

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Lorany Vitoria dos Santos Barbosa

Nanopartículas poliméricas para a entrega do paclitaxel na terapia de câncer de
pulmão

São Carlos
2024

Lorany Vitoria dos Santos Barbosa

Nanopartículas poliméricas para a entrega do paclitaxel na terapia de câncer de pulmão

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Ciências Físicas e Biomoleculares.

Orientadora: Dra. Camila Fernanda Rodero - Instituto de Física de São Carlos, USP.

São Carlos
2024

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

RESUMO

O câncer de pulmão é uma neoplasia altamente incidente e letal. Sua elevada taxa de mortalidade está associada ao frequente diagnóstico em estágios avançados da doença, o que reduz significativamente o tempo de sobrevida do paciente. As terapias convencionais, como quimioterapia e radioterapia, são acompanhadas de diversos efeitos colaterais, que complicam o prognóstico dos pacientes. Nesse cenário, a nanomedicina surge como uma alternativa promissora, oferecendo abordagens inovadoras para reduzir os efeitos adversos e aumentar a eficácia do tratamento. O presente estudo visou o desenvolvimento de nanopartículas à base de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), carregando paclitaxel (PTX), como estratégia terapêutica para o câncer de pulmão. A síntese de nanopartículas (NPs) foi investigada através das técnicas de nanoprecipitação e nanoemulsão. Apenas o método de nanoemulsão foi bem-sucedido para a obtenção de NPs contendo o PTX, sendo que a formulação com os melhores parâmetros demonstrou NPs com $60\pm10\%$ de eficiência de encapsulação do PTX, com tamanho médio de 208 ± 8 nm, índice de polidispersividade (PDI) de $0,18\pm0,08$ e potencial Zeta de -10 ± 3 mV. As NPs obtidas apresentaram estabilidade ao longo de duas semanas, conforme monitoramento por DLS, além de uma morfologia esférica e uniforme em imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Ensaios de viabilidade celular utilizando células A549 revelaram que as nanopartículas brancas exibiram biocompatibilidade, enquanto os sistemas contendo PTX apresentaram um efeito citotóxico esperado. Portanto, nanossistemas poliméricos têm potencial significativo para aumentar a eficácia e reduzir os efeitos adversos da quimioterapia contra o câncer de pulmão, indicando um caminho em direção a terapias oncológicas inteligentes e seguras.

Palavras-chave: Nanopartículas de PLGA, Paclitaxel, Câncer de pulmão.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença de incidência mundial, que surge de mutações genéticas que alteram o comportamento da célula, transformando-a numa célula cancerosa [1]. Dos mais de 100 tipos de câncer, no Brasil, o de pulmão foi o terceiro de maior incidência entre os homens e o quarto entre as mulheres, desconsiderando o câncer de pele não melanoma (*Non-Melanoma Skin Cancer* - NMSC), conforme os dados de 2023 do Instituto Nacional de Câncer (INCA) [1]. Globalmente, segundo estimativas de 2020 da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o câncer de pulmão é o terceiro mais incidente e o de maior mortalidade, também excluindo o NMSC [2]. Seu alto índice de mortalidade se deve ao fato de ser majoritariamente diagnosticado em estágios avançados do tumor, o que diminui consideravelmente o tempo de sobrevida do paciente [1].

Atualmente, as principais formas de tratamento são a quimioterapia, radioterapia e ressecção cirúrgica [3]. Entre os quimioterápicos mais utilizados para tratar o câncer está o paclitaxel (PTX) (figura 1), cuja ação antineoplásica foi descoberta em 1979, sendo utilizado posteriormente contra diversos tipos de câncer, sobretudo o de mama, bexiga e pulmão de células não pequenas (*Non-Small Cell Lung Cancer* - NSCLC) [4, 5].

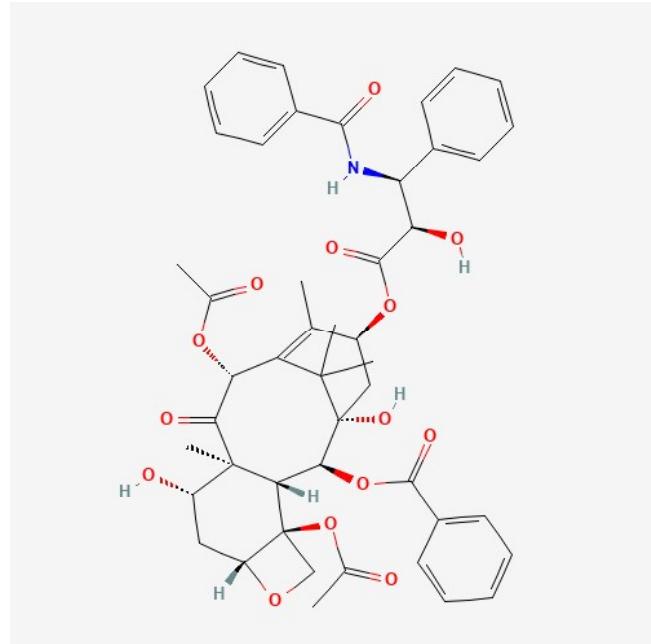


Figura 1 - Estrutura química do Paclitaxel: um diterpenoide tetracíclico proveniente do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*), comercializado sob a marca Taxol® e outras [6].

Este composto possui origem natural e age se ligando às tubulinas, impedindo a despolimerização dos microtúbulos, prejudicando, assim, a mobilidade do citoesqueleto das células

afetadas [4, 5]. A quimioterapia, porém, resulta numa série de efeitos colaterais, devido à falta de especificidade dos fármacos [7], o que debilita ainda mais os pacientes. Além disso, o PTX possui baixa solubilidade em meio aquoso [5], dificultando a sua biodisponibilidade no organismo.

