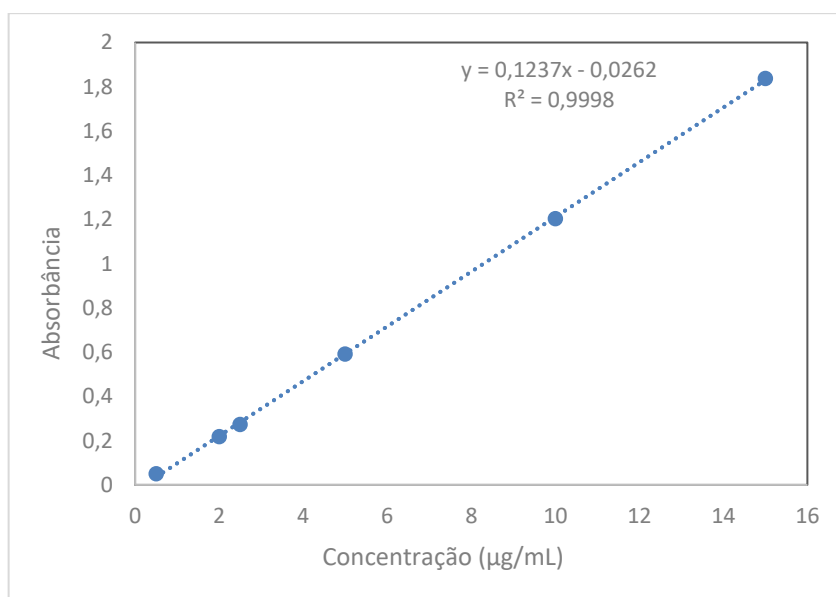


## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Método analítico para quantificação do resveratrol

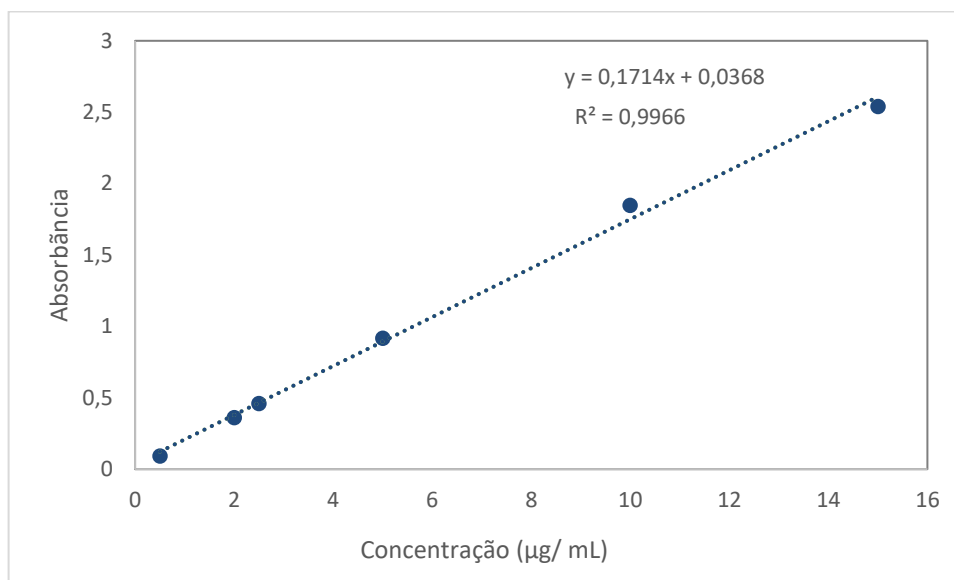
A curva de calibração do resveratrol em presença do interferente PCL e poloxamer 407 está representada abaixo na figura 5. Devem ser utilizados pelo menos 5 pontos de concentrações diferentes da solução de referência em, no mínimo, triplicata. Com a equação da reta observou-se que a curva construída com os pontos propostos apresentou elevada linearidade, com  $R^2$  maior que 0,990, podendo, dessa forma, ser usada para a avaliação da eficiência de encapsulação (Brasil, 2017).

**Figura 5:** Curva de calibração do resveratrol em presença dos interferentes PCL e poloxamer 407.



O mesmo comportamento pode ser observado para a curva de calibração de resveratrol em presença de PCL e TPGS (figura 6), com adequada linearidade (Brasil, 2017). Ressaltamos que todas as curvas de calibração tratam-se de curvas matrizadas, ou seja, em cada uma delas está presente os elementos que compõem a formulação da nanopartícula, ou seja, poloxamer 407, PCL e/ou TPGS.

**Figura 6:** Curva de calibração do resveratrol em presença dos interferentes PCL, Poloxamer 407 e TPGS.



## 6.2. Caracterização físico-química das formulações

O trabalho se iniciou com o estudo das variáveis concentração de fármaco, quantidade de solvente orgânico e concentração de TPGS com o propósito de se observar como tais modificações podem impactar as características físico-químicas das nanopartículas produzidas.

O estudo contemplou a troca do tensoativo Poloxamer 407 pelo TPGS nas nanopartículas 07 a 11, ou então a adição de concentrações de TPGS juntamente com Poloxamer 407 (P-407). Sabe-se que duas características importantes em um tensoativo são a sua ação sobre a tensão superficial e seu Equilíbrio Hidrófilo Lipofílico (EHL). Em uma solução aquosa com baixa tensão superficial a interação entre uma molécula hidrofóbica e o solvente hidrofílico tende a ser facilitada, logo melhorando a solubilidade da mesma, enquanto que uma solução aquosa com maior tensão superficial tende a dificultar a solubilidade da molécula hidrofóbica. Quanto ao EHL, sabe-se que um tensoativo que apresenta um EHL maior que 20 é tido como hidrofílico, logo é mais indicado para a solubilização de moléculas hidrofílicas, enquanto aquele abaixo de 20 apresenta característica lipofílica devido a menor quantidade de porções hidrofílicas (NASEF; GARDOUH; GHORAB, 2015; PHAM et al., 2019).

Sabe-se que o P-407 possui um EHL de 22, enquanto o TPGS possui um EHL de 13,2, embora o EHL sugira que aquele que deveria melhor solubilizar o RSV que é um fármaco

hidrofóbico deveria ser o TPGS em detrimento do P-407. Entretanto o que foi observando foi a ausência de formação de NP nas formulações NP 07 a NP 11 como indicado na tabela 2, tal fator pode ser advindo da baixa tensão superficial proporcionada pelo P-407 quando comparado ao TPGS, dessa forma o RSV, mesmo que na presença de um tensoativo com características hidrofílicas, apresentou uma solubilidade maior que na presença do TPGS levando assim a formação de NPs apenas na presença de poloxâmer P-407 (NASEF; GARDOUH; GHORAB, 2015; PHAM et al., 2019). Outra provável razão para tal fenômeno é a hipótese de uma baixa quantidade de tensoativo TPGS no meio para a estabilização das nanopartículas, embora Zhang et al, tenham produzido nanopartículas com o polímero PCL usando somente TPGS na concentração de 0,03% No trabalho de Zhang H. et al, foram produzidas nanopartículas com tamanho entre 181 e 225 nm, utilizando-se o mesmo método de preparo e mesmo solvente, mas o trabalho não aborda alguns pontos como a velocidade de agitação e de gotejamento, que podem ser alguns dos fatores que colaboraram para a o sucesso da síntese, além disso o fármaco a ser encapsulado em seu trabalho é a genisteína que apresenta características físico-químicas diferentes do RSV, logo também podendo refletir na formação das nanopartículas (ZHANG et al., 2015).

A segunda mudança da fase aquosa foi a utilização dos dois tensoativos em conjunto, tanto o TPGS quanto o poloxamer 407 foram adicionados a partir da formulação NP 12 até a NP 15, uma vez que a concentração de poloxamer continuou a mesma, somente as concentrações de TPGS variaram nas razões 0.2; 1; 2 e 3, em todas as 4 formulações houve a formação das nanopartículas. Todas as formulações produzidas foram caracterizadas quanto a potencial zeta, eficiência de encapsulação, tamanho de partícula e polidispersividade e apresentadas na tabela 3.

**Tabela 3:** Caracterização físico-química das formulações produzidas com relação à tamanho de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e eficiência de encapsulação (EE).

	<i>Tamanho de partícula (nm) ±DP</i>	<i>PDI</i>	<i>Potencial Zeta (mV) ±DP</i>	<i>E.E (%) ±DP</i>
<i>NP 01 RSV</i>	138,8 ± 4,97	0,189 ± 0,01	-4,95 ± 0,47	98,02 ± 0,32
<i>NP 02 RSV</i>	146,2 ± 0,92	0,109 ± 0,007	-2,53 ± 0,22	95,88 ± 0,23
<i>NP 03 RSV</i>	149,0 ± 0,7	0,134 ± 0,01	-2,56 ± 0,18	97,03 ± 0,3
<i>NP 04 RSV</i>	138,1 ± 1,8	0,182 ± 0,01	-2,42 ± 0,56	98,21 ± 0,87
<i>NP 05 RSV</i>	145,9 ± 2,5	0,129 ± 0,01	-2,66 ± 0,51	97,76 ± 0,24
<i>NP 06 RSV</i>	152,5 ± 0,46	0,102 ± 0,01	-1,87 ± 0,23	96,96 ± 0,56
<i>NP 07 RSV</i>	-	-	-	-
<i>NP 08 RSV</i>	-	-	-	-
<i>NP 09 RSV</i>	-	-	-	-
<i>NP 10 RSV</i>	-	-	-	-
<i>NP 11 RSV</i>	-	-	-	-
<i>NP 12 RSV</i>	132,2 ± 0,83	0,190 ± 0,007	- 3,12 ± 0,35	96,80 ± 0,15
<i>NP 13 RSV</i>	131,3 ± 0,80	0,192 ± 0,009	- 2,34 ± 0,38	92,48 ± 0,45
<i>NP 14 RSV</i>	127,3 ± 1,60	0,167 ± 0,01	-2,16 ± 0,32	85,16 ± 3,53
<i>NP 15 RSV</i>	127,5 ± 3,11	0,186 ± 0,01	-2,91 ± 0,90	98,40 ± 0,004
<i>Média</i>	138,6 ± 9,22	0,158 ± 0,036	-2,75 ± 0,85	96,6 ± 1,84

Frente as caracterizações físico-químicas notou-se que as nanopartículas foram produzidas na escala nanométrica já que o tamanho médio foi de  $138,6 \pm 9,22$  dentre as quais as menores tinham 127 nm enquanto a maior delas apresentava tamanho máximo de 152 nm, logo a escolha do método foi efetiva, já que é uma das características da nanoprecipitação a síntese de nanopartículas na escala nanométrica com baixo PDI, o que é corroborado com outros trabalhos que utilizaram o polímero PCL para a produção de nanopartículas, mas utilizando outros métodos. Por exemplo, Pietro e Calvo, através do método de fluido supercrítico conseguiram encapsular a vitamina E em nanopartículas a base de PCL que apresentaram tamanho de partícula variando entre 8 e 276 nm, ou Colmenares-Roldán et al., que produziram NPs de PCL também pelo método de nanoprecipitação com tamanho parecido, 96 a 160 nm (COLMENARES-ROLDÁN et al., 2018; PRIETO; CALVO, 2017).

Outro ponto interessante que deve ser observado é a estreita faixa de variação das características físico-químicas entre todas as formulações produzidas, o que indica um método robusto e seguro que é capaz de produzir resultados reprodutíveis. É importante notar que não são todas as faixas de tamanhos que são passíveis de serem utilizadas para o carreamento de fármacos, sendo a faixa mais aceita aquela que se encontra entre  $> 10$  e  $< 200$  nm, pois segundo a literatura é a que apresenta os melhores resultados nos testes *in vivo*, já que ao se encontrarem nessa faixa de tamanho podem ser endocitadas pelos diversos mecanismos e ao se encontrarem no citoplasma ocorrerá a liberação do fármaco no interior da célula cancerosa. Além disso é possível a passagem das nanopartículas pelo endotélio íntegro dos vasos, dessa forma as nanopartículas tendem em sua maioria a se encontrarem na área tumoral. Isso ocorre graças ao efeito EPR que ocorre em tecidos cancerígenos como explicado anteriormente, em função dos vasos defeituosos com fenestras que permitem a passagem de nanopartículas e, por conseguinte, o acúmulo passivo naquela região em detrimento de outros órgãos, com o aumento da concentração ocorrerá um aumento da endocitose das mesmas, logo potencializando ação do fármaco naquela área (WITT; SCHEPER; WALTER, 2019). Dessa forma as nanopartículas produzidas nesse trabalho se encontram dentro da faixa correta para a utilização que se propõe.

O potencial zeta de todas as formulações se encontraram negativos e bem próximos a zero, conforme esperado em função dos materiais utilizados. Os valores de potencial zeta encontrados podem ser adequados para interação nanopartícula e célula, visto que estudos mostram que nanopartículas com cargas positivas são facilmente retiradas da circulação, enquanto nanopartículas neutras ou fracamente negativas apresentam um tempo de circulação muito maior, podendo atingir mais facilmente o local almejado (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015).

