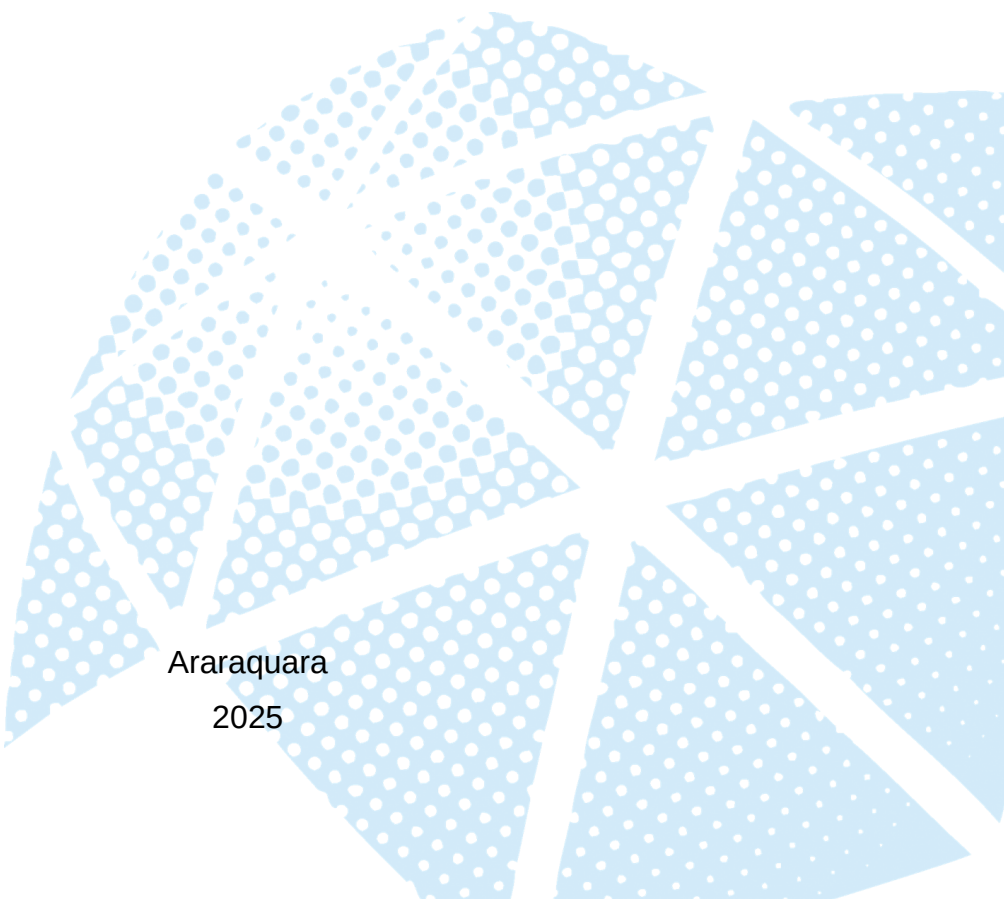


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

ALINE FRANCIANE LEÃO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIANGIOGÊNICO E MUÇO-MODULADOR DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BASEADAS EM QUITOSANA, ÁCIDO
HIALURÔNICO E FTALATO DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSE
CONTENDO BEVACIZUMABE PARA POTENCIAL TRATAMENTO DE CÂNCER
COLORRETAL**

Araraquara
2025



ALINE FRANCIANE LEÃO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIANGIOGÊNICO E MUCO-MODULADOR DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BASEADAS EM QUITOSANA, ÁCIDO
HIALURÔNICO E FTALATO DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSE
CONTENDO BEVACIZUMABE PARA POTENCIAL TRATAMENTO DE CÂNCER
COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião
Coorientadora: Dra. Natália Noronha Ferreira Naddeo
Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Miziara Barboza Ferreira

Araraquara

2025

L437a Leão, Aline Franciane.
Avaliação do efeito antiangiogênico e muco-modulador de nanopartículas poliméricas baseadas em quitosana, ácido hialurônico e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose contendo bevacizumabe para potencial tratamento de câncer colorretal / Aline Franciane Leão. – Araraquara, 2025.
103 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Maria Palmira Daflon Gremião.
Coorientadora: Natália Noronha Ferreira Naddeo.
Coorientador: Leonardo Miziara Barboza Ferreira.

1. Bevacizumabe. 2. Cólon (Anatomia) Câncer. 3. Muco-modulação. 4. Membrana corioalantoide (CAM). 5. Atividade antiangiogênica. 6. Biopolímeros. 7. Câncer Tratamento. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Naddeo, Natália Noronha Ferreira, coorient. III. Ferreira, Leonardo Miziara Barboza, coorient. IV. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação do Efeito Antiangiogênico e Muco-Modulador de Nanopartículas Poliméricas Baseadas em Quitosana, Ácido Hialurônico e Ftalato de Hidroxipropilmetilcelulose Contendo Bevacizumabe para o Tratamento De Câncer Colorretal

AUTORA: ALINE FRANCIANE LEÃO

ORIENTADORA: MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO

COORDINADOR: LEONARDO MIZIARA BARBOZA FERREIRA

COORDINADORA: NATÁLIA NORONHA FERREIRA NADDEO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Farmacêuticas, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. MARIA DE FATIMA MONGINHO BALTAZAR (Participação Virtual)
Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho - Portugal

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 29 de setembro de 2023

Dedico este trabalho à minha família, à minha orientadora Palmira e aos meus co-orientadores Natalia Noronha e Leonardo Miziara que sempre me incentivaram e se dedicaram para o desenvolvimento do trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir a realização deste sonho e conquista, sempre me guiando e colocando pessoas maravilhosas em meu caminho.

Agradeço a minha mãe Roseli, meu irmão Dario, minha sobrinha Bianca e meu namorado Luiz que sempre me deram todo suporte e apoio para realização deste trabalho.

Agradeço a Professora Dra. Maria Palmira que aceitou me orientar e me deu essa oportunidade singular de ampliar meus conhecimentos. Aos meus coorientadores Dra. Natalia Noronha e Prof. Dr. Leonardo Miziara que se dedicaram e me acompanharam diariamente compartilhando conhecimento e crescimento sempre com muita paciência e calma.

A Dra. Fernanda Boni que me ajudou muito com a familiarização do trabalho e laboratório, sendo um pilar essencial no início do desenvolvimento de meu trabalho, sempre com paciência e calma.

A Professora Dra Fátima Baltazar e Dra. Marta Costa por me receberem em seu grupo de pesquisa “BiTCancer” pela dedicação e compartilhamento de conhecimento. Assim como as alunas de doutorado Ana e Mónica que me auxiliaram no Laboratório para realização do estágio de pesquisa - BEPE.

A Universidade do Minho por ter me acolhido como aluna visitante na Escola de Medicina e Instituto de Investigação em Ciência da Vida e Saúde (ICVS), pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Aos amigos que fiz em Porto e Braga, que me ajudaram a superar a saudade, os momentos difíceis e comemorar a todas as conquistas.

Ao professor Doutor Valtencir Zucolotto por me receber tão bem em seu grupo e disponibilizar de todos os equipamentos, conhecimento, permitindo que eu realizasse parte da minha pesquisa em suas dependências do laboratório. Ao Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia do Instituto de Física da USP de São Carlos (Gnano, IFSC - USP) que me recebeu com muito carinho e atenção.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, concedido por meio dos Processos nº 2021/09110-0 e 2022/05904-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) se desenvolve no intestino e é atualmente o terceiro tipo de câncer mais diagnosticado mundialmente, representando cerca de 10% do total de cânceres diagnosticados. O tratamento varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do CCR. No microambiente tumoral, durante o desenvolvimento do câncer, ocorre o processo de angiogênese, que embora seja um processo fisiológico, ocorre de maneira exacerbada liberando os fatores de crescimento VEGF de maneira desregulada, contribuindo para o crescimento de novos vasos sanguíneos capazes de dar aporte de oxigênio e nutrientes às células tumorais. Existem diferentes tratamentos para CCR e, dentre a modalidade de terapia medicamentosa, um dos principais fármacos hoje utilizados é o bevacizumabe (BVZ), aprovado pela FDA desde 2004 para tratamento de CCR, agindo através da inibição do VEGF circulantes, inibindo sua ligação aos receptores VEGFR, impedindo assim, o crescimento de novos vasos sanguíneos. No entanto, o BVZ possui algumas limitações para administração por via oral, devido a sua estrutura proteica, que pode se degradar durante a passagem pelo trato gastrointestinal até chegar ao local de ação. Neste sentido, o uso da nanotecnologia auxiliou no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas (NPs) com capacidade muco moduladora, para liberação modificada do BVZ, baseada nos polímeros ácido hialurônico (AH), ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP) e quitosana (QS). Foram testadas NPs contendo misturas binárias e ternárias de polímeros, sendo denominadas de NPF5_BVZ, NPF12_BVZ e NPF17_BVZ. Esses nanossistemas se apresentaram estáveis, segundo o critério de potencial zeta, durante o período analisado com valores de -35 mV para as NP NPF5_BVZ, - 20 mV para a NPF12_BVZ e + 35 mV para a NPF17_BVZ. Os estudos de interação com a mucina (MUC) demonstraram que as interações das NPs com MUC são dependentes do pH do fluido simulado intestinal. Dessa forma, quando em pH 7.4, as partículas de MUC demonstraram aumento do PZ negativo em todas as formulações e em pH 5.0, as partículas de MUC demonstraram comportamentos diferentes, apresentando aumento do PZ negativo quando entrou em contato com a NPF5_BVZ (-6,91 para -17,75 mV). Não apresentou modificação significativa no PZ quando em contato com a NPF12_BVZ (-8,27 para -10,1 mV) e apresentou diminuição do PZ negativo quando em contato com a NPF17_BVZ (-6,12 para -3,31 mV). Além disso, apresentou diminuições de tamanho das partículas de MUC em cerca de 2x após interação com as NPs. A melhor eficiência de associação do BVZ as NPs, foi obtida pela NP5_BVZ (71%), enquanto para a NPF12_BVZ e NPF17_BVZ foram baixas 10% e 2%, respectivamente. O sistema ternário NPF17_BVZ foi avaliado no modelo biológico de membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM) para avaliação da atividade antiangiogênica e foi possível notar que as NPs foram capazes de manter a atividade biológica do BVZ, apresentando atividade antiangiogênica semelhante ao BVZ livre.

Palavras-chave: bevacizumabe; câncer colorretal; muco-modulação; CAM; atividade anti-angiogênica.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) develops in the intestine and currently is the third most diagnosed type of cancer representing 10% of new cases diagnosis in the world. The treatment varies according to the stage of CRC development. In the tumor microenvironment, during the development of the cancer, occurs the angiogenesis process, that is a natural process. This process occurs out of control and release the VEGF factor of growth wildly contributing to the development of new blood vessels capable of offer oxygen and nutrients to tumor cells growth. There are several alternatives to the CCR treatment, and within the field of drug therapy, the main drug used nowadays is the bevacizumab (BVZ), approved by the FDA since 2004 for the CCR treatment. This drug acts inhibiting the VEGF moving around to bond to the VEGFR receptors, preventing the development of new blood vessels. However, BVZ has some limitations for oral administration due to its protein structure that can degrade during passage through the gastrointestinal tract until it reaches the site of action. In this regard, nanotechnology may assist through the development of polymeric nanoparticles (NPs) with mucus modulating capacity, for modified BVZ release, based on the polymers hyaluronic acid (HA), hydroxypropylmethylcellulose phthalate (HP) and chitosan (Ch). Nanoparticles containing binary and ternary mixtures were tested, namely NPF5_BVZ, NPF12_BVZ and NPF17_BVZ. These nanosystems demonstrated stability by zeta potential (ZP) criteria, and resulted in values of 35 mV for the NPF5_BVZ, - 20 mV for the NPF12_BVZ and + 35 mV for the NPF17_BVZ. Interaction studies with mucin (MUC) revealed that the interactions of NPs with MUC are dependent on the pH of the simulated intestinal solution. In this way, in pH 7.4, the mucin particles demonstrated an increase of the negative ZP, while in the pH 5.0, the mucin particles demonstrated different behaviors, showing an increase of the negative ZP when entering in contact with NPF5_BVZ (-6,91 to -17,75 mV). It did not show significant changes in ZP values when entering in contact with NPF12_BVZ (-8,27 to -19,1 mV) and showed a decrease of ZP values when entering in contact with NPF17_BVZ (-6,21 to -3,31 mV). In addition, it showed a 2x decrease of the initial size of mucin particles when in contact with NPs at both pHs analyzed. High association efficiencies (AE%) of BVZ as NPs were achieved, being 71% in NPF5_BVZ, while for NPF12_BVZ e NPF17_BVZ the AE% was lower, 10 and 2%, respectively. When the ternary system was evaluated in the biological model of chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM) to evaluate the antiangiogenic activity, it was possible to observe that NPF17_BVZ could maintain the biological activity of BVZ, presenting antiangiogenic activity similar to free BVZ.

Key words: bevacizumab; colorectal cancer; muco modulation; CAM; antiangiogenic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estatística global de câncer.....	21
Figura 2 - Esquema representativo de desenvolvimento do CCR.....	22
Figura 3 - Processo de angiogênese.....	23
Figura 4 - Estrutura proteica do bevacizumabe.....	25
Figura 5 - Esquema do mecanismo de ação do bevacizumabe.....	26
Figura 6 - Esquema representativo de sistemas poliméricos.....	28
Figura 7 - Métodos de produção de NPs.....	30
Figura 8 - Esquema representativo da formação de complexos polieletrólitos.....	31
Figura 9 - Estrutura química do ácido hialurônico.....	33
Figura 10 - Estrutura química do ftalato de hidroxipropilmetilcelulose.....	33
Figura 11 - Estrutura química do quitosana.....	34
Figura 12 - Representação esquemática do processo de obtenção das nanopartículas binárias (A) e ternárias (B), com e sem a incorporação do BVZ.....	41
Figura 13 - Variação do tamanho, PDI e potencial zeta das NPS das formulações binárias.....	52
Figura 14 - Variação do tamanho, PDI e potencial zeta das NPS das formulações ternárias.....	53
Figura 15 - Estudo de estabilidade das formulações NPF5 e NPF5_BVZ, NPF12 e NPF12_BVZ, e NPF17 e NPF17_BVZ, considerando ** $p < 0,05$	56
Figura 16 - Curva analítica do BVZ obtida a partir do método cromatográfico de HPLC.....	58
Figura 17 - Cromatograma do bevacizumabe (BVZ), na concentração de 100 µg/mL, utilizando detecção por fluorescência (λ excitação = 280 nm e λ emissão= 360 nm).....	60
Figura 18 - Propriedades coloidais da mucina na presença das formulações NPF5_BVZ, NPF12_BVZ e NPF17_BVZ e polímeros isolados em diferentes concentrações, em tampão fosfato pH 7.4 (5mM). As titulações foram realizadas por titulador MPT- 2 (Malvern) medindo-se os valores de PZ e tamanho, a cada adição da solução titulante (polímeros/formulações). A concentração inicial de MUC e de polímeros totais foram de 0,25 mg/mL. As curvas representam: (A) tamanho e (B) PZ da mucina com concentrações crescentes dos polímeros QS, AH e HP; (C) Tamanho e (D) PZ da mucina em diferentes concentrações de nanopartículas.....	67
Figura 19 - Propriedades coloidais da mucina na presença das formulações NPF5_BVZ, NPF12_BVZ e NPF17_BVZ e polímeros isolados em diferentes concentrações, em tampão fosfato pH 5.0 (5mM). As titulações foram realizadas por titulador MPT- 2 (Malvern) medindo-se os valores de PZ e tamanho, a cada adição da	

solução tituladora (polímeros/formulações). A concentração inicial de MUC e de polímeros totais foram de 0,25 mg/mL. As curvas representam o (A) tamanho e (B) PZ da mucina com concentrações crescentes dos polímeros QS, AH e HP; (C) Tamanho e (D) PZ da mucina em diferentes concentrações de nanopartículas.....68

Figura 20 - Efeito citotóxico do NPF17 e NPF17_BVZ nas linhagens celulares RKO e HUVEC. As células foram tratadas com tampão fosfato pH 6.2 (51 mM) como controle, BVZ livre (Avastin®) 500 µg/mL, NPF17 e NPF17_BVZ, ambas, nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, por 72 horas e sua viabilidade celular foi determinada através do método de SRB. Os dados estão expressos através de média e desvio padrão, através de três triplicatas independentes. (* $p<0.05$).....76

Figura 21 - Avaliação das NPF17_BVZ, BVZ no controle no crescimento tumoral e angiogênese. A) Imagens da CAM *in ovo* e *ex ovo* nos dias 13 (antes da exposição ao tratamento) e 17 (4 dias após a exposição ao tratamento) de desenvolvimento. B) Crescimento tumoral. Os resultados estão expressos pela média da percentagem de crescimento tumoral no dia 13 (dia do tratamento) e no dia 17 de desenvolvimento (após 4 dias de exposição ao tratamento) $\pm$ desvio padrão. C) Contagem de vasos sanguíneos *ex ovo* no 17 dia de desenvolvimento. (* $p<0.05$).....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes gradientes de pH e enzimas presentes no TGI.....	26
Tabela 2 - Composição das Nanopartículas delineadas nos estudos de pré formulação empregadas neste trabalho (NPs).....	39
Tabela 3 - Condições empregadas na metodologia analítica.....	44
Tabela 4 - Análise físico-química das dispersões poliméricas de quitosana, ácido hialurônico e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose através de DLS.....	50
Tabela 5 - Análise macroscópica das formulações sem o fármaco.....	51
Tabela 6 - Nomenclatura e composição das NPs.....	55
Tabela 7 - Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico.....	60
Tabela 8 - Caracterização das dispersões de mucina em tamanho, Pdl e PZ, no DLS, em pH 5.0 e pH 7.4.....	63
Tabela 9 - Interação do BVZ com os poliânions avaliada pela mudança no tamanho, PZ e Pdl das amostras.....	70
Tabela 10 - Efeito da concentração polimérica nas propriedades físicas das partículas (tamanho, PZ e Pdl).....	71
Tabela 11 - Efeito da ordem de adição da dispersão polimérica de HP da propriedades físico-químicas das partículas (tamanho, Pdl e PZ).....	72
Tabela 12 - Efeito da concentração polimérica na EA% das nanopartículas binárias.....	73
Tabela 13 - Efeito da ordem de adição das EA% das nanopartículas ternárias.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	ácido hialurônico
BVZ	bevacizumabe
CCR	câncer colorretal
CPs	complexos polieletrólíticos
HP	Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose
MUC	mucina
NPs	nanopartículas poliméricas
NPF5	nanopartícula polimérica contendo quitosana e ácido hialurônico, na proporção 1QS:9AH
NPF5_BVZ	nanopartícula polimérica de quitosana e ácido hialurônico e BVZ na concentração de 0,5 mg/mL, na proporção 1QS:9AH
NPF12	nanopartícula polimérica contendo quitosana e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, na proporção 1QS:9HP
NPF12_BVZ	nanopartícula polimérica contendo quitosana e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, na proporção 1QS:9HP e BVZ na concentração de 0,5 mg/mL, na proporção 1QS:9HP.
NPF17	nanopartícula polimérica contendo quitosana, ácido hialurônico e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, na proporção de 5QS:2,5AH: 2,5HP
NPF17_BVZ	nanopartícula polimérica contendo quitosana, ácido hialurônico e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, na proporção de 5QS:2,5AH: 2,5HP e BVZ na concentração de 0,5 mg/mL
PDI	índice de polidispersibilidade
PZ	potencial zeta
QS	Quitosana
TAMANHO	diâmetro hidrodinâmico
TGI	trato gastrointestinal
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1. CÂNCER	20
2.1.1. Aspectos epidemiológicos do câncer colorretal	20
2.1.2. Desenvolvimento do câncer colorretal	21
1.1.1. Angiogênese tumoral	22
2.2. TRATAMENTOS	24
2.2.1. Bevacizumabe (BVZ)	25
2.3. SISTEMAS DE ADMINISTRAÇÃO ORAL	27
2.4. NANOPARTÍCULAS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	27
2.4.1. Nanopartículas poliméricas mucoadesivas	28
2.5. MÉTODOS PARA DESENVOLVIMENTO DE NPs	29
2.5.1. Complexação polieletrólítica	30
2.6. BIOPOLÍMEROS	32
2.6.1. Ácido hialurônico	32
2.6.2. Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose	33
2.6.3. Quitosana	34
2.7. MUCO E MUCINA	35
3. OBJETIVOS	36
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. MATERIAIS	37
4.1.1. Principais matérias-primas e reagentes	37
4.1.2. Cultura celular	37
4.1.3. Principais equipamentos	37
4.2. MÉTODOS	38
4.2.1. Obtenção das nanopartículas poliméricas	38
4.2.1.1. Estudos de pré-formulação	38
4.2.1.2. Desenvolvimento das nanopartículas poliméricas	39
4.2.1.2.1. Preparo das dispersões poliméricas	39
4.2.1.2.2. Desenvolvimento das NPs sem o fármaco	40
4.2.1.2.3. Incorporação do bevacizumabe (BVZ) as NPs	40
4.2.1.3. Caracterização do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersibilidade e potencial zeta das nanopartículas poliméricas empregando o DLS	42
4.2.1.3.1. Análise do diâmetro médio hidrodinâmico e Pdl	42
4.2.1.3.2. Análise do potencial zeta das nanopartículas poliméricas	42
4.2.1.4. Estudo de estabilidade das NPs selecionadas para incorporação do BVZ	43

4.2.2. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE BVZ POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	43
4.2.2.1. Linearidade do método cromatográfico	44
4.2.2.2. Conformidade do método cromatográfico	44
4.2.4. Determinação da Eficiência de Associação do BVZ nas NPs	46
4.3. ENSAIOS CELULARES	46
4.3.1. Cultura celular	46
4.3.2. Viabilidade celular	47
4.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-ANGIOGÊNICA UTILIZANDO MODELO MEMBRANA CORIOALANTÓICA (CAM) EM OVOS DE GALINHA	48
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1. ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO	50
5.1.1. Efeito da incorporação de bevacizumabe nas formulações binárias e ternárias	54
5.1.2. Estudo de estabilidade das formulações contendo o BVZ	55
5.2. VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE BVZ POR CLAE	58
5.2.1. Linearidade do método analítico	58
5.2.2. Conformidade do método analítico	59
5.3. ESTUDO DE INTERAÇÃO DA MUCINA (MUC) COM AS NPs E POLÍMEROS ISOLADOS	61
5.3.1. Avaliação de diferentes concentrações mucina	62
5.3.2. TITULAÇÃO EM MPT-2 ACOPLADO AO DLS	63
5.4.1. Estudando a interação do BVZ com os componentes das fórmulas	69
5.4.2. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO POLIMÉRICA E DA ORDEM DE ADIÇÃO NA EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO DO BVZ AS NPs	72
5.5. ENSAIOS CELULARES	74
5.5.1. Cultura celular	74
5.5.2. Viabilidade celular	74
5.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA ATRAVÉS DO MODELO DE MEMBRANA CORIOALANTÓICA DO EMBRIÃO DE GALINHA (CAM, DO INGLÊS, CHORIOALLANTOIC CHICK EMBRIO MEMBRANE)	78
6. CONCLUSOES	81

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional de câncer (INCA), o câncer colorretal (CCR) é definido como tumores que se iniciam no colón ou reto (Instituto nacional de câncer, 2019). A fase inicial do desenvolvimento do câncer, se dá através do aparecimento de pólipos, que após anos ou décadas, passam por mutações genéticas até se tornarem malignos (Montminy *et al.*, 2020). Seu desenvolvimento ocorre de maneira lenta e gradual e, quase sempre, sem apresentação de sintomas. Quando os sintomas aparecem, o tumor já apresenta um tamanho expressivo, que muitas vezes impede a passagem de fezes, resultando em cólicas e dores abdominais (Simon, 2016).

A ocorrência do CCR tem origem multifatorial, tais como predisposição genética, gênero, raça e doenças inflamatórias intestinais (DIIs), como colite ulcerativa (CU) e doença de Crohn (DC). Em casos de pessoas acometidas por DIIs a incidência de CCR é de 3 a 7 vezes maior, variando de acordo com o grau, extensão e atividade da doença (Geneve *et al.*, 2019).

De acordo com o INCA, somente em 2020 foram identificados 20.540 novos casos de CCR em homens e 20.470 novos casos em mulheres, ocupando o patamar de segundo lugar dentre os tipos de câncer diagnosticados no Brasil e o terceiro lugar no *ranking* das mortes relacionadas à câncer no Brasil (INCA, 2020).

O tratamento de CCR varia de acordo com o estágio de desenvolvimento em que a doença se encontra, no momento do diagnóstico. Pode ser indicado cirurgia e tratamentos farmacológicos como quimioterapia e radioterapia (Akhtar *et al.*, 2014). Sendo que dentro das terapias medicamentosas, existem diferentes classes de medicamentos utilizadas em conjunto com o objetivo de alcançar uma maior eficácia terapêutica e qualidade de sobrevida do paciente.

Dessa forma, o tratamento baseado em 5-fluoracila é considerado o tratamento padrão para tratamento de CCR, agindo na inibição da enzima de timidilato sintetase. Esse medicamento pode ser administrado em terapia combinada com outros medicamentos, como fluoruracila + leucoverina + oxiplatina + irrinotecan; fluoruracila + leucoverina + irrinotecan e fluoruracila, + leucoverina + oxiplatina. A oxiplatina é um composto de platina diaminociclohexano, capaz de impedir a replicação do DNA, induzindo a apoptose celular e o irrinotecan é um derivado semissintético do alcalóide

natural - camptotecina que tem sua ação através da inibição da topoisomerase I (Akhtar *et al.*, 2014; Xie; Chen; Fang, 2020).

Além dessas combinações, existem outras classes de fármacos envolvidos no tratamento de CCR, tais como os que agem na inibição de receptores de fatores de crescimento epidermal (EGFR) e vasculares (VEGFR). Esses fármacos demonstram um novo caminho no combate ao câncer, pois em microambiente tumoral esses fatores de crescimento se encontram superexpressos.

Dessa forma, as terapias que são anti-EGFR incluem anticorpos monoclonais para EGFR e inibidores de tirosina quinase. Já as terapias anti-VEGF incluem anticorpos monoclonais capazes de se ligarem aos VEGF circulantes, impedindo que os VEGF se liguem ao VEGFR e, conseqüentemente, inibindo o crescimento de novos vasos sanguíneos, sendo o mais conhecido dentre ele, o bevacizumabe (BVZ) (Xie; Chen; Fang, 2020).

No entanto, devido aos efeitos colaterais produzidos por esses diferentes tratamentos, que podem estar relacionados com uma toxicidade sistêmica, taxa de resposta insatisfatória, resistência e a baixa seletividade específica ocorre o comprometimento da qualidade de vida dos pacientes. Sendo assim, há uma constante busca por novas estratégias tecnológicas capazes de reduzir os efeitos colaterais dos fármacos melhorando sua seletividade para os tecidos tumorais (Kuipers *et al.*, 2015; Mitchell *et al.*, 2020; Patra *et al.*, 2018; Yusuf *et al.*, 2023).

Levando em consideração que a angiogênese é um processo fisiológico natural, responsável pela formação de novos vasos oriundos de estruturas capilares pré-existent (Kolte; McClung; Aronow, 2016; López Camarillo *et al.*, 2020), que ocorre envolvendo diversos fatores, tais como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) sendo seu receptor (VEGFR) essencial para o processo (Nieves; D'amore; Bryan, 2009a).

Além disso, o desenvolvimento do tumor e o processo de metástase do câncer ocorrem concomitantemente com o processo de neovascularização (Giatromanolaki; Sivridis; Koukourakis, 2006). Que, quando em condições fisiológicas, o processo de angiogênese ocorre de maneira controlada, porém em casos de câncer, ele se encontra desregulado para suprir a demanda de crescimento das células tumorais (Huang *et al.*, 2019). Por isso, destaca-se a importância de tratamentos que compreendam o uso de fármacos capazes de impedir o crescimento de novos vasos

sanguíneos, através da ligação aos fatores VEGF circulantes (Duda *et al.*, 2007; Sia *et al.*, 2014a).