Com isso em vista, o estudo de alternativas que minimizem os efeitos negativos e potencializem a especificidade do tratamento são essenciais. Dessa forma, a nanotecnologia possibilita a otimização da terapia contra o câncer, buscando diminuir a toxicidade dos fármacos e promover uma entrega direcionada e controlada ao alvo [8]. Para isso, diversos materiais são testados para estruturar as nanopartículas (NPs) responsáveis por carregar as moléculas de interesse. Um material que se destaca para essa composição é o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) (figura 2), por ser biodegradável, biocompatível e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) [8]. O PLGA é formado por dois monômeros, ácidos lático e glicólico, caracterizando-o como um copolímero, sendo os produtos de sua hidrólise passíveis de serem metabolizados pelo próprio organismo humano [8]. Outra vantagem é a sua eficiência em encapsular fármacos lipofílicos, como é o caso do PTX [5, 8]. Portanto, o desenvolvimento de NPs de PLGA se mostra bastante vantajoso, devido ao seu potencial de aumentar a biodisponibilidade do fármaco e reduzir os efeitos colaterais dos métodos convencionais.

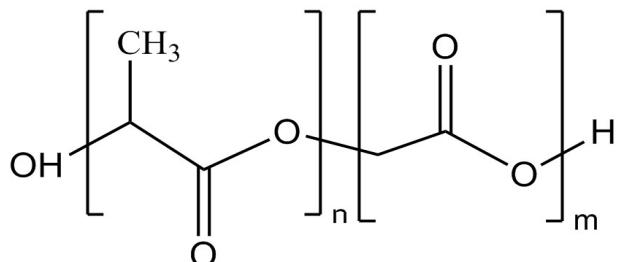


Figura 2 - Estrutura química do PLGA. As letras n e m representam, respectivamente, o número de monômeros dos ácidos lático e glicólico presentes no copolímero.

Diante disso, este projeto teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado à base do copolímero PLGA, contendo PTX, como uma alternativa para o tratamento do câncer de pulmão. Para tal, os objetivos específicos incluíram a investigação das técnicas de nanoprecipitação e nanoemulsão para a síntese de nanopartículas, visando a caracterização físico-química do nanossistema otimizado. Ademais, a citotoxicidade dos nanossistemas, com e sem PTX, foi avaliada *in vitro*, por meio do ensaio de viabilidade celular utilizando uma linhagem tumoral proveniente de câncer de pulmão. Esse conjunto de análises é fundamental para verificar a biocompatibilidade, a reproduzibilidade e a eficácia dos nanossistemas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Síntese de nanopartículas

Os métodos de nanoprecipitação e emulsão simples foram empregados para otimizar a síntese das nanopartículas de PLGA encapsulando o PTX. O processo de nanoprecipitação consiste na dissolução do PLGA e PTX em solvente orgânico, que deve ser rapidamente injetado em uma solução aquosa contendo surfactante, sob agitação magnética constante. Já na técnica de nanoemulsão as soluções orgânica e aquosa são misturadas sob agitação com um sonicador de ponta (Ultrasonic Cleaning, Sono-tech). Nos dois métodos, ilustrados na figura 3, a mistura é mantida sob agitação magnética constante para evaporação do solvente orgânico e estabilização das NPs.

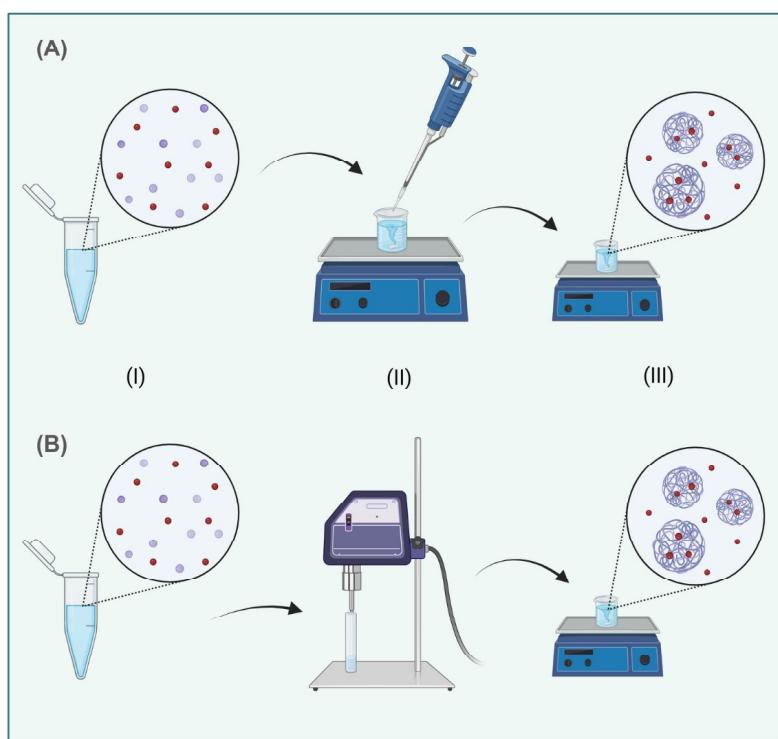


Figura 3 - Esquema de síntese de nanopartículas por nanoprecipitação (A) e nanoemulsão (B): (I) solubilização de PLGA+PTX em solução orgânica; (II) adição da solução orgânica na solução aquosa sob agitação magnética em (A) ou em sonicador de ponta em (B); (III) etapa final, deixar em agitação para evaporação do solvente orgânico.

