

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 25/06/2026.

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

SUZANA GONÇALVES CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS
MULTIFUNCIONAIS DESTINADOS À LIBERAÇÃO
COLÔNICA DO BEVACIZUMABE NO TRATAMENTO DO
CÂNCER COLORRETAL**

Araraquara
2023



SUZANA GONÇALVES CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS
MULTIFUNCIONAIS DESTINADOS À LIBERAÇÃO
COLÔNICA DO BEVACIZUMABE NO TRATAMENTO DO
CÂNCER COLORRETAL**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Palmira Daflon Gremião

Coorientadores: Prof^ª. Dr^ª Andréia Bagliotti Meneguim

Prof. Dr. Leonardo Miziara Barbosa Ferreira

Araraquara
2023

C331d Carvalho, Suzana Gonçalves.
Desenvolvimento e caracterização de sistemas multifuncionais destinados à liberação colônica do bevacizumabe no tratamento do câncer colorretal / Suzana Gonçalves Carvalho. – Araraquara: [S.n.], 2023.
146 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Maria Palmira Daflon Gremião.
Coorientadora: Andréia Bagliotti Meneguim.
Coorientador: Leonardo Miziara Barbosa Ferreira.

1. Nanopartículas poliméricas. 2. Sistemas de liberação de fármacos. 3. Mucoadesão. 4. Liberação cólon-específica. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Meneguim, Andréia Bagliotti, coorient. III. Ferreira, Leonardo Miziara Barbosa, coorient. IV. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Desenvolvimento e caracterização de sistemas multifuncionais destinados à liberação colônica do bevacizumabe no tratamento do câncer colorretal

AUTORA: SUZANA GONÇALVES CARVALHO

ORIENTADORA: MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO

COORIENTADOR: LEONARDO MIZIARA BARBOZA FERREIRA

COORIENTADORA: ANDRÉIA BAGLIOTTI MENEGUIN

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

Profa. Dra. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO (Participação Presencial)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. SILVIA STANISÇUASKI GUTERRES (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Controle de Medicamentos / Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. MARCOS LUCIANO BRUSCHI (Participação Presencial)
Departamento de Farmácia / Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof. Dr. GUILHERME MARTINS GELFUSO (Participação Virtual)
Departamento de Farmácia / Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. RUY CARLOS RUYER BECK (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Araraquara, 25 de agosto de 2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, o maior responsável por essa conquista.

À minha família por todo apoio emocional e incentivo, em especial a minha mãe Penha Cristina Gonçalves Carvalho, minha irmã, minha avó, minhas tias Maria José e Mônica, meu afilhado e minha prima Letícia. Me dedico dia após dia para que vocês tenham orgulho da pessoa que me tornei!

Ao meu namorado Leonardo, por toda paciência, companheirismo, suporte afetivo e conselhos nesse período.

À minha orientadora Prof^a Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, pelo incentivo, confiança, dedicação, conhecimento transmitido, amizade e acima de tudo pela paciência. Foi um verdadeiro privilégio e uma honra para mim compartilhar seus excepcionais conhecimentos científicos e qualidades humanas.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, por toda amizade, conselhos, confiança, apoio, incentivo e paciência durante esses anos. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Bruno Sarmiento, por me receber tão bem e me orientar durante meu estágio de pesquisa no exterior e, acima de tudo por todos ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

Aos meus coorientadores, Profa. Dra. Andréia Bagliotti Meneguim e Prof. Dr. Leonardo Miziara Barbosa Ferreira, por todos os conhecimentos compartilhados, disponibilidade, conselhos, ajuda na realização dos experimentos e discussões.

À Prof. Dra. Janaína Cecília Oliveira Villanova por toda amizade, incentivo nas escolhas profissionais e conhecimento ao longo dos anos. Meu agradecimento por você é eterno.