Dessa forma, o BVZ, que é um anticorpo monoclonal humanizado, com atividade anti – VEGF-A, aprovado para tratamento de CCR em 2004 pela FDA (do *Inglês, Food and Drug Administration*) para quimioterapia intravenosa em tratamento de CCR (Maloney *et al.*, 2021). E, que possui atividade antiangiogênica, é um fármaco bastante utilizado em diversos tipos de cânceres, tais como cervical, colorretal, glioblastoma, pulmão de células não escamosas, ovário, células renais metastáticas e carcinoma hepatocelular (Sia *et al.*, 2014b).

Seu mecanismo de ação consiste em capturar o fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A) da circulação sanguínea e impedir a ligação do fator VEGF-A aos receptores VEGFR-1 e VGFR-2, presente na superfície das células endoteliais. De maneira que ele é capaz de agir inibindo a angiogênese fisiológica e tumoral, acarretando na inibição do crescimento de células tumorais e da metástase do tumor (Papachristos *et al.*, 2020).

Além disso, o BVZ pode ser utilizado como imunomodulador, o que o torna interessante para o tratamento de outros tipos de câncer além do CCR (Garcia *et al.*, 2020). O efeito imunomodulatório do BVZ está correlacionado a sua capacidade de inibição da via VEGF (Chen; Hurwitz, 2018), uma vez que a via do VEGF atua inibindo a diferenciação e maturação de precursores de células dendríticas (Elamin *et al.*, 2015). Adicionalmente, ele pode ser utilizado em terapia combinada com outros agentes quimioterápicos, aumentando a sobrevida dos pacientes em relação a monoterapia de alguns quimioterápicos (Ron *et al.*, 2020).

No entanto, o BVZ produz alguns efeitos indesejáveis, como a hipertensão, eventos tromboembólicos, proteinúria, insuficiência cardíaca congestiva, hemorragia e perfuração gastrointestinal. Sendo que o efeito adverso mais comum é a hipertensão (Chellappan *et al.*, 2018). Além disso, o BVZ possui algumas características que dificultam sua administração por via oral, como sua composição proteica e alto peso molecular, dificultando sua transposição em membranas biológicas e aumentando suas chances de degradação através da hidrólise pelas proteases do trato gastrointestinal (TGI) (Feng *et al.*, 2021).

O organismo possui barreiras fisiológicas para a proteção dos órgãos e células, tais como o mecanismo de bomba E-fluxo, encontrado na região intestinal, como um dos principais responsáveis pela resistência terapêutica; o muco que está presente na

região do TGI e a barreira hematoencefálica, que protege o cérebro de agente patógenos. Com isso, muitos fármacos não conseguem atravessar as barreiras biológicas e, conseqüentemente, não conseguem atingir seu sítio de ação e a eficácia desejada (Choudhury *et al.*, 2019).

Por outro lado, a nanotecnologia tem fornecido ferramentas valiosas capazes de otimizar a ação local, como estratégias para aumentar o acúmulo de fármaco nos tecidos tumorais. Em especial, sistemas nanoestruturados possuem a vantagem do acúmulo no microambiente tumoral através do efeito de retenção e permeabilidade (EPR) (Tiwari *et al.*, 2020).

Portanto, o desenvolvimento de um sistema nanoparticulado que seja capaz de melhorar a estabilidade ou ainda proporcionar a entrega do fármaco no local de ação tem se tornado uma opção bastante promissora para o tratamento de diversas doenças, tais como câncer (Thakkar *et al.*, 2020).

Para o desenvolvimento de nanossistemas administrados pela via oral é necessário considerar as alterações de pH, as enzimas e tempo de trânsito do fármaco ao longo do TGI e a barreira de muco, que tem a função de proteção das células da mucosa, dentre os fatores que podem desencadear a liberação precoce do fármaco (Tiwari *et al.*, 2020).

Dentre as nanopartículas utilizadas como sistemas de liberação de fármacos, atualmente, as nanopartículas poliméricas (NPs) estão ganhando destaque para o tratamento e diagnóstico de câncer, por possibilitarem a utilização de polímeros naturais (Choudhury *et al.*, 2019). Através do desenvolvimento de NPs é possível que o fármaco atinja o alvo com uma maior eficácia, segurança, diminuindo os efeitos colaterais e toxicidade (George; Shah; Shrivastav, 2019).

Neste trabalho, foram utilizados polímeros naturais, principalmente por sua biocompatibilidade (Moritz; Geszke-Moritz, 2015). Os polímeros naturais estão ganhando cada vez mais espaço para a nanomedicina, pois eles são seguros, estáveis, atóxicos, hidrofílicos, biodegradáveis e de custo acessível (Boni *et al.*, 2018b).

A quitosana (QS) é, desde 1970, um polímero que se encontra envolvido nas pesquisas para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos devido suas características tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e baixa imunogenicidade (Zhang *et al.*, 2019). O polissacarídeo natural, catiônico e hidrofílico,

é obtido através da hidrólise alcalina da quitina, e possui capacidade mucoadesiva (Rizeq *et al.*, 2019).

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo natural, encontrado na matriz extracelular, potencialmente, utilizado por sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (Tian *et al.*, 2019). Sua estrutura química consiste em repetidas unidades de N-acetilglicosamina e glucurônico dissacarídeo (Shad *et al.*, 2020). Segundo alguns estudos, a funcionalidade do AH muda de acordo com o seu peso molecular. Quando se encontra com baixo peso molecular ($< 20\text{kDa}$), ele possui característica pró-inflamatória. Com peso molecular intermediário ($100 - 300\text{ kDa}$) apresenta características de regeneração tecidual e quando se encontra com alto peso molecular ($> 1000\text{kDa}$) ele apresenta características de imunossupressor e atividade antiinflamatória (Kim *et al.*, 2019). Além disso, o AH possui capacidade de se ligar ao receptor CD44, que se encontra superexpresso em alguns microambientes tumorais (Mansoori *et al.*, 2020).

O ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP) é um derivado da celulose, amplamente utilizado pela indústria farmacêutica como revestimento entérico (De souza *et al.*, 2020). Ele ainda possui a capacidade de formar complexos polieletrólíticos com polímeros catiônicos proporcionando gastroresistência e modulação na permeabilidade intestinal (Boni *et al.*, 2018).

A escolha dos polímeros para o desenvolvimento das nanopartículas poliméricas depende de suas propriedades específicas e do perfil alvo pretendido. O delineamento racional de sistemas agrega importantes atributos, tais como capacidade de transporte por capilares e veias de baixo calibre, bem como de permear facilmente as membranas biológicas. Além disso, o tamanho na escala nanométrica e a compartimentalização do fármaco em ambiente restrito favorece, a ocorrência de interações dinâmicas e de elevada especificidade na nanobiointerface. Dessa maneira, pode-se notar uma correlação entre a composição polimérica das NPs e sua ação no ambiente tumoral (Yusuf *et al.*, 2023).

Com base no exposto, neste trabalho, o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas orais, baseadas em QS, AH e HP, representa uma estratégia promissora para a administração do BVZ. A escolha dos polímeros foi realizada de acordo com a performance biológica que se pretende alcançar com o desenvolvimento de NPs. Os polímeros foram escolhidos por poderem propiciar um maior tempo de permanência no local de ação, ligação a receptores intestinais e tumorais superexpressos no

ambiente tumoral. Tais atributos foram considerados essenciais para alcançar um sistema de liberação efetivo com capacidade de demonstrar interação com as moléculas de mucina e atividade antiantiogênica.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Câncer

O câncer é considerado o maior problema de saúde pública do mundo (Siegel *et al.*, 2023), definido como um crescimento descontrolado de células humanas que podem invadir ou se espalhar por outras partes do corpo. Esse crescimento exacerbado de células é decorrente de um erro que ocorre na replicação do DNA acarretando uma mutação genética, resultando no surgimento de tumores (Graham; Sottoriva, 2017).

Sendo assim, ele é considerado uma doença complexa, que pode ser desencadeada ou não através de agentes externos, possui diferentes formas de desenvolvimento e uma composição celular heterogênea (Hausman, 2019). Embora o câncer seja bastante conhecido e venha sendo pesquisado a anos, há uma grande dificuldade na obtenção de terapias efetivas para seu tratamento, devido a sua heterogeneidade celular (Zaimy *et al.*, 2017).

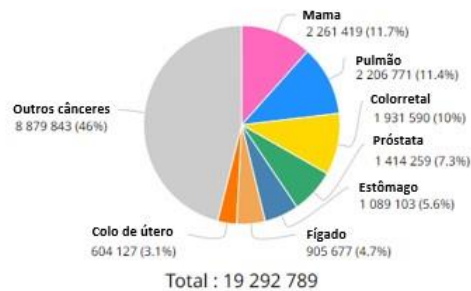
O câncer, ou neoplasia maligna, é a segunda causa de morte no mundo, sendo que o câncer de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado estão entre os tipos mais comuns de câncer em homens e o câncer de mama, colorretal, pulmão, cervical e tireoide os mais comuns em mulheres (“Cancer”, 2022).

2.1.1. Aspectos epidemiológicos do câncer colorretal

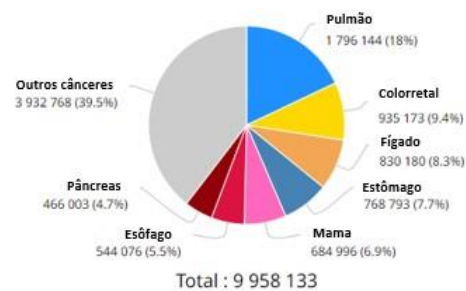
De acordo com o GLOBOCAN 2020, a estimativa é de que 10% dos novos casos diagnosticados de câncer em 2020 seja CCR, colocando-o na posição de 3º tipo de câncer mais comum diagnosticado em todo o mundo. Além de ser responsável pela segunda causa de morte global entre os tipos de cânceres, totalizando 9,4% dos tipos de causa de morte (Union for International Cancer Control, 2020), como demonstrado na **Figura 1**.

Figura 1 - Estatística global de câncer

Novos casos de câncer diagnosticados no mundo



Mortes causadas por câncer no mundo



Fonte: Union for International Cancer Control (2020)

2.1.2. Desenvolvimento do câncer colorretal

O CCR é definido como o câncer que se desenvolve no intestino grosso e reto, podendo ser denominado de câncer de cólon ou câncer de reto, de acordo com a região a qual se iniciou seu desenvolvimento (GOVERNMENT OF CANADA, 2023).

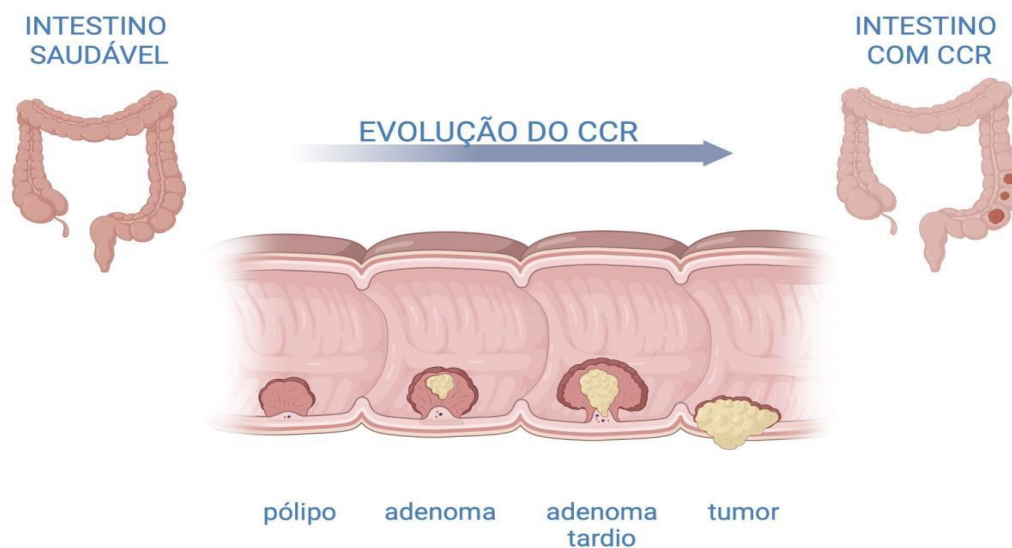
Dentre os diferentes tipos de CCR, no mundo, existem dois tipos que são predominantes: o adeno carcinoma comum, que representa 70 - 90 % dos tipos de CCR e a neoplasia serrilhada (pólipos colorretais hiperplásicos, podendo estar associados a adenomas sesséis), que representa 10 - 20 % dos tipos de CCR (Dekker *et al.*, 2019). A origem do CCR pode ser: hereditária, familiar ou esporádica. Sendo que quando de origem hereditária, ele pode se desenvolver de duas formas: pólipos adenomatosos familiares e não polipomatosos (Síndrome de Lynch) (Eng *et al.*, 2022).

O processo de carcinogênese do CCR pode ocorrer de duas maneiras: através de modificações genéticas que ocorrem nos genes supressores de tumor e/ou através de modificações epigenéticas nos genes que são responsáveis pela estabilidade genética (Weitz *et al.*, 2005). Essas modificações genéticas e epigenéticas dão origem a células tronco, que são responsáveis por inativar os genes de supressão tumoral e ativar os oncogenes (Dekker *et al.*, 2019).

Dessa forma, essas células tronco acarretam o crescimento de um tecido endotelial anormal e, conseqüentemente, no desenvolvimento de pólipos, que são precursores para o desenvolvimento da neoplasia (Colorectal Cancer, 2019; Haydon; Jass, 2002).

Geralmente, o desenvolvimento do CCR ocorre de maneira lenta e sem a presença de sintomas. Os primeiros sintomas são notados quando o tumor já apresenta um tamanho grande, acarretando o impedimento da passagem de fezes, causando cólicas e dores abdominais, e outras vezes, com o aparecimento de sangue nas fezes devido ao movimento peristáltico do intestino (Simon, 2016), como demonstrado na **Figura 2**.

Figura 2 - Esquema representativo de desenvolvimento do CCR



Fonte: Adaptado de Government of Canada (2023)

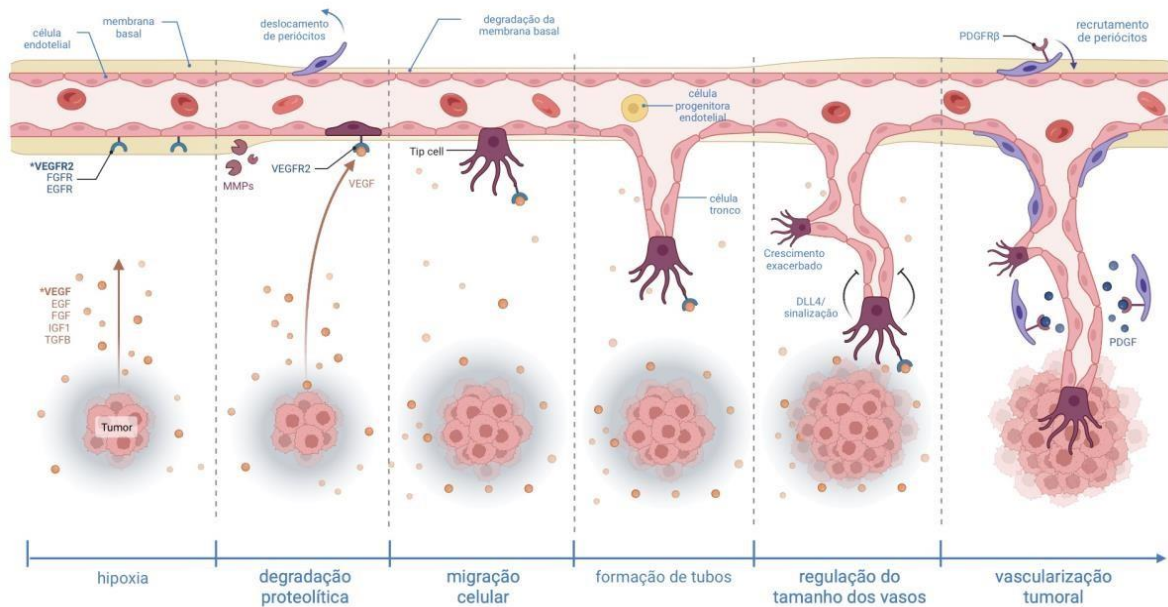
Os fatores de risco associados a incidência do desenvolvimento do CCR podem estar correlacionados com a idade, estilo de vida (sedentarismo, tabagismo, uso excessivo de álcool), etnia (americanos, africanos e Judeus do leste europeu com maior incidência de casos), desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais, além dos casos hereditários (Weitz *et al.*, 2005).

1.1.1. Angiogênese tumoral

A angiogênese é um processo fisiológico natural que ocorre quando são liberados fatores pró-angiogênicos, tais como: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator 2 de crescimento fibroblástico (FGF-2) e o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), para a formação de novos vasos sanguíneos a partir de estruturas capilares já existentes. O VEGF possui capacidade de aumentar a permeabilidade vascular e recrutar células endoteliais. O FGF-2 possui função de

ativar a proliferação e migração endotelial celular e, por fim, o PDGF estimula a estabilidade vascular (Bai *et al.*, 2018) (**Figura 3**).

Figura 3 - Processo de angiogênese em microambiente tumoral



Fonte: Adaptado de Tocris Bioscience (2023)

No entanto, no microambiente tumoral ocorre uma produção desregulada de fatores pró angiogênicos, acarretando o crescimento exacerbado de novos vasos sanguíneos essenciais a fim de garantir o aporte nutricional para o crescimento das novas células tumorais. Sendo assim, através de diferentes mecanismos de sinalizações intra e extracelulares ocorre o desenvolvimento das células tumorais, o processo de invasão tumoral nos tecidos adjacentes e, por fim, a metástase tumoral. Além das mudanças nas propriedades mecânicas dos tecidos que podem auxiliar no desenvolvimento da doença (Shen *et al.*, 2020).

Neste contexto, um dos fatores mais importantes e liberados são os VEGF, principalmente o VEGF - A, sendo considerado a chave para o desenvolvimento da angiogênese tumoral, acarretando um aumento da permeabilidade vascular, induzindo a proliferação e migração das células endoteliais e, a expressão de moléculas de adesão, com efeito mitogênico (Garcia *et al.*, 2020; Lombardil *et al.*, 2022).

A partir disso novos vasos sanguíneos são gerados apresentando um epitélio irregular e desorganizado, com uma capacidade de permeabilidade maior e baixa perfusão comparado aos vasos sanguíneos saudáveis (Treppe; Ager; Hida, 2022).

Além do formato irregular da vasculatura tumoral, são notadas protuberâncias anormais e diminuição do transporte de nutrientes e da atividade de remoção de resíduos através do sistema linfático. Acarretando o transporte inadequado de oxigênio e gerando um microambiente de hipoxia (Jain; Chauhan; Duda, 2013).

Ainda, ocorrem adaptações metabólicas decorrentes da diminuição do oxigênio no microambiente tumoral. De maneira que, na escassez de oxigênio, as células passam a optar pela via glicolítica para a produção de adenosina trifosfato (ATP), um fenômeno conhecido como Efeito Warburg, gerando como subproduto deste metabolismo o lactato e outros metabólitos que estão diretamente relacionados com o crescimento, proliferação e adesão celular (Liberi; Locasale, 2016; Paredes; Williams; San Martin, 2021; Pascale *et al.*, 2020).

Diferentemente, das células normais, as células tumorais optam pela geração de energia através de via glicolítica anaeróbica, transformando glicose e glutamina em ácido láctico, devido a um rápido fornecimento energético, enquanto as células saudáveis optam pela via de fosforilação oxidativa e ciclo de Krebs para geração de energia. Embora esse fenômeno seja estimulado em ambiente com hipóxia, ele ocorre, independentemente da presença de oxigênio no microambiente (Liberti; Locasale, 2016).

2.2. Tratamentos

O tratamento para o CCR é indicado de acordo com o estágio que a doença se encontra no momento do diagnóstico. Ele pode variar entre a cirurgia, quando em estágio inicial para ressecção do local acometido ou tratamento quimioterápicos e radioterapia, que podem variar entre diferentes classes terapêuticas como monoterapia ou terapia combinada.

A primeira linha de tratamento quimioterápico para CCR metastático é baseada no 5-fluoruracila em combinações, tais como 5-fluoruracila + leucovorina + oxaplatina + irrinotecan e leucovorina + 5 fluoruracila + oxiplatina (Liu *et al.*, 2022). Ainda há a terapia gênica, onde podem ser administrados novos genes, através de vetores, tais com vírus (administração local de pmRNAK-Ras; DNA complexado em

nanopartículas, dentre outros), a fim de aumentar a eficácia terapêutica (Hasbullah; Musa, 2021; Zwacka; Dunlop, 1998).

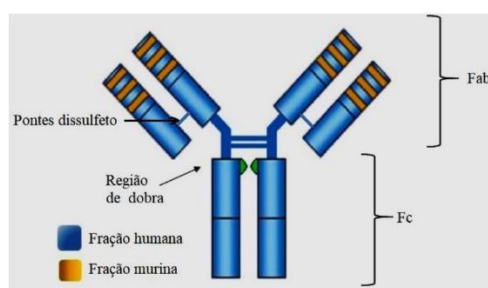
O tratamento quimioterápico de fluoruracila (5-FU) é o de primeira escolha no tratamento de CCR, porém ele apresenta baixa efetividade e seletividade, além de toxicidade e resistência (Alzahrani *et al.*, 2023). O seu mecanismo de ação é baseado na interrupção do ciclo de replicação do RNA e DNA baseado no metabolismo do ácido fólico (Pardini *et al.*, 2011). Dessa maneira, a combinação do 5-FU com fármacos como oxiplatina, irrinotecan dentre outros, são utilizadas como tentativa para aumentar a atividade antitumoral e superar a resistência.

Porém, quando a doença se encontra em estado mais avançados podem ser utilizados outros fármacos adjuvantes no tratamento, como o bevacizumabe, cetuximabe, dentre outros, que são alguns dos fármacos que agem na inibição dos fatores de crescimentos celulares (Chandran *et al.*, 2017). Sendo assim, dentre as alternativas utilizadas, o BVZ é um dos fármacos utilizado em CCR metastático (Habeeb *et al.*, 2023; Pabón; Babiker, 2022).

2.2.1. Bevacizumabe (BVZ)

O BVZ é um anticorpo monoclonal recombinante humanizado, do anticorpo monoclonal murino (MuMAB A4.6.1 - do *Inglês*, *Murine Monoclonal Antibody A4.6.1*) com a imunoglobulina humana G1 (IgG1) (**Figura 4**). O BVZ é composto por 4 ligações peptídicas, consistindo em duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, contendo o peso molecular de 149 kDa (Fillipo *et al.*, 2021).

Figura 4 - Estrutura proteica do bevacizumabe

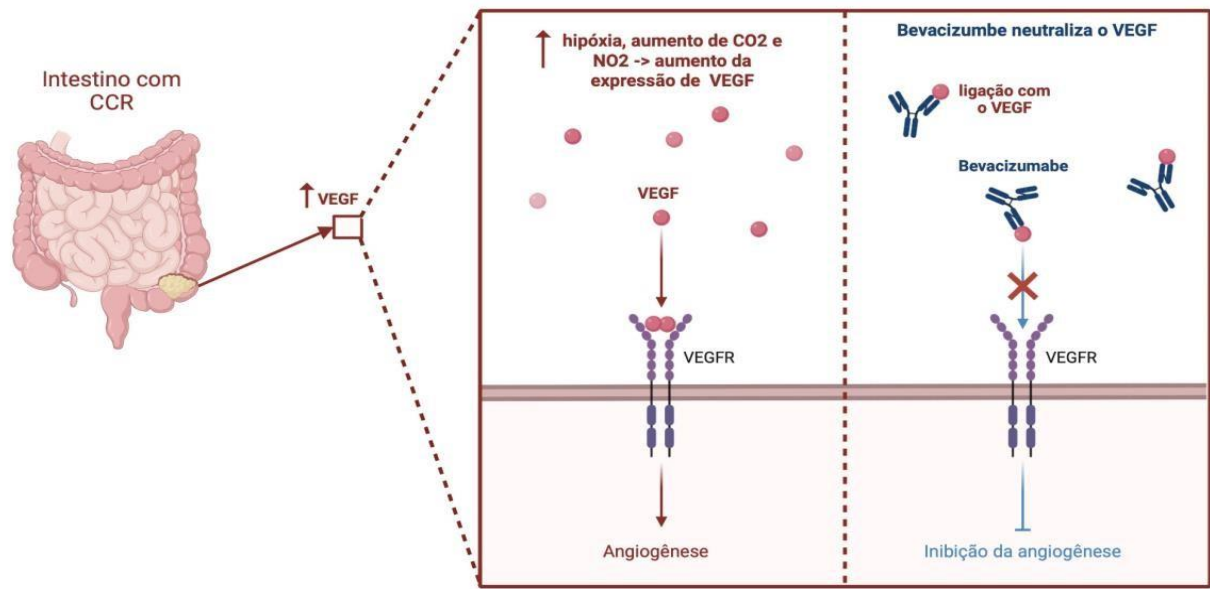


Fonte: Cardoso (2019)

Através da inibição do VEGF, o BVZ é capaz de impedir a ativação dos receptores de tirosina quinase: VEGFR1 e VEGFR2 presentes nas células endoteliais (**Figura 5**) (Oliva; Llabrés; Farinã, 2015). Dessa forma, o efeito antitumoral atribuído

ao BVZ é principalmente devido a inibição dos receptores VEGF acarretando a diminuição do crescimento de vasos sanguíneos e impedindo o suplemento de oxigênio e nutrientes para o desenvolvimento tumoral (Li; Kroetz, 2018).

Figura 5 - Esquema do mecanismo de ação do bevacizumabe



Fonte: Adaptado de BIORENDER (2023).

Embora o BVZ seja promissor e se encontre aprovado pela FDA desde 2004, ele possui algumas limitações. Quando administrado por via oral, a sua estrutura proteica pode estar sujeita a degradação devido as proteases e gradiente de pH presentes ao longo do TGI (**Tabela 1**), limitando sua administração para a via parenteral (Zhu *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Diferentes gradientes de pH e enzimas presentes no TGI.

TGI	pH	Enzimas
Estomago	1,5 - 3,5	Pepsina
Duodeno	5.0 - 6.0	Tripsina,
Jejuino e íleo	7.0 - 8.0	quimiotripsina,
Colón	6.0 - 8.0	carboxipeptidase e elastase

Fonte: Autoria própria.

Devido a necessidade de administração de altas doses, sua lenta taxa de eliminação e tempo de meia vida de 14 a 21 dias, podem resultar em um aumento dos níveis séricos de BVZ, o que pode ainda desencadear alguns efeitos adversos tais como proteinúria, hipertensão, eventos tromboembólicos, perfuração gastrointestinal e hemorragia (Alves *et al.*, 2021; Luis de Redín *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2004a).

Sendo assim, a busca por tecnologias que sejam capazes de impedir a degradação, aumentar a estabilidade do princípio ativo, alcançar uma liberação controlada, diminuir os efeitos colaterais e, conseqüentemente, aumentar a adesão e proporcionar uma maior qualidade de vida aos pacientes acometidos pelo CCR tem aumentado nos últimos anos (Ferreira *et al.*, 2020a).

Atualmente, dentre as tecnologias propostas para aprimoramento de fármacos, a nanotecnologia tem demonstrado ser uma ferramenta bastante promissora, especialmente quando utilizadas para terapias antitumorais (Cheng *et al.*, 2021b; Fan *et al.*, 2023; Gavas; Quazi; Karpinski, 2021).

2.3. Sistemas de administração oral

A administração oral é considerada uma forte alternativa à administração intravenosa, pois possibilita um aumento da flexibilidade e adaptabilidade da dose ao paciente, com base nas respostas de eficácia e toxicidade. Além disso, não exige uma demanda de procedimentos específicos exigidos para administração intravenosa, tais como profissionais de saúde altamente qualificados e centro de internação. Como consequência, as formulações orais podem aumentar o número de pacientes tratados e reduzir o número de pacientes em hospitais e clínicas, o que significa uma redução de custos para o sistema de saúde e melhoria na qualidade de vida do paciente (Pridgen; Alexis; Farokhzad, 2014).