Pelo método de nanoprecipitação, foram verificadas treze formulações (T1 a T13), variando-se a proporção entre fase orgânica e aquosa, tipo ou concentração dos reagentes e a temperatura da amostra, que estão apresentadas na tabela 1. Em todos os testes o Pluronic® F-127 foi utilizado como agente emulsificante na fase aquosa. Os solventes orgânicos utilizados foram acetonitrila, acetona e dimetilformamida (DMF), sendo que o volume aplicado variou de 1 a 2 mL por teste, de forma a obter a concentração final desejada de PLGA. Além disso, nas sínteses T6, T7

e T7.1 foi utilizado o PLGA 50:50, enquanto nas demais se utilizou o 85:15 (proporção ácido lático:ácido glicólico). O volume de fase orgânica inserida na fase aquosa foi sempre mantido em 1 mL, variando-se apenas o volume da fase aquosa. Na etapa de agitação as amostras foram deixadas por cerca de 1 hora e 30 minutos para evaporação do solvente, com exceção do DMF, que não é volátil e foi deixado por aproximadamente 20 minutos. Ademais, as sínteses T1 a T9 foram realizadas a temperatura ambiente (25°C), enquanto as sínteses T10 a T13 foram realizadas após a fase aquosa atingir a temperatura de 35 a 38°C.

Tabela 1 - Parâmetros investigados nas sínteses das nanopartículas por nanoprecipitação.

	PLGA		PTX	Solvente orgânico	Fase aquosa		Temperatura
	Tipo	(mg/mL)			(% m/v)	(mL)	
T1	85:15	5	1	acetonitrila	2	2	ambiente
T2	85:15	10	1	acetonitrila	2	2	
T3	85:15	5	1	acetonitrila	2	4	
T4	85:15	10	-	DMF	2	4	
T5	85:15	10	-	acetona	2	4	
T6	50:50	10	-	DMF	2	4	
T7	50:50	10	-	acetonitrila	2	4	
T7.1	50:50	10	1	acetonitrila	2	4	
T8	85:15	5	-	acetonitrila	1	4	
T8.1	85:15	5	1	acetonitrila	1	4	
T9	85:15	10	-	acetona	1	5	
T9.1	85:15	10	1	acetona	1	5	
T10	85:15	5	-	acetonitrila	1	4	35 a 38°C
T10.1	85:15	5	1	acetonitrila	1	4	
T11	85:15	5	-	DMF	2	4	
T11.1	85:15	5	1	DMF	2	4	
T12	85:15	10	1	acetonitrila	5	4	
T13	85:15	10	1	DMF	10	4	

Em seguida, foram avaliadas seis formulações (T14 a T19) utilizando a técnica de nanoemulsão simples com evaporação de solvente, analisando-se a proporção entre fase orgânica e aquosa, o tipo e a concentração de PLGA e de surfactante, além da amplitude de sonicação, conforme apresentado na Tabela 2. A síntese T14 foi a única cuja nanoemulsão utilizou o surfactante Pluronic® F-127, que foi substituído por álcool polivinílico (PVA) nas demais formulações (T15 a T19). Na síntese T16, a amplitude de sonicação foi de 30%, enquanto nas outras foi de 40%. Além disso, nessa mesma amostra, a concentração de PVA foi de 1% m/v, enquanto nas demais foi de 2% m/v. O tempo de sonicação nas sínteses T14 a T16 foi de 1 minuto, com um volume de fase orgânica de 1 mL em cada uma, exceto na T17, que foi realizada com 2 mL. Ademais, a partir da amostra T17, foi aplicada uma sonicação de 30 segundos na fase orgânica isoladamente, seguida de 1 minuto de sonicação junto à fase aquosa. Por fim, foram analisadas concentrações de 5 mg/mL de PLGA (85:15) nas sínteses T17 e T18 e de 10 mg/mL nas demais. O tempo de agitação após a sonicação foi semelhante ao do método de nanoprecipitação, variando entre 1h e 1h30min.

Tabela 2 - Parâmetros investigados nas sínteses das nanopartículas por nanoemulsão.

	PLGA		PTX	Clorofórmio	Fase aquosa			Amplitude de sonicação
	Tipo	(mg/mL)	(mg)	(mL)	Surfactante	% m/v	(mL)	
T14	85:15	10	1	1	Pluronic®	1	4	40%
T15	85:15	10	1	1	PVA	2	4	40%
T16	85:15	10	1	1	PVA	1	4	30%
T17*	85:15	5	1	2	PVA	2	4	40%
T18*	85:15	5	1	1	PVA	2	4	40%
T19*	85:15	10	1	1	PVA	2	4	40%

* A fase orgânica das amostras T17-19 foi submetida a 30 segundos sonicação antes da adição da fase aquosa. Logo após, a fase aquosa foi adicionada, e a mistura passou por mais 1 minuto de sonicação.

Após a síntese, a amostra melhor avaliada foi selecionada (T18) e submetida a uma ultracentrifugação a 35.000 rpm por 30 minutos, utilizando uma ultracentrífuga Optima MAX-XP (Beckman Coulter, EUA), a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido para a medida indireta de eficiência de encapsulação e a amostra foi ressuspensida em 4 mL de PBS.

2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cálculo da eficiência de encapsulação (EE)

Para avaliar a eficiência de encapsulação do PTX pelas NPs, utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinar a concentração de PTX no sobrenadante e calcular indiretamente a EE. A obtenção dos dados foi realizada com o sistema Agilent 1260 Infinity II LC (Agilent, Santa Clara, Califórnia, EUA), e a análise dos dados, pelo software OpenLab. O sistema empregou uma fase móvel composta por água deionizada e acetonitrila (55:45, v/v, J.T.Baker) e uma coluna de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 (100 × 4,6 mm, 4 µm). O volume de injeção foi ajustado para 60 µL, com uma taxa de fluxo de 1,1 mL/min e temperatura de 40°C. Realizou-se uma medida preliminar em um espectrômetro UV-Vis (U-2900, Hitachi, China) no intervalo de 190 a 600 nm, identificando um pico de absorbância de PTX a 227,4 nm. Uma solução estoque de PTX (1 mg/mL) em acetonitrila foi utilizada para preparar as diluições da solução de trabalho. A partir dessa solução padrão, construiu-se um gráfico de regressão linear, cuja equação foi utilizada para calcular a concentração de PTX no sobrenadante coletado ao final da síntese, após análise por HPLC.