Assim como o potencial zeta os valores de PDI também se encontram baixos como pode ser visto na tabela 3, o que é um ponto muito importante já que demonstra a homogeneidade das nanopartículas produzidas não somente entre as escolhidas para a continuidade das caracterizações como pode ser visto ainda mais claramente na figura 7, mas de forma geral entre todas as formulações produzidas. Este achado está de acordo com o que se esperava uma vez que o método utilizado para a síntese das mesmas, a nanoprecipitação, tem como uma das suas qualidades a produção de nanopartículas com baixo índice de polidispersividade (PULINGAM et al., 2022). Os valores de PDI encontrados são corroborados por trabalhos como o de Danafar et al. que produziram nanopartículas poliméricas funcionalizadas com PEG, que apresentaram PDI de 0,166 dentro da faixa de valores encontrados para todas as formulações produzidas, ou

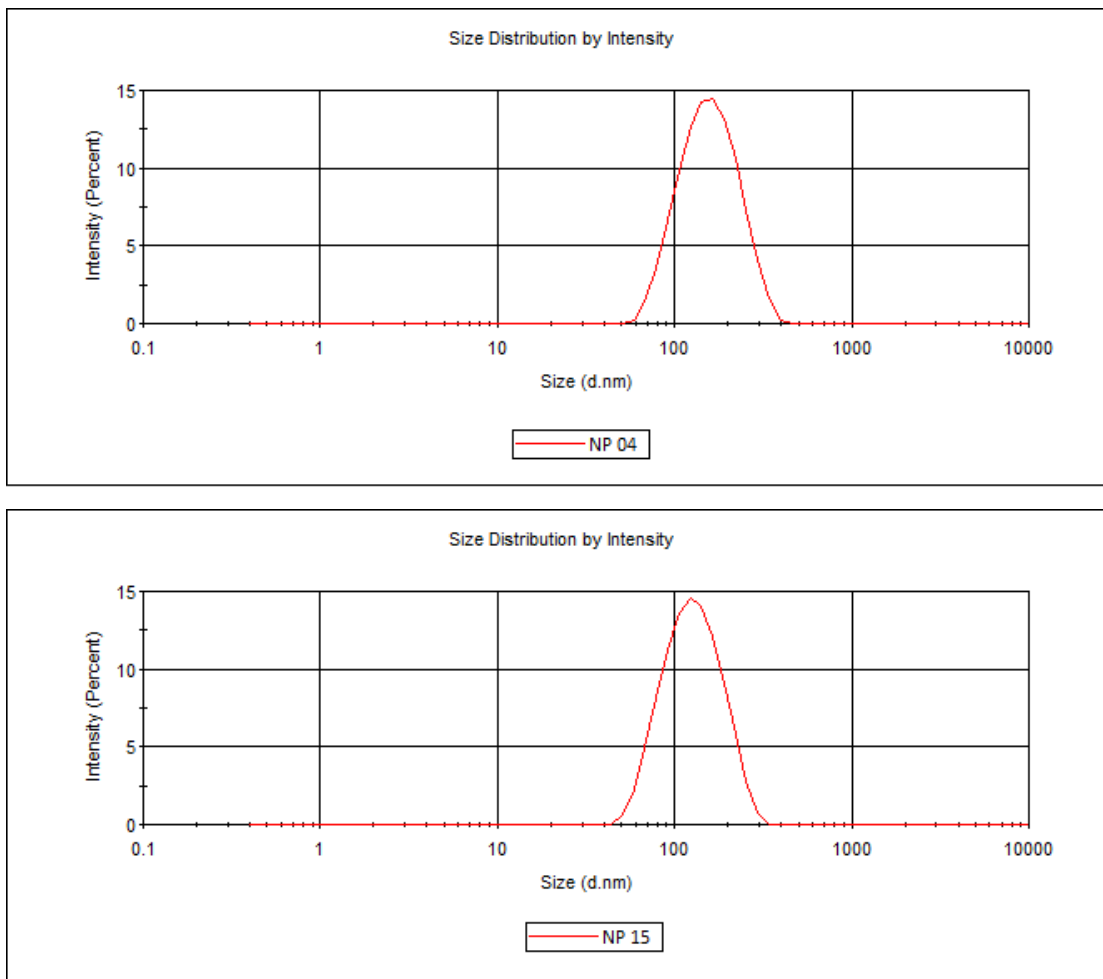


Yin et al que em 2014 produziram as mesmas nanopartículas a base de PEG e PCL apresentando resultados semelhantes com PDI de 0,15, assim como o de Sanna et al. que sintetizaram nanopartículas poliméricas contendo RSV e que apresentaram PDI semelhante ao encontrado, entre 0,110 e 0,146 (DANAFAR et al., 2014; SANNA et al., 2013; YIN et al., 2014)

Outro ponto importante é a eficiência de encapsulação que apresentou ótimos resultados com uma média de 96,6 %  $\pm$  1,84, sendo que as variações, assim como no tamanho, foram muito pequenas, assim como no trabalho de Carletto et al, que ao produzirem NPs a base de PCL contendo RSV pelo mesmo método utilizado nesse trabalho alcançaram um valor de eficiência de encapsulação de 98,4%. Dentre todas as formulações aquela que apresentou melhor resultado foi a NP 15 com uma eficiência de 98,40%, esta contém o TPGS na sua composição, já entre aquelas que não apresentam TPGS a formulação NP04 apresentou o melhor resultado com uma eficiência de 98,21 %, resultados idênticos aos de Carletto et al que ao produzirem nanopartículas a base de PCL contendo a mesma quantidade de RSV conseguiram uma eficiência de encapsulação de 98,4%, diferente de Wang et al que ao produzirem nanopartículas a base de PCL e TPGS conseguiu uma EE% inferior de apenas 82,4%. A explicação mais provável para os altos valores de encapsulação encontrados se dá pelas características físico-químicas do próprio RSV que por ser lipofílico supõem-se permitir uma melhor acomodação do fármaco na matriz polimérica da nanopartícula formada, levando assim a uma maior quantidade de fármaco encapsulado (CARLETTO et al., 2016; WANG et al., 2015).

Tais resultados promissores são corroborados por trabalhos como o de Sanna et al. que sintetizaram nanopartículas poliméricas contendo RSV e que apresentaram PDI semelhante ao encontrado, entre 0,110 e 0,146 e eficiência de encapsulação entre 74 e 99%, por sua vez quando comparado ao trabalho de Colmenares-Roldán et al., que produziram NPs de PCL também pelo método de nanoprecipitação com tamanho parecido, 96 a 160 nm, mas uma polidispersividade bem maior, 0,31 a 0,42 (COLMENARES-ROLDÁN et al., 2018; SANNA et al., 2013).

**Figura 7:** Gráficos de distribuição de tamanho de partículas das formulações NP 04 e NP 15



Houve mudanças relacionadas à concentração de fármaco e volume de solvente. Em relação ao fármaco foram testadas quantidades de 1, 5 e 10 mg de RSV, enquanto que os volumes de solvente testadas foram 5 e 10 mL. Os testes da fase orgânica só seguiram até a formulação NP 06, a partir dela foi mantida constante as quantidades do fármaco e de solvente. Carletto et al, também produziram nanopartículas com as mesmas variações produzindo partículas com tamanhos semelhantes, variando entre 130 e 136, com menor valor sendo atingido ao se utilizar 10 mg de fármaco (CARLETTO et al., 2016).

Quanto a fase orgânica Miladi et al, argumentam que na nanoprecipitação a síntese das NPs se dá pela rápida difusão do solvente pela fase aquosa, logo quanto menor a quantidade de solvente maior a velocidade de difusão que, por sua vez, leva a uma diminuição do tamanho de partícula que corrobora a queda no tamanho de partícula das formulações sem TPGS, mas dado a dificuldade de dissolução de polímero e fármaco em um volume tão pequeno de solvente, se

optou pela utilização do volume de 10 ml de acetona após a formulação NP06. É interessante notar que embora não haja a diminuição do volume de acetona na formulação NP15, nela há a presença do TPGS que junto do P-407 foi capaz de levar a uma diminuição ainda mais acentuada da tensão superficial, o que explicaria a diminuição do tamanho de partícula dessa formulação frente as demais (MILADI et al., 2016; NASEF; GARDOUH; GHORAB, 2015; PHAM et al., 2019).

Entre as formulações produzidas escolheram-se a NP 04 e a NP 15, respectivamente sem e com TPGS, como base para as próximas caracterizações necessárias e para a avaliação em cultura celular e *in vivo*. A escolha das mesmas foi baseada nas melhores características físico-químicas encontradas. As duas formulações foram as que apresentam o melhor resultados de tamanho de partícula versus eficiência de encapsulação, sendo essas duas características das mais importantes para a escolha de um sistema de liberação de fármacos.

### 6.3. Liofilização das nanopartículas

O primeiro passo para a estabilidade de uma formulação contendo nanopartículas é a obtenção de um potencial zeta que apresente um valor adequado, para impedir a agregação e posterior precipitação das mesmas, mas outro processo que apresenta resultados ainda melhores é a liofilização, que consiste na retirada de toda a água do material fornecendo uma estabilidade por uma quantidade bem maior de tempo. Para que o processo ocorra da maneira adequada é imprescindível a utilização de um crioprotetor, que tem por função prover grupamentos hidroxilas que eram outrora providos pela água presente na formulação antes da sublimação da mesma.

**Tabela 3:** Formulações com crioprotetor (10, 20 e 30%) e suas características físico-químicas

	<i>Tamanho de partícula (nm) ± DP</i>	<i>Aumento percentual do tamanho</i>	<i>PDI ±DP</i>	<i>Potencial Zeta (mV) ±DP</i>
<b>NP 04 10%</b>	289,1 ± 36,9	109,3	0,480 ± 0,03	- 2,81 ± 0,54
<b>NP 04 20%</b>	185 ± 2,7	33,9	0,396 ± 0,01	- 2,05 ± 0,32

<i>NP 04 30%</i>	189,5 ± 2,99	37,2	0,204 ± 0,01	- 2,48 ± 0,48
<i>NP 15 10%</i>	152,6 ± 2,05	19,7	0,396 ± 0,02	- 2,23 ± 0,29
<i>NP 15 20%</i>	150,9 ± 2,60	18,3	0,355 ± 0,01	- 1,89 ± 0,35
<i>NP 15 30%</i>	502,2 ± 5,78	293,8	0,441 ± 0,02	- 2,56 ± 0,63