À Aline Martins dos Santos por toda contribuição e amizade para a realização de experimentos e discussões para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de Farmacotécnica, pela convivência durante esses anos. Em especial gostaria de agradecer ao Alberto, André, Bruna Furquim, Bruno Fonseca, Geanne, Jennifer, Jonatas, Larissa e Leonardo Di Filippo, por todo apoio, conselhos e por tornarem a caminhada mais fácil. À Amanda, Winner e Jessyca pelo

AGRADECIMENTOS

apoio incondicional que ultrapassou o ambiente de trabalho, pelas conversas, companheirismo e estarem sempre dispostos a me ajudar e ouvir. Aos demais amigos que me apoiaram nessa jornada: Victor Felipe, Daniela, Jessica Siqueira e Luiz Carlos obrigado por dividirem um pouco da vida de vocês comigo.

Ao Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto (Poto, Portugal) e ao grupo *Nanomedicines & Translational Drug delivery*, por todo acolhimento e infraestrutura durante meu estágio no exterior. Em especial a Bárbara Ferreira, Maria José Silveira e Mariana Domingues por toda ajuda e companheirismo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas Araraquara (UNESP) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelas condições logísticas para a execução da tese.

Ao Prof. Dr. Cauê Benito Scarim, pela colaboração e ajuda com as análises de CAM, em especial, ao mestrando Felipe Falcão Haddad, pela realização das análises.

À Seção técnica de Pós-graduação, em especial à Claudinha, Aniele, Denise e Victor, pela atenção, apoio e serviços prestados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de doutorado no país (Processo 2019/10761-5) e Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) (Processo 2021/08699-0).

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanotecnologia Farmacêutica: uma abordagem transdisciplinar INCT-NANOFARMA, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brasil) Processo nº 2014/50928-2 e pelo CNPQ Processo nº 465687/2014-8.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese. Muito obrigado!

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

*“Be less curious about people,
and more curious about ideas”*

MARIE CURIE

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é um problema de saúde pública e, entre os tipos de câncer, ocupa a terceira posição em termos de incidência e o segundo em mortalidade. A quimioterapia endovenosa tem sido o recurso terapêutico utilizado no tratamento do câncer. Todavia, a eficácia terapêutica limitada e os efeitos adversos comprometem a utilização por essa via. O bevacizumabe (BVZ) foi o primeiro anticorpo monoclonal (mAb) aprovado pela FDA e tem mostrado importante avanço na terapia antitumoral do CCR. A presente tese teve como objetivo desenvolver nanopartículas (NPs) de goma gelana (GG) e BVZ pelo método de complexação polieletrólítica, modificar sua superfície com quitosana (QS) e incorporá-las em micropartículas baseadas em amido retrogradado (AR) e pectina (PEC) para liberação cólon-específica do BVZ. Diferentes proporções de polímeros foram testadas para obtenção das NPs, exibindo diâmetros médios na faixa de 222,6 a 412,1 nm, potencial zeta de -16,3 a -40 mV e índice de polidispersão (PDI) de ~0,222 a 0,412. A modificação de superfície com quitosana promoveu inversão de carga ($> +40$ mV), além de aumento do diâmetro das partículas (268 a 400 nm) e da eficiência de encapsulação, variando de 29 % para aproximadamente 60 %. As NPs exibiram boa estabilidade física, boa permeabilidade em mucosa intestinal suína e forte interação com a mucina. A biocompatibilidade das NPs foi avaliada em células HCT116, HPMEC, fibroblastos humanos e macrófagos em modelos 2D e modelos de esferóides 3D, exibindo citotoxicidade dose e tempo dependentes. Em adição, os modelos de esferóides foram delineados e desenvolvidos para avaliação da atividade anti-angiogênica. Assim, foi realizado o tratamento com as NPs por 48 horas nos modelos e foi observada redução da expressão de CD31, redução da viabilidade intratumoral e perda de matriz extracelular, denotando boa atividade anti-angiogênica das NPs, que foram confirmadas pela redução de vasos sanguíneos em modelo de membrana corioalantóica de embrião de galinha. Dando sequência ao desenvolvimento do sistema proposto, as NPs foram microencapsuladas por blendas de AR e PEC (de baixa e alta esterificação), exibindo micropartículas circulares (circularidade de 0,869 a 0,893), com diâmetro variando entre 801,29 e 991,01 μm e índice span variando entre 0,08 e 0,33. A capacidade de absorção de líquido das micropartículas foi mais elevada em pH de 7,4, sendo até 4 vezes maior que em pH ácido, e também maior degradação enzimática quando incubadas com pancreatina. As micropartículas controlaram as taxas de liberação do BVZ em pH ácido e em função do tempo. O sistema multifuncional se mostrou efetivo para liberação cólon-específica do BVZ.