Posteriormente, o valor médio da concentração de PTX no sobrenadante ($[PTX]_{sobrenadante}$) e a concentração total de PTX utilizada na síntese inicial ($[PTX]_{inicial}$) foram empregados para calcular a porcentagem de EE, conforme demonstrado na equação abaixo. Esse resultado foi então utilizado para calcular a concentração molar aplicada nos ensaios de viabilidade celular subsequentes.

$$\% \text{ EE} = \frac{[PTX]_{inicial} - [PTX]_{sobrenadante}}{[PTX]_{inicial}} \times 100$$

2.3. Caracterização das NPs

Os dados de caracterização das NPs foram obtidos a partir de duas amostras brancas (NPBR) e três contendo PTX (NPPTX). Assim, os valores finais representam a média entre as amostras de NPBR e de NPPTX, visando obter dados para o cálculo do desvio padrão das características físico-químicas, além de avaliar a reprodutibilidade da metodologia de síntese.

2.3.1. Dispersão dinâmica da luz (DLS), potencial zeta e análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersidade (PDI) das NPs foi medido com base na dispersão dinâmica da luz (Dynamic Light Scattering - DLS) utilizando o Zetasizer

(Malvern espetrômetro Nano ZS - Malvern Instruments, UK), com ângulo de dispersão de 90° e temperatura igual a 20°C. Para tanto, as amostras foram diluídas 100× em água deionizada à temperatura ambiente. O potencial zeta (PZ) também foi medido no Zetasizer, que aplica uma mobilidade eletroforética sob um campo elétrico, utilizando a mesma suspensão diluída anteriormente. Adicionalmente, as NPs tiveram o seu tamanho médio e concentração medidos através da análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) utilizando o NanoSight NS300 (Malvern Panalytical Instruments). Para isso, as amostras foram diluídas 1000× em água deionizada em temperatura ambiente.

2.3.2. Estabilidade das nanopartículas

As NPs tiveram o seu tamanho médio, PDI e potencial zeta monitorados no Zetasizer ao longo de 6 semanas, sendo analisadas com intervalos de uma a quatro semanas ao longo do período, com o objetivo de avaliar a estabilidade físico-química das nanopartículas.

2.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização da morfologia das NPs foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando o microscópio eletrônico de varredura ZEISS (SIGMA). Previamente, as amostras de NPs foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos para remoção do PBS e posterior ressuspensão em água deionizada. Para a análise, uma lâmina de silício polido foi fixada a um stub com fita dupla face de carbono condutora. Sobre a lâmina de silício, foram adicionados 10 μ L da solução de nanopartículas diluída 100× em água deionizada, sendo esta deixada para secar a vácuo. Finalmente, as imagens foram geradas por MEV utilizando um feixe de elétrons de 2 kV.

2.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Foram realizados testes *in vitro* para estimar o efeito das nanopartículas na viabilidade das células A549, uma linhagem celular de câncer de pulmão. Para tanto, as células em meio de cultivo com soro foram adicionadas em placas de 96 poços e após 24 horas de incubação em estufa, foram expostas a diferentes concentrações das nanopartículas, incubando-se novamente as células durante 24h. As concentrações foram previamente calculadas utilizando o valor de EE, de forma que a concentração de PTX fosse igual na solução de fármaco livre e na suspensão de NPPTX (0, 1, 10, 100 e 1000 nM). Ademais, as amostras de NPBR e de PBS foram adicionadas em número de partículas e volume equivalentes à quantidade de NPPTX (0, 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} NPs/mL,

respectivamente). Após o período de exposição de 24h e 72h, foi realizada a quantificação da viabilidade celular através do método colorimétrico por redução do tetrazólio MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio]. A leitura das placas foi realizada por absorbância a 570 nm no SpectraMax® M3.

3. RESULTADOS

3.1. Síntese de nanopartículas por nanoprecipitação

A técnica de nanoprecipitação se aplica para a construção de nanopartículas poliméricas capazes de encapsular compostos lipofílicos, como é o caso do paclitaxel (PTX). Além disso, outras vantagens deste método consistem na sua boa reproduzibilidade em laboratório e capacidade de ser produzida em escala industrial [9]. Aqui nós investigamos treze formulações diferentes para a síntese das nanopartículas por essa técnica (tabela 1), em busca da formulação mais efetiva para a encapsulação do PTX. As primeiras sínteses, T1 a T3, foram realizadas adicionando o PTX nas formulações. A amostra T1 foi analisada via DLS, apresentando tamanho em torno de 300 nm e PDI 0,6, o que indica uma alta polidispersividade e um tamanho quase o dobro do esperado [10]. As amostras T2 e T3 formaram um precipitado com aspecto brilhoso disperso na solução aquosa, indicando a não efetividade do método de síntese.

Em seguida, testamos sínteses sem o PTX e alterando o solvente orgânico para DMF (T4) e para acetona (T5). Nas duas sínteses também ocorreu a formação de um precipitado, principalmente na T5, indicando que essas condições de síntese mais uma vez não são as mais efetivas para a obtenção das nanopartículas. As sínteses T6 e T7 tiveram então o tipo de PLGA substituído para o 50:50, sendo o T6 repetido com DMF e o T7 com a acetonitrila. Destas, ambas resultaram em nanopartículas homogêneas, com PDI próximo de 0,1, e diâmetro médio em torno de 60 nm em T6 e de 124 nm em T7. Como o PTX é uma molécula relativamente grande, cujo peso molecular é 853,9 g/mol [6], selecionamos a metodologia que apresentou maior tamanho, T7, para adicionar o PTX, conforme descrito para o teste T7.1, visando um maior rendimento na encapsulação. No entanto, os resultados novamente indicaram que a metodologia de síntese não é aplicável para a produção de NPs contendo este fármaco, cujo tamanho e PDI foram respectivamente, de 434 nm e 0,7. Na sequência, realizamos as sínteses T8 e T9, na ausência do PTX, e T8.1 e T9.1, adicionando o PTX. Visualmente, as amostras na ausência do fármaco apresentaram aspecto homogêneo.