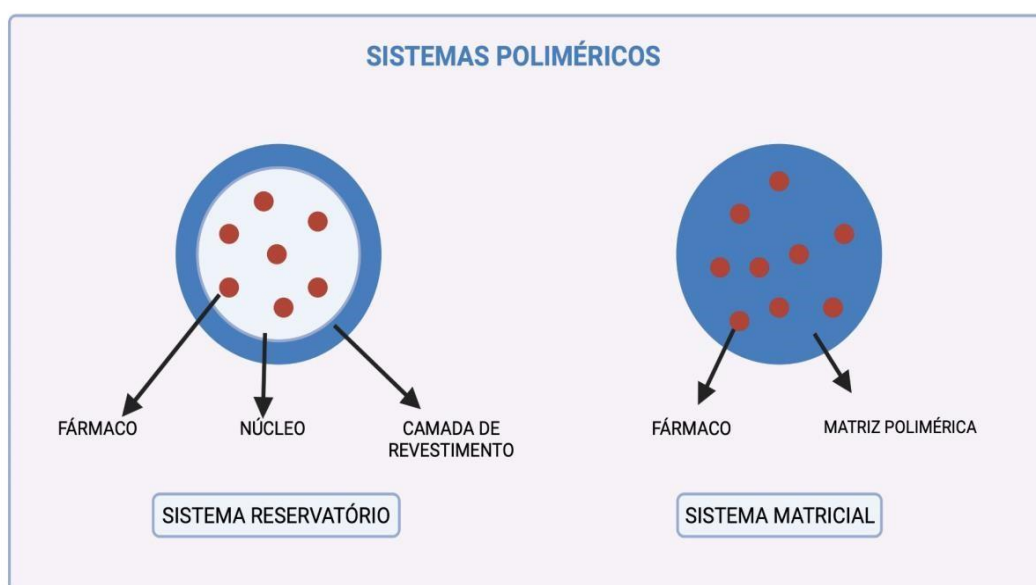
2.4. Nanopartículas como sistema de liberação de fármacos

Através da nanotecnologia é possível modular o tamanho de partículas e adicionar características desejáveis ao sistema de liberação de fármacos através da seleção de determinados polímeros em sua composição (Farokhzad; Langer, 2009; Hoshyar *et al.*, 2016). Além disso, as propriedades físico-químicas e morfológicas de diferentes nanoestruturas possuem influência na interação com as células alvo, assim como determinam a sua rota de eliminação e possíveis efeitos (Severino *et al.*, 2019).

De uma maneira geral, são consideradas nanopartículas, as partículas que possuem seu tamanho delimitado entre 1 a 1000 nm, sendo elas orgânicas ou inorgânicas (Zielinska *et al.*, 2020).

O desenvolvimento e organização das NPs podem ocorrer através de duas formas distintas: sistema matricial e sistema reservatório. O sistema matricial é composto pelo princípio ativo farmacêutico distribuído de maneira homogênea pela matriz polimérica e o sistema reservatório é composto por um núcleo contendo o insumo farmacêutico ativo revestido por uma camada polimérica (Yuan *et al.*, 2019), como demonstrado na **Figura 6**.

Figura 6 - Esquema representativo de sistemas poliméricos



Fonte: Autoria própria.

Dado isso, nos últimos anos, estão sendo realizadas inúmeras pesquisas no desenvolvimento e compreensão de sistemas nanoparticulados para fins terapêuticos, a fim de alcançar a medicina personalizada (Alghamdi *et al.*, 2022; Van der Meel *et al.*, 2019; Zhang; Gao; Bao, 2015).

2.4.1. Nanopartículas poliméricas mucoadesivas

A mucoadesão é definida como a capacidade que um material possui de se aderir ao muco por um período. Esse fenômeno pode aumentar a capacidade de penetração do fármaco na circulação sistêmica. A mucoadesão ocorre em diferentes etapas:

- 1) Contato: contato íntimo entre o material mucoadesivo e a mucosa
- 2) Dado isso, nos últimos anos, estão sendo realizadas inúmeras pesquisas no desenvolvimento e compreensão de sistemas nanoparticulados para fins terapêuticos, a fim de alcançar a medicina personalizada (Alghamdi *et al.*, 2022; Van der Meel *et al.*, 2019; Zhang; Gao; Bao, 2015).

A interação entre as nanopartículas poliméricas com propriedades mucoadesivas administradas pela via oral e o muco pode ocorrer de duas diferentes maneiras:

muco-penetração: difusão das NPs através do muco e interação com as células epiteliais, permitindo a penetração através da barreira de muco;

mucoadesão: aumento do tempo de residência no local de ação, da interação de biomateriais mucoadesivos com as moléculas do muco, acarretando um maior tempo de retenção do fármaco no local de ação (Pridgen; Alexis; Farokhzad, 2015).

muco-modulação: capacidade que um sistema possui em modular as propriedades na interface sistema/muco, modificando o potencial de interação do sistema com a MUC (Nordgård; Draget, 2018).

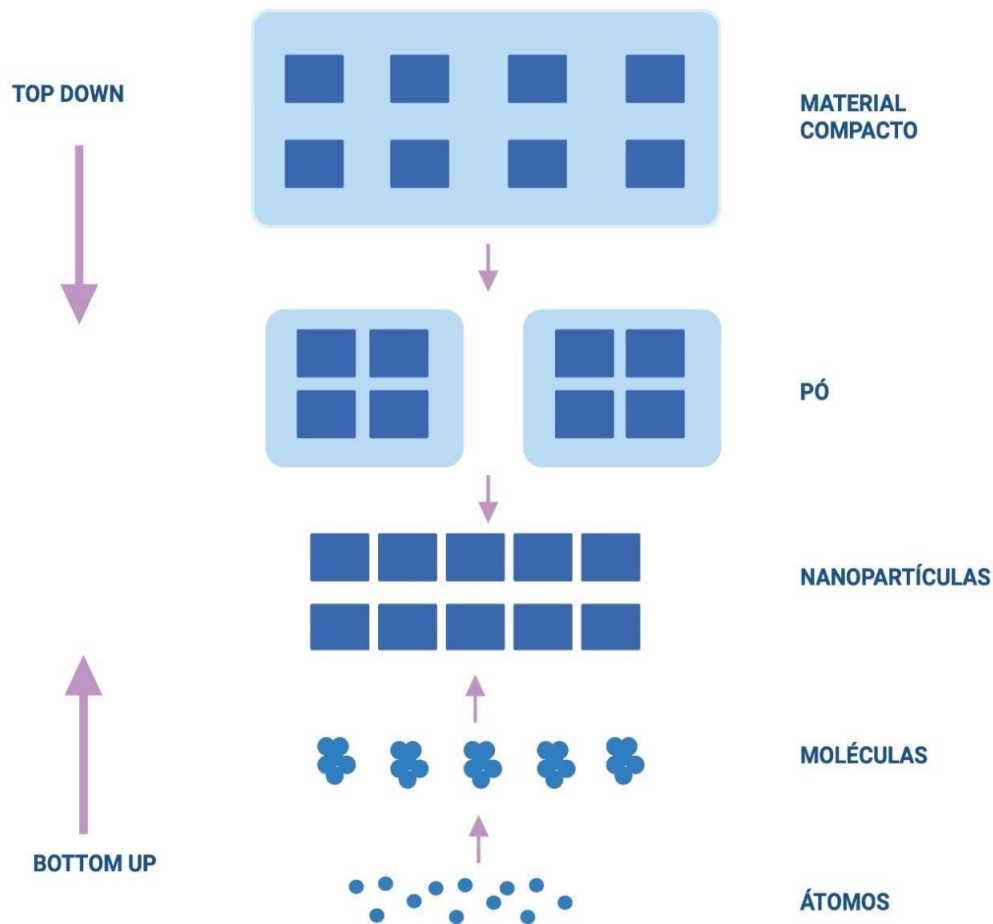
No entanto, alguns fatores, intrínsecos e externos, podem alterar o fenômeno da mucoadesão. Os fatores intrínsecos estão relacionados com as características estruturais, dos polímeros utilizados na síntese das NPs. Os fatores externos são considerados estímulos gerados pelo ambiente fisiológico que podem alterar as propriedades mucoadesivas (Dodou; Breedveld; Wieringa, 2005).

Dessa forma, a escolha dos polímeros deve ser delineada para que seja possível modular as características desejáveis ao sistema.

2.5. Métodos para desenvolvimento de NPs

Existem diferentes métodos para o desenvolvimento de nanopartículas, que são classificados como *bottom up* e *top down*, que se baseiam na construção através de adição de átomos ou na diminuição do tamanho de partículas (micropartículas → nanopartículas), respectivamente (**Figura 7**). Dentre esses métodos, estão: coprecipitação, microemulsão, ultrassom, microondas, ablação por laser, sol-gel, síntese biológica, síntese padrão, precipitação, dentre outros (Abid *et al.*, 2022; Harish *et al.*, 2022; Rane *et al.*, 2018).

Figura 7 - Métodos de produção de NPs



Fonte: Adaptado de Abid e colaboradores (2022)

2.5.1. Complexação polieletrólítica

O método de escolha para o desenvolvimento das NPs do presente trabalho é o de complexação polieletrólítica, classificado como método bottom-up.

A complexação polieletrólítica é explorada desde 1930. Porém, atualmente, ela tem ganhado importância na área de desenvolvimento de NPs, pois permite a formação de complexos a partir de polímeros naturais, que são de grande interesse devido à baixa toxicidade, segurança, biodegradabilidade e estabilidade (Kulkarni *et al.*, 2016; Taber; Umerska, 2015).

Os polieletrólitos, quando dissolvidos em meio aquoso, podem apresentar-se na forma neutra, ionizados positivamente ou negativamente. Sendo assim, os

complexos eletrolíticos (CPes) - são formados a partir da mistura de soluções aquosas contendo cargas opostas (Srivatava; Tirrell, 2016).

O pH do meio, temperatura, proporções poliméricas, peso molecular dos polímeros, grau de ionização dos polímeros, força iônica e densidade de carga polimérica podem influenciar formação dos CPes (Sarika; James, 2016).

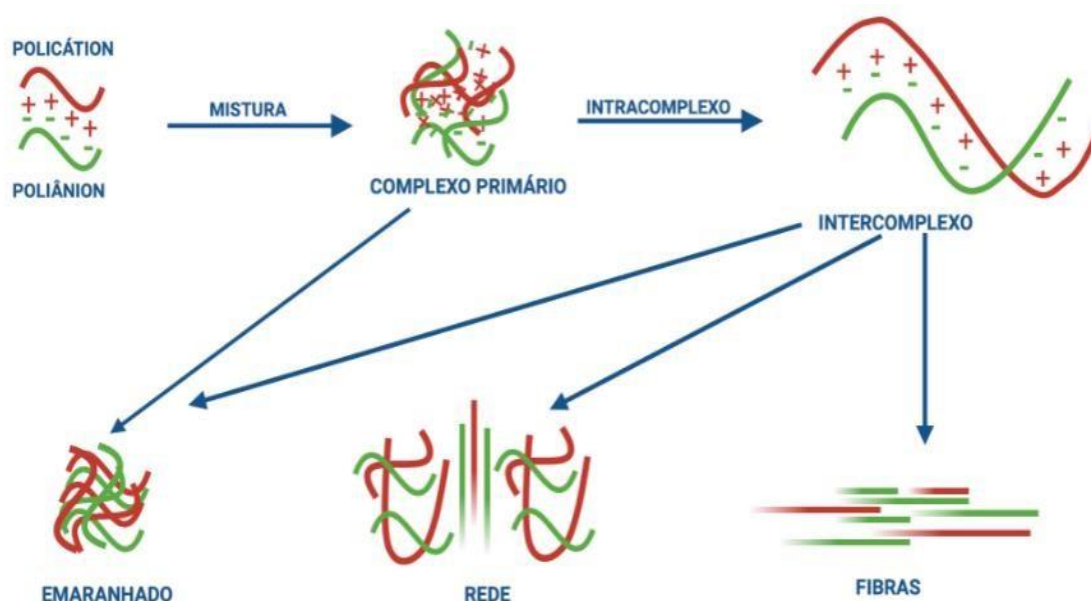
De maneira que, a formação desses complexos ocorre em três etapas (**Figura 8**) ocasionadas pelo aumento da entropia, acarretada pela liberação de contraíons (íons que acompanham a espécie iônica e são responsáveis por manter a neutralidade elétrica) de baixo peso molecular. Esses processos são:

Complexo primário: formação imediata, após a mistura de dispersões que contenham cargas opostas direcionadas através de forças de ligação;

Intra complexos: formação intermediária de complexos, que ocorre 1 a 2 h após o início da agitação, ao qual, são formadas novas ligações eletrostáticas ou ocorrem alterações nas cadeias poliméricas.

Intercomplexo/agregação: Esse processo envolve a formação de complexos intermediários, principalmente através de ligações hidrofóbicas. No entanto, o fenômeno de agregação é influenciado por outros fatores, por exemplo, estrutura polimérica e condições de complexação (Buriuli; Verma, 2017; Meka *et al.*, 2017).

Figura 8 - Esquema representativo da formação de complexos polieletrólíticos.



Fonte: Adaptado de Kulkarni e colaboradores (2016)

Uma grande vantagem do desenvolvimento de NPs a partir da formação de CPes, comparado a outros métodos de desenvolvimento, é a síntese não exigir a utilização de solventes orgânicos, o baixo custo de produção e sua fácil reprodutibilidade.

2.6. Biopolímeros

Os biopolímeros são muito importantes na área da medicina pois normalmente são biodegradáveis, biocompatíveis e não apresentam toxicidade (Singh; Shitiz; Singh, 2017).

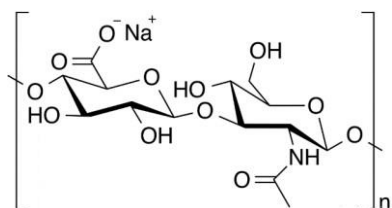
O uso desses polímeros como nanocarreadores é especialmente atrativo, pois eles podem ser utilizados sob condições específicas, em locais específicos e sob condições fisiológicas estabelecidas (Karlsson; Vaughan; Green, 2018).

2.6.1. Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (AH) (**Figura 9**) é utilizado nos campos de medicina, alimentos, cosméticos e cuidados com a saúde, devido as suas características de não-imunogenicidade, biocompatibilidade e viscosidade. Além disso, ele pode desempenhar diferentes funções de acordo com o seu peso molecular (Qiu *et al.*, 2021; Sato *et al.*, 2022). Ele é encontrado nos tecidos conjuntivos, se ligando principalmente aos receptores de superfície celular CD44 (molécula transmembrana de adesão celular) (Sato *et al.*, 2022). Dado isso e o fato de as células tumorais de intestino apresentarem uma superexpressão dos receptores CD44, ele pode ser utilizado para vetorizar a entrega do fármaco no local de ação.

É um polímero natural, hidrofílico, que possui em sua estrutura heteropolissacarídeos glicoaminosícaros, sendo composto por ligações dissacarídeas de D-glucurônico e N-acetil-D-glicosamina, alternando em ligações glicosídicas β -1,3 and β -1,4 (Marinho; Nunes; Reis, 2021). O grupo D-glucurônico presente na estrutura do AH lhe confere característica ácida em meio aquoso em determinados pHs, possibilitando a formação de CPes com polímeros catiônicos (Le *et al.*, 2021).

Figura 9 - Estrutura química do ácido hialurônico



Fonte: The Cosmetic Chemistry (2023).

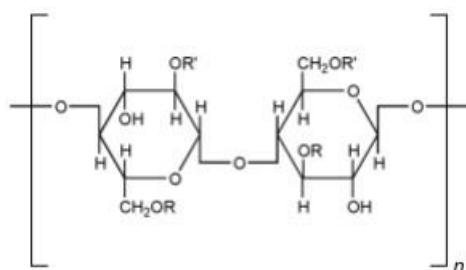
Sua degradação no intestino se dá através das enzimas hialuronidases (Dos Santos *et al.*, 2021a). Além disso, o AH possui em sua estrutura grupos polares e apolares, que dão a ele a capacidade de interagir com diferentes grupos químicos; podendo formar, por exemplo, ligações de hidrogênio, que dão a ele, características de rigidez a cadeia polimérica (Snetkov *et al.*, 2020).

2.6.2. Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose

O Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP) é um ácido ester ftálico de hidroxipropilmetilcelulose, com característica aniônica (Martins; Santos, 2020; Nogami *et al.*, 2021) (**Figura 10**).

É um polímero que possui a capacidade de proteger o fármaco ou princípio ativo da degradação do estômago e possíveis efeitos adversos no estômago, assim como modular a permeabilidade celular (Boni *et al.*, 2018; Chung *et al.*, 2014). De ampla utilização na indústria farmacêutica como revestimento entérico devido a sua capacidade de não se degradar em pH ácido, abaixo de 5.3 (Bang *et al.*, 2014).

Figura 10 - Estrutura química do ftalato de hidroxipropilmetilcelulose



Fonte: Pedreiro (2012)

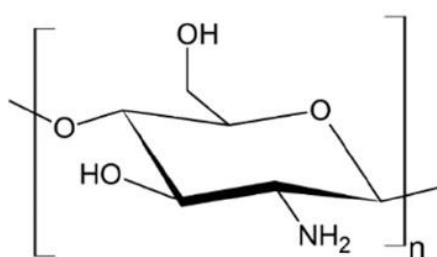
2.6.3. Quitosana

A quitosana (QS) (**Figura 11**) é um polímero natural, biodegradável e não-tóxico que possui atividade antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena e anti-inflamatória (Yang *et al.*, 2023). A QS é obtida através da hidrólise alcalina da quitina, composto que faz parte da estrutura do esqueleto de crustáceos e paredes celulares de fungos (Zhang *et al.*, 2023).

Ela é um polímero catiônico, que possui ligações beta - D - glucosamina em sua estrutura e propriedades que permitem o desenvolvimento de estruturas com multicamadas ou complexos eletrostáticos com polímeros aniônicos. Além disso, a massa molecular da QS e o seu grau de desacetilação interfere diretamente em sua atividade biológica (Abd El-Hack *et al.*, 2020).

Sua carga positiva é decorrente da presença de muitos grupos aminos em sua estrutura, que podem se ligar a moléculas ácidas e polissacarídeos (Tang *et al.*, 2023). A quitosana possui solubilidade em meio ácido, devido a protonação dos grupamentos amino presentes em sua estrutura. Quando em meio ácido, prótons se ligam ao redor dos grupos amino (NH₂) e formam cargas positivas (NH₃). O grau de protonação se encontra diretamente relacionado ao número de grupamentos amino presentes na molécula de quitosana (Wani; Pandith; Sheikh, 2021).

Figura 11 - Estrutura química do quitosana



Fonte: Adaptada de Macedo (2022)

A QS sofre a ação de lisoenzimas e enzimas colônicas (glucoronidases e glicosidades) (Dos Santos *et al.*, 2021a). As funções da QS variam de acordo com sua massa molecular e grau de desacetilação (Ferreira *et al.*, 2020b) e sua classificação é realizada de acordo com seu peso molecular, que pode variar de 50 a 2000 KDa, sendo classificado como QS de baixo, médio e alto peso molecular (Dos Santos *et al.*, 2022).

2.7. MUCO e mucina

O muco consiste em uma camada de hidrogel que reveste as superfícies de mucosa do corpo. Ele é produzido por células de Goblet ou células epiteliais especializadas, possuindo em sua composição água, mucina, lipídeos, eletrólitos, proteínas e detritos celulares (Cheng *et al.*, 2021a). Sua função é lubrificar e proteger as células contra patógenos e estresse físico. De acordo com isso, ele reveste todo o TGI, cavidade nasal e trato urogenital (Mcshane *et al.*, 2021).

A mucina (MUC) é o principal componente do muco. Ela é uma glicoproteína, formada através de ligações O-oligossacarídeos e N-oligossacarídeos, que possui em sua estrutura grupos de treonina, serina e prolina na região central, além das regiões de cisteína que são as responsáveis pelas ligações mucina-mucina, através de ligações de bissulfeto (Carlson; Lock; Carrier, 2018).

A MUC possui carga negativa resultante dos grupos carboxilatos e sulfatos presentes em sua estrutura proteica, que se ionizam na presença de pHs ácidos, comumente encontrados em microambientes tumorais. A MUC pode realizar interações não covalentes (interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) e ligações covalentes (ligações dissulfetos) com outras moléculas de MUC ou demais componentes do meio fisiológico (Carlson; Lock; Carrier, 2018).

Existem diferentes classes de MUC, sendo que a MUC2 é o principal tipo de MUC e está presente nas duas camadas de muco que revestem o intestino. A camada externa normalmente é mais fina e a camada interna é mais densa. Em situações em que ocorrem a perda de MUC2 é desenvolvido um microambiente no qual podem ocorrer respostas inflamatórias na superfície epitelial (Kufe, 2009). O muco possui diferentes espessuras e funções de acordo com o local em que se encontra e sua composição de MUC.

Considerando que o intestino é revestido por muco e a mucina é o principal componente do muco, os estudos que levam em consideração a interação das NPs com a MUC, podem demonstrar uma abordagem biorrelevante para compreensão do comportamento mucoadesivo de sistemas de liberação de fármacos.

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver, otimizar e avaliar a atividade muco moduladora e antiangiogênica de nanopartículas poliméricas baseadas em ácido hialurônico, ftalato de hidroxipropilmetilcelulose e quitosana compartimentalizando o fármaco BVZ para potencial tratamento de câncer colorretal.

3.1. Objetivos específicos

- Desenvolvimento, otimização e caracterização de sistemas nanoestruturados baseados em QS, AH e HP contendo o BVZ;
- Avaliação *in vitro* da interação das NPs e polímeros isolados com a mucina;
- Avaliação da influência do BVZ na formação das NPs
- Avaliação da liberação *in vitro* do fármaco;
- Avaliação *in vitro* da viabilidade celular das NPF17 e NPF17_BVZ nas linhagens celulares - RKO e HUVEC;
- Avaliação do efeito antiangiogênico do BVZ incorporados em nanopartículas baseadas em QS, AH e HP (NPF17_BVZ) empregando modelo da membrana corioalantóica do embrião de galinha (CAM).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Principais matérias-primas e reagentes

- Quitosana de baixo peso molecular (grau de desacetilação de 90%, Sigma Aldrich®)
- Mw: ~120 KDa;
- Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (Shin-Etsu®) – Mw: ~75 KDa;
- Hialuronato de sódio (ViaFarma) – Mw: ~1000KDa;
- Bevacizumabe (Avastin - Roche®) – Mw: 149 KDa;
- Mucina tipo II (Sigma-Aldrich®);
- Ácido clorídrico- teor 37% (Qhemis), ácido acético P.A (Qhemis), fosfato de potássio monobásico (Sigma-Aldrich®), fosfato de potássio dibásico (Sigma-Aldrich®) e hidróxido de sódio (Grupo Química®).

4.1.2. Cultura celular

- Linhagem celular RKO (ATCC – American Type Culture Collection);
- Linhagem celular HUVEC fornecido pelo Professor Doutor Bruno Sarmiento (i3S – Porto, Portugal);
- Meio de cultura M199, suplementado com 10 % de soro bovino fetal, 1% de solução de penicilina-estreptomicina (P/S) – Invitrogen, USA e fatores de crescimento celular: 0,6% EGF, 0,6% FGF, 0,6% VGF, 0,1% hidrocortisona – Endopan 3 (Suplement pack – PanBiotech®) em meio especial para células endoteliais M199 (P04-07050 PanBiotech®);
- Meio de cultura DMEM (do *Inglês*, *Dulbecco's modified Eagle médium* - Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, do *Inglês*, *Fetal Bovine Serum* (FBS)- (Gibco, Invitrogen – USA) e 1% de solução de penicilina- streptomicina (Invitrogen – USA);
- Placa de cultura celular de 96 poços (Corning, SPC Life Science Co, Ltd.);

4.1.3. Principais equipamentos

- Agitador magnético (Global Trade Technology - AMA5L);
- Balança analítica (Shimadzu - Marte AUW220D);

- Peagômetro modelo DM-23 – Dividem (Mettler Toledo).
- Centrífuga (Spectrafuge- 16M, Labnet);
- Analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS (Malvern Instruments) acoplado ao autotitulado MPT –2;
- HPLC AGILENT modelo 1220 Infinity LC (Agilent Technologies); - Incubadora, com atmosfera controlada (Binder® CB).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Obtenção das nanopartículas poliméricas

4.2.1.1. Estudos de pré-formulação

O desenvolvimento de nanopartículas poliméricas foi realizado com base em estudos previamente desenvolvidos pelo nosso grupo coordenado pela Professora Doutora Maria Palmira Daflon Gremião, e os dados publicados na literatura (Boni *et al.*, 2018b; Dos Santos *et al.*, 2021b; Ferreira *et al.*, 2020c).

Levando em consideração os estudos desenvolvidos por Boni e colaboradores (Boni *et al.*, 2018), foi possível notar um efeito na modulação da permeabilidade celular em NPs que continham HP, comparado a NPs que continham apenas com QS e AH. Portanto, as formulações foram delineadas com o propósito de avaliar o comportamento do HP frente a permeabilidade nas formulações de QS contendo HP ou AH, e os três polímeros (QS, AH e HP).

Para tanto, foram delineadas um total de 17 formulações com diferentes proporções de polímeros para a obtenção das nanopartículas poliméricas (NPs) **(Tabela 2)**.

Tabela 2 - Composição das anopartículas delineadas nos estudos de pré formulação empregadas neste trabalho (NPs)

Nomenclatura	Composição	Proporção (m/m)	Concentração polimérica (mg/mL)
NPF1	QS:AH	9:1	0,48
NPF2	QS:AH	7:3	0,23
NPF3	QS:AH	6:4	0,20
NPF4	QS:AH	5:5	0,17
NPF5	QS:AH	1:9	0,11
NPF6	QS:AH	3:7	0,13
NPF7	QS:AH	4:6	0,15
NPF8	QS:HP	9:1	0,50
NPF9	QS:HP	7:3	0,50
NPF10	QS:HP	6:4	0,50
NPF11	QS:HP	5:5	0,50
NPF12	QS:HP	1:9	0,50
NPF13	QS:HP	3:7	0,50
NPF14	QS:HP	4:6	0,50
NPF15	QS:AH:HP	2:4:4	0,19
NPF16	QS:AH:HP	8:1:1	0,36
NPF17	QS:AH:HP	5:2,5:2,5	0,25

Fonte: Autoria própria.

4.2.1.2. Desenvolvimento das nanopartículas poliméricas

4.2.1.2.1. Preparo das dispersões poliméricas

As dispersões poliméricas foram preparadas com agitação magnética na concentração de quitosana 0,5 mg/mL (QS) em ácido acético 0,2 M, ácido hialurônico 0,1 mg/mL (AH) em hidróxido de sódio 0,1 M e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose 0,5 mg/mL (HP) em água ultrapurificada MilliQ®.

As soluções de QS e HP foram produzidas através de agitação magnética por aproximadamente, 8 horas, em temperatura ambiente (25°C) e a solução de AH foi deixada em agitação por 24 horas devido a sua solubilidade limitada em água (Harrer

et al., 2021). Após esta etapa, o pH foi ajustado para 6,0 com o auxílio de soluções de ácido acético e de hidróxido de sódio, utilizando Peagômetro, modelo DM-23 (Mettler Toledo). O critério utilizado para escolha do pH foi a estabilidade funcional e estrutura do BVZ, que será, posteriormente, incorporado as NPs (Ferreira *et al.*, 2018a).

4.2.1.2.2. Desenvolvimento das NPs sem o fármaco

O desenvolvimento das NPs sem o fármaco foi realizado através do método da complexação polieletrólítica, considerando a carga residual de cada polímero (Carvalho *et al.*, 2021). A complexação polieletrólítica é baseada na formação de misturas de polieletrólitos de cargas opostas, sendo um ou mais poliânion (s) e um ou mais polication (s), de maneira que ocorre uma interação espontânea entre eles (De Moraes *et al.*, 2021).

Sendo assim, foram desenvolvidas NPs binárias, combinando os polímeros QS com AH ou HP e ternárias combinando QS, AH e HP em diferentes proporções (**Tabela 2**). O modo de preparo das mesmas foi baseado em metodologia desenvolvida por BONI e colaboradores, no qual os sistemas foram desenvolvidos por CPs e agitação constante em rotação média de 7000 rpm (Boni *et al.*, 2018). A ordem de adição variou de acordo com os componentes das formulações, nas formulações binárias sempre foi adicionado AH ou HP a solução de QS (**Figura 12a**) e, nas formulações ternárias primeiramente foi adicionada à QS a solução de AH e posteriormente, adicionou-se a solução de HP (**Figura 12b**).