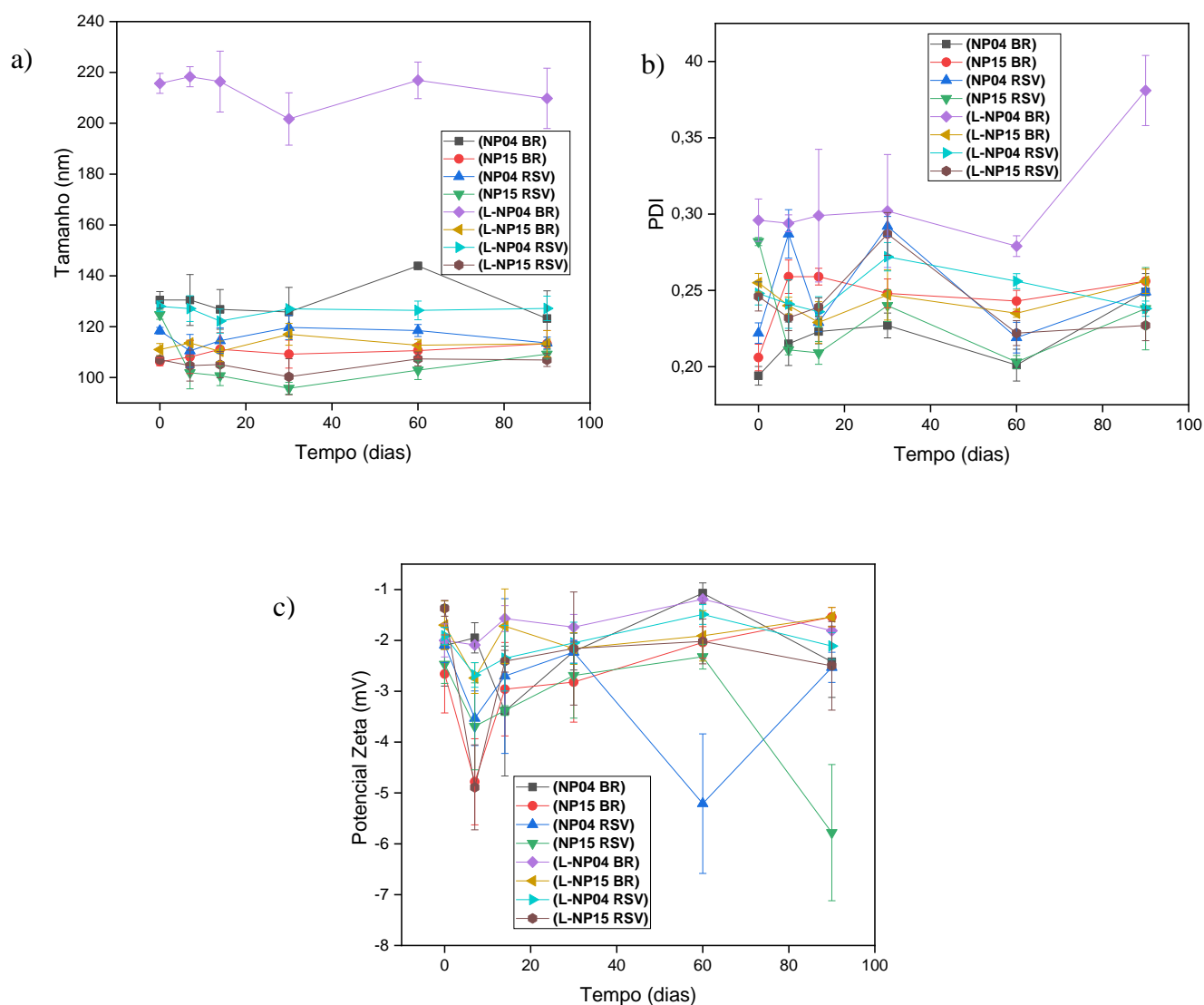
Tem-se que em sua maioria os crioprotetores são açúcares, dentre estes o que foi escolhido nesse trabalho foi a sacarose devido a vasta literatura sobre o papel deste açúcar. Os estudos foram feitos levando em consideração três razões, 10, 20 e 30 % de sacarose para o peso do polímero PCL. Após processo de liofilização das formulações NP 04 e NP 15 procedeu-se a caracterização físico-química do nanomaterial, os resultados estão demonstrados na tabela 4, frente aos resultados obtidos foi decido utilizar 20 % de sacarose nas formulações, assim como Saez et al, que produziram nanopartículas poliméricas utilizando as mesmas concentrações de sacarose testadas obtendo resultados semelhantes com NPs indo de 117 nm para 178 nm ao serem liofilizadas, indicando que o aumento percentual do tamanho encontrado nas formulações estudadas está dentro do que se observa. Embora haja um aumento considerável do PDI, cerca de 117.5 % para a formulação NP04 e 90.9% para a NP15 e um pequeno aumento do tamanho médio nas duas formulações, o principal objetivo da liofilização é a obtenção de material na forma sólida para a continuidade das caracterizações do estado sólido. Destaca-se a manutenção de tamanho de partícula dentro da faixa de trabalho esperada < 200 nm (ABDELWAHED et al., 2006; SAEZ et al., 2000).

#### **6.4. Teste de estabilidade**

Os dados obtidos pelo teste de estabilidade foram agrupados na figura 8. O teste de estabilidade mostrou as médias de todos os resultados com seus respectivos desvios padrões não mostraram modificações alarmantes durante os 90 dias de teste. É interessante notar que as formulações liofilizadas e não liofilizadas mostraram resultados semelhantes, indicando que uma vez que a amostra seja armazenada na geladeira em condições ideais, a estabilidade consegue ser mantida por um longo período. Um dado que corrobora essa ideia é justamente os valores de PDI que apresentam um desvio padrão da média muito pequeno, indicativo de que não houve agregação significativa do material com o passar dos 90 dias, embora seja possível

notar um aumento mais expressivo de 73% para o grupo de liofilizado NP 04 na leitura após 90 dias. O potencial zeta se manteve negativo durante todo o teste com valores baixos de desvio padrão, assim como as demais caracterizações, o tamanho não apresentou grandes variações para nenhuma amostra em nenhum momento do estudo, que vai de encontro ao trabalho de Shin et al, que produziram NPs de PCL funcionalizadas com PEG que ao serem mantidas em temperatura de 4 °C tiveram aumento de mais de 100 nm após 7 dias de armazenamento, o que novamente reafirma a qualidade do método de síntese escolhida, assim como dos tensoativos que fizeram seu papel na estabilização da solução, juntamente com o crioprotetor (LI et al., 2015; SHIN et al., 2021).

**Figura 8.** Gráficos de Tamanho de partícula (a), PDI (b) e Potencial Zeta (c) para as formulações NP 04 e NP 15 com e sem RSV em suas formas pré (NP) e pós-liofilização (L-NP).



### 6.5. Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama

As formulações NP04 e NP15 foram analisadas por cromatografia gasosa para determinação do teor de acetona residual, uma vez que concentrações elevadas desse solvente não são permitidas em produtos farmacêuticos para utilização em humanos uma vez que a presença de solventes orgânicos residuais aumenta a toxicidade da formulação além de poder afetar as propriedades físico-químicas da mesma (DIKPATI et al., 2020).

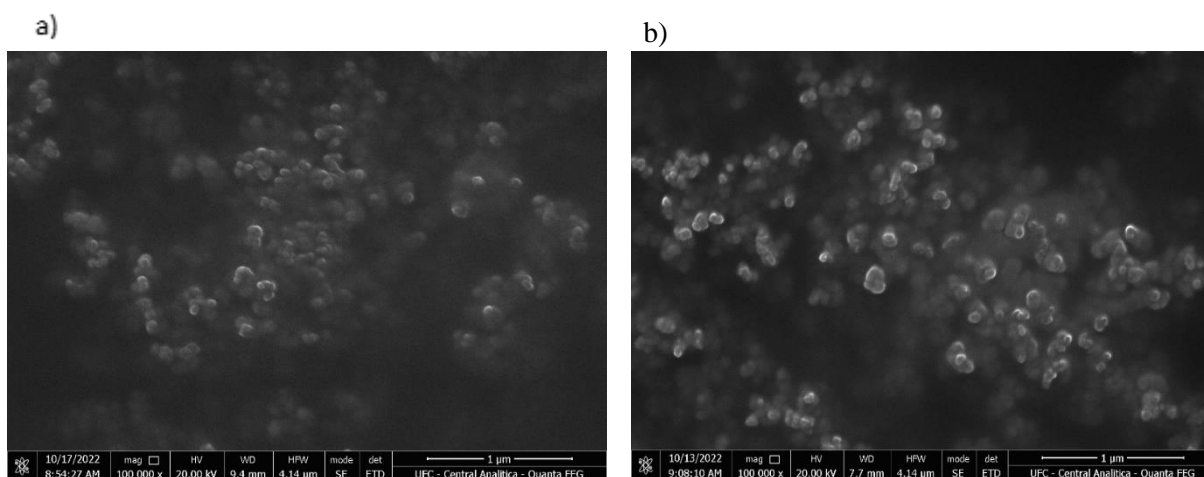
A partir da área sob a curva dada pelo CG foi possível encontrar teores de acetona com valores de  $0,11\% \pm 0,003$  para NP04 e  $0,12\% \pm 0,008$  para NP15 (USP, 2019) de acordo com o Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos

Farmacêuticos para Uso Humano (ICH Q3C-R8)(AGENCY, 2022) e pelo Método Geral <467> Solventes Residuais da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP-NF)(USP, 2019), o limite para solventes de classe 3, incluindo acetona, não pode exceder 0,5%, dessa forma os traços de acetona presentes nas formulações são completamente aceitáveis e não são considerados perigosos para a utilização em humanos e nem suficientemente altas para levar a alguma alteração nas propriedades físico-químicas das formulações produzidas.

## 6.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Através das imagens obtidas pela MEV, foi estudada a morfologia das formulações NP 04 e NP 15 contendo o fármaco RSV.

**Figura 9:** Imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura para NP04 RSV (a); NP15 RSV (b).



A técnica pode ser feita com amostras na forma líquida ou sólida, nesse caso foi feito com as duas formas possíveis, mas as imagens das nanopartículas obtidas na formulação liofilizadas não são passíveis de uso uma vez que os blocos cristalinos produzidos pelo crioprotetor utilizado, sacarose, se sobrepõem as nanopartículas impossibilitando a visualização das mesmas, dessa forma as imagens apresentadas são referentes as amostras pré-liofilizadas, ou seja, em seu estado líquido e sem o crioprotetor.

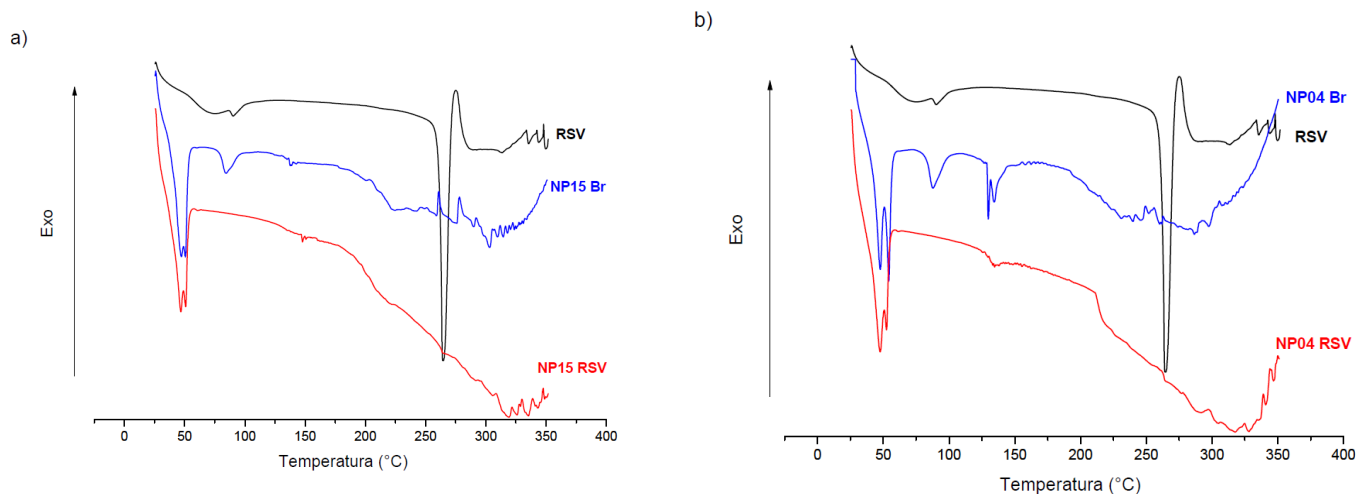
A utilização das NPs nesse estado só foi possível graças ao processo de gotejamento sobre uma fita de carbono que foi reservada até completa secagem levando a formação de um filme polimérico, e é sobre este filme que as nanopartículas se encontram encrustadas. Como não só o filme, que é constituído de Poloxamer 407 e TPGS, mas as próprias nanopartículas tem como base um polímero a diferenciação das estruturas se torna difícil, não obstante, é possível observar que houve a produção de nanopartículas com tamanho entre 100 – 200 nm,

que apresentam formato esférico com baixa agregação, tais resultados estão de acordo com o trabalho de outros pesquisadores como Carletto et al., que também foram capazes de produzir NPs a base de PCL contendo RSV que apresentavam morfologia e características físico-químicas semelhantes (CARLETTO et al., 2016).

### 6.7. Análises térmicas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Com o objetivo de se investigar as propriedades das nanopartículas, bem como avaliar a interação entre os seus constituintes, foi empregada a técnica de DSC, que permite, por exemplo, investigar o estado físico do RSV dentro e fora da matriz polimérica e como isso muda durante todo o espectro de variação de temperatura. Para melhor compreensão dos resultados foram testados as NPs com e sem o fármaco, além do RSV na sua forma livre (SANNA et al., 2013).

**Figura 10:** Curvas do DSC das formulações NP 04 (a) e NP 15 (b) contendo 20 % de sacarose com e sem resveratrol, e resveratrol puro.



Observando o gráfico da figura 10, nota-se um pico endotérmico em 269 °C que está diretamente relacionado a fusão do RSV cristalino. Já nas curvas referentes as nanopartículas, é possível observar um pico em 51 °C que se relaciona com a fusão do polímero semicristalino PCL, que apresenta ponto de fusão em torno de 58 °C (CHAWLA; AMIJI, 2002). É interessante notar que nas duas formulações ocorrem diminuições do valor inicial do ponto de fusão do PCL, na formulação NP 04 a fusão do polímero ocorre em 52,83 °C e 53,9 °C para as formulações



com e sem o fármaco, já na formulação NP 15 o ponto de fusão do PCL cai para 51,17 °C na formulação com RSV e 46,69 °C na sem RSV.

A diminuição do ponto de fusão das matérias observado no DSC está comumente ligada às interações entre os diversos constituintes da formulação, por exemplo, é provável que um dos fatores que levou a diminuição do ponto de fusão do PCL é a presença da sacarose comum a todas as formulações testadas, uma vez que todas as formulações apresentam uma queda do valor ideal para a fusão do PCL, e essa diminuição é ainda mais exacerbada na formulação NP15 que apresenta um constituinte a mais, o TPGS, que pode ser o responsável pelo maior queda do ponto de fusão do PCL, uma vez que essa é a única mudança entre as formulações. Fato que é corroborado pelo trabalho de Sanna et al que ao produzirem nanopartículas poliméricas a base de PCL e PLGA que apresentaram diminuição de 5 graus no ponto de fusão do PCL quando comparado sua forma livre e em formulação, tal evento foi atribuído, assim como nesse trabalho, a interação do polímero com os outros componentes da mistura, o mesmo comportamento foi observado por Danafar et al que ao sintetizarem NPs de PCL funcionalizadas com PEG para o carreamento de curcumina notaram a diminuição do ponto de fusão do PCL de 58 °C para 49 °C quando este foi adicionado a formulação (DANAFAR et al., 2014; SANNA et al., 2013).