Entretanto, T8.1 e T9.1 apresentaram novamente a formação de um precipitado disperso na solução aquosa após a evaporação do solvente orgânico, indicando a não encapsulação do PTX.

A temperatura foi o próximo parâmetro investigado como uma possível interferência na formação do precipitado nas sínteses. Assim, as sínteses T10 e T11 foram realizadas sob temperatura de 35 a 38 °C, bem como os respectivos pares e outras duas formulações semelhantes contendo PTX, T10.1, T11.1, T12 e T13. As amostras sem o fármaco foram obtidas com o aspecto almejado, sendo que T11 apresentou tamanho em torno de 56 nm e 0,1 em PDI. Porém, naqueles contendo o fármaco houve, mais uma vez, a formação de um precipitado, não sendo possível obter uma metodologia efetiva de síntese pela técnica de nanoprecipitação. Portanto, neste estudo a metodologia de síntese por nanoprecipitação segue como um desafio a ser superado.

3.2. Síntese de nanopartículas por nanoemulsão

A técnica de nanoemulsão simples com evaporação do solvente foi empregada com o objetivo de otimizar o nanossistema, focando principalmente no aumento da EE, sem comprometer as características físico-químicas desejáveis. Neste estudo, foram avaliadas seis formulações (T14 a T19), cujos resultados estão apresentados na Tabela 2. Dentre as sínteses realizadas, a formulação T18 foi selecionada como a mais promissora, devido aos melhores resultados em termos de tamanho, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta. A formulação T14 apresentou formação de precipitado, o que motivou a substituição do surfactante Pluronic® por PVA nas sínteses subsequentes. Nas formulações T15 e T16, foram testadas concentrações de 2% e 1% m/v de PVA, respectivamente, além de uma redução da amplitude de sonicação de 40% para 30% em T16. A amostra T15 apresentou um tamanho médio de 210 nm, PDI de 0,15 e potencial zeta de -21 mV logo após a evaporação do solvente, ainda em solução aquosa contendo PVA, com um PDI que indica um perfil monodisperso e um tamanho próximos da literatura [10-12].

Posteriormente, realizamos a síntese T17 com o dobro do volume da fase orgânica, com o objetivo de verificar o efeito da mudança na proporção entre as fases aquosa e orgânica, alterando-a de 1:4 para 1:2. No entanto, essa modificação resultou na separação de fases ao final da sonicação, tornando a mistura heterogênea, o que não é desejado. Em vista disso, retomamos as condições utilizadas em T15, adicionando 30 segundos de sonicação à fase orgânica isolada e comparando as concentrações de 5 e 10 mg/mL de PLGA nas sínteses T18 e T19, respectivamente. Ambas as formulações foram analisadas no Zetasizer imediatamente após a evaporação do solvente, ainda em

solução aquosa contendo PVA. A formulação T18 apresentou um diâmetro médio de 201,4 nm, PDI de 0,14 e potencial zeta de -30,3 mV, enquanto a T19 apresentou valores de 235,8 nm, 0,09 e -28,6 mV, na mesma ordem. Dessa forma, o fator determinante na escolha da formulação foi o menor tamanho, uma vez que as demais características foram equivalentes entre si.

3.3. Caracterização das nanopartículas

Após a seleção da síntese T18, realizamos a caracterização completa das NPs, subsequentemente à centrifugação e ressuspensão em PBS. Os valores obtidos para NPPTX e NPBR antes do revestimento estão apresentados na Tabela 3 e mostraram-se estatisticamente equivalentes entre si. A concentração das NPs está dentro do esperado, na ordem de 10^{12} [11], assim como o tamanho, que foi determinado em 208 ± 8 nm pelo DLS e 174 ± 2 nm pelo NTA para a NPPTX, com valores equivalentes para NPBR. Essa discrepância nos tamanhos entre o DLS e o NTA é atribuída às particularidades técnicas de cada equipamento, que oferecem análises complementares. A técnica de DLS é mais sensível para a detecção de NPs maiores, pois considera a intensidade da luz espalhada pelo movimento browniano das partículas, a qual é proporcional à sexta potência do diâmetro das NPs [13, 14]. Isso implica em uma superestimação do tamanho de NPs maiores, uma vez que o espalhamento de luz aumenta com o diâmetro [13, 14]. Em contrapartida, o NTA mede o movimento browniano das NPs individualmente, utilizando um sistema de alta resolução para a detecção do espalhamento de luz [14]. Assim, essas características explicam por que as NPs medidas pelo DLS apresentam um diâmetro médio cerca de 40 nm maior do que o obtido pelo NTA.

Tabela 3 - Resultados de caracterização das NPs suspensas em PBS, antes do revestimento com MC, quanto à eficiência de encapsulação (EE), concentração (partículas/mL), diâmetro médio (nm), índice de polidispersão (PDI) e carga superficial (mV).

	% EE	NTA		DLS		PZ (mV)
		(partículas/mL)	(nm)	(nm)	PDI	
NPBR	-	$(1,1 \pm 0,6) \cdot 10^{12}$	170 ± 3	210 ± 20	$0,20 \pm 0,10$	-10 ± 3
NPPTX	60 ± 10	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^{12}$	174 ± 2	208 ± 8	$0,18 \pm 0,08$	-10 ± 3

O PDI, com valor em torno de 0,2, indica uma homogeneidade de tamanho na suspensão das NPs, considerando que o intervalo de leitura varia de 0,1 a 1, representando, respectivamente, os extremos monodisperso e polidisperso. A partir da análise por HPLC, calculamos uma %EE de

60±10%, valor compatível com estudos anteriores. Um destes estudos relatou uma eficiência de encapsulamento de 60,55±3,6% para uma NP de PLGA (50:50) contendo PTX [12], sob condições de síntese semelhantes às utilizadas neste estudo. Por fim, as medições de PZ resultaram nos valores de -10±3 mV para a NPPTX e para a NPBR. A relevância do PZ consiste na avaliação da estabilidade física das NPs, visto que ele promove a repulsão eletrostática entre as partículas. Além disso, o PZ é um parâmetro importante para a interação com membranas celulares [12]. Adicionalmente, a carga negativa das NPs pode ser atribuída à dissociação dos grupos carboxílicos terminais dos monômeros de ácido lático presentes no PLGA [15].