Após o preparo, as NPs foram analisadas visualmente (análise macroscópica coloidal) quanto ao fenômeno de formação de turbidez, característica está indicativa de formação de nanopartículas (Cardoso *et al.*, 2021). Através desta análise, foi possível classificar as formulações como turvas e/ou ligeiramente turvas, límpidas e com formação de agregados macroscópicos (quando ocorre a formação de precipitados) e determinar quais as formulações iriam prosseguir nas próximas etapas do estudo, de acordo com o fenômeno de turbidez.

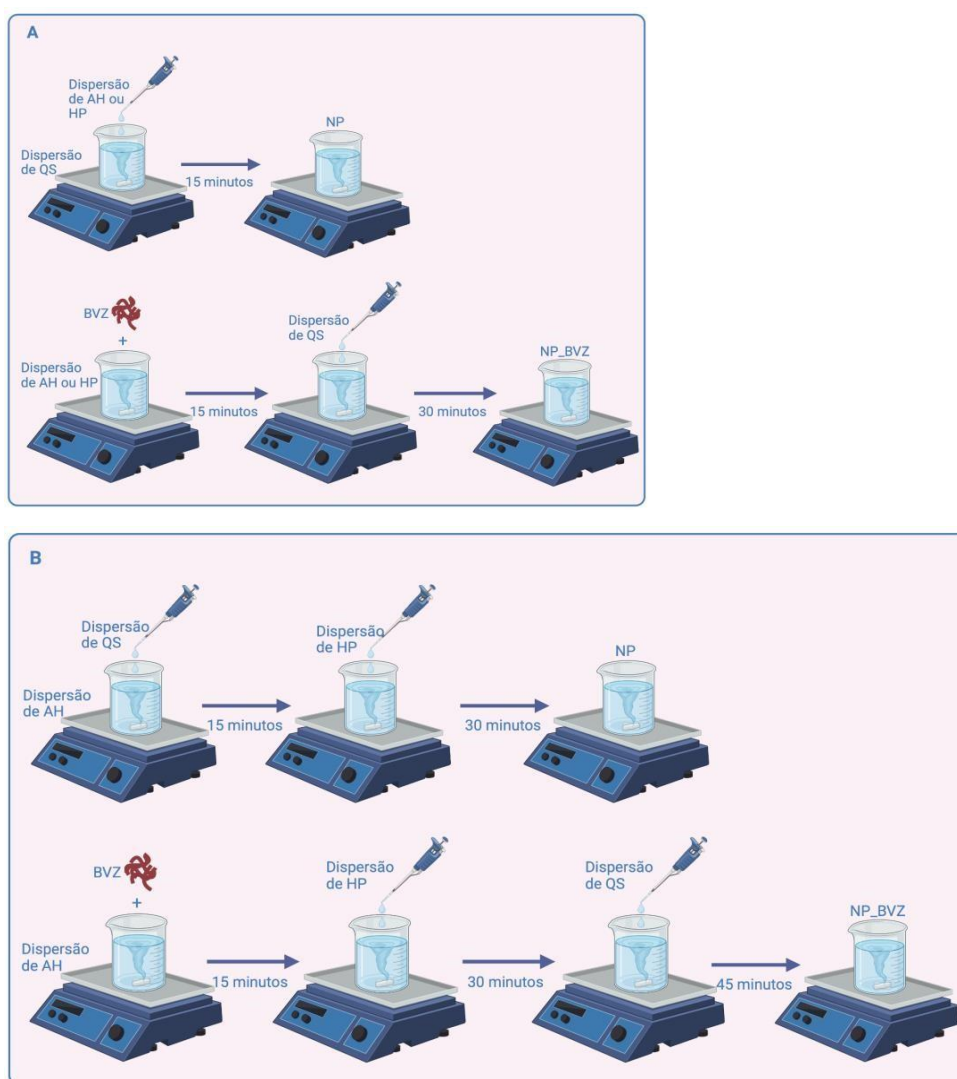
4.2.1.2.3. Incorporação do bevacizumabe (BVZ) as NPs

Após o desenvolvimento das NPs sem o fármaco, busca de dados literários e resultados experimentais obtidos, foi possível selecionar a concentração de 0,500 mg/mL de BVZ para incorporação as NPs. (Ugurlu *et al.*, 2019; Luis de Redín *et al.*,

2020; Luis de Redín et al., 2019; Lu et al., 2013; Ferreira et al., 2018; Sousa et al., 2017).

Em etapa posterior a definição da concentração adequada de BVZ para incorporação as NPs, foi realizada a adição de um volume adequado de BVZ, solução comercial de Avastin®, gota a gota sobre a solução de poliânion presente na formulação (AH ou HP). **(Figura 12)**, sendo que então a ordem de adição dos polieletrólitos foi modificada, em relação as NPs sem o fármaco, sendo adicionado BVZ ao poliânion e posteriormente adicionado a QS, nas NPs binárias **(Figura 12a)** e o BVZ adicionado ao AH, posteriormente adicionado o HP e por fim, a QS, nas NPs ternárias **(Figura 12b)**.

Figura 12 - Representação esquemática do processo de obtenção das nanopartículas binárias (A) e ternária (B), com e sem a incorporação do BVZ.



Fonte: Autoria própria.

4.2.1.3. Caracterização do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersibilidade e potencial zeta das nanopartículas poliméricas empregando o DLS

A análise por espalhamento de luz dinâmica das dispersões poliméricas, NPs e do BVZ foram realizadas utilizando equipamento de DLS, (Dynamic Light Scattering (DLS) - zetasizer Nano series, modelo - Zen 3600 (Malvern), sob a temperatura de 25°C, sem diluições.

Através dessa análise foi possível a obtenção dos valores de diâmetro hidrodinâmico da partícula (tamanho), índice de polidispersibilidade (Pdl) e potencial zeta (PZ) de cada formulação.

4.2.1.3.1. Análise do diâmetro médio hidrodinâmico e Pdl

O diâmetro médio hidrodinâmico e Pdl das NPs foram determinados através da técnica de DLS, em equipamento Zetasizer Nano-ZS sob temperatura ambiente (25°C) e ângulo de 173°. Através do movimento browniano é possível obter uma relação denominada de Stokes-Einstein (**Equação 1**), que é medida pelo movimento aleatório provocado pelas colisões entre as partículas. Os dados sobre o tamanho e Pdl foram obtidos através do Software Zetasizer nano ZS v7.11. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

$$Dh = \frac{KT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

Em que, Dh é o diâmetro hidrodinâmico, K a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta, η a viscosidade e D é o coeficiente de difusão.

4.2.1.3.2. Análise do potencial zeta das nanopartículas poliméricas

O PZ das dispersões de nanopartículas foi obtido pela equação de Smoluchwski (**Equação 2**) através da mobilidade eletroforética de partículas, em analisador de partículas Zetasizer Nano-ZS, em temperatura ambiente (25°C) e ângulo de 173°. Os dados de diâmetro médio e índice de polidispersibilidade foram obtidos com auxílio do Software Zetasizer nano ZS v7.11. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\epsilon} \quad (2)$$

Em que, ζ é o potencial zeta, μ está relacionado com a mobilidade eletroforética, η indica a viscosidade do meio dispersante e Σ constante dielétrica.

A carga de superfície das partículas pode variar de acordo com os parâmetros experimentais utilizados, como a proporção dos polímeros e presença de fármaco. A influência desses parâmetros foi avaliada para se encontrar as condições favoráveis e de maior estabilidade para o sistema desenvolvido.

4.2.1.4. Estudo de estabilidade das NPs selecionadas para incorporação do BVZ

Para o estudo de estabilidade foram realizadas a análise da estabilidade macroscópica visual e a caracterização de tamanho, Pdl e PZ das formulações selecionadas NPF5, NPF12, NPF17 e NPF5_BVZ, NPF12_BVZ e NPF17_BVZ através da técnica de DLS, por um período total de 60 dias, com medidas em intervalos quinzenais.

4.2.2. Validação da metodologia analítica para quantificação de BVZ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A validação analítica foi realizada em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), modelo 1220 Infinity LC (Agilent Technologies) com amostrador automático e detector de Fluorescência, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 280 nm e 360 nm, respectivamente, seguindo metodologia previamente descrita por Cardoso (Cardoso et al., 2021). Dado isso, foram avaliados os parâmetros de conformidade e linearidade do sistema, seguindo as normas preconizadas pela ANVISA (RDC nº 166, de 24 de julho de 2017).

As diluições foram obtidas a partir da solução padrão de BVZ 500 µg/mL em tampão fosfato de sódio pH 6,2 (51mM).

Os parâmetros utilizados para realização do teste estão listados na **tabela 3**.

Tabela 3 - Condições empregadas na metodologia analítica.

PARÂMETROS	
Fase estacionária	Coluna HPLC 250 x 4,6 um Phenomenex C18, mantida à 80°C.
Fase móvel	Água ultrapura (eluente A) e Acetonitrila (eluente B) ambos com 0,1% ácido trifluoroacético (TFA), nas proporções de 97:3 (v/v) em modo gradiente de 0 - 8 min, seguindo com modo isocrático até 13 min, até atingir a proporção 10:90 (v/v)
Fluxo	1,0 mL/min
Onda de excitação e emissão (fluorescência)	280 nm e 360 nm
Volume de injeção	20 uL
Temperatura	80 °C
Tempo de corrida	13 Min

Fonte: Autoria própria.

4.2.2.1. Linearidade do método cromatográfico

A linearidade do método foi determinada através da construção de uma curva analítica do BVZ (área do pico versus a concentração), partindo-se da solução estoque de BVZ (500 µg/mL). Foram preparadas 6 diluições que as concentrações variam entre 10 e 300 µg/mL (10, 20, 40, 100, 200 e 300 µg/mL), em triplicata.

A linearidade foi avaliada através da média dos valores obtidos e a equação da reta foi adquirida através do estudo da regressão linear utilizando– se o método dos mínimos quadrados.

4.2.2.2. Conformidade do método cromatográfico

A conformidade é um dos critérios a ser analisado para validação e revalidação de métodos analíticos, pois através dela é possível garantir que o método reproduza resultados confiáveis. Sendo assim, ela foi realizada através de seis injeções consecutivas da mesma amostra de BVZ na concentração padrão de 100 µg/mL, com o intuito de garantir que o parâmetro analisado se mantém nas injeções consecutivas.

Para esta análise foram considerados os parâmetros cromatográficos: tempo de retenção do fármaco (k) das áreas afins, fator de cauda (FC), números de pratos

teóricos (N) e simetria de pico (10%), todos fornecidos pelo software do equipamento de CLAE- modelo 1220 Infinity LC (Agilent Technologies).

4.2.3. Estudos de interação da MUC com as NPs e polímeros através da determinação de tamanho, PDI e PZ das NPs em titulador MPT-2, no DLS

As dispersões de MUC foram produzidas na concentração de 0,500 mg/mL no pH 5.0 e 7.4, estes valores de pH estão relacionados com o ambiente tumoral e o fisiológico, respectivamente. Foram preparadas diluições em tampão acetato de potássio pH 5.0 e tampão fosfato de sódio pH 7.4 para a obtenção da MUC em concentrações de 0,250 mg/mL; 0,125mg/mL e 0,0625 mg/mL. Após esta etapa, as dispersões de MUC nas diferentes concentrações foram caracterizadas e os parâmetros (tamanho de partícula, PDI e PZ) determinados para escolha da concentração de trabalho.

As NPs usadas nestes experimentos foram obtidas na concentração polimérica de 0,25 mg/mL, a fim de garantir que as modificações observadas fossem ocasionadas pelas diferentes proporções e combinações poliméricas diferentes e não pelas diferentes concentrações de polímeros presentes nas NPs.

Os estudos de mucomodulação foram realizados através da titulação de dispersão de mucina (MUC) com as formulações (NPF5_BVZ, NPF12_BVZ e NPF17_BVZ) e os polímeros isolados empregando titulador MPT-2 (Malvern), e a obtenção dos dados como PZ e tamanho de partícula foram obtidos através do DLS (Malvern).

O experimento de titulação foi conduzido em duplicata e os parâmetros (tamanho, PDI e PZ) foram avaliados em 7 pontos, representando concentrações crescentes de NPs adicionadas a dispersão de mucina. As formulações de NPs e as dispersões de MUC foram preparadas para uma concentração polimérica de 0,25 mg/mL.

Durante a titulação, o sistema mantém a dispersão de MUC sob agitação magnética e as medidas são realizadas para observar possíveis modificações de tamanho e PZ a cada adição de NPs ou polímeros, resultando em uma compreensão do comportamento das NPs ou polímeros quando em contato com a MUC.

4.2.4. Determinação da Eficiência de Associação do BVZ nas NPs

A quantidade de BVZ incorporado às NPs foi avaliada através do método indireto de quantificação, considerando a concentração de BVZ livre no sobrenadante. Assim, no dia posterior ao preparo das NPs, elas foram submetidas a centrifugação à 14.000 rpm em centrífuga (Thermo Scientific), em temperatura ambiente, por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e a proteína quantificada por CLAE, a partir da equação da reta da curva analítica obtida com método cromatográfico previamente validado. A determinação da EA (%) do fármaco nas nanopartículas foi calculada pela **Equação 3**.

$$EA\% = \frac{Mq - Ma}{Ma} \times 100 \quad (3)$$

Em que,

Mq = massa quantificada

Ma = total de massa adicionada

4.3. ENSAIOS CELULARES

Os ensaios celulares foram conduzidos no Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS), Escola de Medicina da Universidade do Minho, sob orientação da Dra. Marta Silvia Costa e Profa. Dra. Fátima Baltazar, com a colaboração das doutorandas Ana Silva e Mónica Cerqueira através da realização de um estágio de pesquisa no exterior (bolsa BEPE 2022/05904-4).

4.3.1. Cultura celular

Os estudos de viabilidade celular foram conduzidos em duas linhagens celulares: HUVEC, do *Inglês, Normal Primary Umbilical Human Vein Endothelial Cells*, como modelo de linhagem celular fisiológica e RKO como modelo de linhagem celular pouco diferenciada de cólon carcinoma, desenvolvida por Michael Brattain (“RKO | ATCC”, [s.d.]), como modelo de linhagem celular de câncer colorretal, mantidas em Incubadora (Hera Cell 150i, CO2 Incubator – Thermo Scientific) à 37°C em 5% de CO₂.

As células HUVEC foram mantidas em meio M199 (Pan Biotech®), suplementado com 10% soro bovino fetal, 1% de solução de penicilina/estreptomicina

(P/S) – Invitrogen®, USA e fatores de crescimento celular: 0,6% EGF, 0,6% FGF, 0,6% VEGF, 0,1% hidrocortisona – Endopan 3 (Suplement pack - PanBiotec®) em meio especial para células endoteliais M199 (P04-07050 PanBiotec®).

As células RKO foram mantidas em meio DMEM, do *Inglês*, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* - (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, do *Inglês*, *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco, Invitrogen, USA) e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, USA).

4.3.2. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada em placa de 96 poços (Corning, SPC Life Science Co, Ltd, Korea), utilizando densidade celular de 3×10^3 e 7×10^3 células por poço para linhagem RKO e HUVEC, respectivamente. Após 24 horas, foram retirados o meio de cultura de cada poço e adicionados 100 µL de cada um dos tratamentos realizados: BVZ 500 µg/mL, controle de tampão fosfato pH 6.2 51 mM, NPF17 e NPF17_BVZ, nas concentrações de 25 e 50 µg/mL de BVZ, respectivamente, por 24, 48 e 72 horas.

Após 24, 48 e 72 horas de exposição das células ao tratamento, as placas foram lavadas com 100 µL de tampão fosfato – PBS, do *inglês*, *Phosphate Buffer Saline* e, posteriormente, adicionados 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) e mantido à 4°C por cerca de 1 hora. Após esta etapa, a placa foi lavada com água destilada e levada a estufa à 37°C para secagem. Após a secagem, foi realizada a adição de 50 µL de corante Sulfarodamina B (SRB) e a placa foi mantida a temperatura ambiente por 30 minutos. Após isto, a placa foi lavada com ácido acético 1% e então levada para secagem em estufa à 37°C. Em uma próxima etapa, ocorreu a adição de 100 µL da solução de tris-base 10 mM, que se manteve em agitação por cerca de cinco minutos em agitador Edmund Bühler® GmbH - Germany.

Ao final de todo o procedimento foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro (Varioskan Flash – Thermo Scientific) nos comprimentos de onda de 490, 530 e 570 nm.

E a viabilidade foi determinada a partir da Equação 4.

$$Viabilidade_{celular}(\%) = \frac{F_{x100}}{F_{controle}} \quad (4)$$

Em que,

F: fluorescência medida em cada poço dos grupos experimentais

F_{controle}: fluorescência média do grupo controle

Os biopolímeros são muito importantes na área da medicina pois normalmente são biodegradáveis, biocompatíveis e não apresentam toxicidade (Singh; Shitiz; Singh, 2017).

4.4. Análise da atividade anti-angiogênica utilizando modelo membrana corioalantóica (CAM) em ovos de galinha

O teste de CAM foi desenvolvido em dois experimentos independentes entre si, realizados sob as mesmas condições, totalizando um n de 12 para o grupo controle, 19 para o grupo BVZ e 16 para o grupo NPF17_BVZ.

No dia 0, os ovos foram limpos com água ultrapura autoclavada e incubados à 37°C (Termaks® – Incubadoras de refrigeração, Suécia). No 3º dia de desenvolvimento, foi aberta uma pequena janela de acesso a CAM em cada ovo, analisada a viabilidade, descartando os que não se encontravam viáveis e retornando os ovos viáveis a incubadora. No 9º dia de desenvolvimento, as células cancerígenas, da linhagem RKO foram preparadas para um total de 2×10^6 células e homogeneizadas com 10 µL de Geltrex® (Thermo Scientific) para formação de um gel e assim, possibilitar a inserção das células tumorais na CAM.

No 13º dia desenvolvimento, foi realizada uma abertura maior na janela da CAM para possibilitar o registro de imagens dos tumores *in ovo* (Steriomicroscópio SZX16 – Olympus, Japão), antes do tratamento, e separá-los em 3 diferentes grupos: controle (tampão fosfato pH 6.2 51 mM – veículo do Avastin®), fármaco livre e NPF17_BVZ, sendo realizado o tratamento com 30 µl do fármaco livre, da NPF17_BVZ nas concentrações de 500 µg/ml e tampão fosfato pH 6.2 51 mM como controle negativo.

No 17º dia de desenvolvimento, foram coletadas imagens (Steriomicroscópio SZX16 – Olympus, Japão), com fonte de luz fria (KL2500 LCD – Zeiss, Germany) externa dos tumores *in ovo*. Após esta etapa, os ovos foram anestesiados com CO₂, por cerca de 15-20 minutos, e então, receberam uma alíquota formaldeído 4% e foram levados ao freezer -80°C por cerca de 15-20 minutos. Por fim, foram retiradas as membranas corioalantóicas de cada ovo e transferidas para

placas de 6 poços (SPL Life Science Co., Ltd., Korea), lavadas com PBS até a membrana estar límpida para a coleta de *ex ovo* (Steriomicroscópio SZX16 – Olympus, Japão), para contagem de vasos sanguíneos.

4.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida de análise de Turkey, para determinar quais grupos se diferenciam entre si, considerando um valor estatisticamente significativo para um $p < 0,05$, com auxílio do software *Origin 9.0* e *GraphPad Prism 5*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudos de pré-formulação

A avaliação dos valores de PZ das dispersões poliméricas é importante, pois permite que seja determinado as cargas residuais presentes nas dispersões no pH 6,0, pH em que o fármaco demonstra maior estabilidade estável (Tabela 4), principalmente se o processo de obtenção das partículas envolver a formação de CPs, que são formados a partir da interação entre cargas residuais opostas.

Tabela 4 - Análise físico-química das dispersões poliméricas de quitosana, ácido hialurônico e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose em pH 6 empregando o DLS.

Dispersões poliméricas	Concentração (mg/mL)	Tamanho (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)
Quitosana	0,5	133,3	0,931	10,7
Ácido hialurônico	0,1	848,9	0,601	-22,5
Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose	0,5	149,9	0,472	-7,47

Fonte: Autoria própria.

Após a caracterização das dispersões poliméricas, para caracterização das cargas residuais, as NPs foram sintetizadas e classificadas de acordo com o fenômeno de turbidez, definindo quais prosseguiriam no estudo para caracterização físico-química (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Análise macroscópica das formulações sem o fármaco

Nomenclatura	Proporção polimérica (m/m)	Aparência
NPF1	9QS:1AH	Ligeiramente turva
NPF2	7QS:3AH	Límpida
NPF3	6QS:4AH	Ligeiramente turva
NPF4	5QS:5AH	Ligeiramente turva
NPF5	1QS:9AH	Turva
NPF6	3QS:7AH	Formação de agregados
NPF7	4QS:6AH	Formação de agregados
NPF8	9QS:1HP	Ligeiramente turva
NPF9	7QS:3HP	Turva
NPF10	6QS:4HP	Turva
NPF11	5QS:5HP	Turva
NPF12	1QS:9HP	Turva
NPF13	3QS:7HP	Formação de agregados
NPF14	4QS:6HP	Formação de agregados
NPF15	2QS:4AH:4HP	Formação de agregados
NPF16	8QS:1AH:1HP	Turva
NPF17	5QS:2,5AH:2,5HP	Turva

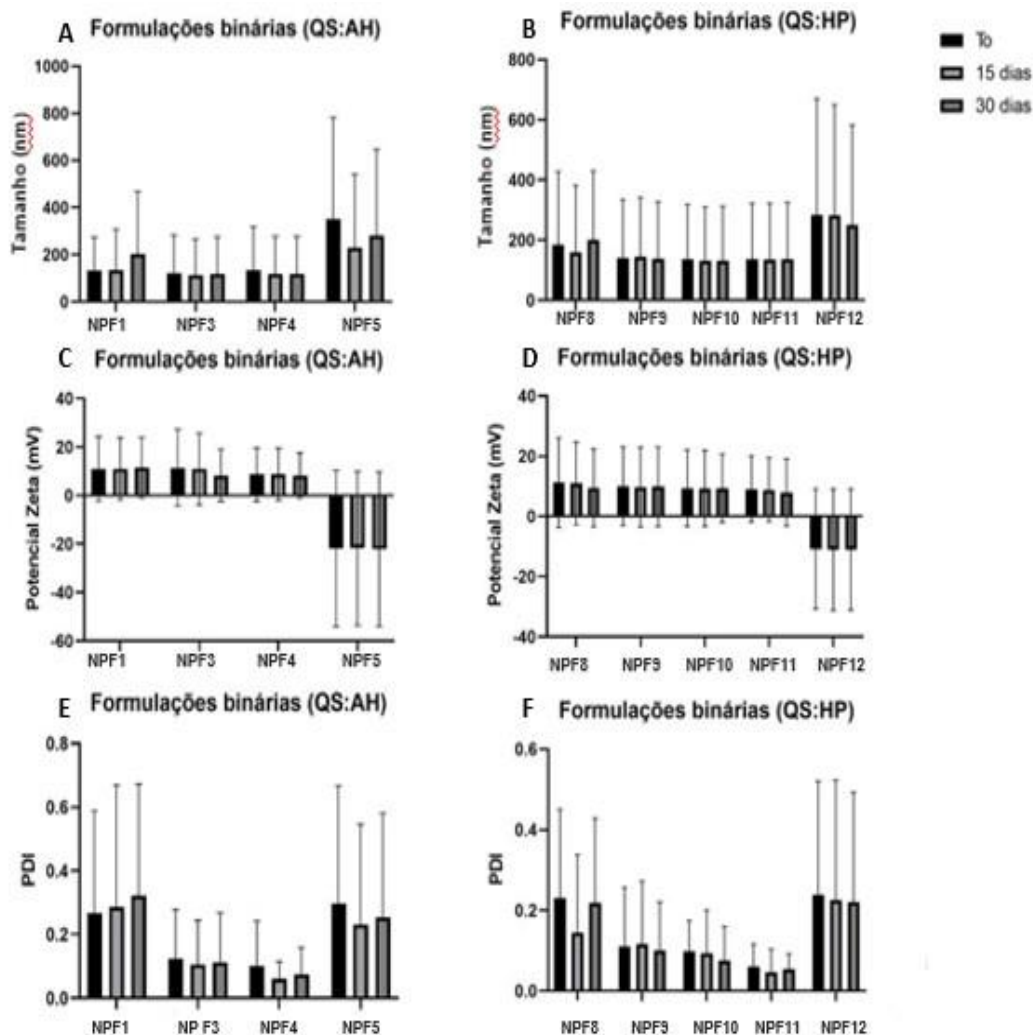
Fonte: Autoria própria.

As formulações que se apresentaram límpidas ou que formaram agregados/precipitados durante seu preparo, foram excluídas do estudo, pois a turbidez é utilizada como indicativo para a formação de NPs. Sendo assim, permaneceram no estudo, as formulações: NPF1, NPF3, NPF4, NPF5, NPF8, NPF9, NPF10, NPF11, NPF12, NPF16 e NPF17.

Ainda foi possível observar que as NPs binárias que continham 3 partes de polication para 7 partes de poliânion e aquelas que eram compostas por 4 partes de polication para 6 de poliânion apresentarem formação de agregados. As NPs binárias que apresentaram 1 parte de polication para 9 partes de poliânion formaram NPs (Item 4.2.1.2.2. e 4.2.1.2.3.).

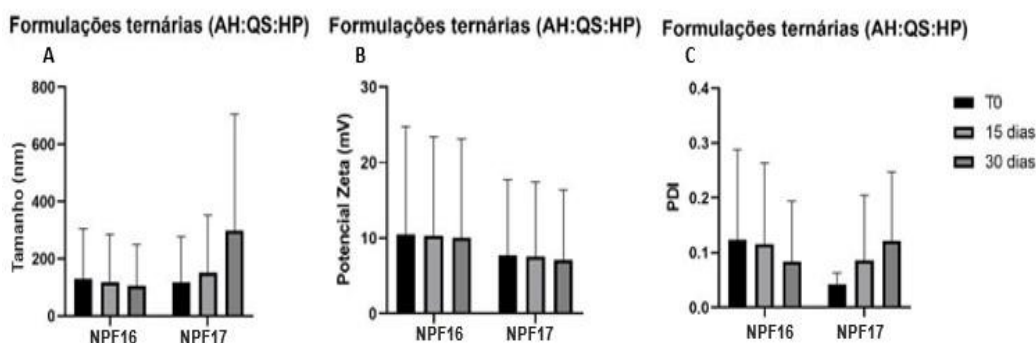
A partir disso, as formulações que permaneceram foram caracterizadas em DLS, para determinação de tamanho, PDI e PZ (Figura 11 e 12).

Figura 13 - Variação do tamanho, PDI e potencial zeta das NPS das formulações binárias



Fonte: Autoria própria.

Figura 14 - Variação do tamanho, PDI e potencial zeta das NPS das formulações ternárias



* os dados utilizados para construção dos gráficos foram a média e desvio padrão obtidos através do Software Zetasizer 7.0 - (zetasizer Nano series, modelo - Zen 3600 (Malvern)).

Fonte: Autoria própria.

As formulações binárias (**Fig.13**) contendo QS e AH (NPF1, NPF3, NPF4 e NPF5) em sua composição, demonstraram ter tamanho em torno de 150 nm, exceto a formulação NPF5 em que o tamanho se apresentou em torno de 400 nm. As formulações que continham QS e HP (**Fig.14**) (NPF8, NPF9, NPF10, NPF11 e NPF12) em sua composição demonstraram ter tamanho de aproximadamente 200 nm, exceto a NPF12 que apresentou tamanho em torno de 300 nm.

O PZ das nanopartículas binárias (**Fig.13**) se mantiveram em torno de + 15 mV, exceto das formulações NPF5 e NPF12 que apresentaram valores de - 20 mV e - 15 mV, respectivamente. Em relação ao PDI das formulações binárias (**Fig.14**), todas apresentaram valores abaixo de 0.3.

As formulações ternárias (NPF16 e NPF17) (**Fig. 14**), demonstraram tamanho de 150 nm e 300 nm, na NPF16 e NPF17, respectivamente. O PZ se manteve em torno de 10 mV e 15 mV. O PDI foi em torno 0.1 para ambas as NPs analisadas.

De um modo geral, as NPs binárias e ternárias demonstraram ser estáveis ao longo do tempo de análise (30 dias) de acordo com os parâmetros de tamanho, PZ e PDI.