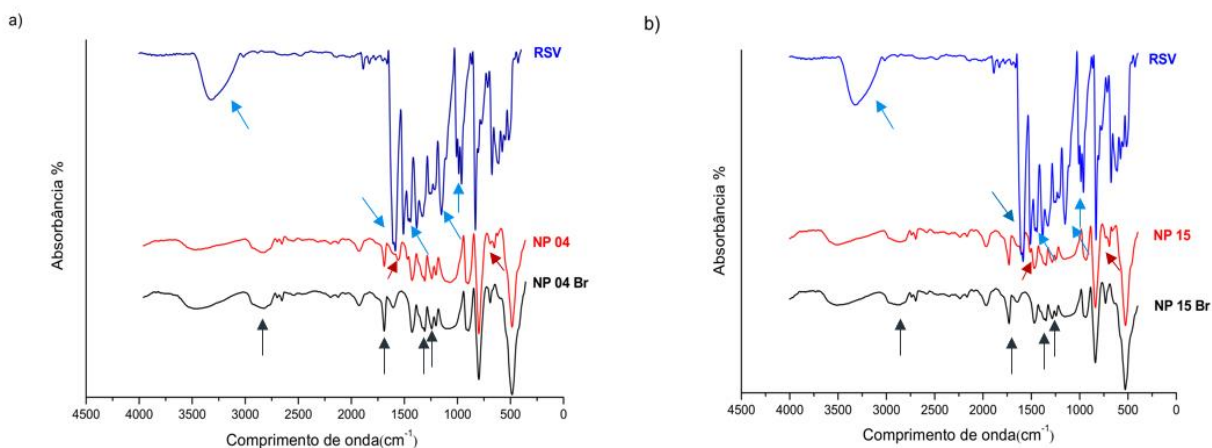
Outro ponto importante é que o pico endotérmico do RSV presente na sua forma livre desaparece nas curvas referentes as formulações, a ausência do pico é um indicio não só da interação do fármaco com os demais excipientes, mas como da provável mudança de um estado cristalino para um estado amorfo ao ser encapsulado, o que é benéfico para a biodisponibilidade do fármaco, já que a solubilidade de um fármaco no estado amorfo é melhor que em seu estado cristalino, assim como é visto no trabalho de Wang que ao produzirem NPs a base de PCL e TPGS também observou a ausência do pico de RSV na formulação onde este se encontra encapsulado, chegando a mesma conclusão de mudança de estado de cristalino para amorfo. Outro exemplo é Abriata et al que sintetizaram NPs a base de PCL para o carreamento de paclitaxel pelo método de nanoprecipitação, observando o mesmo comportamento nos gráficos de DSC, com ausência dos picos referentes ao paclitaxel uma vez que este foi encapsulado (ABRIATA et al., 2019; SANNA et al., 2013; WANG et al., 2015).

## **6.8. Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Assim como na técnica anterior, também foi utilizada as formulações liofilizadas com e sem o fármaco, além do RSV na sua forma pura. Na espectroscopia do infravermelho o objetivo

a ser alcançado e a observação da composição qualitativa das nanopartículas estudadas, além de padrões estruturais do material.

**Figura 11:** FTIR das formulações NP04, NP 15, com sem fármaco, e RSV puro.



Na figura 11 se encontra o espectro e todas as bandas características para a identificação do RSV, como por exemplo, a banda olefínica em  $1010 - 968 \text{ cm}^{-1}$ , uma banda de absorção em  $1147 \text{ cm}^{-1}$  relacionada ao alongamento  $\text{C} - \text{O} \text{ cm}^{-1}$ , em  $1581 \text{ cm}^{-1}$  e  $1467 \text{ cm}^{-1}$ , além disso tem-se um alongamento ligado a  $\text{C} = \text{C}$  devido ao anel aromático presente na estrutura desse fármaco, há também uma banda trans olefínica em  $963 \text{ cm}^{-1}$ , além da banda de absorção devido o alongamento  $\text{O} - \text{H}$  do grupo alcoólico em torno de  $3250 \text{ cm}^{-1}$  tais dados são corroborados por Sanna et al, que observaram as mesmas bandas tanto para o fármaco RSV quanto para o polímero PCL(SANNA et al., 2013). Assim como no espectro característico do RSV, naquele referente as nanopartículas também foi possível a identificação de bandas que permitem a identificação do PCL, como o alongamento da carbonila em  $1725 \text{ cm}^{-1}$ , uma banda em  $2942 \text{ cm}^{-1}$  à  $2844 \text{ cm}^{-1}$  referente ao  $\text{CH}_2$ , uma banda em  $1292 \text{ cm}^{-1}$  referente ao alongamento  $\text{C} - \text{C}$ , a banda em  $1237 \text{ cm}^{-1}$  referente ao alongamento assimétrico do  $\text{C} - \text{O} - \text{C}$ .

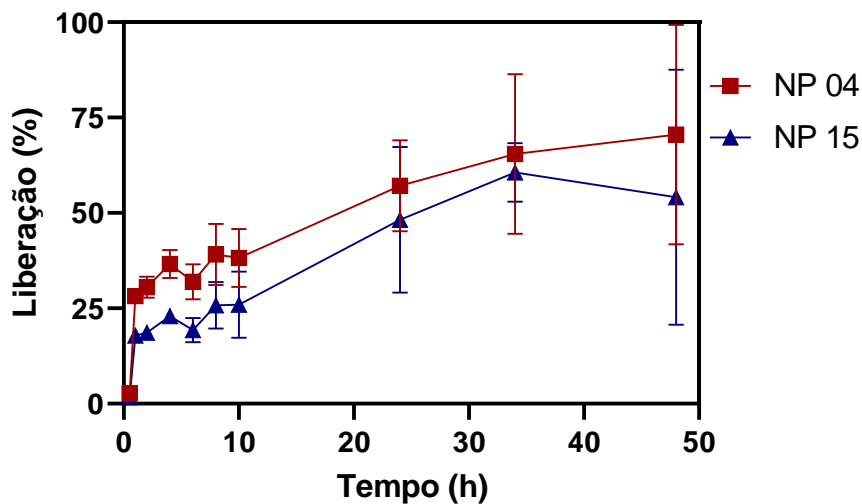
Embora as bandas referentes ao RSV tenham quase que em sua totalidade desaparecido no espectro referente a NP com o fármaco impedindo assim prever a interação deste com as nanopartículas, ainda assim é possível notar algumas bandas indicativas da presença do fármaco na matriz polimérica da NP, como a banda em torno de  $1520 \text{ cm}^{-1}$  que é referente a ligações  $\text{C} = \text{C}$  aromáticas, outra banda seria a  $750 \text{ cm}^{-1}$  que se refere a deformação angular das quatro ligações  $\text{C} - \text{H}$  presentes no anel aromático do RSV. As duas bandas aparecem tanto no espectro do RSV quanto no espectro das nanopartículas contendo esta molécula, em intensidades diferentes, a quase completa ausência de bandas do RSV nas formulações é um indicativo de completa encapsulação pela nanopartícula, como foi notado por Abriata et al em seu trabalho

com NP a base de PCL para a encapsulação de paclitaxel, onde se notou a ausência das bandas referentes ao fármaco ao se comparar a sua forma livre com a encapsulada (ABRIATA et al., 2019; JOSE et al., 2014; SANNA et al., 2012, 2013).

### 6.9. Liberação *in vitro* de resveratrol

Com o intuito de se avaliar o potencial das formulações produzidas para administração parenteral, assim como estudar a liberação do RSV foram estudadas as liberações das formulações NP 04 e NP 15 em pH 7.4 com o intuito de mimetizar o pH fisiológico. A liberação cumulativa de RSV pelas NPs pode ser observada na figura 12.

**Figura 12.** Gráfico de liberação *in vitro* do RSV encapsulado.



**Tabela 5:** Valores de coeficiente de determinação dos modelos de liberação das amostras testadas.

	$R^2$			
	<i>Ordem 0</i>	<i>Ordem 1</i>	<i>Higushi</i>	<i>Korsmeyer-Peppas</i>
<b>NP 04</b>	0,21	0,73	0,89	0,78
<b>NP 15</b>	0,67	0,85	0,95	0,87

Dentre as duas formulações testadas se observou uma maior liberação da formulação NP 04 frente a NP15 enquanto a primeira apresentou uma liberação de 70.56% a segunda liberou 54.1%, Danafar et al ao sintetizarem NPs a base de PCL para liberação de curcumina observou uma liberação parecida em pH semelhante após 120h de 73.13%, indicando a manutenção de um platô de liberação lenta e sustentada como era esperado, já que o fármaco se apresenta preso no interior da matriz polimérica que precisa ser degradada para permitir sua liberação. Wang et al em seu trabalho com NPs a base de PCL e TPGS também obtiveram valores de liberação bastante semelhantes de 51% de liberação de RSV após 96h de incubação, também indicando uma liberação lenta e sustentada. A mais provável explicação para a diferença das porcentagens de liberação existente entre as duas formulações é a presença do TPGS que por se tratar de um derivado PEGlado da vitamina E é capaz de atuar como uma barreira hidrofílica que retardaria a degradação da matriz polimérica levando a uma diminuição da liberação do fármaco retido nesta matriz (Danafar et al., 2014; S. Wang et al., 2015). A liberação sustentada é uma característica importante dada pelo uso de nanopartículas poliméricas que permite justamente a liberação de fármaco por períodos de tempo muito mais longos, tal qualidade leva a uma queda direta da quantidade de doses necessárias, o que diminui a chance de esquecimento, aumentando de forma direta a qualidade de vida do paciente, como Destache et al., que ao produzir nanopartículas a base de PLGA para carrear antirretrovirais, foi capaz de produzir a liberação sustentada dos mesmos por 28 dias, frente os 2 dias que a droga livre possuía antes de ser eliminada (RIZVI; SALEH, 2018).

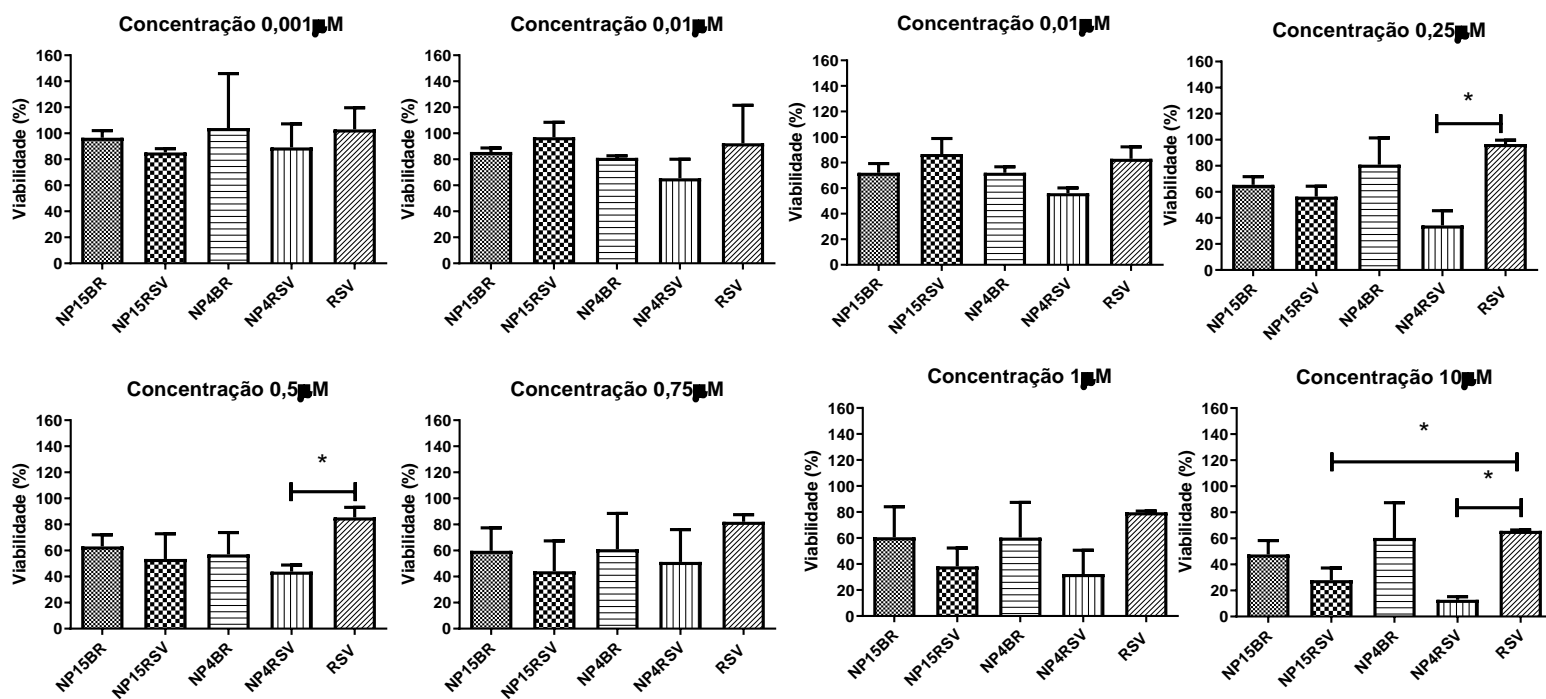
Buscou-se identificar qual modelo explicaria de forma adequada a cinética de liberação do fármaco encapsulado, assim testou-se os modelos de ordem zero, primeira ordem, Korsmeyer-Peppas e Higuchi, o resultado se encontra na tabela 5, onde são mostrados os valores do coeficiente de determinação para cada um dos modelos testados. os testes indicaram a partir do coeficiente de correlação entre os modelos testados, que a liberação do fármaco é regida pelo modelo de Higuchi, um modelo que indica a liberação através da difusão. Assim esse modelo indica que o meio que cerca a nanopartícula polimérica lentamente penetra na matriz polimérica

a base de PCL, um poliéster alifático susceptível a degradação hidrolítica pela quebra das ligações dos ésteres, dissolvendo-a e causando a difusão do fármaco RSV (PARASHAR et al., 2018; SANNA et al., 2013).