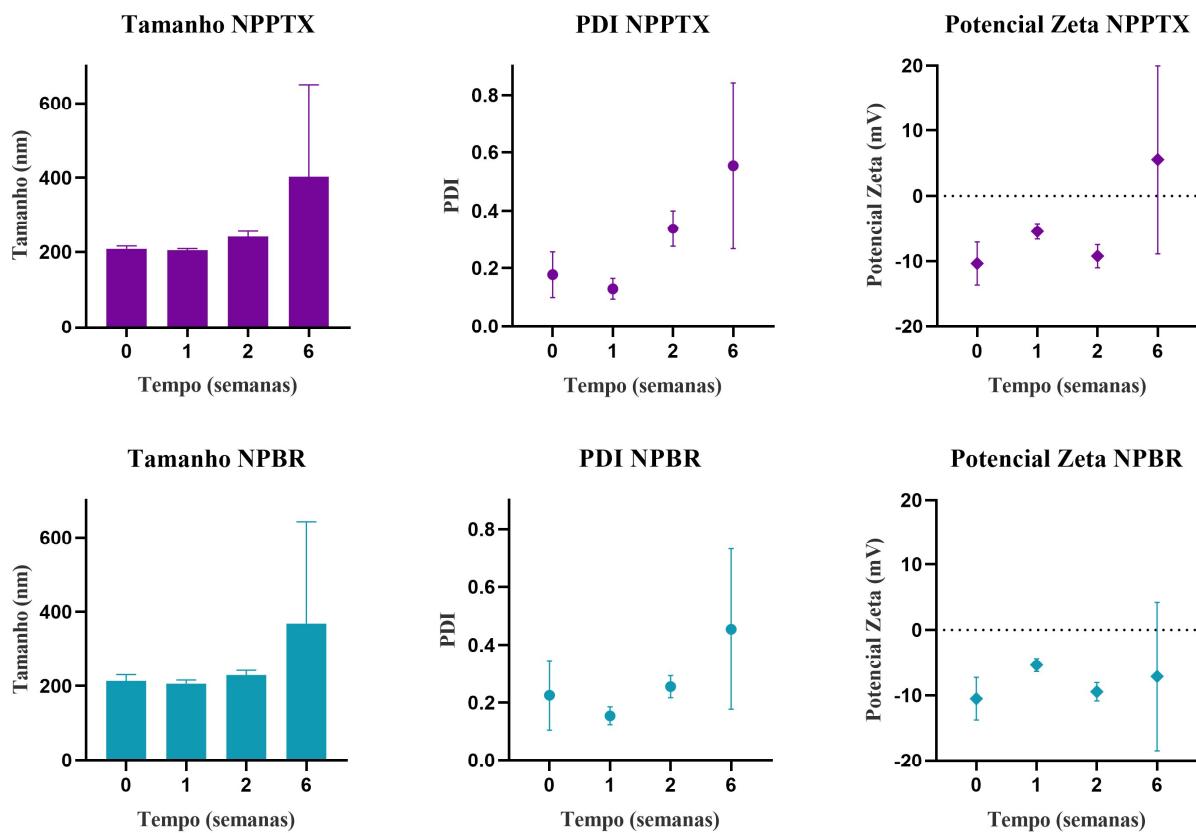


Figura 4 - Gráficos de estabilidade de NPPTX e de NPBR. O tamanho hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (PDI) e carga superficial (Potencial Zeta) foram monitorados nos períodos de 0, 1, 2, e 6 semanas após a síntese das nanopartículas.

Na figura 4, são exibidos os gráficos de estabilidade das NPs em relação ao tamanho, PDI e potencial Zeta, essenciais para estimar a durabilidade da integridade das NPs. Os resultados indicam que ambas as NPs (NPBR e NPPTX) mantiveram-se estáveis durante as duas primeiras semanas, com os valores de tamanho se mantendo constantes e o PDI exibindo uma diminuição durante a primeira semana, sugerindo maior homogeneidade. No entanto, na segunda semana, o PDI

apresentou um aumento considerável para a NPPTX, passando de 0,3, sinalizando uma perda de estabilidade na formulação. Apesar da NPBR não apresentar a mesma diferença na segunda semana, é possível notar o mesmo perfil crescente no PDI entre a primeira e sexta semanas, o que reflete também no tamanho de ambas as nanopartículas. Entretanto, não houve formação de precipitados, mesmo com o aumento da polidispersidade.

O potencial Zeta apresentou pequenas flutuações até a segunda semana, com uma variação significativa na sexta semana, o que confirma perda de estabilidade. Essa grande variação na carga após a segunda semana pode indicar que o PBS, meio de armazenamento das NPs, esteja fornecendo contra-íons que desestabilizam a carga superficial das NPs, resultando no aumento do desvio padrão do potencial Zeta. Consequentemente, isso pode induzir à perda da repulsão eletrostática entre as NPs, facilitando seu agregamento. No entanto, as causas intrínsecas a esse efeito ainda precisam ser melhor investigadas nesta pesquisa.