Palavras-chave: nanopartículas poliméricas; sistemas de liberação de fármacos; mucoadesão; liberação cólon-específica.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a public health problem, and, among types of cancer, it ranks third in terms of incidence and second in mortality. The encapsulation of bevacizumab (BVZ), an angiogenesis inhibitor antibody, in nanocarriers, has been explored to increase its efficacy in the treatment of CRC. The present project aims to develop GG and BVZ nanoparticles (NPs) by the polyelectrolytic complexation method, modify their surface with chitosan (CS), and incorporate them into microparticles based on retrograded starch (RS) and pectin (PEC) for colon release specific to BVZ. Different proportions of polymers were tested to obtain NPs, exhibiting average diameters in the 222.6 to 412.1 nm range, zeta potential from -16.3 to -40 mV, and PDI from ~222 to 412. Surface modification with chitosan promoted charge inversion (> +40 mV) in addition to increasing particle diameter (268 to 400 nm) and encapsulation efficiency, ranging from 29 % to approximately 60 %. The NPs exhibited good physical stability, good permeability in porcine intestinal mucosa, and strong interaction with mucin. The biocompatibility of NPs was evaluated in HCT116 cells, HPMEC, human fibroblasts, and macrophages in 2D and 3D spheroid models, exhibiting dose and time-dependent cytotoxicity. In addition, the spheroid models were designed and developed to evaluate the anti-angiogenic activity, thus, treatment with NPs was performed for 48 hours in the models and a reduction in CD31 expression, reduction in intratumoral viability, and loss of extracellular matrix, denoting good anti-angiogenic activity of the NPs, which were confirmed by the reduction of blood vessels in analyzes in a chicken embryo chorioallantoic membrane model. Continuing with the development of the proposed system, the NPs were microencapsulated in microparticles composed of blends of AR and PEC (low and high esterification), exhibiting circular microparticles (circularity from 0.869 to 0.893), with a diameter ranging from 801.29 to 991, 01 μm and span index varying between 0.08 and 0.33. The liquid absorption capacity of the microparticles was higher at a pH of 7.4, up to 4 times greater than at an acidic pH, and greater enzymatic degradation when incubated with pancreatin. The microparticles controlled the BVZ release rates. The multifunctional system proved to be effective for colon-specific release of BVZ.

Keywords: Polymeric nanoparticles; drug delivery systems with mucoadhesive properties; colon-specific release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica das estratégias adotadas para desenvolvimento deste projeto.....	24
Figura 2. Representação esquemática da carcinogênese.....	25
Figura 3. Estrutura do bevacizumabe.....	28
Figura 4. Considerações fisiológicas gerais no trato gastrointestinal enfrentadas por sistemas de liberação de fármacos direcionados ao cólon.....	30
Figura 5. Representação esquemática de nanoesferas e nanocápsulas	31
Figura 6. Etapa de contato e consolidação, envolvidas no mecanismo de mucoadesão de partículas	34
Figura 7. Estrutura molecular da goma gelana	35
Figura 8. Estrutura química da quitosana, na qual n e M_w podem assumir diferentes valores originando diferentes tipos de quitosanas. A seta rosa indica a unidade D-glucosamina e a marcação azul indica o grupo amino funcional. QSBP: $n > 53$ ($M_w \approx 50.000-190,00$ Da; grau de polimerização > 55). QSO: $n \leq 53$ ($M_w \leq 10.000$ Da; grau de polimerização ≤ 55). $R_1=H$, $R_2=H$, $R_3=H$ (podendo variar de acordo com o tipo de QSO).....	35
Figura 9. Estrutura química da pectina. (A) Pectina de baixa metoxilação; (B) Pectina de alta metoxilação	37
Figura 10. Estrutura (a) linear da amilose e (b) ramificada amilopectina.....	38
Figura 11. Etapas de desenvolvimento do projeto.....	42
Figura 12. Desenvolvimento das nanopartículas (A) Processo de obtenção pelo método de complexação polieletrólítica; (B) Modificação de superfície com quitosana.....	47
Figura 13. Representação esquemática dos esferóides desenvolvidos para esse estudo.....	52
Figura 14. Representação esquemática do preparo das micropartículas.....	59
Figura 15. Cromatograma do BVZ em concentração de $200 \mu\text{g. mL}^{-1}$ obtido por detecção por fluorescência (280 nm para excitação e 360 nm para emissão).....	64
Figura 16. Cromatogramas do BVZ, GG e mistura de quitosanas (QSO e QSBP). Os cromatogramas foram obtidos por detecção de fluorescência (280 nm para excitação e 360 nm para emissão), fluxo de $1,0 \text{ mL/min}$ a 80°C	65
Figura 17. Curva analítica do BVZ obtido por CLAE.....	65