## 6.10. Citotoxicidade

Na figura 13 é possível observar os resultados dos testes em cultura celular das duas formulações sintetizadas NP 15 e NP 04 contendo ou não o fármaco resveratrol, além de resveratrol não encapsulado.

**Figura 13.** Viabilidade celular das formulações NP 15 e NP 04 com e sem o fármaco RSV, e RSV em solução. Teste t-student entre os grupos NP15 RSV X RSV, NP4RSV X RSV e NP15RSV X NP4RSV. \*  $p < 0,05$ .



A avaliação da citotoxicidade das nanopartículas produzidas foi feita a partir da utilização do ensaio de MTT, que atua pela avaliação da função mitocondrial de células vivas permitindo através de resultados colorimétricos indicar o resultado de viabilidade celular. O ensaio utilizou células murinas da linhagem 4T1, uma linhagem de células de câncer de mama com alto poder metastático (JOSE et al., 2014).

Ao se observar a figura 13, é evidente a queda da viabilidade celular causada pelas nanopartículas contendo o fármaco na grande maioria das concentrações testadas. Houve uma clara diferença entre a morte celular causada pelas formulações NP 04 e NP 15 quando comparados os resultados das formulações branco e do próprio fármaco na sua forma livre, conforme esperado.

É possível notar uma relação dose-dependente entre todas as formulações. Entre as formulações contendo o fármaco aquela que se apresentou mais tóxica para as células foi a NP 04 com uma diminuição de até 87,2 % da viabilidade quando se utilizou a concentração de 10  $\mu$ M, ao se observar o RSV nessa mesma concentração tem-se uma diminuição da viabilidade de apenas 34,16 %, enquanto que a formulação NP 15 apresenta uma diminuição de 72,1% mostrando que a encapsulação levou a um grande aumento da ação antitumoral do fármaco. A grande diferença dos resultados entre as formulações e o RSV puro é que as nanopartículas, por possuírem tamanho menor que 200 nm, podem ser internalizadas por endocitose mediada por receptores, dessa forma maior será a quantidade de fármaco atuando sobre a célula, o que leva, por conseguinte, a uma maior morte celular. O mesmo raciocínio se aplica as concentrações, com o aumento das concentrações aumenta a quantidade de nanopartículas que serão internalizadas, aumentando a concentração de fármaco no interior das células, logo mais células morrem conforme a concentração aumenta (SANNA et al., 2014). É interessante notar que tais resultados são corroborados pelo teste de liberação, uma vez que neste a formulação que mais libera fármaco é justamente a mesma que no teste atual demonstra maior ação citotóxica, a NP 04.

Outro ponto importante que deve ser abordado é a clara ação citotóxica produzida pelas nanopartículas sem RSV, que chegam a valores de morte celular de 39,7 % entre a formulação NP 04 branco e 52,4% na NP 15 branco. Deve-se considerar que na formulação NP 15 há a presença do TPGS que apresenta ação antitumoral ligado à sua ação sobre mitocôndrias e inibição da regulação de genes anti-apoptóticos culminando na morte celular, além de atuar inibindo a P-glicoproteína, uma bomba de efluxo capaz de expulsar uma grande quantidade de fármacos antitumorais, levando a resistência tumoral a estes. Assim, a presença do TPGS pode explicar a contínua citotoxicidade das nanopartículas mesmo na ausência do RSV e a

manutenção da relação dose-dependente, além de explicar a sua ação citotóxica relevante mesmo quando é incapaz de liberar a mesma quantidade de fármaco que a formulação NP04 (ZHANG et al., 2015; ZHANG; TAN; FENG, 2012). A formulação NP 04 não apresenta TPGS, assim sua ação citotóxica em teoria deveria ser menor, considerando que o PCL é um polímero que apresenta ótima biocompatibilidade e baixa citotoxicidade (ZHANG et al., 2015). Por outro lado, Chen et al., 2018 observaram que a viabilidade celular de células A549, de carcinoma pulmonar, foi reduzida após a incubação com nanopartículas branco peguiladas de PCL, alcançando 86,21% (Chen et al., 2018).

**Tabela 6.** IC<sub>50</sub> das formulações testas com seus respectivos desvios padrões

<i>Grupo</i>	<i>IC<sub>50</sub> (μM)</i>
<i>RSV</i>	4,06 ± 0,23
<i>NP 04 RSV</i>	0,12 ± 0,12
<i>NP 15 RSV</i>	0,73 ± 0,04

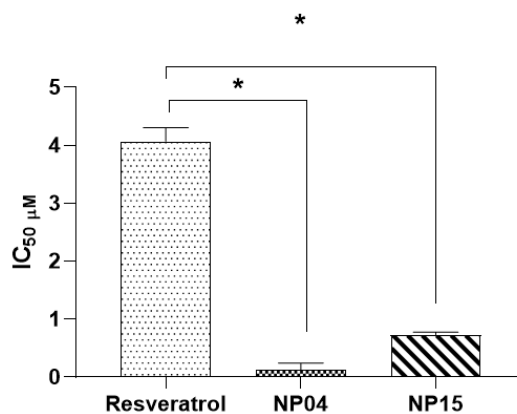
A tabela 6, junto a figura 14 mostram os IC<sub>50</sub> das formulações testadas e RSV livre. Pode se notar a diferença entre as formulações e o fármaco livre, onde apenas 0,12 μM de RSV na formulação NP 04 é suficiente para matar metade das células de câncer de mama, enquanto é necessário 4,06 μM de resveratrol livre para atingir o mesmo resultado. Essa grande diferença indica que a encapsulação do fármaco atuou de forma contundente para uma maior ação citotóxica, como pode ser observado a partir dos dados apresentados, a figura 14 mostra o gráfico referente ao IC<sub>50</sub> das formulações indicando uma clara diferença estatística entre todas as formulações e o RSV na sua forma livre. Tal fato pode estar relacionado à capacidade da

nanopartícula de ser captada pela célula, bem como promover a liberação sustentada. Ainda, observa-se que a formulação NP04, sem TPGS, foi mais citotóxica do que a formulação NP15.

Alguns trabalhos indicam a atuação do resveratrol encapsulado sobre diversas células carcinogênicas, por exemplo Sanna et al. apontaram que o fármaco, que foi encapsulado em nanopartículas a base de PCL e PLGA-PEG-COOH, apresenta IC<sub>50</sub> de 16 µM, 18 µM e 35.5 µM contra as linhagens de câncer de próstata DU-145, LNCaP e PC-3, respectivamente. Nesse trabalho o RSV livre foi testado apresentando IC<sub>50</sub> de 28.4, 47.4, e 50.7 µM, para as linhagens DU-145, PC-3, e LNCaP respectivamente. Assim, mesmo comparando para outras linhagens celulares, parece evidente o efeito da encapsulação de RSV em nanopartículas poliméricas em promover a potencialização da citotoxicidade do fármaco (SANNA et al., 2013). Outro trabalho interessante é de Wang que ao produzirem nanopartículas a base de PCL e TPGS para o carreamento de RSV observaram que ao serem utilizadas contra células de câncer de mama humano da linha MCF-7 as formulações testadas apresentaram ação antiproliferativa e citotóxica melhores que a droga na sua forma livre, esta ação demonstrou ser dose-dependente, assim como neste trabalho (WANG et al., 2015). Outro ótimo exemplo é o trabalho de Gregoriou et al que produziram NPs poliméricas para o carreamento de RSV e ao tratar diferentes linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) observaram o mesmo fato ocorrido nesse trabalho, uma ação dose-dependente das formulações que levava a diminuição da proliferação e aumento da morte celular. Após 42 h a linhagem MCF-7 apresentou uma viabilidade celular de 37,9%, enquanto a linhagem MDA-MB-231 apresentou 14%, finalmente o IC<sub>50</sub> calculado foi de 1,06 e 1,61 para MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente (GREGORIOU et al., 2020). Tais trabalhos corroboram os achados uma vez que indicam uma ação antiproliferativa e citotóxica do RSV em sua forma encapsulada muito mais evidente que na sua forma livre, indicando que sua encapsulação é fundamental para potencializar suas características antitumorais.



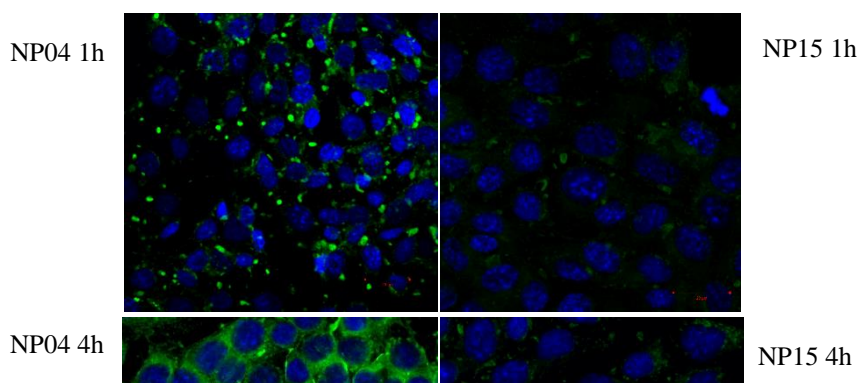
**Figura 14.** IC<sub>50</sub> das formulações testadas na linha celular 4T1. Teste t de Student entre NP15 RSV vs. RSV e NP04 RSV vs. RSV. \* p < 0,05.



### 6.11. Captação celular por microscopia confocal

A microscopia confocal tem como objetivo principal a observação da captação celular das nanopartículas em diferentes tempos. No presente estudo foi realizado um estudo cinético de captação celular, com avaliação nos tempos de 1h, 4h e 24h. Nesse teste, foi encapsulado o agente fluorescente Dio, que irá indicar de forma qualitativa se há ou não a captação celular do nanocarreador. Os dados coletados se encontram na figura 15.

**Figura 15.** Imagens por microscopia confocal da captação celular das nanopartículas no interior de células cancerígenas da linhagem 4T1 nos tempos de 1h, 4h e 24h, respectivamente das formulações NP 04 (sem TPGS) e NP 15 (com TPGS) contendo o marcador DIO.



É facilmente perceptível que a captação celular se apresenta de forma diretamente proporcional ao tempo, de tal forma que no último tempo testado a fluorescência captada é muito maior que em todas as demais. Outro ponto que é importante notar é que a fluorescência do DIO se encontra concentrado no citoplasma das células cancerígenas, onde a liberação do fármaco a partir da nanopartícula ocorrerá de forma mais pronunciada, tais achados são corroborados por Gregoriou et al que também observaram a concentração das NPs poliméricas a base de TPGS no citoplasma de células de câncer de mama da linhagem MCF-7 e MDA-MB-231, assim como pelo trabalho de Sanna que ao encubarem NPs a base de PCL e PLGA contendo RSV observaram o mesmo padrão de concentração de NPs no citoplasma e ao redor do núcleo (GREGORIOU et al., 2020; SANNA et al., 2013).