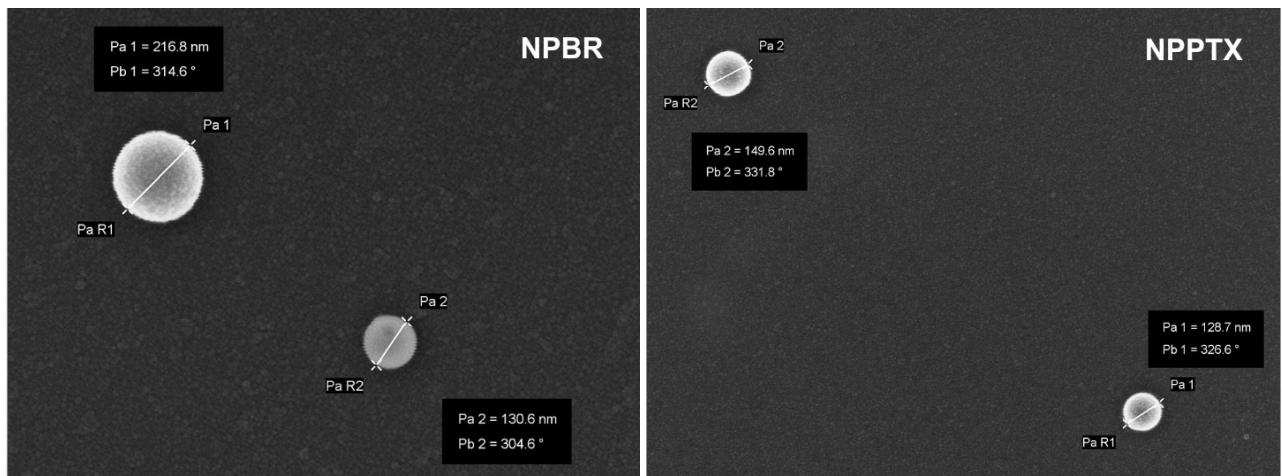


Figura 5 - Imagens obtidas por MEV das NPs, demonstrando alguns valores de tamanho obtidos por meio desta técnica: 216,8 e 130,6 nm (NPBR); e 149,6 e 128,7 nm (NPPTX).

As imagens obtidas por MEV da NPBR e da NPPTX são exibidas na figura 5, que mostram uma morfologia esférica, com superfície uniforme e medidas de diâmetros de 216,8 e 130,6 nm para NPBR e 149,6 e 128 nm para NPPTX, nas imagens expostas na figura. Essas medidas resultantes do MEV, realizadas com amostras secas, oferecem alta resolução na imagem, gerando dados bem acurados, como uma boa precisão no tamanho. Apesar disso, foi possível observar que, em média, os valores de tamanho corroboram com as análises realizadas pelas técnicas de DLS e NTA.

Um fator importante para a avaliação desses resultados é o conhecimento a respeito do microambiente tumoral. Ele é naturalmente favorável ao direcionamento passivo das nanopartículas

devido ao efeito de permeabilidade e retenção aprimorada (EPR), uma vez que o estímulo à angiogênese é característico de tumores malignos para ter mais acesso ao oxigênio e nutrientes [16]. Para além, nanopartículas com diâmetro entre 20 e 200 nm são capazes de se acumular no espaço intersticial, o que é beneficiado pela vascularização atípica, cuja permeabilidade é aumentada, pela deficiência de tecido linfático no microambiente tumoral [16]. Portanto, grande parte das NPs obtidas neste estudo estão dentro da faixa de tamanho adequado para se acumular no microambiente tumoral.

3.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Os nanossistemas foram avaliados *in vitro* no modelo celular A549, derivado de câncer de pulmão humano, mediante o ensaio de MTT. Este teste consiste na análise colorimétrica quantitativa baseada na reação de redução do MTT (amarelo) em cristais de Formazan (roxo), que ocorre na mitocôndria de células viáveis [17]. A figura 6 mostra os resultados de viabilidade celular obtidos por meio deste ensaio nos períodos de 24 e 72h após o tratamento com NPBR, NPPTX e PTX em diferentes concentrações. No intervalo de 24h não houve uma redução significativa na viabilidade para a concentração de 1 e 10 nM, seguido por uma redução de 20% a 25% para 100 e 1000 nM, para NPPTX. Neste mesmo tempo, o fármaco livre causou uma redução de aproximadamente 50% na viabilidade entre 10 e 100 nM.

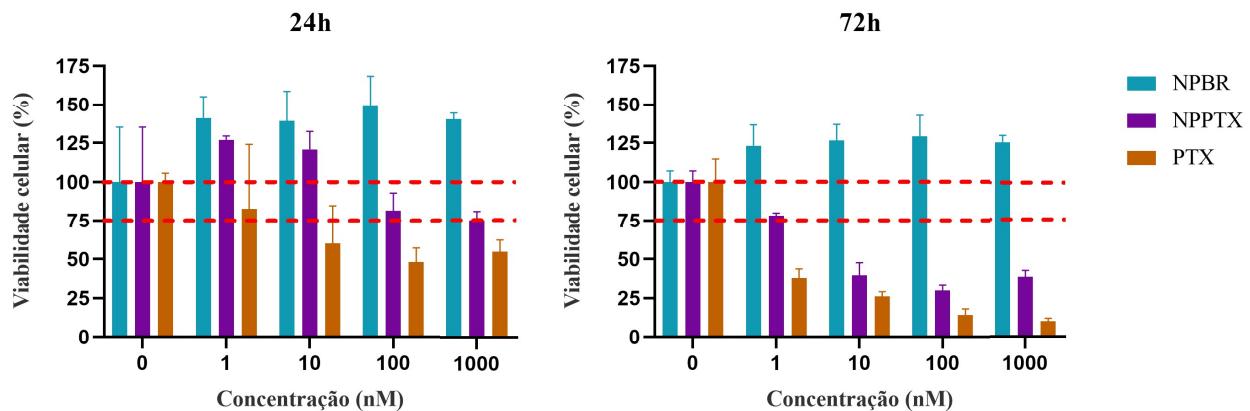


Figura 6 - Gráficos de viabilidade celular de 24h e 72h. Os nanossistemas NPBR e NPPTX, além do fármaco livre (PTX), foram testados em 5 concentrações de PTX diferentes (0, 1, 10, 100 e 1000 nM), as quais possuem concentrações de NPs correspondentes para as NPBRs (0, 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} NPs/mL, respectivamente).