Figura 18. Potencial zeta em função do pH das dispersões poliméricas de goma gelana (GG), quitosana de baixo peso molecular (QSBP) e quitosana oligomérica (QSO). As análises foram realizadas na faixa de pH de 2,0 a 8,0 (com intervalos de $0,7 \pm 0,1$) à 25 °C	69
Figura 19. Gráficos de distribuição de tamanho por intensidade de espalhamento de luz das nanopartículas estudadas	72
Figura 20. Distribuição de tamanho das nanopartículas pela técnica de NTA.....	77
Figura 21. Fotomicrografias das nanopartículas poliméricas obtidas por MEV-FEG com aumento de 25.000 vezes e 50.000 vezes	78
Figura 22. Curva de nano-DSC em solução aquosa de nanopartículas com e sem modificação de superfície. As análises foram plotadas sob faixa de aquecimento de 25 a 100 °C e taxa de aquecimento de 1 °C min ⁻¹	80
Figura 23. Estabilidade física de nanopartículas após 120 dias de armazenamento à 4 °C. As análises foram realizadas em DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C. (A) diâmetro médio em função do tempo (B) Potencial zeta em função do tempo	81
Figura 24. Influência de diferentes concentrações de mucina (0, 150, 250 e 500 µg/mL) no potencial zeta das nanopartículas em pH de 6,8. As análises foram realizadas a partir da agitação da dispersão de mucina com nanopartículas em incubadora shaker, por 30 minutos à 37 °C.....	83
Figura 25. Análise da interação nanopartículas/mucina em função do tempo. As análises foram realizadas por 90 minutos à 25 graus, viscosidade de 1,8 cps. (A) Diferença na concentração de partículas/mL em função do tempo. (B) Coeficiente de difusão das nanopartículas em função do tempo	85
Figura 26. Atividade metabólica de células endoteliais, células de câncer colorretal HCT116, fibroblastos intestinais e macrófagos após 24 e 48 horas de incubação com diferentes concentrações de nanopartículas carregadas com BVZ (50, 200 e 300 µg/mL) a 37 °C sob 5 % de CO ₂ e 95 % de umidade relativa. Em cada ponto de tempo, a viabilidade foi medida por um ensaio baseado em resazurina. (A) Células HPMEC; (B) Células HCT116; (C) Fibroblastos humanos e (D) Macrófagos.....	87
Figura 27. Caracterização de esferóides multicelulares com base em uma co-cultura quádrupla (HCT116: HIF: HPMEC: Monócitos). (A) Diâmetro dos esferóides ao longo de sete dias. (B) Atividade metabólica dos esferóides em cultura. (C) Morfologia de	