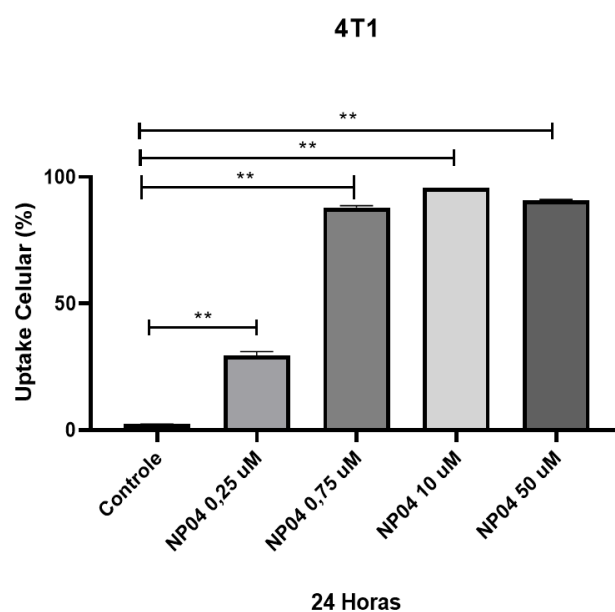
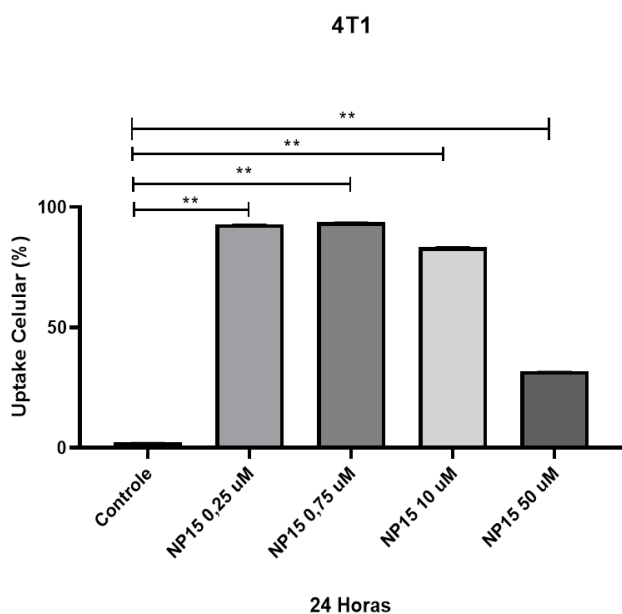
Não somente houve mudanças relacionadas com o tempo, mas também entre as formulações já que é possível observar uma clara diferença entre a fluorescência causada pela captação celular da formulação NP 04 quando comparada a NP 15, esta última apresenta uma fluorescência bem menor que a primeira em todos os tempos testados, como a única diferença entre as duas formulações é a presença de TPGS, se presume que a menor captação celular se dá justamente pela existência desse derivado do PEG, que é capaz de levar a produção de um impedimento estérico e físico que prejudica a captação celular das NPs da formulação NP15, tal hipótese é corroborada pelos resultados de citotoxicidade e liberação *in vitro*. Vale lembrar que foi a formulação em questão que apresentou os menores valores de citotoxicidade frente as células de câncer de mama da linhagem 4T1, o que pode ser explicado, justamente pela menor

taxa de captação celular dessa formulação frente a NP04 e, não obstante, a quantidade que conseguiu ser captada não consegue liberar a mesma quantidade de fármaco que a formulação NP04 (SANNA et al., 2013; WANG et al., 2015; YANG et al., 2018).

## **6.12. Avaliação da captação celular por citometria de fluxo**

Diferente da microscopia confocal a citometria de fluxo é uma técnica quantitativa que permite a observação da internalização das nanopartículas contendo o agente fluorescente DIO no lugar do fármaco RSV. Na figura 16 é possível observar como ocorre a variação da fluorescência de acordo com as concentrações, em um primeiro momento é possível observar que com o aumento das concentrações ocorre também o aumento da captação celular, o que é indicado pelo aumento da fluorescência do DIO, de forma diretamente proporcional à concentração, com a única exceção da concentração 10  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  da formulação NP 15 que não seguem esse crescimento proporcional.

**Figura 16.** Gráficos da citometria de fluxo das formulações NP 04 e NP15 em concentrações diferentes 0,25  $\mu\text{M}$ ; 0,75  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$  e 50 mostrando captação celular de acordo com o aumento da concentração das formulações, quando na ausência de TPGS \*\*  $p < 0.0001$ .



É interessante notar que, assim como na microscopia confocal, a formulação NP 04 apresenta uma internalização maior que a NP 15, por exemplo, ao se comparar a concentração 10  $\mu\text{M}$  das duas formulações nota-se que a NP04 indica uma internalização de 95.70 % enquanto a formulação NP15 apresenta, 82.98%, fato que é corroborado pelos gráficos (a) e (b) da figura 17 que indicam uma clara diferença da leitura de fluorescência para as duas formulações, favorecendo a formulação NP04 frente a NP15.

Como anteriormente mencionado, uma das prováveis razões para essa diminuição da captação celular é a presença do TPGS que cria barreiras estéricas que dificultam a internalização, mas além desse fator, segundo Gregoriou et al o tensoativo poloxamer 407 é capaz de causar um aumento da microviscosidade da membrana celular, levando a alterações da mesma, permitindo a melhora da endocitose o que explicaria uma melhor endocitose da formulação NP04 frente a NP15, que embora também possua o poloxamer em sua formulação apresenta também a ação do TPGS (GREGORIOU et al., 2020). Ao se relacionar os resultados da citotoxicidade das formulações, microscopia confocal e citometria de fluxo nota-se que os resultados estão em acordo, já que inicialmente se espera que a formulação que cause a maior queda de viabilidade celular deveria ser também aquela que possui a melhor internalização celular, pois esta levaria a um aumento da concentração de fármaco e, por conseguinte, a uma

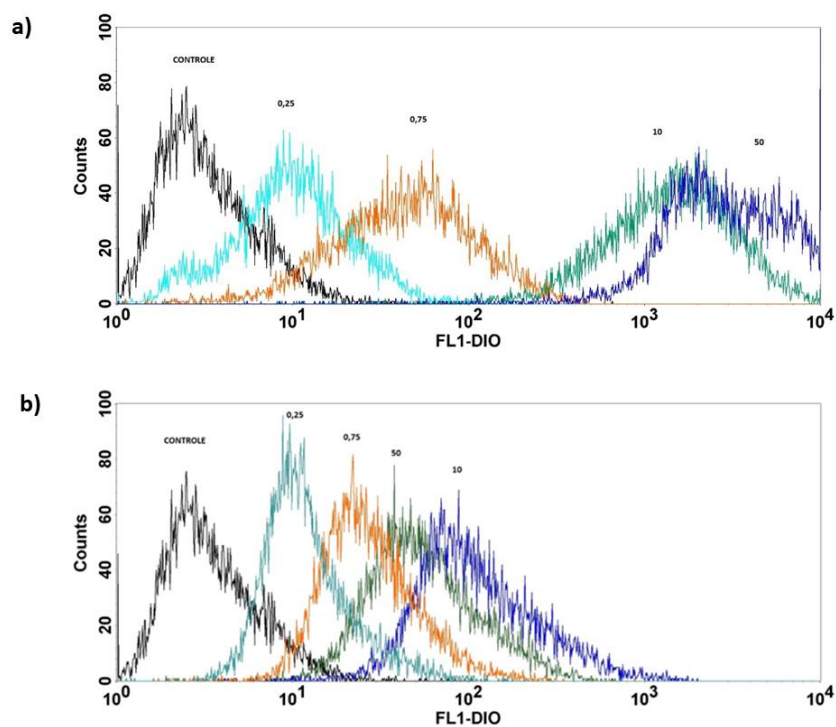
maior morte celular e é justamente o que se observa com a formulação NP 04 quando comparada a que apresenta o TPGS em sua formulação.

Wang et al ao produzirem NPs a base de PCL e TPGS observou uma maior captação celular do agente fluorescente quando encapsulado do que em sua forma livre, não somente isso mas, assim como nesse trabalho, essa captação celular é dose-dependente, é interessante notar que esse aumento da captação celular não se deu apenas pela utilização de uma NP, mas também devido ao TPGS em sua formulação que através de sua ação inibitória de glicoproteína P e ação antitumoral intrínseca demonstrou ótima captação celular ao ser estudadas em células de câncer de mama da linhagem MCF-7 (WANG et al., 2015).

He et al ao desenvolverem NPs a base de PCL e PEG afirmaram que as rotas de endocitose principais utilizadas por formulações baseadas em PCL funcionalizadas com PEG e seus derivados são as dependentes de claritina e caveolina, dessa forma é possível pressupor que os caminho de endocitose usado pelas NPs desse trabalho podem ser os mesmos, o que poderá ser investigado futuramente (HE et al., 2015).

Nos testes de citotoxicidade a queda da viabilidade celular com a utilização das nanopartículas branco é muito aparente nas maiores concentrações, já na citometria de fluxo observa-se que a morte celular, a qual é marcada pelo iodeto de propídio nos gráficos, se mostra muito baixa, tal fenômeno é um indicativo de que a morte celular causada pela nanopartícula sem fármaco ocorre somente em elevadas concentrações, em concentrações menores nota-se valores de morte celular próximos de zero, que é o esperado para uma nanopartícula produzida a partir de um polímero com ótima biocompatibilidade tal qual o PCL.

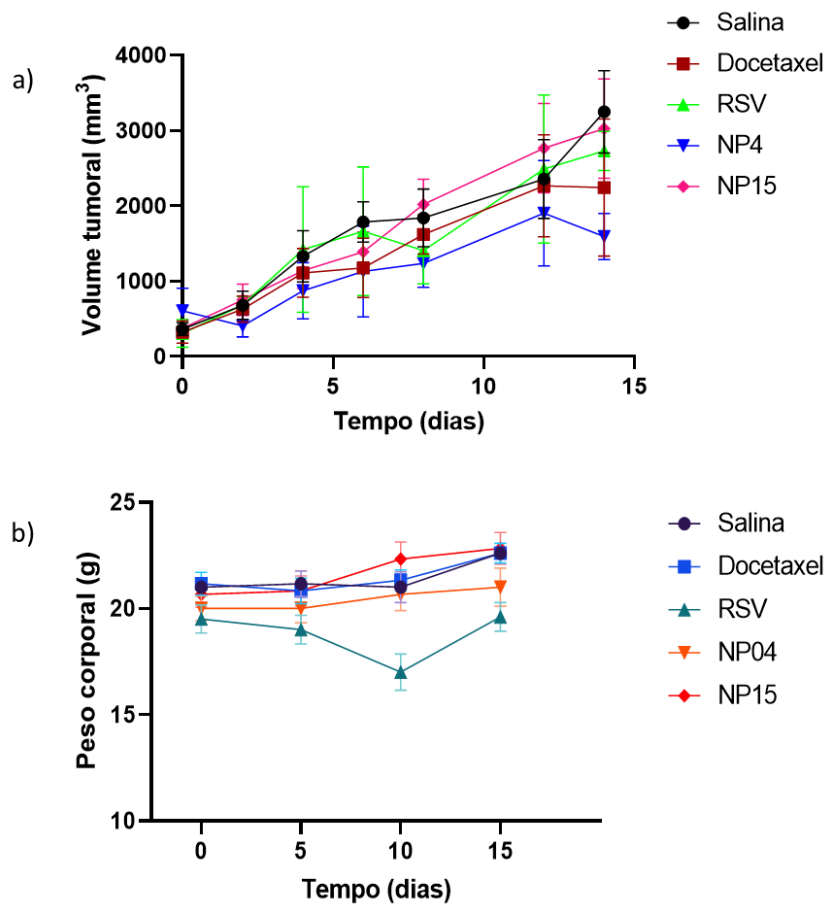
**Figura 17.** Gráficos gerais da fluorescência do DIO vs. concentração para a formulação NP 04 (sem TPGS) (a) e para a formulação NP 15 (com TPGS) (b).



### 6.13. Estudo de ação antitumoral *in vivo*

Uma vez que os resultados do *in vitro* se mostraram extremamente positivos, partiu-se para a realização dos ensaios *in vivo* para a observação do efeito da funcionalização do TPGS sob as características da formulação e seu efeito biológico. Inicialmente notou-se que não houveram grandes mudanças significativas de peso em nenhum grupo, excetuando-se o resveratrol que aparentou uma queda e subsequente evolução do peso dos camundongos para a média de 20 g como pode ser visto na fig. 18b.

**Figure 18.** (a) Curva de crescimento tumoral para cada grupo. (b) Curva de peso corporal após as subsequentes administrações.