Dessa forma, as NPs, tanto binárias quanto ternária, demonstraram uma tendência a distribuição homogênea de partículas, por possuírem valores de PDI inferior 0.3. Além disso, demonstram um PZ variando de 10 a 20 mV, em módulo, que

é um indicativo de não tendência a formação de agregados, devido a repulsão entre as partículas através das cargas residuais.

Após a caracterização físico-química das NPs pelo período total de 30 dias, em intervalos quinzenais, foi realizada a seleção das formulações mais promissoras para a incorporação do BVZ.

5.1.1. Efeito da incorporação de bevacizumabe nas formulações binárias e ternárias

As formulações selecionadas para incorporação do BVZ foram as formulações binárias que possuíam o PZ negativo. Essa característica é importante, devido seleção de processo de síntese das NPs por complexação polieletrólítica, uma vez que o BVZ possui PZ positivo no pH de preparo das formulações. Além das formulações binárias com PZ negativo, também foram escolhidas outras duas formulações binárias com o PZ positivo, NPF4 e NPF11, pois elas também haviam demonstrado formação de NPs, de acordo com o fenômeno de turbidez, e estabilidade ao longo do período analisado. Todas as formulações ternárias testadas apresentaram valores positivos de PZ. As formulações NPF16 e NPF17 foram mantidas no estudo de incorporação de BVZ.

Após a incorporação do BVZ nas formulações NPF4, NPF11 e NPF16, notou-se a formação de agregados, o que fez com que elas fossem eliminadas do estudo. A formulação NPF5_BVZ, NPF12_BVZ e NPF17_BVZ se tornaram turvas e, visualmente, sem formação de agregados, e, portanto, foram consideradas adequadas para continuar nos estudos e foram caracterizadas empregando o DLS, para determinação de tamanho, Pdl e PZ (**Tabela 6**).

O fenômeno de agregação ocorre durante o processo de síntese de NPs, devido a uma atração que pode ocorrer entre as NPs através das forças de Van der Waals ou ligações químicas (Zare, 2016).

Tabela 6 - Nomenclatura e composição das NPs

Formulação	Proporção polimérica (m:m)	Concentração de BVZ (mg/mL)
NPF5	1QS:9AH	0
NPF12	1QS:9HP	0
NPF17	5QS:2,5AH:2,5HP	0
NPF5_BVZ	1QS:9AH	0,500
NPF12_BVZ	1QS:9HP	0,500
NPF17_BVZ	5QS:2,5AH:2,5HP	0,500

Fonte: Autoria própria.

5.1.2. Estudo de estabilidade das formulações contendo o BVZ

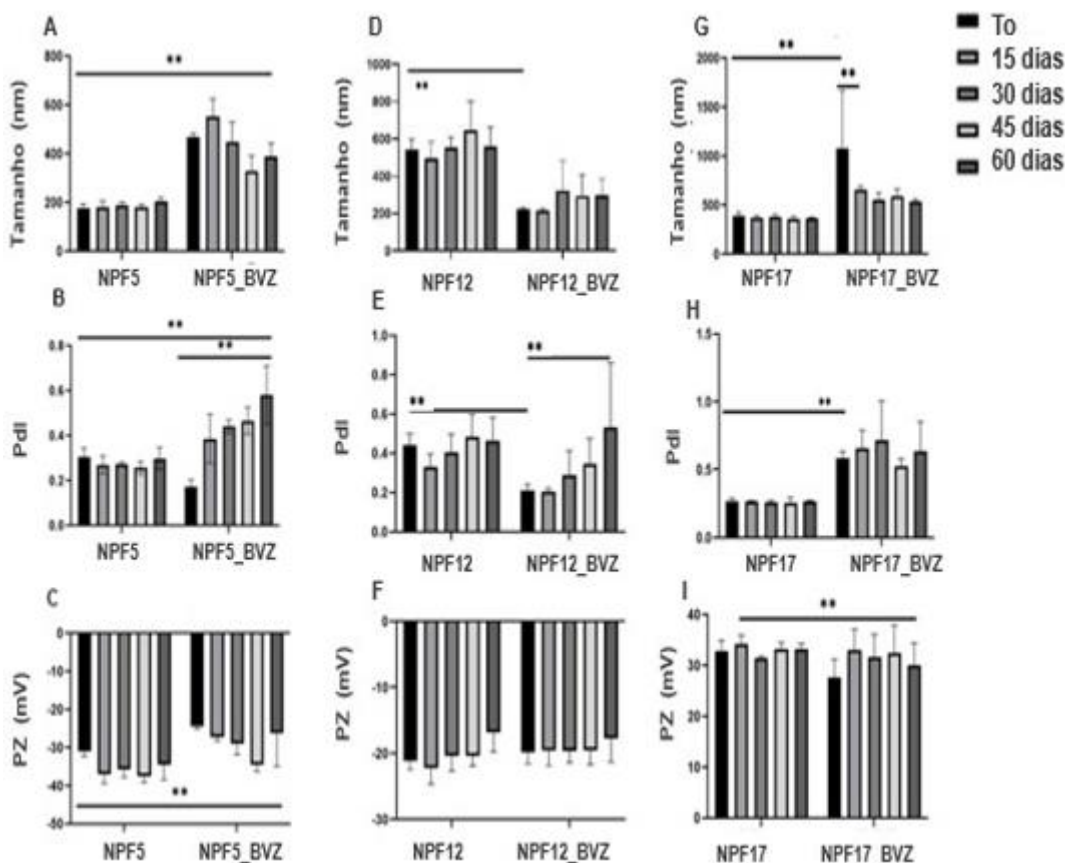
Um grande desafio para o desenvolvimento de NPs é a obtenção de NPs que possuam estabilidade físico-química adequada. A estabilidade encontra-se correlacionada com a preservação das propriedades da estrutura, composição, formato, tamanho, homogeneidade e carga residual (Phan; Haes, 2019).

Sendo assim, o estudo da estabilidade das nanopartículas através de técnicas que possuam a capacidade de garantir que são conservadas essas características estruturais descritas, são de suma importância.

Através da análise macroscópica visual das formulações NPF5_BVZ, NPF12_BVZ e NPF17_BVZ, foi possível notar que elas não formaram agregados ao longo do tempo (60 dias), demonstrando estabilidade macroscópica visual em função do tempo avaliado.

Na **figura 15** estão apresentados os dados comparativos das NPs sem e com a incorporação de BVZ.

Figura 15. Estudo de estabilidade das formulações NPF5 e NPF5_BVZ, NPF12 e NPF12_BVZ, e NPF17 e NPF17_BVZ, considerando **** p<0,05**. A) Tamanho de partícula na NPF5 e NPF5_BVZ; B) PDI na NPF5 e NPF5_BVZ; C) PZ da NPF5 e NPF5_BVZ; D) Tamanho de partícula na NPF12 e NPF12_BVZ; E) PDI na NPF12 e NPF12_BVZ; F) PZ da NPF12 e NPF12_BVZ; G) Tamanho de partícula na NPF17 e NPF17_BVZ; H) PDI na NPF17 e NPF17_BVZ; I) PZ da NPF17 e NPF17_BVZ.



Fonte: Autoria própria.

Os valores de PDI indicam a homogeneidade de tamanho de partículas presentes na amostra, quando estes valores se encontram acima de 0,500 indicam que as partículas podem formar agregados, diminuindo sua estabilidade (Mudholab; Seema; Peddhaabs, 2022).

Os valores de PZ, que são resultantes das cargas residuais da partícula, permitem determinar a estabilidade do nanossistema. Os valores próximos a 30 mV, em módulo, indicam uma boa estabilidade, pois as forças repulsivas dificultam a formação de agregados (Higazy *et al.*, 2021).

Através dos estudos desenvolvidos foi possível notar que ao incorporar o BVZ a NPF5 ocorreu um aumento de tamanho de, aproximadamente 2x (200nm para 400nm) (Fig. 15A), no PDI a mudança foi 3x (de 0,2 até chegar próximo de 0,6) (Fig. 15B) e, em relação ao PZ ocorreu uma diminuição em seu valor negativo de, aproximadamente - 40mV para - 30 mV (Fig. 15C). Os valores de PDI apresentaram uma mudança estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em função do tempo quando o BVZ foi incorporado.

O tamanho da NPF12 se manteve em torno de 600 nm e após a incorporação do BVZ, ocorreu uma diminuição no tamanho de 3x, diminuindo em torno de 200 nm (Fig. 15D), o PDI apresentou uma mudança de 3x, de aproximadamente, 0,2 para 0,6 durante o período de análise (Fig. 15E) e o PZ se manteve em torno de -20 mV antes e após a incorporação do BVZ (Fig. 15F).

O tamanho da NPF17 sofreu uma modificação, demonstrando um aumento de tamanho após a incorporação do BVZ se modificando de aproximadamente 400 nm (NPF17) para em torno de 600 nm (NPF17_BVZ) (Fig. 15G), o PDI se manteve em torno de 0,6 após a incorporação do BVZ na formulação (Fig. 15H) e o PZ se manteve em torno de - 30 mV (Fig. 15I).

Apesar de algumas características físico-químicas terem apresentados algumas modificações após a incorporação do fármaco (BVZ), tais como tamanho de partícula e PZ, elas não demonstraram mudanças estatisticamente significativas ($*p < 0.05$). A mudança no PDI após a incorporação do fármaco é com crescente aumento nos intervalos de tempo analisados (Figura 15E), demonstra que as partículas foram se tornando mais heterogêneas com o passar do tempo (Turanli; Acarturk, 2022). Porém, os valores de PZ se mantiveram em torno de 30 mV em módulo, indicando formulações fisicamente mais estáveis, pois há repulsão eletrostática entre as partículas, prevenindo a agregação (Parveen; Sahoo, 2010).

Semelhante ao que foi demonstrado no trabalho de BONI, devido as dispersões poliméricas de AH e HP possuírem densidade eletrônica negativa e o BVZ possuir densidade eletrônica positiva em pH 6.0, ocorre o favorecimento de interações eletrostáticas com o poliânion e, conseqüentemente sua incorporação no sistema, de acordo com a teoria de formação dos complexos polieletrólíticos. Sendo assim, as NPs binárias que possuíam a proporção de 1 de policação para 9 de poliânion formaram NPs e demonstraram possuir estabilidade coloidal pelo período analisados, segundo o critério de PZ (Vogel *et al.*, 2017).

5.2. VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE BVZ POR CLAE

Um método que seja adequado para quantificação de substâncias ativas é de suma importância para a avaliação de diferentes atributos de qualidade no desenvolvimento de novos sistemas de liberação (Ferreira *et al.*, 2020c). Sendo assim, os critérios utilizados para validar o método de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado para identificação do BVZ foram: linearidade e conformidade do método (Shabir, 2003; Sousa; Gonçalves; Sarmiento, 2017).

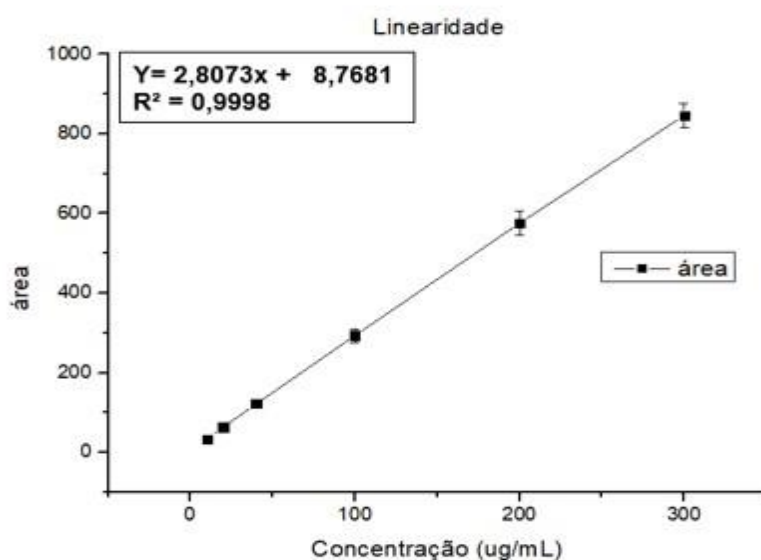
5.2.1. Linearidade do método analítico

A linearidade tem como objetivo garantir que o sistema seja capaz de quantificar a concentração, do analito em questão, através de uma relação da área sob a curva, dentro dos pontos determinados na curva analítica. A curva foi obtida através do método dos mínimos quadrados, onde a equação da regressão e o coeficiente de correlação (r^2) foram calculados a partir da equação 5 (**Figura 16**).

$$y = 2,8073x + 8,7681 (r^2 = 0,998) \quad (5)$$

Sendo que y = área do pico e x = concentração da solução padrão ($\mu\text{g/mL}$).

Figura 16 - Curva analítica do BVZ obtida a partir do método cromatográfico proposto



Fonte: Autoria própria.

Através do estudo é possível garantir que dentro da curva analisada os resultados sejam diretamente proporcionais a concentração do fármaco (“Farmacopeia Brasileira — Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa”, (2022); “ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures - Scientific guideline | European Medicines Agency”, (2022)).

Sendo assim, a linearidade obtida foi satisfatória, tendo como R^2 de 0.9998, sendo que o recomendado é que o R^2 seja maior do que 0,998 (Todoroki *et al.*, 2016).

5.2.2. Conformidade do método analítico

De acordo com o ICHQR2 e a RDC nº166, a conformidade do método analítico é um pré-requisito para que seja garantido que as condições do equipamento, condições analíticas e método validade estejam conformes com os seus requisitos, a fim de garantir a reprodutibilidade do sistema cromatográfico (“ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures - Scientific guideline | European Medicines Agency”, (2020); “Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Resolução da Diretoria Colegiada- RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017”, (2017)).

A conformidade do método analítico foi realizada através de seis injeções consecutivas de um analito na mesma concentração (100 µg/mL). A tabela 7 demonstra os valores encontrados ao realizar o teste de adequabilidade do sistema.

Através desse estudo, foram analisados os tempos de retenção, área do pico, fator de assimetria, fator de cauda e número de pratos para garantir que o método se encontra reprodutível (**Tabela 7**). O tempo de retenção é característico da substância analisada, a área do pico se dá através de diferentes áreas corresponde a diferentes concentrações (“Farmacopeia Brasileira — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa”, (2022)).

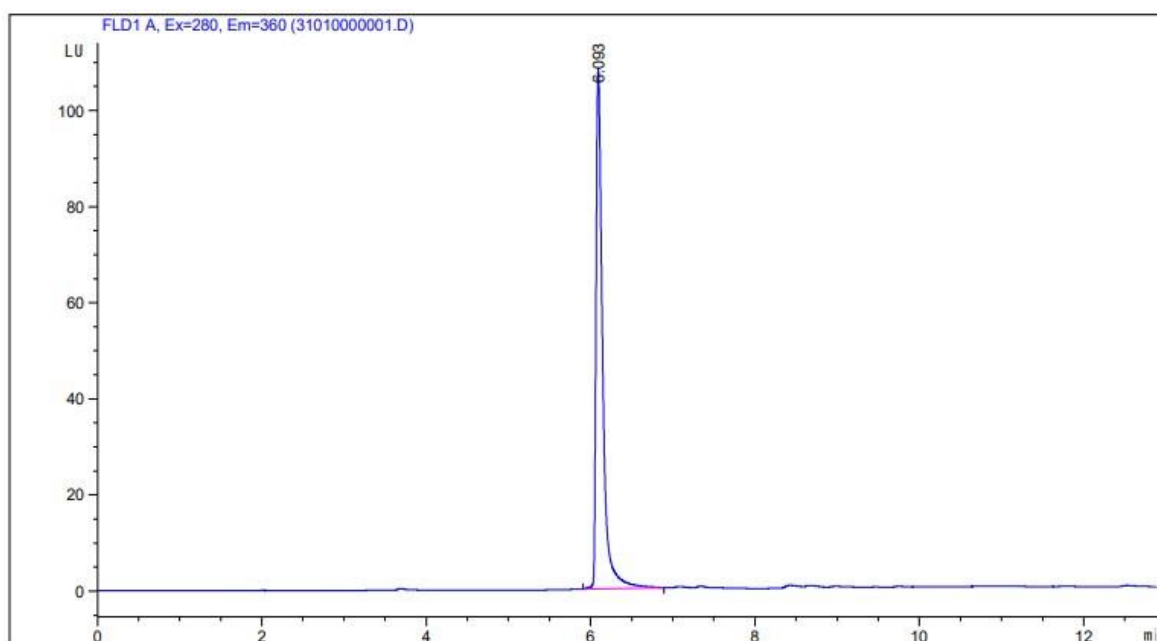
Tabela 7 - Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico

Parâmetros	Resultados	Critério de aceitação
Tempo de retenção do BVZ (min)	6,093 ± 0,005	-
Área do pico (A)	393,08542 ± 8,306951182	-
Fator de assimetria (10%)	1,36002 ± 0,012424305	≤ 2
Fator de cauda (T)	1,53235 ± 0,015930931	< 2
Número de pratos (N)	34189,5 ± 112,528663	N > 2000

*(SHABIR, 2003)

De acordo com o método cromatográfico desenvolvido, o pico que aparece no tempo de 6,093 ± 0,005 (**Figura 17**).

Figura 17 - Cromatograma do bevacizumabe (BVZ), na concentração de 100 µg/mL, utilizando detecção por fluorescência (λ excitação = 280 nm e λ emissão= 360 nm).



Fonte: Autoria própria.

O estudo de linearidade se demonstrou adequado, uma vez, que o R^2 foi maior que 0,998, demonstrando que a área sob a curva é crescente de acordo com o aumento da concentração do analito em questão. Os dados assim do estudo de

conformidade do método, que se encontram na **Tabela 7**, como o tempo fator cauda e número de pratos teóricos, que se demonstraram adequados.

Além disso, no cromatograma o pico correspondente ao BVZ apareceu no tempo de $6,093 \pm 0,005$ (**Figura 17**), bem próximo ao valor obtido por Cardoso, em sua validação do método de quantificação do BVZ através de CLAE. Demonstrando que o método se encontra adequado.

De acordo com os dados obtidos e levando em consideração as especificações contidas no Guia do Conselho Internacional de Harmonização da técnica de requisitos para produtos farmacêuticos de uso humano, ICHQ2(R2), do *Inglês*, “*INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE*” e Farmacopeia Brasileira N6. ed., foi possível concluir que o método de CLAE se encontra adequado para o uso pretendido.

5.3. Estudo de interação da mucina (MUC) com as NPs e polímeros isolados

O muco recobre todas as mucosas gastrointestinal, respiratória, oftálmica e genital, sendo responsável pela hidratação e lubrificação do epitélio, agindo como uma primeira barreira de proteção contra agentes externos. Em casos, de algumas doenças, como câncer, ele pode sofrer modificações em sua produção, composição de mucina e propriedades reológicas. Estas propriedades podem influenciar na difusão e a eficiência do fármaco (Onnainty *et al.*, 2021).

A mucoadesão é definida como a interação que ocorre entre a superfície de dois materiais, sendo um deles a mucosa, através de forças interfaciais por um determinado período (Brako *et al.*, 2018). A mucoadesão pode ocorrer através da combinação de diferentes mecanismos dos materiais e sistemas que possuem a capacidade de estabelecer ligações supramoleculares com os componentes do muco, como as moléculas de mucina, que podem facilitar a adesão do sistema ao muco. Por outro lado, a muco penetração adota uma lógica oposta, de maneira que se torna mais interessantes ausências de interações ou interações que permitam uma maior penetração do sistema (ex. eletrostáticas repulsivas, forças de hidratação etc.) (Ferreira *et al.*, 2018b). A mucina (MUC), componente majoritário presente no muco, é capaz de interagir com as moléculas hidrofílicas ou hidrofóbicas através de interações eletrostática, van der Waals e ligações de hidrogênio e, assim, modular a difusão dos fármacos (Butnarasu *et al.*, 2019).

Sendo assim, os sistemas mucoadesivos podem proporcionar boa disponibilidade no local de ação ou absorção (Shaikh *et al.*, 2011). Através do contato do muco com o sistema ocorre um aumento no tempo de permanência na mucosa, acarretando uma maior biodisponibilidade do fármaco e, conseqüentemente, melhorando sua eficácia clínica e reduzindo os efeitos colaterais (Boni *et al.*, 2018a).

O estudo de interação de mucina com as NPs é importante, pois pode possibilitar a compreensão do comportamento do sistema desenvolvido em nível molecular frente ao ambiente fisiológico (Nordgard; Draget, 2018).

Para avaliação da interação dos sistemas desenvolvidos com a MUC foi utilizado o DLS e realizada em dois valores de pH, pH 7.4 e pH 5.0, que representam o pH intestinal em condição saudável (fisiológica) e condição tumoral (doente), respectivamente (Nunes *et al.*, 2021).

5.3.1. Avaliação de diferentes concentrações mucina

A etapa de desenvolvimento do estudo de interação das formulações com a MUC se deu inicialmente através da caracterização das dispersões de MUC em diferentes concentrações. O diâmetro hidrodinâmico, assim como o PDI, são características importantes que devem ser consideradas durante a avaliação de agregados proteicos do tipo MUC-MUC e que são responsáveis pela estrutura supramolecular do muco.

A partir destes parâmetros pode-se inferir sobre possíveis interações entre sistemas de liberação e partículas de MUC que podem ser correlacionadas a propriedades intrínsecas da nano-biointerface (ex. nível de hidratação, grau de agregação, formação de corona proteica etc.). O PZ também foi utilizado como um dos parâmetros para definir a concentração de trabalho da MUC, pois em alguns estudos ele aparece como indicativo do tipo de comportamento que irá ocorrer entre polímeros ou partículas ao interagir com a MUC. Mudanças nos valores de PZ podem indicar que o nanossistema ou polímeros interagiram com as partículas de MUC, através de diferentes ligações intermoleculares, possibilitando um efeito muco modulatório, modificando a integração do fármaco com as partículas de MUC (Zaichik *et al.*, 2020).

O tamanho de partícula, assim como o PDI foram utilizados para a escolha da concentração de MUC, de trabalho. Em pH 7,4 as partículas de MUC apresentaram valores de tamanho menores que em pH 5.0. Os valores do PDI na menor

concentração de MUC, nos dois valores de pH, estão próximos de 1, o que indicam uma menor estabilidade e uma tendência a formação de agregados. A concentração de 0,25 mg/mL foi selecionada para a continuação dos estudos (**Tabela 8**), pois ela é a concentração que também é possível obter as NPs e assim, ter um comparativo da interação das NPs com as partículas de MUC, sem interferência do fator concentração polimérica das NPs.

Sendo assim, é possível conseguir avaliar o comportamento das partículas de MUC, com as mesmas concentrações dos diferentes nanossistemas.

Tabela 8 - Caracterização das dispersões de mucina em tamanho, PDI e PZ, em DLS, em pH 5.0 e pH 7.4

Concentração (mg/mL)	pH 5.0			pH 7.4		
	Tamanho (nm)	PDI	PZ (mV)	Tamanho (nm)	PDI	PZ (mV)
0,0625	2648 ± 1026	1,000 ± 0,000	-5,79 ± 0,962	1365 ± 497,9	0,942 ± 0,066	- 12,5 ± 1,34
0,125	1762 ± 197,8	0,538 ± 0,049	-6,49 ± 0,519	1636 ± 397,4	0,840 ± 0,242	- 9,81 ± 0,603
0,250	2293 ± 290,7	0,650 ± 0,180	-6,66 ± 0,131	1523 ± 289,1	0,854 ± 0,089	- 9,55 ± 0,365
0,500	2431 ± 54,0	0,477 ± 0,05	-6,06 ± 0,166	1542 ± 262,5	0,699 ± 0,150	- 8,69 ± 0,690

Fonte: Autoria própria.

5.3.2. Titulação em MPT-2 acoplado ao DLS

Existem diferentes técnicas para analisar a interação da MUC com as NPs ou polímeros, tais como: microscopia de força atômica, espalhamento de luz dinâmica, turbidimetria, dentre outras (Rinaldi *et al.*, 2020). Dentre elas, através da técnica do DLS é possível mensurar o tamanho e PZ das partículas de MUC resultantes da interação com os sistemas em estudo, ou seja, através da mudança de tamanho ou PZ das partículas de MUC pode-se inferir que está ocorrendo algum tipo de interação entre as moléculas de mucina e os polímeros/NPs (Szilágyi *et al.*, 2020).

Neste trabalho o uso do DLS acoplado ao titulador MPT-2 foi utilizado para análise do comportamento da MUC frente a concentrações crescentes de NPs ou polímeros isolados, baseado no trabalho de Ferreira e colaboradores (Ferreira *et al.*, 2023a, 2023b). De acordo com os dados obtidos, foi possível inferir como ocorrem as interações desses polímeros ou nanossistemas com a MUC, já que a MUC é o principal componente presente no muco.

Através das análises realizadas nos dois valores de pH que simulam o TGI fisiológico (pH 7.4) e tumoral (pH 5.0), foi possível notar que a interação do HP com a MUC promoveu uma diminuição de tamanho de partícula tanto em pH 7.4 (de 1200nm para 600 nm) (Fig. 18A), quanto no pH 5.0 (1600nm para 600 nm) (Fig. 19A), demonstrando comportamentos semelhantes. Não foram observadas alterações significativas nos valores de PZ ($p^* < 0.05$), os valores permanecendo na faixa de -11 em pH 7.4 (Fig. 18B) e na faixa de -7,8 em pH 5.0 (Fig. 19B).

Na interação das partículas de MUC com a dispersão de AH em pH 7.4, foi possível observar que ocorreu uma variação no valor de PZ (-10,8 para -15,0) (Fig. 18B) e uma diminuição do tamanho da partícula da escala micro para escala nano (1219 nm para 648 nm) (Fig. 19A) das partículas de MUC. Já em pH 5.0, foi possível observar que ocorreu um aumento negativo do PZ (-7,94 para -20,1) (Fig. 19B) e diminuição do tamanho de partículas de MUC (1963 nm para 1638 nm) (Fig. 19A).

Na interação das partículas de MUC com a dispersão de HP em pH 7.4 foi possível notar que, o tamanho das partículas de MUC reduziram em 2 x (1009,9 nm para 576,35 nm) e, em pH 5.0, ocorreu redução das partículas de MUC na mesma proporção, 2x (1762,5 nm para 968,15 nm). Em relação ao PZ das partículas de MUC, foi possível notar que independentemente do pH não foi possível notar modificações nos valores de PZ, uma vez que em pH 7.4 ele se manteve durante toda a análise em torno de -11 mV e em pH 5.0 o PZ se manteve em torno de -8 mV. Sendo assim, a interação das partículas de MUC com a dispersão de HP ocorreu de maneira semelhante em ambos os pHs analisados.

Na interação das partículas de MUC com a dispersão de QS, em pH 7.4 ocorreu uma diminuição do PZ negativo das partículas de MUC (-10,35 mV a 2,03 mV) (Fig. 18B). Em pH 5.0 ocorreu até uma inversão de cargas (-8,72 mV à + 3,98 mV) (Fig. 19B). Considerando o tamanho, ocorreu uma diminuição inicial no tamanho das partículas de MUC, passando da escala de micropartículas para a escala nanométrica, nos três primeiros pontos de titulação em ambos os valores de pH. Em pH 7.4 essa redução foi de 1353 nm para 355,95 nm (Fig. 18A) e em pH 5.0 essa redução foi de 1879 nm para 675,55 nm (Figura 19A), sendo que em ambas após o terceiro ponto demonstraram uma tendência de aumento de tamanho, retornando ao seu tamanho inicial antes da interação com as partículas de MUC com a QS.

A interação da QS, que possui carga residual positiva, com a MUC ocorre devido a interação de seus grupamentos amino presentes na estrutura da QS com os

grupamentos siálicos pertencentes à MUC através de interações, majoritariamente, eletrostáticas (Xavier Junior *et al.*, 2018). As ligações eletrostáticas fortes entre a MUC e a QS, possibilitaram a redução do tamanho de partícula (Hejjaji; Smith; Morris, 2018), além de inversão de cargas em pH 5.0 e tendência de carga a zero em pH 7.4, que pode ser indicativo da ocorrência de adsorção de partículas de QS à superfície das partículas de MUC, alterando a sua carga residual.

Sendo assim, nos dois valores de pH utilizada no estudo, é possível sugerir que ocorreram interações entre os polímeros AH, HP e QS com as partículas de MUC de maneira que foi observada redução tamanho de partícula de MUC. No entanto, na interação das partículas de QS com a MUC, é notado uma diminuição de tamanho das partículas de MUC inicial, que posteriormente tendem a aumentar novamente, que pode ser decorrente de interações supramoleculares (ligações de hidrogênio, Van der Waals, dentre outras) (Boni *et al.*, 2018).