esferóides multicelulares ao longo de 7 dias de cultura. (D) Coloração H&E dos diferentes esferóides formados (e respectiva ampliação, na foto abaixo).....	89
Figura 28. Imagens de microscopia de imunofluorescência de esferóides multicelulares com base em uma co-cultura quádrupla. Imagens representativas mostrando a deposição de proteínas da matriz extracelular (fibronectina em amarelo) e organização dentro dos esferóides: HIF-vimentina (vermelho), HCT116-EpCAM (verde), macrófagos-CD68 (rosa), HPMEC-CD31 (azul claro) contracolorados com DAPI (azul). As imagens foram tiradas com uma objetiva de 20X	91
Figura 29. Citometria de fluxo de esferóides multicelulares com base em uma co-cultura quádrupla. Imagens representativas mostrando a organização dentro dos esferóides: HCT116 (EpCAM), HIF (CD90), HPMEC (CD31), macrófagos (CD14)	93
Figura 30. Atividade metabólica de esferóides de co-cultura quádrupla após 24 h e 48 h de tratamento. A viabilidade foi medida através da quantificação de adenosina trifosfato das células utilizando CellTiter-Glo®. Comparação estatística entre os diferentes grupos de teste. *p < 0,05, **p < 0,01 ou ***p < 0,001	94
Figura 31. Morfologia dos esferóides multicelulares após tratamento com diferentes concentrações de bevacizumabe (50 µg/mL, 200 µg/mL e 300 µg/mL) por 48 h. Coloração H&E dos diferentes esferóides formados (e respectiva ampliação, na foto abaixo)	95
Figura 32. Perfil de liberação do bevacizumabe a partir de nanopartículas poliméricas compostas por GG:BVZ com e sem modificação de superfície com quitosana (NP 2:8 e NP QSBP) em meio ácido (HCl/KCl; pH 1,2)	97
Figura 33. Perfil de liberação do bevacizumabe a partir de nanopartículas poliméricas compostas por GG:BVZ com e sem modificação de superfície com quitosana (NP 2:8 e NP QSBP) em tampão fosfato (pH 7,4)	98
Figura 34. Perfil de liberação do bevacizumabe a partir de nanopartículas poliméricas compostas por GG:BVZ com e sem modificação de superfície com quitosana (NP 2:8 e NP QSBP) em tampão fosfato (pH 6,8)	99
Figura 35. Ensaio de permeação utilizando mucosa intestinal suína. As análises foram realizadas a partir do BVZ livre e de nanopartículas poliméricas compostas por GG:BVZ com e sem modificação de superfície com quitosana (NP 2:8 e NP QSBP) em tampão fosfato (pH 6,8). (A) Perfil de permeação na mucosa intestinal. (B)	