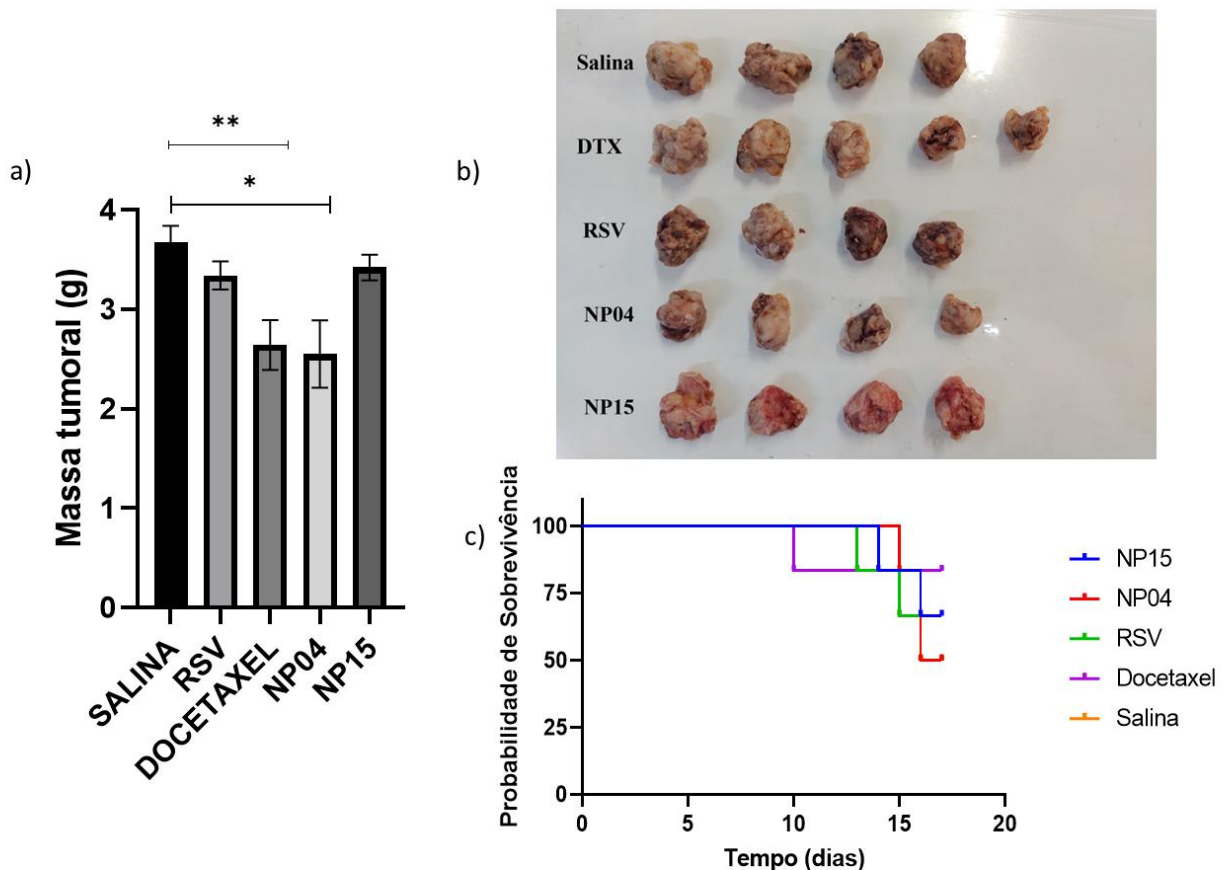


O volume tumoral se manteve em constante crescimento por todo o período testado, sendo o grupo salina o que apresentou o maior crescimento, enquanto que a formulação NP04 apresentou a menor taxa de crescimento apresentando volume final de 1593 mm<sup>3</sup>, contra os 2730 mm<sup>3</sup> do grupo RSV e o 3252 mm<sup>3</sup> do grupo salina contra os quais mostrou diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ), tais valores são corroborados por estudos como de Carletto et al., que ao produzir nanopartículas a base de PCL para carreamento de RSV contra melanoma observaram a diminuição tumoral do grupo RSV-NP frente o grupo controle salina e contra a droga na sua forma livre, embora com resultados inferiores aos encontrados nesse trabalho (CARLETTO et al., 2016). A formulação NP04 se mostrou mais positiva que o controle com docetaxel que mostrou inibições em diversos graus, indo contra achados anteriores que indicavam inatividade do RSV contra essa linhagem tumoral (fig. 18a) (SINHA et al., 2016b).

Seguindo a mesma linha dos resultados anteriores o grupo NP04 apresentou um crescimento diário de 70,35 mm<sup>3</sup>/ dia, sendo o menor valor frente a todos os demais grupos que

apresentaram um crescimento diário muito maior, o grupo salina apresentou crescimento de 206,2 mm<sup>3</sup>/dia, seguido pelo grupo RSV com crescimento de 173,07 mm<sup>3</sup>/dia, já o grupo NP15 mostrou um crescimento elevado de 189,4 mm<sup>3</sup>/dia, enquanto o DTX apresentou o melhor valor, após o grupo NP04, com crescimento de 137,24 mm<sup>3</sup>/dia, assim é clara a atuação NP04 sobre a taxa de crescimento, retardando de forma clara o crescimento do tumor, frente ao fármaco livre, que já era esperado dada sua baixa biodisponibilidade (XIONG et al., 2021) e a formulação com TPGS, indicando mais uma vez que tal funcionalização levou a resultados inferiores.

**Figure 19.** (a) Peso médio tumoral de cada grupo obtido no final do estudo (\*P<0,05). (b) Imagem dos tumores retirados dos camundongos de cada grupo. (c) Curva de sobrevivência dos diversos grupos ao longo do estudo.



A formulação NP04 continuou mostrando os melhores resultados frente as demais formulações e o RSV na sua forma livre, como pode ser notado no gráfico da massa tumoral na



figura 19a e visualmente na figura 19b. Ao se observar a massa tumoral, somente a formulação NP04 com massa média de 2,55 g e o controle positivo com massa média de 2,64 g mostraram diferença estatística frente o controle negativo que apresentou massa média de 3,67 g, valor bem próximo da massa tumoral média da formulação NP15 de valor 3,42 g, tais achados corroboram os testes anteriores que indicaram a formulação sem TPGS (NP04) como a que possui melhor atuação frente as células da linhagem 4T1 em contraste com a formulação com TPGS (NP15).

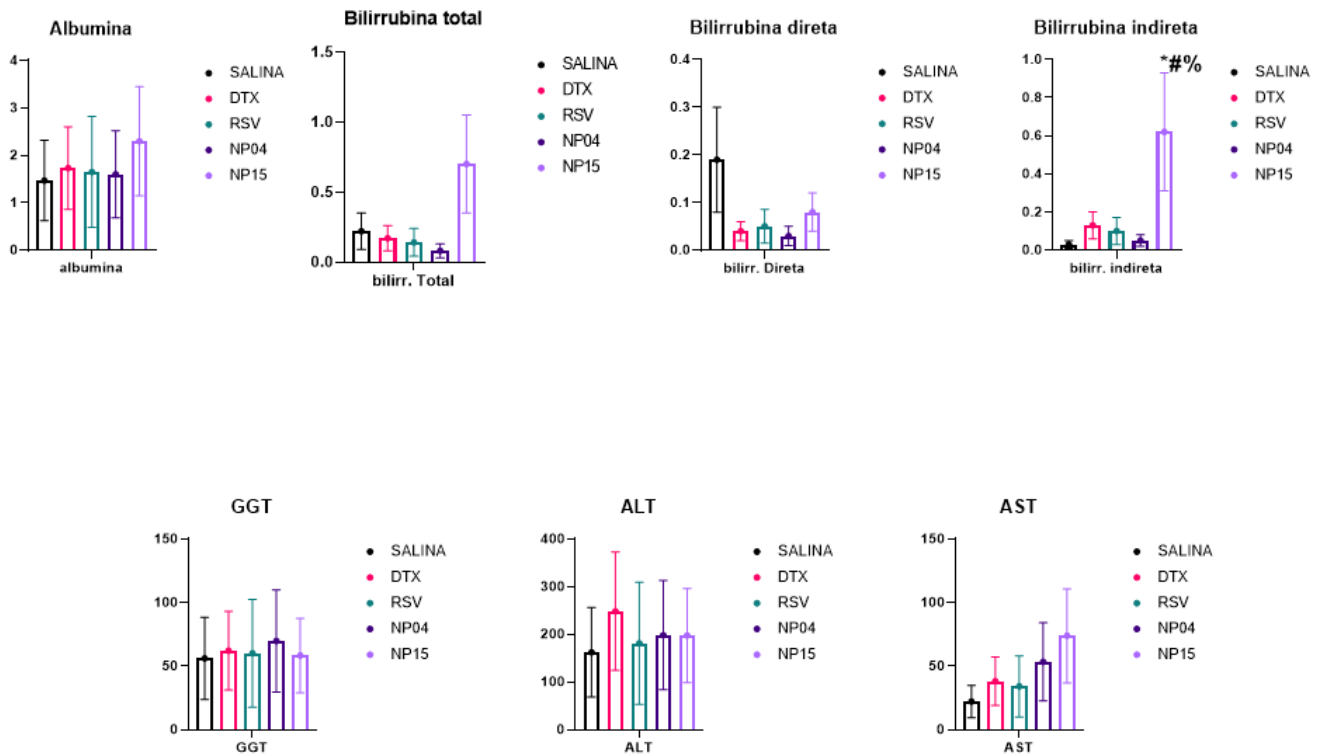
Um achado interessante foi a presença de uma certa toxicidade no grupo docetaxel que levou a morte prematura de uma dos camundongos, indicando que embora ele tenha atuado na diminuição tumoral, ele levou a uma toxicidade que não foi vista nos outros grupos, tal fato é notado ao se observar o gráfico de sobrevivência (WANG et al., 2021; XIONG et al., 2021)(Fig. 19c).

#### **6.14. Análises bioquímicas**

Para avaliar e comparar a toxicidade das formulações, foram feitas dosagens bioquímicas, conforme Figura 8. Observou-se que os grupos não apresentaram diferença na albumina sérica (Figura 20a). Esta observação é consistente com a cinética da albumina, que é produzida no fígado e tem um tempo médio de vida em circulação de 20 dias, apresentando alterações nos níveis séricos mais direcionadas a lesões hepáticas subagudas e crônicas (Newsome et al., 2018). Para realizar um monitoramento mais sensível da toxicidade hepática, as aminotransferases, também chamadas de transaminases, desempenham um papel crucial. A ALT é uma enzima citosólica e o aumento de sua atividade no plasma indica dano hepático de alta especificidade; A AST, uma enzima mitocondrial, também está presente em tecidos como o músculo esquelético e cardíaco. A AST tem uma cinética de liberação mais lenta e pode indicar alterações hepáticas posteriores que excedem 48 h (Lee et al., 2021). Nesse sentido, os resultados revelaram que a ALT (Figura 20b) não apresentou diferença de atividade em função dos tratamentos assim como a AST (Figura 20c).

**Figure 20.** Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos após tratamento com salina, docetaxel (DTX), resveratrol (RSV) e nanopartículas poliméricas NP04 e NP15. (a) Albumina,

(b) alanina aminotransferase (ALT), (c) aspartato aminotransferase (AST), (d) bilirrubina indireta, (e) bilirrubina total, (f) bilirrubina direta, (g) gama-glutamil transferase (GGT). ANOVA com post-hoc de Bonferroni,  $p < 0,05$ : \* vs. salina; # contra DTX; % vs. RSV.

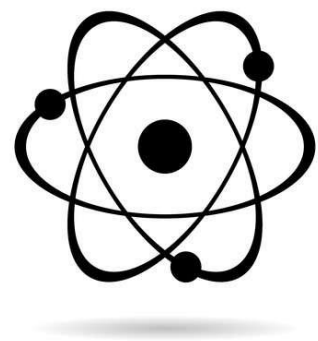


Os dados de toxicidade hepática são confirmados com a determinação da bilirrubina, que é produzida no baço como produto da degradação do grupo heme das hemácias senescentes. Após os processos de oxidação da heme, forma-se a bilirrubina que é transferida para o fígado ligada à albumina. No fígado, a bilirrubina é conjugada ao ácido glicurônico pela ação da enzima UDP-glucuronosiltransferase, por meio de reações do metabolismo de fase II, que torna a bilirrubina conjugada, ou diretamente hidrossolúvel, permitindo sua eliminação fecal via vesícula biliar. Níveis séricos aumentados de bilirrubina indireta ou não conjugada são marcadores precoces com alta especificidade para danos aos hepatócitos e consequente alteração da conjugação (Kwo et al., 2017). O presente estudo mostrou níveis aumentados de bilirrubina indireta no grupo tratado com NP15 em comparação com o controle tratado com solução salina com o grupo tratado com docetaxel e também com resveratrol livre (Figura 20d).

As alterações hepáticas podem ser tóxicas ou obstrutivas. Nas alterações obstrutivas, a bilirrubina sofre conjugação nos hepatócitos, mas não consegue chegar à vesícula biliar, fazendo com que essa bilirrubina conjugada ou direta se acumule no tecido hepático e seja

drenada pela corrente sanguínea. Assim, as doenças obstrutivas ocorrem com aumento da bilirrubina direta com ou sem aumento da bilirrubina total, sendo o total a soma das concentrações direta e indireta. Uma forma de confirmar a obstrução é avaliando o marcador gama-glutamil transferase (GGT); essa enzima tem sua atividade aumentada no plasma em praticamente todos os processos obstrutivos hepáticos (Bussler et al., 2018). Os dados de bilirrubina total, bilirrubina direta e GGT juntos não são sugestivos de obstrução hepática. Assim, o ligeiro aumento da bilirrubina indireta é sugestivo da competição do NP-15 com a bilirrubina pelo sítio catalítico da enzima metabolizadora, como acontece com uma variedade de drogas, como a rifampicina (Kwo et al., 2017).