O pH pode interferir na intensidade e nos tipos de interações supramoleculares que ocorrem entre os polímeros e as partículas de MUC. Pois, as mudanças de tamanho possuem amplitudes diferentes, já que em pH 5.0 ocorrem reduções bem menores do tamanho das partículas de MUC em presença de AH quando comparado com o HP. Já em relação a mudança nos valores de PZ, foi observada uma mudança apenas na interação do AH com a MUC, enquanto ao HP não houve mudança.

Portanto, pode-se inferir que o AH realiza interações mais fortes com a MUC, comparado ao HP. Enquanto a QS possui um perfil distinto, possivelmente por possuir um PZ positivo e realizar interações eletrostáticas com as partículas de MUC.

Ao analisar o comportamento do tamanho das partículas de MUC em contato com as NPs (NPF5_BVZ, NPF12_BVZ e NPF17_BVZ), foi possível observar que ocorreu uma diminuição (2x) do tamanho inicial das partículas de MUC (Figura 18C e 19C), independentemente do pH analisado. Em relação ao PZ, em pH 7.4 as formulações NPF5_BVZ e NPF17_BVZ se comportaram de forma semelhante, acarretando um aumento dos valores de PZ negativo das partículas de MUC e quando em contato com a NPF12_BVZ ocorreu uma pequena diminuição do PZ negativo da partícula de MUC (Figura 18D).

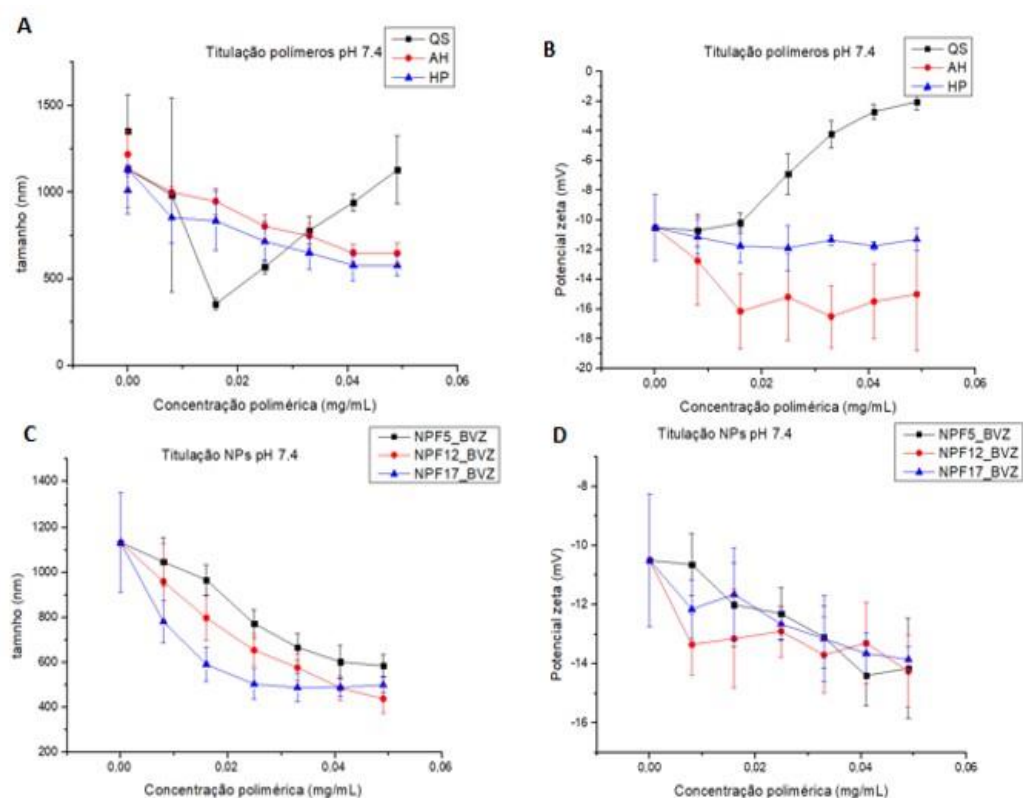
Por outro lado, em pH 5.0, as partículas de MUC ao entrar em contato com as NPs, demonstrou comportamentos distintos entre todas as formulações analisadas (NPF5_BVZ, NPF12_BVZ e NPF17_BVZ). Quando em contato com a NPF5_BVZ (Figura 19D), houve um aumento do PZ negativo semelhante. Os valores não

apresentaram mudanças significativas quando a MUC entrou em contato com a NPF12_BVZ (Figura 19D), concordando com o comportamento da MUC quando em contato com o HP. Por fim, a MUC demonstrou uma diminuição do PZ negativo quando em contato com a NPF17_BVZ (Figura 19D), tendendo a zero, semelhante ao comportamento da MUC quando em contato com a QS.

Considerando a mudança do comportamento em relação aos valores de PZ da MUC, em pH 5.0 e PH 7.4, quando em presença com as diferentes formulações, é possível concluir que as combinações e o pH de análise podem influenciar nos diferentes comportamentos observados. Uma vez que em pH 7.4, todos os sistemas se comportaram de maneira semelhante, com um aumento do PZ negativo, indicando que possivelmente pode ter ocorrido adsorção de partículas dos sistemas a superfície das partículas de MUC. E, no pH 5.0 as interações com a MUC com as formulações ocorrem de maneira semelhantes ao polímero isolado, presente nas formulações em maior proporção.

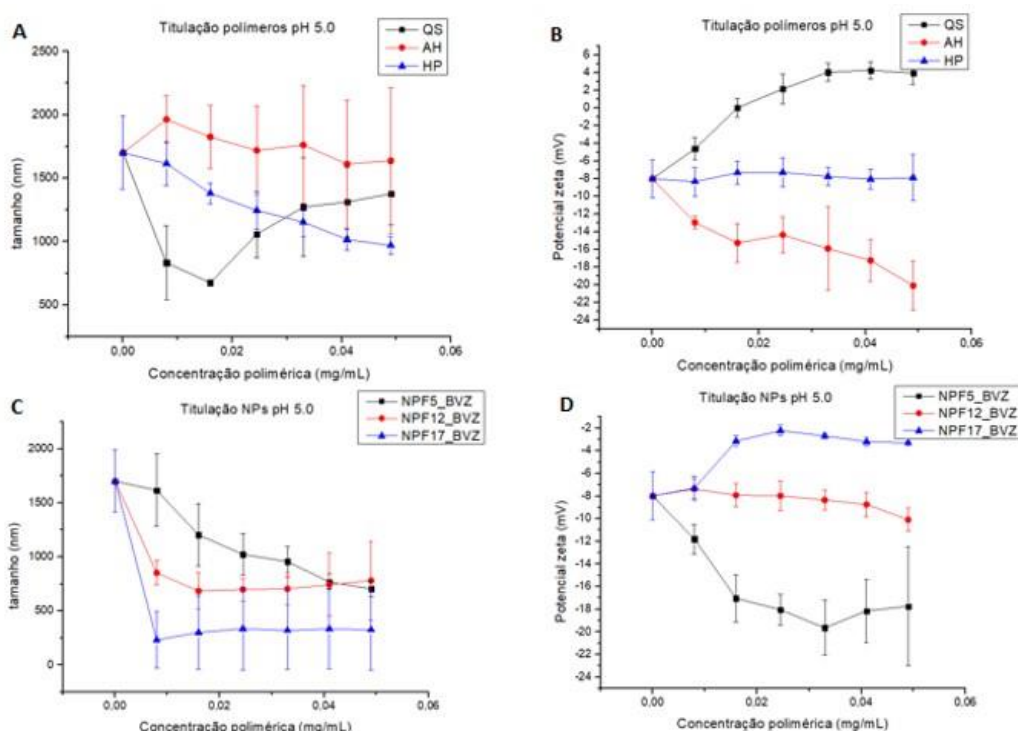
De maneira geral, considerando o conjunto de dados para todas as formulações avaliadas, é possível sugerir que o fenômeno de diminuição do tamanho das partículas de MUC quando interagiram com as NPs pode ter ocorrido por diferentes ligações tais como ligações não covalentes, hidrofóbicas, de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (Nordgard, Draget, 2018), que independente de sua natureza, resultam na alteração do tamanho das partículas de mucina (Szilágyi *et al.*, 2020).

Figura 18 - Propriedades coloidais da mucina na presença das formulações NPF5_BVZ, NPF12_BVZ e NPF17_BVZ e polímeros isolados em diferentes concentrações, em tampão fosfato **pH 7.4**, (5mM). As titulações foram realizadas por titulador MPT- 2 (Malvern) medindo-se os valores de PZ e tamanho, a cada adição da solução titulante (polímeros/formulações). A concentração inicial de MUC e de polímeros totais foram de 0,25 mg/mL. As curvas representam: (A) tamanho e (B) PZ da mucina com concentrações crescentes dos polímeros QS, AH e HP; (C) Tamanho e (D) PZ da mucina em diferentes concentrações de nanopartículas.



Fonte: Autoria própria.

Figura 19 - Propriedades coloidais da mucina na presença das formulações NPF5_BVZ, NPF12_BVZ e NPF17_BVZ e polímeros isolados em diferentes concentrações, em tampão fosfato pH 5.0, (5mM). As titulações foram realizadas por titulador MPT- 2 (Malvern) medindo-se os valores de PZ e tamanho, a cada adição da solução tituladora (polímeros/formulações). A concentração inicial de MUC e de polímeros totais foram de 0,25 mg/mL. As curvas representam o (A) tamanho e (B) PZ da mucina com concentrações crescentes dos polímeros QS, AH e HP; (C) Tamanho e (D) PZ da mucina em diferentes concentrações de nanopartículas.



Fonte: Autoria própria.

Levando em consideração que foi observado um comportamento distinto das NPs (NPF5_BVZ, NPF12_BVZ e NPF17_BVZ) nos diferentes valores de pH analisados e o fato de que em pH 5.0 a QS encontra-se com uma maior densidade de cargas eletrônicas positivas que diminui em pH 7.5, já o AH possui um aumento de sua densidade eletrônica com o aumento do pH e o HP mantém a sua densidade eletrônica em torno de -10 mV, independentemente do aumento do valor de pH (Boni, 2017).

Com tudo isso, levando em consideração a mudança dos valores de PZ das partículas de MUC quando em contato com as diferentes NPs, em pH 7.4, é possível

compreender que o comportamento observado é predominantemente direcionado pela densidade eletrônica negativa dos poliânions presentes nas NPs, resultando em um aumento do PZ negativo das partículas de MUC, independentemente da composição polimérica das NPs. Já em pH 5.0, é possível observar um comportamento distinto nos valores de PZ das partículas de MUC quando em contato com as NPs, predominando o comportamento semelhante ao notado quando as partículas de MUC entraram em contato com os polímeros isolados (dispersões poliméricas), presente em maior composição das NPs. Esse comportamento observado, pode ser explicado, pois quando em pH 5.0 a QS apresenta com uma maior densidade de carga eletrônica em pHs mais baixos, se tornando quase nulo em pH 7.4. O que explica o diferente comportamento observado da interação da partícula de MUC com a NPF17_BVZ em pH 7.4 e pH 5.0.

5.4. Desvendando a interação do BVZ com os polímeros

5.4.1. Estudando a interação do BVZ com os componentes das fórmulas

Embora existam vantagens no uso da terapia oral, tais como a fácil administração, ausência da necessidade de profissionais especializados e internação, dentre outros (Pridgen; Alexis; Farokhzad, 2014), as proteínas e peptídeos são altamente instáveis nos segmentos do TGI alto. As propriedades físico-químicas e biofísicas dos anticorpos, como grande tamanho, baixa solubilidade, instabilidade em altas temperaturas e tensão de cisalhamento podem causar instabilidade física (por exemplo, desdobramento e agregação) e química (por exemplo, hidrólise, desamidação e oxidação), resultando na desnaturação, agregação e inativação (Sadeghi *et al.*, 2020).

Adicionalmente, o desenvolvimento racional de sistemas para liberação pode atribuir habilidades específicas e moduladas para que atinja as necessidades terapêuticas específicas. Sendo assim, o uso de blendas de polissacarídeos naturais, como QS, polication e os poliânions AH e HP, pode fornecer habilidade como mucoadesão, melhor da permeabilidade intestinal, dentre outros (BONI *et al.*, 2018). A complexação polieletrólítica ocorre sob condições reacionais brandas, evitando o uso de solventes orgânicos e altas temperaturas (Kulkarni *et al.*, 2016; Taber; Umerska, 2015).

Devido a estabilidade do BVZ, o pH reacional selecionado foi 6.0 (Sousa; Sarmiento; Neves Petersen, 2017). Neste pH, o BVZ possui uma densidade de carga conhecida de +9 mV (Cardoso, 2019). Neste pH, o AH e HP apresentam carga negativa, sendo o potencial zeta do AH maior que o do HP. O potencial zeta da QS, neste valor de pH é cerca de +30 mV (Boni *et al.*, 2021). A interação do BVZ com os poliânions foi avaliada pela análise do tamanho, potencial zeta e Pdl. O fármaco, que é um dos polieletrólitos de carga positiva, foi adicionado às dispersões dos poliânions e agitados sob baixa tensão de cisalhamento. Esse processo foi racionalmente estabelecido para maximizar as interações entre fármaco-poliânion e preservar a estabilidade do fármaco. O tamanho da amostra composta por AH e BVZ foi menor que o apresentado com as amostras contendo HP. Os valores de PDI destas amostras apresentaram comportamentos semelhantes, sendo menor para a amostra com AH. O valor do PZ da amostra com AH foi, em módulo, maior que o observado com a amostra composta com HP. Este conjunto de dados sugere que a interação de BVZ com o AH é mais forte do que a com o HP. **(tabela 9).**

Tabela 9 - Interação do BVZ com os poliânions avaliada pela mudança no tamanho, PZ e Pdl das amostras.

Etapas de adição	Concentração poliânion (mg/mL)	Composição das nanopartículas				Tamanho (nm)	Pdl	PZ (mV)
		QS (mg/mL)	AH (mg/mL)	HP (mg/mL)	BVZ (mg/mL)			
AH + BVZ	0,99	0	0,099	0	0,500	281	0.7	-18,3
HP + BVZ	0,99	0	0	0,099	0,500	1600	0.9	-8,3

Fonte: Autoria própria.

Para a compreensão do efeito da incorporação de BVZ nas partículas contendo QS e AH ou HP, foram testadas duas concentrações poliméricas, 0,1 mg/mL e 0,5 mg/mL, mantendo a proporção entre os polímeros **(tabela 10)**. Quando comparada com a amostra contendo apenas AH **(tabela 9)**, houve um aumento no tamanho das partículas compostas com QS e AH, porém os valores se mantiveram na escala nanométrica, independentemente da concentração polimérica empregada. Na presença de QS, as partículas apresentaram um Pdl menor, 0.5, indicando que a presença deste polycation teve capacidade de aumentar a homogeneidade nas

partículas (Mudalige *et. al.*, 2019). Os valores de PZ foram -30 mV e -35 mV nas duas concentrações poliméricas analisadas.

Tabela 10 - Efeito da concentração polimérica nas propriedades físicas das partículas (tamanho, PZ e Pdl).

Etapas de adição	Concentração	Composição das nanopartículas				Tamanho (nm)	P dl	PZ (mV)
	polimérica (mg/mL)	QS (mg/mL)	AH (mg/mL)	HP (mg/mL)	BVZ (mg/mL)			
AH+ BVZ+QS	0,11	0,011	0,099	0	0,500	400	0.5	-30
AH + BVZ + QS	0,5	0,05	0,45	0	0,500	380	0.5	-35
HP + BVZ + QS	0,11	0,011	0	0,099	0,500	1100	0.7	15,5
HP + BVZ + QS	0,5	0,05	0	0,45	0,500	300	0.5	-20

Fonte: Autoria própria.

Na concentração polimérica de 0,1 mg/ml, as amostras contendo HP e QS o tamanho foi semelhante ao observado na amostra sem QS (1100 nm), já em concentração polimérica maior (0,5 mg/ML), ocorreu a formação de partículas na escala manométrica (380 nm) e homogêneas (Pdl de 0.5) e PZ de – 20 mV.

Dado isso, é possível sugerir que embora os dois polímeros possuam carga negativa, o AH possui capacidade de formar nanopartículas com o BVZ, independentemente da concentração polimérica, porém quando na presença de QS, ocorre uma maior estabilidade, devido uma formação de partículas mais homogêneas quando comparado a partícula formada apenas com AH e BVZ. Já a formação de partículas de BVZ e HP é dependente da concentração polimérica, sendo que em na concentração polimérica menor não ocorre a formação de nanopartículas, mesmo na presença de QS, e quando a concentração polimérica aumenta, ocorre a formação de partículas homogêneas e na escala nanométrica.

As amostras ternárias o BVZ foi adicionado primeiramente à dispersão de AH, tendo modificação apenas a ordem de adição da dispersão de HP. Foi possível notar que ao ser adicionado o HP após a adição do BVZ, ocorre uma formação de NP com tamanho menor que quando o HP é adicionado após a QS, com um PZ mais alto (+30 mV) comparado ao HP adicionado após a QS, e os valores de Pdl mostrando maior homogeneidade das partículas (**tabela 11**).

Tabela 11 - Efeito da ordem de adição da dispersão polimérica de HP da propriedades físico-químicas das partículas (tamanho, Pdl e PZ)

Ordem de adição do HP	Concentração polimérica das nanopartículas	Composição das nanopartículas				Size (nm)	PZ (mV)	Pdl
		BVZ (mg/mL)	QS (mg/mL)	AH (mg/mL)	HP (mg/mL)			
AH+BVZ+QS+HP	0,25 mg/mL	0,500	0,125	0,0625	0,0625	840	21	0.9
AH+BVZ+HP+QS	025 mg/mL	0,500	0,125	0,0625	0,0625	600	30	0.6

Fonte: Autoria própria.

Sendo assim, é possível compreender que as formulações compostas por AH e BVZ, formaram NPs homogêneas (Pdl = 0.5) (Mudalige *et al.*, 2019) e com baixa capacidade de formação de agregados (PZ = - 30 e - 35 mV) (Attama *et al.*, 2023), indicando ter boa estabilidade. Além disso, a ordem de adição do HP nas partículas ternárias, demonstrou ser um fator importante para a formação de NPs com características mais promissoras: partículas de tamanho menores, com maior PZ e menor Pdl quando o HP é adicionado após o BVZ, ao invés de após a QS.

5.4.2. Influência da concentração polimérica e da ordem de adição na Eficiência de Associação do BVZ as NPs

A eficiência de associação (EA%) é definida como a porcentagem de princípio ativo que se encontra incorporados às NPs. Esse parâmetro é de grande importância, pois encontra-se diretamente correlacionado com a eficácia terapêutica. A EA% pode ser influenciada por fatores como as propriedades físico-químicas dos polímeros e fármaco, método de encapsulamento e interações entre os materiais (carreadores e princípio ativo). Sendo que, quando são alcançados altos valores de EA% é possível que ocorra uma diminuição do efeito adverso e melhoria da eficiência terapêutica do fármaco no sistema desenvolvido (Fahmy *et al.*, 2023).

Para possível compreensão dos efeitos na concentração polimérica, foram testadas duas concentrações poliméricas, 0,1 mg/mL e 0,5 mg/mL, mantendo a proporção entre os polímeros, em duas NPs (NPF5_BVZ e NPF12_BVZ) **tabela 12**.

Tabela 12 - Efeito da concentração polimérica na EA% das nanopartículas binárias

Proporção polimérica	Concentração polimérica das partículas	Composição das partículas				EA %
		BVZ (mg/mL)	QS (mg/mL)	AH (mg/mL)	HP (mg/mL)	
1QS:9AH	0,11 mg/mL	0,500	0,11	0,099	0	71
	0,5 mg/mL	0,500	0,05	0,45	0	55
1QS:9HP	0,11 mg/mL	0,500	0,11	0	0,099	10
	0,5mg/mL	0,500	0,05	0	0,45	Nd*

Nd* = nada detectado

Fonte: Autoria própria.

O resultado observado na tabela 12, que ocorre uma diminuição da EA% com o aumento da concentração polimérica, pode indicar que mesmo aumentando a disponibilidade de sítios eletrônicos para a formação de partículas, a forma com que os polímeros se estruturam, pode diminuir estes sítios eletrônicos disponíveis para ligação.

Adicionalmente, foi realizado o teste de mudança na ordem de adição dos poliânions. Foram testadas duas ordens de adição: AH + BVZ + HP + QS e AH + BV + QS + HP. Através disso, foi possível notar não houve uma alteração da EA% do BVZ (**tabela 13**).

Tabela 13 - Efeito da ordem de adição das EA% das nanopartículas ternárias

Ordem de adição do HP	Concentração polimérica das partículas	Composição das partículas				EA %
		BVZ (mg/mL)	QS (mg/mL)	AH (mg/mL)	HP (mg/mL)	
AH+BVZ+QS+HP	0,25 mg/mL	0,500	0,125	0,0625	0,0625	2
AH+BVZ+HP+QS	0,25mg/mL	0,500	0,125	0,0625	0,0625	Nd*

Nd* = nada detectado

Fonte: Autoria própria.

Através dos dados obtidos, foi possível compreender que a capacidade de associação do BVZ as formulações NPF5_BVZ e NPF12_BVZ é inversamente proporcional a concentração polimérica dos poliânions, ou seja, quanto maior a concentração polimérica, menor a EA% do BVZ à NP. Esse fenômeno pode ter ocorrido devido a forma de rearranjo das partículas quando em maiores concentrações, por exemplo, algum tipo de enovelamento ou estrutura rígida, ou ainda pela disponibilidade de sítios eletrônicos negativos disponíveis para a ligação do BVZ, visto que, o AH e HP apresentam PZ diferentes.

Através disso é possível sugerir que embora as dispersões poliméricas em maior concentração possam apresentar mais sítios eletrônicos disponíveis para a ligação do BVZ, não ocorreu um aumento da EA% do BVZ as NPs. Além disso, a ordem de adição dos polímeros interfere na EA% do BVZ, como demonstrado na mudança da ordem de adição dos polímeros na NPF17_BVZ, embora não se tenha sido modificado a concentração polimérica na formulação.

5.5. ENSAIOS CELULARES

5.5.1. Cultura celular

Os ensaios em cultura celular são essenciais para o desenvolvimento de pesquisas na biologia e medicina (Aoki et al., 2016). Sendo que, a cultura celular em duas dimensões (2D) é definida como a forma de cultivo em frascos de vidro ou plástico, em que as células são cultivadas em um plano (Song *et al.*, 2023).

Através de estudos realizados em modelos celulares é possível compreender alguns aspectos metabólicos que acontecem perante a exposição das células a um composto ativo por um certo período (Fischer, 2023).

No trabalho desenvolvido, foram utilizadas as linhagens RKO e HUVEC. As células RKO é uma linhagem celular carcinoma de colón pouco diferenciada ("RKO - CRL-2577 | ATCC", [s.d.]). As células HUVEC é uma linhagem celular primária de células endoteliais das veias umbilicais humanas ("Primary Umbilical Vein Endothelial Cells; Normal, Human (HUVEC) - PCS-100-010 | ATCC", [s.d.]). Sendo que as HUVECs são utilizadas há bastante tempo como modelo *in vitro* para estudo de propriedades vasculares endoteliais ("Culture and Application of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) - ACCEGEN", 2021).

5.5.2. Viabilidade celular

A viabilidade celular é definida como a percentagem de células saudáveis presentes em uma amostra. Os ensaios de viabilidade celular/citotoxicidade são normalmente realizados para que seja possível compreender os efeitos do fármaco ou novos sistemas de liberação sobre a proliferação celular (Adan; Kiraz; Baran, 2016). Estes testes de viabilidade celular *in vitro* são muito importantes, pois permitem

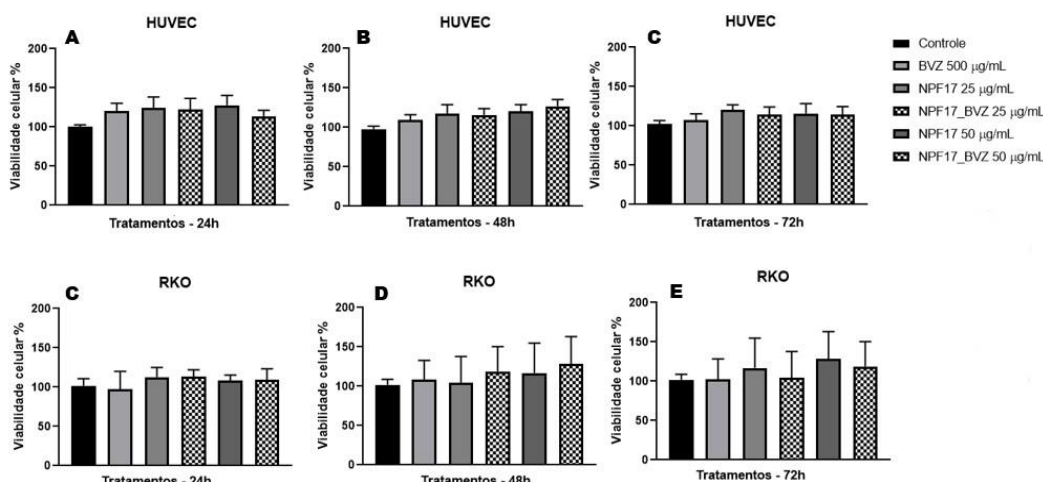
saber se os compostos testados são biocompatíveis (não tóxicos) para as células analisadas, antes de serem realizados os testes *in vivo* (Ramakrishna *et al.*, 2015).

O método de determinação de viabilidade celular de SRB é baseado na absorção do corante de aminoxantina (SRB), por aminoácidos presentes nas células. Sendo assim, após ocorrer a lise celular, através da fixação com TCA, quanto maior for a quantidade de células viáveis, maior será a intensidade da coloração em cada poço da placa (Houghton *et al.*, 2007).

As células endoteliais (CEs) são as primeiras células que enfrentam os tóxicos no lúmen sanguíneo, devido a isso, é importante garantir a ausência de toxicidade dos sistemas de liberação nas CEs. Dessa forma, as células HUVEC representam um dos modelos *in vitro* mais utilizados para essa finalidade (Javaheri Ghezeldizaj *et al.*, 2023). Além disso, durante o desenvolvimento do câncer colorretal, ocorre a liberação de fatores pró angiogênicos pelas células tumorais que se ligam aos receptores presentes nas CEs, promovendo a migração, proliferação, diferenciação e formação de novos vasos sanguíneos (Kim; Lee; Bae, 2019; Schellerer *et al.*, 2007). Sendo assim, as células HUVEC são consideradas relevantes para estudos que envolvam VEGF-A, uma vez que, as células endoteliais expressam receptores VEGF1 e VEGF2, receptores que participam no processo de progresso do tumor, sendo que o VEGF1 é expresso de maneira mais ampla (Fearnley *et al.*, 2014).

Os ensaios de viabilidade celular foram também conduzidos com uma linhagem de células neoplásicas de câncer de colón – RKO. A avaliação da viabilidade celular foi determinada frente a exposição ao BVZ (500 µg/mL), das NPF17 e NPF17_BVZ nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, e, tampão fosfato pH 6.2 51 mM, por 72 horas **(Figura 20)**. As concentrações das NPF17 e NPF17_BVZ foram de 25 e 50 µg/mL baseado em dados prévios da literatura.

Figura 20 - Efeito citotóxico do NPF17 e NPF17_BVZ nas linhagens celulares RKO e HUVEC. As células foram tratadas com tampão fosfato pH 6.2 51 mM (controle), BVZ livre (Avastin®) 500 µg/mL, NPF17 e NPF17_BVZ, ambas, nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, por 72 horas e sua viabilidade celular foi determinada através do método de SRB. Os dados estão expressos através de média e desvio padrão, através de três triplicatas independentes. (* $p < 0.05$)



Fonte: Autoria própria.

As células HUVEC (**Figura 20 (A, B, C)**), não apresentaram quaisquer mudanças estatisticamente significativa (* $p < 0.05$), nos tempos de 24, 48 e 72 horas e nos diferentes tratamentos aplicados. Dessa forma, percebe-se que a exposição dessas células ao BVZ, bem como as NPF17 e NPF17_BVZ não resultaram em modificações em termos de viabilidade celular.