Permeabilidade aparente. a e b = $p < 0,05$ diferença significativa por ANOVA, seguida por teste de Tukey	104
Figura 36. Retenção de bevacizumabe livre e veiculados em nanopartículas poliméricas em mucosa intestinal suína após 12 horas	105
Figura 37. Imagens de estereomicroscópio obtidas antes da aplicação das amostras (T0) e cinco minutos após a aplicação (T5) de CAMs inoculados com controle negativo (NaCl 0,9 %), controle positivo (NaOH 0,1 N), bevacizumabe, NP 2:8 e NP QSBP	106
Figura 38. Imagens <i>in ovo</i> obtidas após 48 horas de aplicação do controle negativo (NaCl 0,9 %), bevacizumabe, NP 2:8 e NP QSBP. As setas amarelas indicam alteração morfológica dos vasos na área de aplicação das amostras	107
Figura 39. Análise quantitativa do número de vasos na CAM do embrião de galinha após 48 h de tratamento com controle negativo (NaCl 0,9 %), bevacizumabe, NP 2:8 e NP QSBP	108
Figura 40. Fotomicrografias óptica e de luz polarizada do amido antes do processo de retrogradação (A), ao final do processo juntamente com pectina LM-5206 (B) e juntamente com pectina USP/100 (C)	109
Figura 41. Fotomicrografias da superfície (aumento de 120x e 500x) e estrutura interna (aumento de 1200x) das micropartículas com e sem nanopartículas obtidas por MEV-FEG. (A) LM, (B) USP:LM, (C) LM _{2:8} , (D) USP:LM _{2:8} , (E) LM _{QSBP} e (F) USP:LM _{QSBP}	112
Figura 42. Histograma da distribuição granulométrica das micropartículas com e sem incorporação de nanopartículas	113
Figura 43. Fotomicrografias da superfície (aumento de 100x) das micropartículas com nanopartículas obtidas por MEV-FEG após a análise de degradação enzimática. (A: LM _{2:8} ; B: USP:LM _{2:8} ; C: LM _{QSBP} ; D: USP:LM _{QSBP} , 1:meio gástrico contendo pepsina e 2:meio entérico contendo pancreatina)	118
Figura 44. Perfil de liberação cumulativo de micropartículas contendo nanopartículas LM _{2:8} . As análises foram realizadas em dissolutor, utilizando o aparato I (cesto), por 720 minutos, sob agitação de 50 rpm, à 37 °C.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros cromatográficos utilizados na validação de métodos analíticos do bavacizumabe.....	43
Tabela 2. Proporções de BVZ e GG testadas para otimizar o preparo das nanopartículas	46
Tabela 3. Parâmetros de avaliação de adequabilidade do sistema cromatográfico.....	63
Tabela 4. Análise de variância da curva analítica do bevacizumabe	66
Tabela 5. Resultados obtidos pelo teste de precisão intracorrída	67
Tabela 6. Resultados obtidos pelo teste de precisão intercorrída	67
Tabela 7. Valores de exatidão obtidos no método analítico do BVZ	68
Tabela 8. Diâmetro médio, PdI e potencial zeta das nanopartículas preparadas sob diferentes proporções GG:BVZ. As nanopartículas apresentam uma concentração total de 0,5 mg/mL ⁻¹ (pH 6,2). As análises foram realizadas em DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C	71
Tabela 9. Diâmetro médio, PdI e PZ das nanopartículas com modificação de superfície. As análises foram realizadas em DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C	74
Tabela 10. Nomenclatura e composição das nanopartículas.....	75
Tabela 11. Diâmetro médio, PdI, PZ, índice SPAN e concentração das nanopartículas utilizadas no estudo por DLS e NTA.....	77
Tabela 12. Eficiência de associação de nanopartículas com modificação de superfície e sem modificação de superfície	78
Tabela 13. Coeficientes de modelos matemáticos aplicados aos perfis de liberação a partir das nanopartículas (Higuchi, Korsmeyer Peppas, First order, Hixson-Crowell e Weibull) em meio ácido (HCl/KCl; pH 1,2)	100
Tabela 14. Coeficientes de modelos matemáticos aplicados aos perfis de liberação a partir das nanopartículas (Higuchi, Korsmeyer Peppas, First order, Hixson-Crowell e Weibull) em tampão fosfato (pH 7,4).....	102
Tabela 15. Coeficientes de modelos matemáticos aplicados aos perfis de liberação a partir das nanopartículas (Higuchi, Korsmeyer Peppas, First order, Hixson-Crowell e Weibull) em tampão fosfato (pH 6,8).....	104
Tabela 16. Nomenclatura e composição das micropartículas	111
Tabela 17. Diâmetro médio, circularidade, índice Span e rendimento das micropartículas.....	115

Tabela 18. Eficiência de incorporação das nanopartículas contendo BVZ nas micropartículas.....	116
Tabela 19. Capacidade de intumescimento e erosão de micropartículas contendo nanopartículas em pH de 1,2, 6,8 e 7,4, após 2 horas de análise.....	117
Tabela 20. Degradação enzimática das micropartículas contendo nanopartículas com BVZ. As amostras foram incubadas por 2 horas em meio ácido (HCl 0,1 N; pH 1,2) contendo a enzima pepsina (0,3 mg. mL ⁻¹) ou tampão fosfato (pH 6,8) contendo a enzima pancreatina (3,2 mg.mL ⁻¹) durante 4 horas, em incubadora shaker, sob agitação de 35 rpm, em 37 °C.....	118
Tabela 21. Coeficientes de modelos matemáticos aplicados aos perfis de liberação a partir das nano-in-micropartículas (Higuchi, Korsmeyer Peppas, First order, Hixson-Crowell e Weibull).....	121

LISTA DE ABREVIACOES

AR	Amido retrogradado/amido resistente
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BVZ	Bevacizumabe
CCR	Câncer colorretal
CLAE	Cromatógrafo líquido de alta eficiência
CPEs	Complexos polieletrólíticos
DLS	Espalhamento de luz dinâmica, do inglês, <i>dynamic light scattering</i>
DPR	Desvio padrão relativo
FDA	<i>Food and drug administration</i>
GG	Goma gelana
H&E	Hematoxilina e Eosina
HCT116	Células de câncer colorretal humano
HIF	Fibroblastos intestinais humanos
HPMEC	Células endoteliais microvasculares pulmonares humanas
IF	Imunofluorescência
IgG1	Imunoglobulina G1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mAb	Anticorpo monoclonal