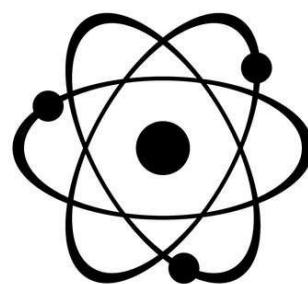
# CONCLUSÃO



## 7. CONCLUSÃO

O trabalho teve como finalidade o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas a base de PCL com o intuito da encapsulação do fármaco resveratrol, além de estudar como o TPGS poderia influenciar nas características físico-químicas das nanopartículas, bem como em seu efeito em de câncer de mama, *in vitro* e *in vivo*. As nanopartículas foram produzidas apresentando tamanho nanométrico com índice de polidispersão satisfatório. Além disso, evidenciamos o papel do TPGS como adjuvante na formação de nanopartículas. Pôde-se notar também a elevada eficiência de encapsulação de resveratrol em nanopartículas a base de policaprolactona. Logrou-se liofilizar as nanopartículas e as caracterizações físico-químicas do estado sólido permitiram identificar os picos característicos de cada uma das substâncias através do FTIR, além das possíveis interações que podem ocorrer entre eles através do DSC. Os resultados de microscopia eletrônica de varredura mostraram a forma esférica, confirmando o tamanho nanométrico das partículas, a liberação *in vitro* mostrou uma maior liberação de RSV pela formulação NP04, embora sem diferença estatística frente a formulação NP15. Os resultados de citotoxicidade foram promissores, indicando uma potente ação do resveratrol encapsulado contra a linhagem celular de câncer de mama com ênfase na formulação sem TPGS, os resultados de liberação *in vitro*, captação celular e citotoxicidade indicaram que o TPGS levou a uma liberação mais lenta e menor, diminuindo assim sua citotoxicidade, tal fator se correlaciona com a diminuição da captação celular também vista para a formulação com esse excipiente, de tal forma que a formulação que não o contém demonstra ter resultados mais promissores. Finalmente, os resultados do efeito antitumoral *in vivo* mostraram que a formulação NP04 apresentou um melhor controle sobre a taxa de crescimento do tumor e provou ser não hepatotóxica, demonstrando ser mais eficaz não apenas do que o fármaco livre, mas também do que o docetaxel e o formulação NP15, corroborando com todos os demais resultados, que indicam uma melhor ação da formulação sem TPGS em relação à que foi funcionalizada com tal material.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAMOR, E. S. et al. Nigella sativa oil entrapped polycaprolactone nanoparticles for leishmaniasis treatment. **IET Nanobiotechnology**, v. 12, n. 8, p. 1018–1026, 2018.
- ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688–1713, 2006.
- ABRIATA, J. P. et al. Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 96, p. 347–355, 1 mar. 2019.
- AGENCY, E. M. ICH guideline Q3C (R8) on impurities: guideline for residual solvents [Internet]. [cited 2023 January 16]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-q3c-r8-impurities-guideline-residual-solvents-s. v. 31, n. November 2021, 2022>.
- ANNAJI, M. et al. **Resveratrol-loaded nanomedicines for cancer applications**. **Cancer Reports** John Wiley and Sons Inc, , 1 jun. 2021.
- ARAUJO, L.; LÖBENBERG, R.; KREUTER, J. Influence of the surfactant concentration on the body distribution of nanoparticles. **Journal of Drug Targeting**, v. 6, n. 5, p. 373–385, 1999.
- BARENHOLZ, Y. (CHEZY). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 117–134, 2012.
- BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 941–951, 2015.
- BRASIL. **RESOLUÇÃO RDC Nº 166. Diário oficial da união**, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/186602/PPAU0156-D.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttp://journal.stainkudus.ac.id/index.php/equilibrium/article/view/1268/1127%0Ahttp://www.scielo.br/pdf/rae/v45n1/v45n1a08%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j>>
- CARLETTO, B. et al. Resveratrol-loaded nanocapsules inhibit murine melanoma tumor growth. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 144, p. 65–72, 2016.
- CHAWLA, J. S.; AMIJI, M. M. Biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1–2, p. 127–138, 2002.
- CHHIKARA, B. S.; PARANG, K. Chemical Biology LETTERS Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. **Chemical Biology Letters Chem. Biol. Lett**, v. 2023, n. 1, p. 1–16, 2023.
- COLMENARES-ROLDÁN, G. J. et al. Production of bioabsorbible nanoparticles of polycaprolactone by using a tubular recirculating system. **DYNA (Colombia)**, v. 85, n. 204, p. 277–282, 2018.
- CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 771–784, 2017.
- DANAFAR, H. et al. Biodegradable m-PEG/PCL core-shell micelles: Preparation and characterization as a sustained release formulation for curcumin. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. Suppl 2, p. 501–510, 2014.
- DIKPATI, A. et al. Residual Solvents in Nanomedicine and Lipid-Based Drug Delivery Systems: a Case Study to Better Understand Processes. **Pharmaceutical research**, v. 37, n. 8, p. 149, jul. 2020.
- ELOY, J. O. et al. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, n. 141, p. 74–82, 2016.
- FDA. Guidance for industry considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology. **Biotechnology Law Report**, v. 30, n. 5, p. 613–616, 2014.
- FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.
- GORAIN, B. et al. Paclitaxel loaded vitamin E-TPGS nanoparticles for cancer therapy. **Materials Science and Engineering C**, v. 91, n. September 2017, p. 868–880, 2018.
- GORMLEY, A. J. et al. Guided delivery of polymer therapeutics using plasmonic photothermal therapy. **Nano Today**, v. 7, n. 3, p. 158–167, 2012.
- GREGORIOU, Y. et al. Resveratrol loaded polymeric micelles for theranostic targeting of breast cancer cells. **Nanotheranostics**, v. 5, n. 1, p. 113–124, 2020.
- GREWAL, I. K. et al. Polymeric nanoparticles for breast cancer therapy: A comprehensive review. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 11151–11171, 2021.
- GUO, Y. et al. The applications of Vitamin e TPGS in drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 175–186, 2013.
- HE, X. et al. Poly(ethylene glycol)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone)-and phospholipid-based stealth nanoparticles with enhanced therapeutic efficacy on murine breast cancer by improved intracellular drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1791–1804, 2015.

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

JOSE, S. et al. In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 474, n. 1–2, p. 6–13, 2014.

KOU, L. et al. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2013.

KULHARI, H. et al. Cyclic-RGDfK peptide conjugated succinoyl-TPGS nanomicelles for targeted delivery of docetaxel to integrin receptor over-expressing angiogenic tumours. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 6, p. 1511–1520, ago. 2015.

LI, L. et al. Poly(ethylene glycol)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone) and phospholipid-based stealth nanoparticles with enhanced therapeutic efficacy on murine breast cancer by improved intracellular drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1791, 5 mar. 2015.

LOFTERØD, T. et al. Exploring the effects of lifestyle on breast cancer risk, age at diagnosis, and survival: the EBBA-Life study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 182, n. 1, p. 215–227, 1 jul. 2020.

MERAZ, I. et al. Multivalent presentation of MPL by porous silicon microparticles favors T helper 1 polarization enhancing the anti-tumor efficacy of doxorubicin nanoliposomes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

MILADI, K. et al. **Polymer Nanoparticles for Nanomedicines**. [s.l.: s.n.].

MOO, T. A. et al. Overview of Breast Cancer Therapy. **PET Clinics**, v. 13, n. 3, p. 339–354, 2018.

MOZAR, F. S.; CHOWDHURY, E. H. Impact of PEGylated Nanoparticles on Tumor Targeted Drug Delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 28, p. 3283–3296, 2018.

MS, M. D. S. **A mulher e o câncer de mama no Brasil**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/centrais-de-conteudo/exposicoes/a-mulher-e-o-cancer-de-mama-no-brasil>>. Acesso em: 8 abr. 2023.

MUSSI, S. V. et al. New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1–2, p. 282–290, 2013.

NASEF, A. M.; GARDOUH, A. R.; GHORAB, M. M. Polymeric nanoparticles: Influence of polymer, surfactant and composition of manufacturing vehicle on particle size. **World J Pharm Sci**, v. 3, n. 12, p. 2308–2322, 2015.

PARASHAR, P. et al. Hyaluronic acid decorated naringenin nanoparticles: Appraisal of chemopreventive and curative potential for lung cancer. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, 2018.

PHAM, C. V. et al. A thorough analysis of the effect of surfactant/s on the solubility and pharmacokinetics of (S)-zaltoprofen. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 435–444, 2019.

PRIETO, C.; CALVO, L. Supercritical fluid extraction of emulsions to nanoencapsulate vitamin E in polycaprolactone. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 274–282, 2017.

PULINGAM, T. et al. Exploring Various Techniques for the Chemical and Biological Synthesis of Polymeric Nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 12, n. 3, 2022.

RIZVI, S. A. A.; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 1, p. 64–70, 2018.

SAEZ, A. et al. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 3, p. 379–387, 2000.

SANNA, V. et al. Development of novel cationic chitosan-and anionic alginate-coated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5501–5516, 2012.

SANNA, V. et al. Resveratrol-Loaded Nanoparticles Based on Poly( $\epsilon$ -caprolactone) and Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)–Poly(ethylene glycol) Blend for Prostate Cancer Treatment. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 10, p. 3871–3881, 7 out. 2013.

SANNA, V. et al. Resveratrol-Loaded Nanoparticles Based on Poly( $\epsilon$ -caprolactone) and Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)–Poly(ethylene glycol) Blend for Prostate Cancer Treatment. **Mol Pharm**, v. 10, n. 10, p. 3871–3881, 2014.

SHAO, J. et al. Enhanced growth inhibition effect of Resveratrol incorporated into biodegradable nanoparticles against glioma cells is mediated by the induction of intracellular reactive oxygen species levels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, n. 1, p. 40–47, 2009.

SHIN, H. J. et al. Optimization and pharmacokinetic evaluation of synergistic fenbendazole and rapamycin co-encapsulated in methoxy poly(Ethylene glycol)-b-poly(caprolactone) polymeric micelles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, n. April, p. 4873–4889, 2021.

SINHA, D. et al. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40–41, p. 209–232, 2016a.

SINHA, D. et al. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40\_41, p. 209–232, 2016b.



SONG, R. et al. **Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. Drug Design, Development and Therapy** Dove Medical Press Ltd., , 2018.

SUBEDI, R. K.; KANG, K. W.; CHOI, H.-K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 508–513, 2009.

TALIB, W. H. et al. **Resveratrol and tumor microenvironment: mechanistic basis and therapeutic targets. Molecules** MDPI AG, , 1 set. 2020.

TANG, X.; LOC, W. S.; DONG, C. Nanoparticles in Breast Cancer. **Nanomedicine**, p. 1–21, 2017.

USP. Residual Solvents - Chapter 467. **The United States Pharmacopeial Convention**, p. 22, 2019.

WANG, S. et al. MPEG-b-PCL/TPGS mixed micelles for delivery of resveratrol in overcoming resistant breast cancer. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 3, p. 361–373, 2015.

WANG, W. et al. Resveratrol-Loaded TPGS-Resveratrol-Solid Lipid Nanoparticles for Multidrug-Resistant Therapy of Breast Cancer: In Vivo and In Vitro Study. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. December, p. 1–14, 2021.

WITT, S.; SCHEPER, T.; WALTER, J. G. Production of polycaprolactone nanoparticles with hydrodynamic diameters below 100 nm. **Engineering in Life Sciences**, v. 19, n. 10, p. 658–665, 2019.

WONG, K. H. et al. **Natural ingredient-based polymeric nanoparticles for cancer treatment. Molecules** MDPI AG, , 1 ago. 2020.

XIONG, L. et al. Resveratrol and its nanoparticle suppress doxorubicin/ docetaxel-resistant anaplastic thyroid cancer cells in vitro and in vivo. **Nanotheranostics**, v. 5, n. 2, p. 143–154, 2021.

YANG, C. et al. Recent advances in the application of vitamin E TPGS for drug delivery. **Theranostics**, v. 8, n. 2, p. 464–485, 2018.

YIN, H. et al. Resveratrol-loaded nanoparticles reduce, oxidative stress induced by radiation or amyloid- $\beta$  in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 8, p. 1536–1544, 2014.

ZHANG, H. et al. Fabrication of genistein-loaded biodegradable TPGS-b-PCL nanoparticles for improved therapeutic effects in cervical cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 2461–2473, 2015.

ZHANG, Z.; TAN, S.; FENG, S. S. Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4889–4906, 2012.

ZHAO, Y. N. et al. Anti-breast cancer activity of resveratrol encapsulated in liposomes. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 1, p. 27–37, 2019.

ZIELINSKA, A. et al. **Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. Molecules** MDPI AG, , 1 ago. 2020.