Por outro lado, no período de 72h foi notável a redução na viabilidade, que ocorreu gradualmente da menor para a maior concentração de fármaco, para NPPTX e PTX. As NPs com PTX demonstraram perda de 50% da viabilidade entre 1 e 10 nM, enquanto o PTX reduziu mais da

metade do número de células na menor concentração testada, em 72h. Por fim, as NPs brancas não causaram citotoxicidade relevante em nenhuma das concentrações e tempos testados, inclusive sugere o aumento da viabilidade celular, indicando biocompatibilidade com as células, característica desejável para essas nanopartículas. Apesar disso, o efeito que proporcionou o aumento nos valores de viabilidade necessita de análises complementares que verifiquem suas possíveis causas. Ademais, a perda de viabilidade mais expressiva em 72h, em comparação com 24h, pode indicar uma liberação controlada do fármaco para as células, o que favorece o aumento da sua biodisponibilidade e a proteção do fármaco à degradação do meio. Porém, essas características devem ser melhor investigadas por ensaios de liberação do PTX, para verificar o perfil de liberação do fármaco das NPs ao longo do tempo.

Um estudo publicado este ano [10], realizado também com NPs de PLGA contendo PTX testadas *in vitro* contra células A549, demonstraram que para a concentração de 3 μ g/mL (3513 nM) houve uma diminuição próxima de 50% na viabilidade para NPs com PTX no período de 24h de incubação. Para uma concentração 10 vezes menor, a redução foi em torno de 20%. Isso indica que os nossos resultados estão coerentes, visto que na concentração de 1000 nM obtivemos uma perda de viabilidade de 25%, intermediária aos dois valores observados no estudo.

4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As sínteses das nanopartículas mostraram resultados positivos para as NPs sem o paclitaxel, mas ainda não obtivemos condições favoráveis para o encapsulamento desse fármaco pela técnica de nanoprecipitação, sendo necessário o aprimoramento da metodologia de encapsulação pelas mudanças de parâmetros. Entretanto, por meio da técnica de nanoemulsão foi possível encapsular o PTX de forma satisfatória, obtendo uma eficiência maior que 50%. Os demais resultados de caracterização confirmam que a metodologia utilizada é adequada para preparar nanopartículas, mantendo um tamanho conveniente para captação celular, mas com uma desestabilização a partir da segunda semana, que ainda deve ser melhor investigada, para entendimento e aumento da estabilidade. Adicionalmente, os resultados *in vitro* demonstram a biocompatibilidade das nanopartículas em células epiteliais, uma vez que as NPs brancas não apresentaram citotoxicidade, mesmo na maior concentração testada. Em contraste, as NPs contendo PTX exibiram o efeito citotóxico esperado, com a diminuição gradual na viabilidade das células e demonstrando a liberação controlada do fármaco, mas que ainda necessita de ensaios de liberação que confirmem

essa característica. Em suma, este estudo fornece evidências de que a nanotecnologia é uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de tumores pulmonares, sendo necessário seu contínuo aprimoramento.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer (Brasília). **Câncer**. Brasília, 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer>>. Acesso em: 04 ago. 2024.
2. International Agency for Research on Cancer (Lyon, França). **Cancer Today**. Lyon, França, 2023. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em: 04 ago. 2024.
3. SHARMA, Parvarish et al. Emerging trends in the novel drug delivery approaches for the treatment of lung cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 309, p. 108720, 2019.
4. ALQAHTANI, Fulwah Yahya et al. Paclitaxel. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**, v. 44, p. 205-238, 2019.
5. SINGLA, Anil K.; GARG, Alka; AGGARWAL, Deepika. Paclitaxel and its formulations. **International journal of pharmaceutics**, v. 235, n. 1-2, p. 179-192, 2002.
6. National Library of Medicine. **Paclitaxel**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36314>>. Acesso em: 07 ago. 2024.
7. AHMAD, Javed et al. Nanotechnology-based inhalation treatments for lung cancer: state of the art. **Nanotechnology, science and applications**, p. 55-66, 2015.
8. DANHIER, Fabienne et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. **Journal of controlled release**, v. 161, n. 2, p. 505-522, 2012.
9. RIVAS, Claudia Janeth Martínez et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 532, n. 1, p. 66-81, 2017.
10. ZHOU, Jiahua et al. Cancer cell membrane-camouflaged paclitaxel/PLGA nanoparticles for targeted therapy against lung cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 177, p. 117102, 2024.
11. FERREIRA, Natália Noronha et al. Using design of experiments (DoE) to optimize performance and stability of biomimetic cell membrane-coated nanostructures for cancer therapy. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, p. 1120179, 2023.
12. AVERINENI, Ranjith K. et al. PLGA 50: 50 nanoparticles of paclitaxel: development, in vitro anti-tumor activity in BT-549 cells and in vivo evaluation. **Bulletin of Materials Science**, v. 35, p. 319-326, 2012.
13. HOU, Jun et al. Nanoparticle tracking analysis versus dynamic light scattering: Case study on the effect of Ca²⁺ and alginate on the aggregation of cerium oxide nanoparticles. **Journal of hazardous materials**, v. 360, p. 319-328, 2018.
14. JAMES, Andre E.; DRISKELL, Jeremy D. Monitoring gold nanoparticle conjugation and analysis of biomolecular binding with nanoparticle tracking analysis (NTA) and dynamic light scattering (DLS). **Analyst**, v. 138, n. 4, p. 1212-1218, 2013.
15. LAZZARI, Stefano et al. Colloidal stability of polymeric nanoparticles in biological fluids. **Journal of nanoparticle research**, v. 14, p. 1-10, 2012.
16. DANHIER, Fabienne; FERON, Olivier; PRÉAT, Véronique. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 148, n. 2, p. 135-146, 2010.

17. BERRIDGE, Michael V.; TAN, An S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.