LISTA DE ABREVIACOES

MCTS	Esferóides tumorais multicelulares
Mw	<i>molecular weight</i>
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
QS	Quitosana
QSBP	Quitosana de baixo peso molecular
QSO	Quitosana oligomérica
PBS	Tampão fosfato
PdI	ndice de polidispersão
PZ	Potencial zeta
PEC	Pectina
PEC LM-5206	Pectina de baixa esterificao
PEC USP/100	Pectina de alta esterificao
RPMI	do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
TFA	cido trifluoroacético
TGI	Trato gastrointestinal
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR-1	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1 (do inglês, <i>vascular endothelial growth factor receptor-1</i>)

LISTA DE ABREVIACOES

VEGFR-2 Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (do inglês,
vascular endothelial growth factor receptor-2)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
2.1 Câncer colorretal	25
2.2 Bevacizumabe	27
2.3 Sistemas para liberação cólon-específica	29
2.3.1 Nanopartículas poliméricas.....	31
2.3.2 Nanopartículas-em-micropartículas.....	32
2.4 Mucoadesão	33
2.5 Biopolímeros	34
2.5.1 Goma Gelana.....	34
2.5.2 Quitosana.....	35
2.5.3 Pectina.....	36
2.5.4 Amido retrogradado.....	37
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivos gerais	40
3.2 Etapas para alcançar o objetivo proposto	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Material	41
4.1.1 Principais matérias primas e reagentes.....	41
4.1.2 Cultura celular.....	41
4.1.3 Equipamentos.....	41
4.2 Métodos	42
4.2.1 Validação de método analítico para quantificação do bevacizumabe.....	43
4.2.1.1 <i>Determinação dos parâmetros para validação do método para determinação do bevacizumabe</i>	43
4.2.1.2 <i>Conformidade do método cromatográfico</i>	44
4.2.1.3 <i>Especificidade/ Seletividade</i>	44
4.2.1.4 <i>Linearidade</i>	44
4.2.1.5 <i>Precisão</i>	44
4.2.1.6 <i>Exatidão</i>	45
4.2.2 Análise do potencial zeta das dispersões poliméricas em função do pH.....	45
4.2.3 Delineamento e desenvolvimento das nanopartículas com e sem modificação de superfície.....	45

4.2.3.1	<i>Preparo das dispersões poliméricas</i>	45
4.2.3.2	<i>Avaliação das condições de obtenção das nanopartículas</i>	46
4.2.3.3	<i>Modificação de superfície com quitosana</i>	46
4.2.4	Caracterização físico-química das nanopartículas	47
4.2.4.1	<i>Análise do diâmetro médio e do índice de polidispersão das nanopartículas por DLS</i>	47
4.2.4.2	<i>Análise do tamanho, índice span e concentração de nanopartículas por NTA</i>	47
4.2.4.3	<i>Análise do potencial zeta das partículas</i>	48
4.2.4.4	<i>Eficiência de associação (EA%)</i>	48
4.2.4.5	<i>Análise morfológica das nanopartículas</i>	48
4.2.5	Desnaturação térmica do bevacizumabe	49
4.2.6	Análise da estabilidade física das nanopartículas	49
4.2.7	Estudo das propriedades mucoadesivas das nanopartículas	49
4.2.7.1	<i>Estudo da interação entre as nanopartículas e mucina pela análise do potencial zeta</i>	49
4.2.7.2	<i>Estudo da interação entre as nanopartículas e a mucina por NTA</i>	49
4.2.8	Estudos celulares	50
4.2.8.1	<i>Condições da cultura celular</i>	50
4.2.8.2	<i>Biocompatibilidade das nanopartículas poliméricas em culturas 2D</i>	51
4.2.8.3	<i>Delineamento e desenvolvimento de esferóides para avaliação da atividade anti-angiogênica das nanopartículas</i>	52
4.2.8.3.1	Formação dos esferóides	52
4.2.8.3.2	Caracterização dos esferóides	52
4.2.8.3.3	Análise histológica	53
4.2.8.3.4	Caracterização dos esferóides por imunofluorescência	53
4.2.8.3.5	Caracterização dos esferóides por citometria de fluxo	54
4.2.8.4	<i>Biocompatibilidade de nanopartículas poliméricas em culturas 3D</i>	54
4.2.8.5	<i>Avaliação do potencial anti-angiogênico das nanopartículas</i>	55
4.2.9	Estudo do perfil de liberação do BVZ	55
4.2.10	Permeação <i>ex vivo</i> em mucosa suína	56
4.2.11	Análises utilizando membrana corioalantóica de galinha (CAM)	57
4.2.12	Microencapsulação das nanopartículas	58
4.2.12.1	<i>Preparo das blendas de amido resistente e pectina</i>	58
4.2.12.2	<i>Birrefringência das dispersões de amido</i>	58