A ausência de alterações na viabilidade celular dessa linhagem após os tratamentos avaliados pode estar correlacionada com o mecanismo de ação do BVZ, que age na redução de vasos sanguíneos e dessa maneira, não se verifica o efeito *in vitro*.

Além disso, é importante ressaltar que embora o BVZ iniba a ação de VEGF-A, pode ter ocorrido a ativação de outras vias de proliferação celular que não são dependentes da via de VEGF-A. Alguns estudos demonstram que existem vias alternativas para a proliferação celular ao bloqueio do VEGF, o que pode explicar a continua proliferação das células HUVEC (Li *et al.*, 2020). Quando os VEGF são inativados no microambiente tumoral, pode ser que sejam ativadas outras vias para suprimir essa inibição e permitir que o tumor se desenvolva, tais como: as vias de

Angiopoetina-2, Bombina Variegata Peptídeo 8, Fator de crescimento fibroblástico, Interleucina-1, Fator de crescimento derivado de plaquetas, Fator de crescimento de placenta, sinalização do fator de crescimento transformador- β , dentre outras (Itatani *et al.*, 2018).

As células RKO (**Figura 20 (D, E, F)**), linhagem de células de carcinoma de cólon, não sofreram qualquer alteração quanto a proliferação celular quando exposta ao BVZ e as NPF17_BVZ (25 e 50 $\mu\text{g/ml}$), quando comparada com o grupo controle. Não demonstrando mudanças estatisticamente significativas (* $p < 0.05$).

Esse comportamento das células RKO frente a exposição do fármaco BVZ pode ser compreendido como um mecanismo de resistência desenvolvido através da ativação de outras vias de crescimento e proliferação celular que alguns tumores sólidos podem desenvolver frente a terapias anti-VEGF, assim como o observado por Kang e colaboradores (Kang *et al.*, 2012). Adicionalmente, é possível correlacionar esse comportamento observado ao fenômeno da senescência celular observada observado através do uso de BVZ para tratamento de linhagem celular RKO, relatado por Hasan e colaboradores (Hasan *et al.*, 2011). O processo de senescência celular é caracterizado por um estado em que as células atingem interrupção do ciclo celular em resposta a diferentes estímulos, mas que permanecem vivas (Liu *et al.*, 2017).

Através do estudo de viabilidade celular *in vitro*, foi possível sugerir que as NPF17 e NPF17_BVZ são biocompatíveis em ambas as linhagens celulares (RKO e HUVEC), ou seja, não demonstraram interferência sobre a proliferação celular ou efeito citotóxico sobre as mesmas (**Figura 20 (A, B, C, D, E e F)**), uma vez que nos tempos de tratamento em que as células (RKO e HUVEC) ficaram expostas ao BVZ (500 $\mu\text{g/ml}$), controle, NPF17 e NPF17_BVZ, a viabilidade celular permaneceu em torno de 100%, não demonstrando mudanças estatisticamente significativas (* $p < 0.05$).

Desta maneira, observando os dados de viabilidade provenientes do tratamento com a NPF17 é possível inferir que o nanossistema desenvolvido não possui qualquer efeito citotóxico que seja capaz de influenciar na proliferação celular. Este é um dado muito importante, pois demonstra que qualquer efeito que possa ser notado nessas formulações, é possivelmente referente ao fármaco encapsulado. Ou seja, a matriz polimérica que faz parte da composição da NPF17 não interfere no metabolismo celular, sendo inerente a qualquer efeito observado pela NPF17_BVZ.

5.6. Avaliação da atividade antiangiogênica através do modelo de membrana corioalantóica do embrião de galinha (CAM, do Inglês, Choriallantoic Chick Embryo Membrane)

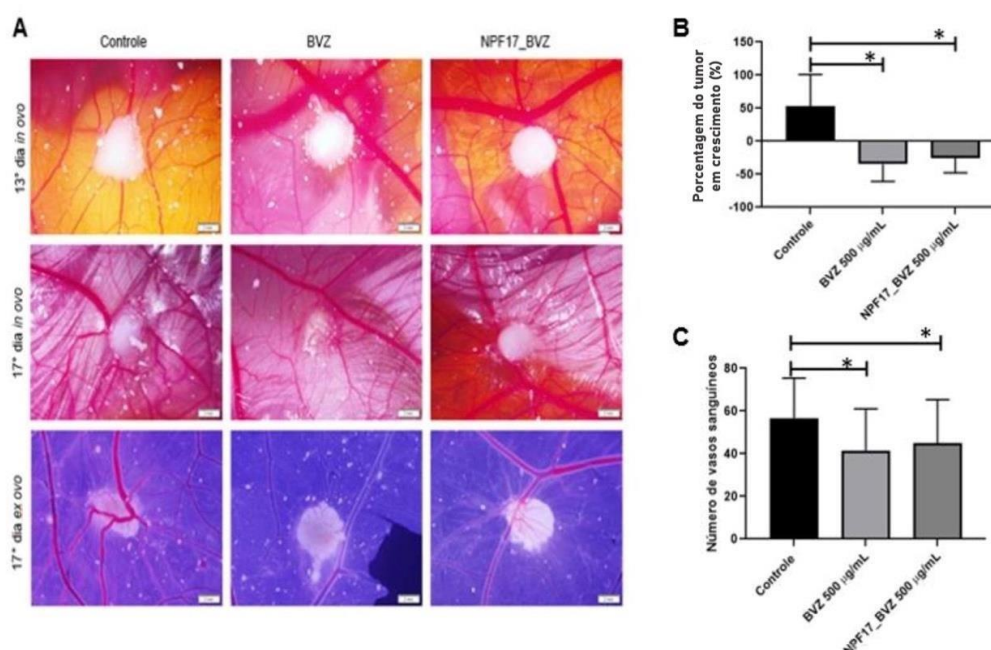
O teste de CAM foi desenvolvido em dois experimentos independentes entre si, realizados sob as mesmas condições em tempos diferentes, totalizando um n de 12 para o grupo controle, 19 para o grupo BVZ e 16 para o grupo NPF17_BVZ. O grupo controle foi realizado através do tratamento com o veículo presente na solução de BVZ comercial, Avastin®, tampão fosfato pH 6.2.

Para o desenvolvimento de um novo sistema de liberação de fármacos, é necessário que ele seja avaliado em termos de performance biológica. Como alternativa aos modelos animais, o modelo de CAM que é muito utilizado para a avaliação do desenvolvimento do tumor (Vu et al., 2018). Este modelo possui uma membrana altamente vascularizada (Ribatti, 2022). Uma das principais vantagens da CAM, em relação a outros modelos mamários *in vivo*, é sua fácil execução, reprodutibilidade, simplicidade e baixo custo, permitindo a avaliação da atividade angiogênica/anti-angiogênica (Victorelli et al., 2020).

É possível também implantar células tumorais e acompanhar o desenvolvimento do tumor, assim como a atividade antiangiogênica, o que é de suma importância quando se quer avaliar fármacos com atividade antitumoral (Kennedy et al., 2022; Merckx et al., 2020; Ribatti, 2022).

Sendo assim, o modelo de CAM foi utilizado no estudo para avaliar a atividade do BVZ livre e da NPF17_BVZ frente ao número de vasos sanguíneos e o perímetro tumoral, através da contagem de vasos sanguíneos das imagens obtidas *ex ovo* no 17º dia de desenvolvimento e medida da massa branca (que representa a massa tumoral) antes e após o tratamento. A medida de perímetro tumoral foi realizada através de imagens adquiridas *in ovo*, antes e após o tratamento, no 13º e 17º dia de desenvolvimento, respectivamente. No 17º de desenvolvimento, também, foram adquiridas imagens *ex ovo*, as quais foram utilizadas para a contagem de vasos sanguíneos (**Figura 21A**).

Figura 21 - Avaliação das NPF17_BVZ, BVZ no controle no crescimento tumoral e angiogênese. A) Imagens da CAM *in ovo* e *ex ovo* nos dias 13 (antes da exposição ao tratamento) e 17 (4 dias após a exposição ao tratamento) de desenvolvimento. B) Crescimento tumoral. Os resultados estão expressos pela média da percentagem de crescimento tumoral no dia 13 (dia do tratamento) e no dia 17 de desenvolvimento (após 4 dias de exposição ao tratamento) $\pm$ desvio padrão. C) Contagem de vasos sanguíneos *ex ovo* no 17 dia de desenvolvimento. (* $p < 0.05$)



Fonte: Autoria própria.

Através da observação das características dos vasos sanguíneos, é possível notar que os vasos dos grupos que foram expostos aos tratamentos de BVZ e NPF17_BVZ apresentaram vasos colapsados e uma quantidade menor de vasos sanguíneos em relação do grupo controle. Em relação ao perímetro tumoral, de maneira que foi possível notar que ocorreu uma diminuição em ambos os grupos tratados (NPF17_BVZ e BVZ livre) em relação ao grupo controle.

Através dos dados analisados dos perímetros tumorais foi possível notar que ocorreu um aumento de cerca de 1,2 x no perímetro tumoral no grupo que não recebeu tratamento (23,77 mm para 40,06 mm) em comparação com uma regressão de 0,62 a 0,82 x nos grupos que receberam tratamento (**Figura 21B**).

O número de vasos sanguíneos encontrados no grupo controle foi maior do que o número de vasos sanguíneos encontrados nos grupos que receberam os tratamentos (BVZ e NPF17_BVZ, ambos, na concentração de 500 µg/mL) (**Figura 21C**).

6. CONCLUSOES

Estudos de pré-formulação devem ser realizados para conhecer as características dos componentes das formulações. Vários parâmetros podem influenciar a formação de nanopartículas obtidas por complexação polieletrólítica, principalmente quando o fármaco apresenta propriedades físico-químicas, como alta massa molar, baixa solubilidade, instabilidade em altas temperaturas e tensão de cisalhamento podem causar como ocorre com anticorpos. Assim, a compreensão mais profunda dos parâmetros envolvidos no processo de formação de partícula e seus efeitos nas propriedades estruturais de tais sistemas é crucial para avançar na obtenção de sistema de liberação de fármacos com propriedades moduladas em relação a melhor resposta biológica.

Nesse sentido, é fundamental estudar os parâmetros que governam a formação das partículas. Diante dos dados de caracterização físico-química das NPs obtidos, foi possível concluir que o AH interage mais do que o HP com o BVZ.

Além disso, o parâmetro de EA% do BVZ as NPs, apresentou modificações inversamente proporcionais a concentração polimérica, ou seja, quanto maior a concentração polimérica, menor a EA% do BVZ as NPs. Nas partículas ternárias, ao modificar a ordem de adição dos polímeros HP e QS, também foi possível notar uma modificação na EA% de associação do BVZ aos sistemas, de maneira, que ao mudar a ordem de adição de AH + BVZ + HP + QS para AH + BVZ + QS + HP ocorreu uma diminuição da EA%.

As interações das NPs com o muco foram mimetizadas através de estudo de interação entre as NPs e MUC. O microambiente tumoral foi mimetizado através de dispersão de MUC em tampão acetato pH 5.0 e ambiente fisiológico, através de dispersão de MUC em tampão fosfato pH 7.4. Foi possível compreender que o pH pode modular as interações entre as NPs e a MUC, uma vez que em pH 5.0 a QS possui valores altos de PZ (+35 a +45 mV) e em pH 7,4 esses valores tendem a se reduzir, se tornando próximo de +10 mV. A forte redução no tamanho das partículas de MUC e a inversão de carga observada na presença da NPF17_BVZ em pH de microambiente tumoral, pH 5,0, possivelmente ocorreu através de interações eletrostática fortes com os grupamentos siálicos presentes na estrutura da mucina, uma vez que ela se encontra em maior proporção na composição desta formulação,

indicando uma possível adsorção de partículas de QS a superfície das partículas de MUC.

As NPF17 e NPF17_BVZ não demonstraram interferência na atividade biológica celular das linhagens celulares representativas de CCR (RKO) e comum (HUVEC). Além disso, demonstraram capacidade de manutenção da atividade biológica do BVZ, quando incorporado a NPF17, apresentando atividade antiangiogênica e capacidade de regressão tumoral, semelhante do BVZ livre.

Sendo assim, dentro dos objetivos traçados no presente trabalho, de avaliação da atividade muco moduladora e antiangiogênica das NPs baseadas em QS, HP e AH, contendo BVZ para potencial tratamento de CCR e com base em trabalhos realizados anteriormente pelo grupo, no qual foram utilizados o fármaco BVZ e os presentes polímeros utilizados para o desenvolvimento das NPs, é possível inferir que as NPs binárias compostas por AH ou HP e QS, na presença de BVZ se comportam de maneira distintas em pH tumoral (pH 5.0) e em pH fisiológico (pH 7.4) se comportam de maneira semelhante, indicando que o pH e a combinação polimérica possui grande influência sobre o comportamento das partículas de MUC quando em contato.

Além disso, o sistema ternário (NPF17_BVZ), composto pelos três polímeros, AH, HP e QS na presença de BVZ demonstrou grande capacidade de manutenção da atividade biológica do BVZ, demonstrando atividade antiangiogênica e antitumoral.

Diante disso, o presente trabalho conseguiu trazer para o grupo uma nova perspectiva sobre o estudo de atividade antiangiogênica assim como a avaliação da interação de nanossistemas com a MUC, que pode ser realizada através da técnica de titulação, permitindo uma avaliação concomitante da mudança de tamanho e PZ ao se aumentar a concentração dos nanossistemas a dispersão de mucina, permitindo um ensaio de nano – biointerface.

REFERÊNCIAS

ABD EL-HACK, M. E. *et al.* Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2726–2744, 1 dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32841671/>. Acesso em: 20 abr. 2023.

ABID, N. *et al.* Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 300, 102597, p.1-18, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102597>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001868621002384?via%3Dihub>. Acesso em: 13 fev. 2023.

ACCEGEN R&D TEAM. **Culture and Application of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)**. AcceGen, April, 1 2021. Disponível em: <https://www.accegen.com/recent-posts/culture-and-application-of-human-umbilical-vein-endothelial-cells-huvecs/>. Acesso em: 13 fev. 2023.

ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/77627> . Acesso em: 14 mar. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Farmacopeia Brasileira*. 6. ed. Brasília, DF: Anvisa, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>. Acesso em: 15 jun. 2023.

ALGHAMDI, M. A. *et al.* The Promise of Nanotechnology in Personalized Medicine. **Journal of Personalized Medicine**, v. 12, n. 5, 673, 1 maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/jpm12050673>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-4426/12/5/673> . Acesso em: 1 mai. 2022.

ALVES, A. DE C. S. *et al.* Organic nanocarriers for bevacizumab delivery: An overview of development, characterization and applications. **Molecules**, v. 26, n. 14, 4127, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26144127>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/14/4127>. Acesso em: 3 mai. 2023.

ALZAHIRANI, S. M. *et al.* 5Fluorouracil and capecitabine therapies for the treatment of colorectal cancer (Review). **Oncology reports**, v. 50, n. 4, p. 1–16, 1 out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.2023.8612>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2023.8612>. Acesso em: 13 jul. 2023.

AMERICAN CANCER SOCIETY. O que é câncer colorretal?. Disponível em: <https://www-cancer-org.translate.goog/cancer/types/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html? x tr sl=en& x tr tl=pt& x tr hl=pt& x tr pto=tc>. Acesso em: 11 jun. 2023.

ATCC – American Type Culture Collection. *RKO: ATCC catalog number CRL-2577*. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/crl-2577>. Acesso em: 13 fev. 2023.

ATCC – American Type Culture Collection. *Primary Umbilical Vein Endothelial Cells; Normal, Human (HUVEC) – PCS-100-010*. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/pcs-100-010>. Acesso em: 13 fev. 2023.

AOKI, S. *et al.* Progress in cell culture systems for pathological research. **Pathology International**, v. 66, n. 10, p. 554-562, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/pin.12443>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pin.12443>. Acesso em: 10 out. 2022.

BAI, Y. *et al.* Sequential delivery of VEGF, FGF-2 and PDGF from the polymeric system enhance HUVECs angiogenesis in vitro and CAM angiogenesis. **Cellular Immunology**, v. 323, p. 19–32, 1 jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.10.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008874917301831?via%3Dihub>. Acesso: 10 out. 2022.

BANG, S. H. *et al.* Preparation and characterization of composite gels and films containing gelatin and hydroxypropyl methylcellulose phthalate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 3, 39597, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.39597>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.39597>. Acesso em: 10 nov. 2022.

BIORENDER. Bevacizumab. Disponível em: <https://app.biorender.com/illustrations/620bad94a41471009ec1cd1a>. Acesso em: 10 set. 2023.

BONI, F. I. *et al.* Mucoadhesive nanostructured polyelectrolytes complexes modulate the intestinal permeability of methotrexate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 73-82, 2018a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.042>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928098717305341?via%3Dihub>. Acesso em: 30 jul. 2022.

BURIULI, M.; VERMA, D. Advanced Structured Materials. In: TRIPATHI, A.; MELO, J. (eds) **Advances in Biomaterials for Biomedical Applications**. Singapore: Springer, 2017. v. 66. ISBN: 978-981-10-3327-8. Acesso em: 23 ago. 2023.

CARDOSO, V. M. Sistemas mucoadesivos de gelatina/amido retrogradado destinados à liberação colônica do bevacizumabe para o tratamento do câncer colorretal. 2019. 204 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/entities/publication/863a41d7-24d7-430c-84cb-1631c8366f7d>. Acesso em: 13 jul. 2023.

CARDOSO, V. M. DE O. *et al.* Rational design of nanocarriers based on gellan gum/retrograded starch exploiting polyelectrolyte complexation and ionic crosslinking processes: A potential technological platform for oral delivery of bevacizumab. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 66, p.102765, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102765>. Disponível em: <https://www.scienc>

[cedirect.com/science/article/abs/pii/S1773224721004457?via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1773224721004457?via%3Dihub). Acesso em: 05 jun. 2022.

CARLSON, T. L.; LOCK, J. Y.; CARRIER, R. L. Engineering the Mucus Barrier. v. 20, p. 197–220. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-121156>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-bioeng-062117-121156>. Acesso em: 04 jun. 2023.

CARVALHO, S. G. *et al.* New insights into physicochemical aspects involved in the formation of polyelectrolyte complexes based on chitosan and dextran sulfate. **Carbohydrate Polymers**, v. 271, p. 118436, 1 nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118436>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861721008237?via%3Dihub>. Acesso em: 1 out. 2022.

CHANDRAN, S. P. *et al.* Nano drug delivery strategy of 5-fluorouracil for the treatment of colorectal cancer. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 2, p. 45–48, 1 jun. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.02.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2311300616301847?via%3Dihub>. Acesso em: 12 nov. 2022.

CHELLAPPAN, D. K. *et al.* The role of bevacizumab on tumour angiogenesis and in the management of gynaecological cancers: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 102, p. 1127–1144, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.061>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332218310060?via%3Dihub>. Acesso em: 13 out. 2022.

CHEN, D. S.; HURWITZ, H. Combinations of bevacizumab with cancer immunotherapy. **Cancer Journal** (United States), v. 24, n. 4, p. 193–204, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000327>. Disponível em: https://journals.lww.com/journalppo/abstract/2018/07000/combinations_of_bevacizumab_with_cancer.7.aspx. Acesso em: 20 out. 2022.

CHENG, H. *et al.* Mucoadhesive versus mucopenetrating nanoparticles for oral delivery of insulin. **Acta Biomaterialia**, v. 135, p. 506–519, 1 nov. 2021a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.08.046>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1742706121005791?via%3Dihub>. Acesso em: 25 out. 2022.

CHENG, Z. *et al.* Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 14, n. 1, 85, 2021b. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01096-0>. Disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-021-01096-0>. Acesso em: 20 ago. 2023.

CHOUDHURY, H. *et al.* Strategizing biodegradable polymeric nanoparticles to cross the biological barriers for cancer targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 565, p. 509–522, jun. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.042>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517319304016?via%3Dihub>. Acesso em: 23 abr. 2022.

DE MORAIS, S. C. *et al.* Evaluation of polyelectrolytic complexes based on poly(epichlorohydrin-co-dimethylamine) and poly(4-styrene-sulfonic acid-comaleic

acid) in the delivery of polyphosphates for the control of CaCO₃ scale in oil wells.

Journal of Molecular Liquids, v. 339, 11675, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116757>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167732221014811?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jul. 2023.

DE SOUZA, M. P. C. *et al.* Design of mucoadhesive nanostructured polyelectrolyte complexes based on chitosan and hypromellose phthalate for metronidazole delivery intended to the treatment of helicobacter pylori infections. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 12, 1211, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121211>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/12/1211>. Acesso em: 25 mai. 2022.

DEKKER, E. *et al.* Colorectal cancer. **The Lancet**, v. 394, n. 10207, p. 1467–1480, 19 out. 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(19\)32319-0/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(19)32319-0/abstract). Acesso em: 13 abr. 2022.

DODOU, D.; BREEDVELD, P.; WIERINGA, P. A. Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 1, p. 1–16, 1 maio 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.01.007>. Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641105000202?via%3Dihub>. Acesso em: 22 nov. 2022.

DOS SANTOS, A. M. *et al.* Oral delivery of micro/nanoparticulate systems based on natural polysaccharides for intestinal diseases therapy: Challenges, advances and future perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 334, p. 353-366, 2021b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.04.026>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365921001929?via%3Dihub>. Acesso em: 22 ago. 2022.

DOS SANTOS, A. M. *et al.* Understanding the role of electrostatic interactions on the association of 5-fluorouracil to chitosan-TPP nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 640, 128417, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128417>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927775722001716>. Acesso em: 23 nov. 2022.

DUDA, D. G. *et al.* VEGF-targeted cancer therapy strategies: current progress, hurdles and future prospects. **Trends in molecular medicine**, v. 13, n. 6, p. 223, jun. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.04.001>. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/abstract/S1471-4914\(07\)00065-2?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471491407000652%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/abstract/S1471-4914(07)00065-2?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471491407000652%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 22 out 2022.

ELAMIN, Y. Y. *et al.* Immune Effects of Bevacizumab: Killing Two Birds with One Stone. **Cancer Microenvironment**, v. 8, n. 1, p. 15, 18 out. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12307-014-0160-8>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12307-014-0160-8>. Acesso em: 10 jan. 2023.

ENG, C. *et al.* A comprehensive framework for early-onset colorectal cancer research. **The Lancet Oncology**, v. 23, n. 3, p. e116–e128, 1 mar. 2022. DOI:

[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00588-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00588-X). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(21\)00588-X/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(21)00588-X/abstract) . Acesso em: 21 jun. 2022.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY: Science Medicines Health, 2022. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures - Scientific guideline. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>. Acesso em: 15 jun. 2023.

FAHMY, O. M. *et al.* Machine learning algorithms for prediction of entrapment efficiency in nanomaterials. **Methods**, v. 218, p. 133–140, 1 out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2023.08.008>. Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046202323001378?via%3Dihub>. Acesso em: 2 out. 2023.

FAN, D. *et al.* Nanomedicine in cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy** v. 8, n. 1, p. 1–34, 7 ago. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01536-y>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01536-y>. Acesso em: 22 set. 2023.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS nano**, v. 3, n. 1, p. 16–20, jan. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/nn900002m>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn900002m>. Acesso em: 10 out. 2022.

FEARNLEY, G. W. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor A-Stimulated Signaling from Endosomes in Primary Endothelial Cells. **Methods in Enzymology**, v. 535, p. 265–292, 1 jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397925-4.00016-X>. Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012397925400016X>. Acesso em: 24 nov. 2022.

FENG, Q. P. *et al.* Oral administration co-delivery nanoparticles of docetaxel and bevacizumab for improving intestinal absorption and enhancing anticancer activity. **Materials Science and Engineering C**, v. 124, 112039, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112039>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493121001788?via%3Dihub>. Acesso em: 15 jan. 2023.

FERREIRA, L. M. B. *et al.* Exploiting supramolecular interactions to produce bevacizumab-loaded nanoparticles for potential mucosal delivery. **European Polymer Journal**, v. 103, p. 238-250, 2018a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.04.013>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014305718304683?via%3Dihub>. Acesso em: 23 ago. 2022.

FERREIRA, L. M. B. *et al.* Design of chitosan-based particle systems: A review of the physicochemical foundations for tailored properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, 116968, 2020b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116968>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861720311413?via%3Dihub>. Acesso em: 30 ago. 2022.

FERREIRA, L. M. B. *et al.* Understanding mucus modulation behavior of chitosan oligomers and dextran sulfate combining light scattering and calorimetric observations. **Carbohydrate Polymers**, v. 306, p. 120613, 15 abr. 2023a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120613>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861723000772?via%3Dihub>. Acesso em: 24 ago. 2023.

FERREIRA, N. N. *et al.* Validation of an innovative analytical method for simultaneous quantification of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid and the monoclonal antibody cetuximab using HPLC from PLGA-based nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 190, 113540, 2020c. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113540>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708520314266?via%3Dihub>. Acesso em: 25 mai. 2022.

FILIPPO, L. D. DI *et al.* A Critical Review of Biological Properties, Delivery Systems and Analytical/Bioanalytical Methods for Determination of Bevacizumab. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 445-453, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1743641>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408347.2020.1743641>. Acesso em: 15 jun. 2022.

FISCHER, M. Physiological media advance cell culture experiments. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 48, n. 2, p. 103–105, 1 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.08.007>. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/fulltext/S0968-0004\(22\)00232-8?returnURL=https%3a%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0968000422002328%3Fshoall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/fulltext/S0968-0004(22)00232-8?returnURL=https%3a%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0968000422002328%3Fshoall%3Dtrue). Acesso em: 22 jul. 2023.

GARCIA, J. *et al.* Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. **Cancer Treatment Reviews**, v. 86, p. 102017, 1 jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102017>. Disponível em: [https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372\(20\)30055-4/fulltext](https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372(20)30055-4/fulltext). Acesso em: 27 ago. 2022.

GAVAS, S.; QUAZI, S.; KARPIŃSKI, T. M. Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. **Nanoscale Research Letters**, v. 16, n. 1, p. 173, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03628-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s11671-021-03628-6>. Acesso em: 22 mar. 2022.

GENEVE, N. *et al.* Colorectal Cancer Screening. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 46, n. 1, 135-148, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.11.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0095454318301076?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago. 2022.

GEORGE, A.; SHAH, P. A.; SHRIVASTAV, P. S. Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 561, p. 244-264, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm>

.2019.03.011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517319301887>. Acesso em: 1 ago. 2022.

GIATROMANOLAKI, A.; SIVRIDIS, E.; KOUKOURAKIS, M. I. Angiogenesis in colorectal cancer: Prognostic and therapeutic implications. **American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials**, v. 29, n. 4, p. 408-417, August 2006. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.coc.0000221317.56731.4e>. Disponível em: https://journals.lww.com/amjclinicaloncology/abstract/2006/08000/angiogenesis_in_colorectal_cancer_prognostic_and.16.aspx. Acesso em: 15 nov. 2022.

GOLSHANI, G.; ZHANG, Y. Advances in immunotherapy for colorectal cancer: review. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 13, p. 1-11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1177/1756284820917527>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1756284820917527>. Acesso em: 23 set. 2022.

GOVERNMENT OF CANADA. Colorectal cancer. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/chronic-diseases/cancer/colorectal-cancer.html>. Acesso em 29 mai 2023.

GRAHAM, T. A.; SOTTORIVA, A. Measuring cancer evolution from the genome. **The Journal of Pathology**, v. 241, n. 2, p. 183–191, 1 jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.4821>. Disponível em: <https://pathsocjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.4821>. Acesso em: 15 ago. 2022.

HABEEB, M. *et al.* Strategies of nanomedicine for targeting the signaling pathways of Colorectal cancer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 84, p. 104487, 1 jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104487>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1773224723003398?via%3Dihub>. Acesso em: 23 ago. 2023.

HARISH, V. *et al.* Nanoparticle and Nanostructure Synthesis and Controlled Growth Methods. **Nanomaterials**, v. 12, 18, p. 3226, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano12183226>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/12/18/3226>. Acesso em: 12 de ago. 2023.

HARRER, D. *et al.* Is hyaluronic acid the perfect excipient for the pharmaceutical need?. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, 120589, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.iijpharm.2021.120589>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037851732100394X?via%3Dihub>. Acesso em: 15 mai. 2022.

HASAN, M. R. *et al.* Inhibition of VEGF induces cellular senescence in colorectal cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 9, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.26179>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.26179>. Acesso em: 23 jan. 2023.

HASBULLAH, H. H.; MUSA, M. Gene Therapy Targeting p53 and KRAS for Colorectal Cancer Treatment: A Myth or the Way Forward? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, 1 nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms2>

22111941. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11941>. Acesso em: 11 nov. 2022.

HAUSMAN, D. M. What Is Cancer? **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 62, n. 4, p. 778–784, 1 set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1353/pbm.2019.0046>. Disponível em: <https://muse.jhu.edu/article/740322>. Acesso em: 23 mar. 2022.

HAYDON, A. M. M.; JASS, J. R. Emerging pathways in colorectal-cancer development. **Lancet Oncology**, v. 3, n. 2, p. 83–88, 1 fev. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(02\)00649-6](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(02)00649-6). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(02\)00649-6/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(02)00649-6/abstract). Acesso em: 23 fev. 2022.

HARVARD HEALTH PUBLISHING: Harvard Medical School. Colorectal cancer. Disponível em: <https://www.health.harvard.edu/cancer/colorectal-cancer-a-to-z>. Acesso em: 24 abri 2023.

HIGAZY, I. M. *et al.* Development and evaluation of polyvinyl alcohol stabilized polylactide-co-caprolactone-based nanoparticles for brain delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, 102274, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102274>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S177322472031563X>. Acesso em: 22 set. 2023.

HOSHYAR, N. *et al.* The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. **Nanomedicine**, v. 11, n. 6, p. 673–692, 1 mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.2217/nnm.16.5>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2217/nnm.16.5>. Acesso em: 22 out. 2022.

HOUGHTON, P. *et al.* The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, (San Diego, CA) v. 42, n. 4, p. 377–387, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046202307000060?via%3Dihub>. Acesso em: 4 fev. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estatísticas de câncer. O que é câncer? Rio de Janeiro, RJ: Inca. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br>. ITATANI, Y. *et al.* Resistance to anti-angiogenic therapy in cancer alterations to anti-VEGF pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, 1232, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19041232>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/4/1232>. Acesso em: 22 jan. 2023.

JAIN, R. K.; CHAUHAN, V. P.; DUDA, D. G. Vascular and interstitial biology of tumors. In: NIEDERHUBER, J. E. *et al.* **Abeloff's clinical oncology**. 5. ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2013. p. 108–126.e6. ISBN 978-1455728817.

JAVAHERI-GHEZELDIZAJ, F. *et al.* In vitro safety assessment of alkyl lactate esters in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Toxicology Reports**, v. 10, p. 11–16, 1 jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.11.008>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214750022002219?via%3Dihub>. Acesso em: 3 mar. 2023.

KANG, H. N. *et al.* Abrogation of Gli3 expression suppresses the growth of colon cancer cells via activation of p53. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 5, p. 539-549, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.12.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014482711004812?via%3Dihub>. Acesso em: 3 mar. 2023.

KARLSSON, J.; VAUGHAN, H. J.; GREEN, J. J. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Therapeutic Cancer Treatments. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 9, p. 105–127, 7 jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060817-084055>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-chembioeng-060817-084055>. Acesso em: 24 fev. 2022.

KENNEDY, D. C. *et al.* Microvascular experimentation in the chick chorioallantoic membrane as a model for screening angiogenic agents including from gene-modified cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, 452, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23010452>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/1/452>. Acesso em: 25 jan. 2023.

KIM, D. Y.; LEE, S. S.; BAE, Y. K. Colorectal cancer cells differentially impact migration and microRNA expression in endothelial cells. **Oncology Letters**, v. 18, n. 6, p. 6361–6370, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2019.11055>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2019.11055>. Acesso em: 13 out. 2022.

KIM, H. *et al.* Hyaluronic Acid Derivatives for Translational Medicines. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 8, p. 2889–2903, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00564>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.9b00564>. Acesso em: 24 de set. 2022.

KOLTE, D.; MCCLUNG, J. A.; ARONOW, W. S. Vasculogenesis and Angiogenesis. In: ARONOW, W.S.; MCCLUNG, J.A. Editors. **Translational Research in Coronary Artery Disease: Pathophysiology to Treatment**. London: Academic Press, 2016. Chapter 6, p. 49–65. ISBN: 978-012802385-3. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802385-3.00006-1>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128023853000061?via%3Dihub>. Acesso em: 22 abr. 2023.

KUFE, D. W. Mucins in cancer: Function, prognosis and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 874–885, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc2761>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc2761>. Acesso em: 26 ago. 2022.

KUIPERS, E. J. *et al.* Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, 15065, 17 dez. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201565>. Acesso em: 15 dez. 2022.

KULKARNI, A. D. *et al.* Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 7, p. 1615-1625, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1129624>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/21691401.2015.1129624>. Acesso em: 12 jul. 2022.

LE, H. VAN *et al.* Polyelectrolyte complexes of hyaluronic acid and diethylaminoethyl dextran: Formation, stability and hydrophobicity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 629, 127485, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127485>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927775721013546?via%3Dihub>. Acesso em: 13 mar. 2022.

LI, H. *et al.* Endosulfan promotes cell migration via PTP4A3-mediated signaling pathways in HUVECs. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 192, p. 110267, 1 abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110267>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651320301068?via%3Dihub>. Acesso em: 10 de dez. 2022.

LI, M.; KROETZ, D. L. Bevacizumab-induced hypertension: Clinical presentation and molecular understanding. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 182, p. 152– 160, 1 fev. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016372581730222X?via%3Dihub>. Acesso em: 23 jan. 2022.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?. **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 3, p. 211, 1 mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/abstract/S0968-0004\(15\)00241-8?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0968000415002418%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/abstract/S0968-0004(15)00241-8?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0968000415002418%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 15 mar. 2022.

LIU, Z. *et al.* VEGFR2 regulates endothelial differentiation of colon cancer cells. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, 593, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3578-9>. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3578-9>. Acesso em: 25 fev. 2023.

LOMBARDI, P. *et al.* Bevacizumab-induced hypertension as a predictor of clinical outcome in metastatic colorectal cancer: An individual patient data-based pooled analysis of two randomized studies and a systematic review of the literature. **Cancer Treatment Reviews**, v. 103, p. 102326, 1 fev. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102326>. Disponível em: [https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372\(21\)00174-2/abstract](https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372(21)00174-2/abstract). Acesso em: 17 ago. 2023.

LÓPEZ-CAMARILLO, C. *et al.* Editorial: Neovascularization, Angiogenesis and Vasculogenic Mimicry in Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 1140, 16 jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01140>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2020.01140/full>. Acesso em: 23 nov. 2022.

LUIS DE REDÍN, I. *et al.* In vivo effect of bevacizumab-loaded albumin nanoparticles in the treatment of corneal neovascularization. **Experimental Eye Research**, v. 185, 107697, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107697>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014483519300776?via%3Diuhub>. Acesso em: 1 set. 2023.

LUIS DE REDÍN, I. *et al.* In vivo efficacy of bevacizumab-loaded albumin nanoparticles in the treatment of colorectal cancer. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 3, p. 635 – 645, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00722-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13346-020-00722-7>. Acesso em: 8 de abr. 2022.

MACEDO, J *et al.* Atividade Antimicrobiana de Quitosana e seus Derivados: Influência das Características Estruturais. *Química Nova*. 45, 06, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170867>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/kc3N6c8v5R57mBkw53kvm8d/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 23 set. 2023.

MALONEY, M. H. *et al.* Risk of Systemic Adverse Events after Intravitreal Bevacizumab, Ranibizumab, and Aflibercept in Routine Clinical Practice. **Ophthalmology**. v. 128, n. 3, p. 417-424, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.opthta.2020.07.062>. Disponível em: [https://www.aaojournal.org/article/S0161-6420\(20\)30782-X/abstract](https://www.aaojournal.org/article/S0161-6420(20)30782-X/abstract). Acesso em: 13 mar. 2022.

MANSOORI, B. *et al.* Hyaluronic acid-decorated liposomal nanoparticles for targeted delivery of 5-fluorouracil into HT-29 colorectal cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 10, p. 6817-6830, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.29576>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.29576>. Acesso em: 4 out. 2022.

MARINHO, A.; NUNES, C.; REIS, S. Hyaluronic Acid: A Key Ingredient in the Therapy of Inflammation. **Biomolecules**, v. 11, n. 10, p. 1518, out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11101518>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/10/1518>. Acesso em: 15 jul. 2022.

MARTINS, J. P.; SANTOS, H. A. Oral drug delivery: Overview. Part I. In: MARTINS, J.P.; SANTOS, H.A. (editors). **Nanotechnology for Oral Drug Delivery: From Concept to Applications**. Academic Press, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-03669-5>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128180389/nanotechnology-for-oral-drug-delivery?via=ihub>. Acesso em: 15 fev. 2022.

MCSHANE, A. *et al.* Mucus. **Current Biology**, v. 31, n. 15, p. R938–R945, 9 ago.2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.093>. Disponível em: [https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822\(21\)00922-2?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982221009222%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(21)00922-2?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982221009222%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 22 set. 2022.

MEKA, V. S. *et al.* A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 11, p. 1697-1706, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359644617301265?via%3Dihub>. Acesso em: 22 fev. 2022.

MERCKX, G. *et al.* Chorioallantoic Membrane Assay as Model for Angiogenesis in Tissue Engineering: Focus on Stem Cells. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 26, n. 6, p. 519-539, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2020.0048>. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2020.0048>. Acesso em: 12 dez. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 166, de 24 de julho de 2017. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, ed. 41, p. 87-89, 25 jul. 2017. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&data=25/07/2017&pagina=87>. Acesso em: 14 ago. 2023.

MONTMINY, E. M. *et al.* Screening for Colorectal Cancer. **Medical Clinics of North America**, v. 104, n. 6, p. 1023-1036, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2020.08.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025712520300821?via%3Dihub>. Acesso em: 17 fev. 2022.

MORITZ, M.; GESZKE-MORITZ, M. Recent developments - In the application of polymeric nanoparticles as drug carriers. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 24, n. 5, p. 749-758, 2015. DOI: <https://doi.org/10.17219/acem/31802>. Disponível em: <https://advances.umw.edu.pl/en/article/2015/24/5/749/>. Acesso em: 22 mar. 2022.

NIEVES, B. J.; D'AMORE, P. A.; BRYAN, B. A. The function of vascular endothelial growth factor. **BioFactors**, v. 35, n. 4, p. 332-337, 2009b. DOI: <https://doi.org/10.1002/biof.46>. Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biof.46>. Acesso em: 24 nov. 2022.

NOGAMI, S. *et al.* Structural changes in pH-responsive gelatin/hydroxypropyl methylcellulose phthalate blends aimed at drug-release systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, p. 989–998, 1 nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.074>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813021019954?via%3Dihub>. Acesso em: 13 mar. 2022.

NORDGÅRD, C. T.; DRAGET, K. I. Co association of mucus modulating agents and nanoparticles for mucosal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 124, p. 175–183, 15 jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.01.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169409X18300012?via%3Dihub>. Acesso em: 15 jul. 2023.

NUNES, S. S. *et al.* pH-responsive and folate-coated liposomes encapsulating irinotecan as an alternative to improve efficacy of colorectal cancer treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112317, dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112317>. Disponível em: <https://www.sciencedir>

[ect.com/science/article/pii/S075333222101101X?via%3Dihub](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.06.011). Acesso em: 23 abr. 2022.

OLIVA, A.; LLABRÉS, M.; FARIÑA, J. B. Fitting bevacizumab aggregation kinetic data with the Finke–Watzky two-step model: Effect of thermal and mechanical stress. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 170–179, 18 set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.06.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928098715003061?via%3Dihub>. Acesso em: 3 set. 2023.

ONNAINTY, R. *et al.* Exploring a new free-standing polyelectrolyte (PEM) thin film as a predictive tool for drug-mucin interactions: Insights on drug transport through mucosal surfaces. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 604, 120764, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120764>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037851732100569X?via%3Dihub>. Acesso em: 25 set. 2022.

PABÓN, M. A. M.; BABIKER, H. M. A Review of Hereditary Colorectal Cancers. **StatPearls [Internet]**, Last Update: September 26, 2022. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430685/>. Acesso em: 23 jan. 2023.

PAPACHRISTOS, A. *et al.* Correlation Between Bevacizumab Exposure and Survival in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. **The Oncologist**, v. 25, n. 10, p. 853–858, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0835>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32272489/>. Acesso em: 13 fev. 2022.

PARDINI, B. *et al.* 5-Fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer and MTHFR/MTRR genotypes. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, n. 1, p.162, jul. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2010.03892.x>. Disponível em: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2125.2010.03892.x>. Acesso em: 4 mar. 2022.

PAREDES, F.; WILLIAMS, H. C.; SAN MARTIN, A. Metabolic adaptation in hypoxia and cancer. **Cancer Letters**, v. 502, p. 133-142, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.12.020>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383520306807?via%3Dihub>. Acesso em: 4 mar. 2023.

PARVEEN, S.; SAHOO, S. K. Evaluation of cytotoxicity and mechanism of apoptosis of doxorubicin using folate-decorated chitosan nanoparticles for targeted delivery to retinoblastoma. **Cancer Nanotechnology**, v. 1, n. 1–6, p. 47–62, 25 dez. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12645-010-0006-0>. Disponível em: <https://cancer-nano.biomedcentral.com/articles/10.1007/s12645-010-0006-0>. Acesso em: 11 nov. 2022.

PASCALE, R. M. *et al.* The Warburg Effect 97 Years after Its Discovery. **Cancers** **2020**, v. 12, n. 10, p. 2819, 30 set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12102819>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/10/2819>. Acesso em: 23 jul. 2023.

PEDREIRO, Liliane Neves. Desenvolvimento e Caracterização de Dispersão Sólida com Propriedade Mucoadesiva para Liberação de Zidovudina. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/content/bitstreams/1421f945-4ddf-4a13-ba0d-6b2223670fd9/content>. Acesso em 10 out. 2023.

PHAN, H. T.; HAES, A. J. What Does Nanoparticle Stability Mean?. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 123, n. 27, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b00913>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.9b00913>. Acesso em: 15 out. 2022.

PRIDGEN, E. M.; ALEXIS, F.; FAROKHZAD, O. C. Polymeric Nanoparticle Technologies for Oral Drug Delivery. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.12, n. 10, p. 1605-1610, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.06.018>. Disponível em: [https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565\(14\)00923-9/fulltext](https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565(14)00923-9/fulltext). Acesso em: 24 mar. 2022.

PRIDGEN, E. M.; ALEXIS, F.; FAROKHZAD, O. C. Polymeric nanoparticle drug delivery technologies for oral delivery applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 9, p. 1459–1473, 2 set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1018175>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.2015.1018175>. Acesso em: 25 fev. 2022.

QIU, Y. *et al.* Current advances in the biosynthesis of hyaluronic acid with variable molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 269, p. 118320, 1 out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118320>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861721007074?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jun. 2022.

RAMAKRISHNA, S. *et al.* Safety testing of a new medical device. In: RAMAKRISHNA, Sneha Mohan, *et al.* Editor. **Medical Devices: Regulations, Standards and Practices**. Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing, 2015. Chapter, 6, p. 137–153, ISBN: 978-008100289-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100289-6.00006-5>. Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780081002896000065?via%3Dihub>. Acesso em: 9 set. 2023.

RANE, A. V. *et al.* Methods for Synthesis of Nanoparticles and Fabrication of Nanocomposites. In: BHAGYARAJ, Sneha Mohan, *et al.* Editor. **Synthesis of Inorganic Nanomaterials: Advances and Key Technologies**. Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing, 2018. Chapter 5, p. 121-139. ISBN: 978-008101976-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101975-7.00005-1>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780081019757000051>. Acesso em: 8 jun. 2022.

RIBATTI, D. Two new applications in the study of angiogenesis the CAM assay: Acellular scaffolds and organoids. **Microvascular Research**, v. 140, 104304, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2021.104304>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026282521004304>.

[direct.com/science/article/abs/pii/S0026286221001746?via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026286221001746?via%3Dihub). Acesso em: 17 fev. 2023.

RINALDI, F. *et al.* Different instrumental approaches to understand the chitosan coated niosomes/mucin interaction. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, 101339, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101339>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S177322471931336X?via%3Dihub>. Acesso em: 27 ago. 2022.

RIZEQ, B. R. *et al.* Synthesis, bioapplications, and toxicity evaluation of chitosan-based nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, 5776, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20225776>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/22/5776>. Acesso em: 14 abr. 2022.

RON, D. A. *et al.* Maintenance treatment in metastatic colorectal cancer: in search of the best strategy. **Clinical and Translational Oncology**, v. 22, p. 1205-1215, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02267-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12094-019-02267-9>. Acesso em: 14 fev. 2022.

SARIKA, P. R.; JAMES, N. R. Polyelectrolyte complex nanoparticles from cationised gelatin and sodium alginate for curcumin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 354–361, 5 set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.073>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861716304416?via%3Dihub>. Acesso em: 23 mar. 2022.

SATO, T. *et al.* Hyaluronic acid and its receptor CD44, acting through TMEM2, inhibit morphological differentiation in oligodendroglial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 624, p. 102–111, 8 out. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.07.092>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X22010671?via%3Dihub>. Acesso em: 15 nov. 2022.

SHELLERER, V. S. *et al.* Endothelial cells of human colorectal cancer and healthy colon reveal phenotypic differences in culture. **Laboratory Investigation**, v. 87, n.11, p. 1159–1170, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700671>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17876298/>. Acesso em: 23 jan. 2023.

SEVERINO, P. *et al.* Alginate Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 11, p. 1312–1334, 25 abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.2174/1381612825666190425163424>. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/98245>. Acesso em: 8 ago. 2022.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between+ validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n.1-2, p. 57-66, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)01536-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)01536-4). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967302015364?via%3Dihub>. Acesso em: 24 mar. 2022.

SHAD, P. M. *et al.* Folate conjugated hyaluronic acid coated alginate nanogels encapsulated oxaliplatin enhance antitumor and apoptosis efficacy on colorectal cancer cells (HT29 cell line). **Toxicology in Vitro**, v. 65, 104756, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104756>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233319306617?via%3Dihub>. Acesso em: 22 mar. 2022.

SHAIKH, R. *et al.* Mucoadhesive drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 89, jan. 2011. DOI: <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76478>. Disponível em: https://journals.lww.com/jpbs/fulltext/2011/03010/mucoadhesive_drug_delivery_systems.9.aspx. Acesso em: 10 out. 2022.

SHEN, Y. *et al.* Reduction of Liver Metastasis Stiffness Improves Response to Bevacizumab in Metastatic Colorectal Cancer. **Cancer Cell**, v. 37, n. 6, p. 800-817.e7, 8 jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.05.005>. Disponível em: [https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(20\)30255-5?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1535610820302555%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(20)30255-5?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1535610820302555%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 15 set. 2023.

SHIBUYA, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and ProAngiogenic Therapies. **Genes and Cancer**, v. 2, n. 12, p. 1097–1105, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1177/1947601911423031>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1947601911423031>. Acesso em: 14 set. 2023.

SIA, D. *et al.* VEGF signaling in cancer treatment. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 17, p. 2834–2842, 13 jun. 2014. DOI: <https://doi.org/10.2174/13816128113199990590>. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/55103>. Acesso em: 15 set. 2023.

SIEGEL MPH, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17–48, 1 jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21763>. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21763>. Acesso em: 20 set. 2023.

SIMON, K. Colorectal cancer development and advances in screening. **Clinical Interventions in Aging**, v. 11, p. 967, 19 jul. 2016. DOI: <https://doi.org/10.2147/CIA.S109285>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27486317/>. Acesso em: 3 set. 2023.

SINGH, R.; SHITIZ, K.; SINGH, A. Chitin and chitosan: biopolymers for wound management. **International Wound Journal**, v. 14, n. 6, p. 1276–1289, 1 dez. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/iwj.12797>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/iwj.12797>. Acesso em: 20 ago. 2023.

SNETKOV, P. *et al.* Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. **Polymers**, v. 12, n. 8, p. 1800, 11 ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym>

12081800. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4360/12/8/1800>. Acesso em: 15 set. 2023.

SONG, Y. *et al.* Biomaterials based on hyaluronic acid, collagen and peptides for three-dimensional cell culture and their application in stem cell differentiation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 226, p. 14–36, 31 jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.213>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813022027726?via%3Dihub>. Acesso em: 12 set. 2023.

SOUSA, F.; GONÇALVES, V. M. F.; SARMENTO, B. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the quantification of monoclonal antibody bevacizumab from polyester-based nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 142, p. 171-177, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708517307355>. Acesso em: 23 jul. 2022.

SRIVASTAVA, S.; TIRRELL, M. V. Polyelectrolyte complexation. **Advances in Chemical Physics**, v. 161, p. 499–544, 3 out. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119290971.ch7>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119290971.ch7>. Acesso em: 2 fev. 2022.

SZILÁGYI, B. Á. *et al.* Mucoadhesive interactions between synthetic polyaspartamides and porcine gastric mucin on the colloid size scale. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 194, 111219, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111219>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776520305750?via%3Dihub>. Acesso em: 17 set. 2022.

TABER, L.; UMERSKA, A. Polyelectrolyte complexes as nanoparticulate drug delivery systems. *European Pharmaceutical Review*, v. 20. n.3. p. 36-40, 2015. Disponível em: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/33085/polyelectrolyte-complexes-as-nanoparticulate-drug-delivery-systems/>. Acesso em: 24 fev. 2022.

TANG, W. *et al.* Review: Application of chitosan and its derivatives in medical materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 240, p.124398, 15 jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124398>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813023012928?via%3Dihub>. Acesso em: 2 out. 2023.

THAKKAR, S. *et al.* Tumor microenvironment targeted nanotherapeutics for cancer therapy and diagnosis: A review. **Acta Biomaterialia**, v. 101, p. 43-68, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S174270611930621X?via%3Dihub>. Acesso em: 20 ago. 2022.

THE COSMETIC CHEMISTRY. Hyaluronic Acid. Disponível em: http://www.the-cosmeticchemist.com/molecule_of_the_week/hyaluronic_acid.html. Acesso em: 13 jun. 2023.

TIAN, G. *et al.* Doxorubicin-loaded dual-functional hyaluronic acid nanoparticles: Preparation, characterization and antitumor efficacy *in vitro* and *in vivo*. **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 1, p. 133-142, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9687>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.9687>. Acesso em: 23 jun. 2022.

TIWARI, A. *et al.* Basics to advances in nanotherapy of colorectal cancer. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 2, p. 319-338, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13346-019-00680-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13346-019-00680-9>. Acesso em: 24 jun. 2022.
TOCRIS BIOSCIENCE. *Angiogenesis*. Disponível em: <https://www.news-medical.net/whitepaper/20190318/Researching-Angiogenesis-in-Cancer.aspx>. Acesso em: 15 mai. 2023.

TODOROKI, K. *et al.* Bioanalysis of bevacizumab and infliximab by high temperature reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity magnetic purification. **Analytica Chimica Acta**, v. 916, p. 112-119, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.029>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267016302306?via%3Diuhub>. Acesso em: 25 ago. 2022.

TREPS, L.; AGER, A.; HIDA, K. Editorial: Tumor Vessels as Directors of the Tumor Microenvironment: New Findings, Current Challenges & Perspectives. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 885670, 29 mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.885670>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2022.885670/full>. Acesso em: 22 out. 2022.

TURANLI, Y.; ACARTÜRK, F. Preparation and characterization of colon-targeted pH/Time-dependent nanoparticles using anionic and cationic polymethacrylate polymers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 171, 106122, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106122>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098722000070?via%3Diuhub>. Acesso em: 25 ago. 2022.

UGURLU, N. *et al.* Transscleral delivery of bevacizumab-loaded chitosan nanoparticles. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 15, n. 4, p. 830-838, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbn.2019.2716>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30841975/>. Acesso em: 21 ago. 2022.

UNION FOR INTERNATIONAL CANCER CONTROL. GLOBOCAN 2020: new global cancer data. 2020. Disponível em: <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-global-cancer-data>. Acesso em: 14 jun. 2023.

VAN DER MEEL, R. *et al.* Smart cancer nanomedicine. **Nature Nanotechnology** v. 14, n. 11, p. 1007–1017, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0567-y>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41565-019-0567-y>. Acesso em: 27 ago. 2023.

- VICTORELLI, F. D. *et al.* Chick embryo chorioallantoic membrane as a suitable in vivo model to evaluate drug delivery systems for cancer treatment: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 153, p. 273–284, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.06.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S093964112030179X?via%3Dihub>. Acesso em: 24 jan. 2023.
- VU, B. T. *et al.* Chick chorioallantoic membrane assay as an in vivo model to study the effect of nanoparticle-based anticancer drugs in ovarian cancer. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 8524. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25573-8>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-25573-8>. Acesso em: 11 set. 2023.
- WANG, Y. *et al.* Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. **Angiogenesis**, v. 7, n. 4, p. 335-345, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10456-004-8272-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10456-004-8272-2>. Acesso em: 13 mai. 2023.
- WANI, T. U.; PANDITH, A. H.; SHEIKH, F. A. Polyelectrolytic nature of chitosan: Influence on physicochemical properties and synthesis of nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 65, 102730, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102730>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S177322472100410X?via%3Dihub>. Acesso em: 17 mai. 2023.
- WEITZ, J. *et al.* Colorectal cancer. **Lancet** (London, England), v. 365, n. 9454, p. 153–165, 8 jan. 2005. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17707-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17707-1). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(05\)17707-1/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(05)17707-1/abstract). Acesso em: 22 fev. 2022.
- XIE, Y. H.; CHEN, Y. X.; FANG, J. Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 22, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-0116-z>. Acesso em: 1 mar. 2022.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Fev. 3, 2022. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 30 jun. 2022.
- YANG, Y. *et al.* Recent developments in improving the emulsifying properties of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 239, p. 124210, 1 jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124210>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813023011042?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jul. 2023.
- YUAN, D. *et al.* Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 1, p. 58–72, 1 jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.10.037>. Disponível em: [https://jpharmsci.org/article/S0022-3549\(18\)30669-5/fulltext](https://jpharmsci.org/article/S0022-3549(18)30669-5/fulltext). Acesso em: 8 mar. 2022.
- ZAICHIK, S. *et al.* Zeta potential changing nanoemulsions: Impact of PEG-corona on phosphate cleavage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 581, 119299,

2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119299>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32251695/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

ZAIFY, M. A. *et al.* New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. **Cancer Gene Therapy** 2017 **24:6**, v. 24, n. 6, p. 233–243, 2 jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/cgt.2017.16>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/cgt201716>. Acesso em: 14 fev. 2023.

ZARE, Y. Study of nanoparticles aggregation/agglomeration in polymer particulate nanocomposites by mechanical properties. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 84, p. 158-164, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2016.01.020>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359835X1600035X>. Acesso em: 23 abr. 2023.

ZHANG, E. *et al.* Advances in chitosan-based nanoparticles for oncotherapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, 115004, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014486171930671X?via%3Dihub>. Acesso em: 15 fev. 2022.

ZHANG, R. *et al.* Application of chitosan with different molecular weights in cartilage tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 314, p. 120890, 15 ago. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120890>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861723003557?via%3Dihub>. Acesso em: 17 out. 2023.

ZHANG, S.; GAO, H.; BAO, G. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. **ACS Nano**, v. 9, n. 9, p. 8655–8671, 22 set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03184>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.5b03184>. Acesso em: 16 fev. 2022.

ZHAO, K. *et al.* The Mucoadhesive Nanoparticle-Based Delivery System in the Development of Mucosal Vaccines. **International Journal of Nanomedicine**, v.17,p. 4579–4598, 28 set. 2022. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S359118>. Disponível em: <https://www.dovepress.com/the-mucoadhesive-nanoparticle-based-delivery-system-in-the-development-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>. Acesso em: 16 nov. 2022.

ZHU, Q. *et al.* Oral delivery of proteins and peptides: Challenges, status quo and future perspectives. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 8, p. 2416–2448, 1 ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.04.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383521001167?via%3Dihub>. Acesso em: 5 ago. 2022.

ZIELINSKA, A. *et al.* Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. **Molecules** 2020, **Vol. 25, Page 3731**, v. 25, n. 16, p.3731, 15 ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/16/3731>. Acesso em: 7 set. 2023.

ZWACKA, R. M.; DUNLOP, M. G. Gene therapy for colon cancer. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 12, n. 3, p. 595–615, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0889-8588\(05\)70010-1](https://doi.org/10.1016/s0889-8588(05)70010-1). Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889858805700101?via%3Di%3Dhub>. Acesso em: 8 de mar. 2022