4.2.12.3 Obtenção das micropartículas por geleificação ionotrópica.....	58
4.2.13 Caracterização do sistema microencapsulado	59
4.2.13.1 Avaliação da forma, índice span, tamanho e circularidade das micropartículas.....	59
4.2.13.2 Rendimento (%).....	59
4.2.13.3 Análise da morfologia das micropartículas carregadas com nanopartículas por MEV-FEG.....	60
4.2.13.4 Avaliação da eficiência de incorporação do BVZ nanoencapsulado nas micropartículas.....	60
4.2.14 Estudos de performance	60
4.2.14.1 Avaliação da capacidade de absorção de líquidos e erosão	60
4.2.14.2 Avaliação da degradação enzimática das micropartículas	61
4.2.14.3 Determinação do perfil de liberação in vitro do BVZ no sistema nano-in-micro	61
4.2.15 Análises estatísticas	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1 Validação de metodologia analítica para quantificação do bevacizumabe	63
5.1.1 Conformidade do método cromatográfico.....	63
5.1.2 Especificidade/seletividade.....	64
5.1.3 Linearidade	65
5.1.4 Precisão	66
5.1.5 Exatidão.....	68
5.2 Otimização das condições para obtenção das nanopartículas.....	68
5.3 Delineamento e desenvolvimento de nanopartículas com e sem modificação de superfície com quitosana	70
5.3.1 Análise da influência da proporção de goma gelana e BVZ no tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das NPs	70
5.3.2 Modificação de superfície com quitosana	73
5.4 Caracterização das nanopartículas.....	76
5.4.1. Caracterização das nanopartículas por NTA	76
5.4.2 Eficiência de associação (EA%) das nanopartículas	78
5.4.3 Análise da morfologia das nanopartículas.....	78
5.5 Desnaturação térmica do BVZ por nano-DSC	79
5.6 Análise da estabilidade física das nanopartículas.....	81
5.7 Estudo das propriedades mucoadesivas das nanopartículas.....	82

5.7.1	Estudo da interação entre as nanopartículas e mucina empregando a análise de potencial zeta.....	82
5.7.2	Estudo da interação entre as nanopartículas e a mucina por NTA.....	84
5.8	Estudos celulares	86
5.8.1	Biocompatibilidade de nanopartículas poliméricas em culturas 2D	86
5.8.2	Delineamento e desenvolvimento de esferóides para avaliação da atividade anti-angiogênica das nanopartículas	88
5.8.3	Biocompatibilidade em modelos de esferóides 3D	94
5.8.4	Triagem do potencial antiangiogênico de nanopartículas carregadas com BVZ	95
5.9	Estudo do perfil de liberação do BVZ	97
5.10	Estudo de permeação <i>ex vivo</i> em mucosa suína	104
5.11	Análises utilizando membrana corioalantóica de galinha (CAM)	106
5.12	Microencapsulação das nanopartículas e caracterização do sistema microencapsulado	109
5.12.1	Retrogradação do amido com pectina	109
5.12.2	Desenvolvimento das micropartículas.....	110
5.12.3	Avaliação da forma, diâmetro, circularidade e índice Span das micropartículas	113
5.12.4	Eficiência de incorporação	115
5.12.5	Capacidade de intumescimento e erosão.....	117
6	CONCLUSÕES	123
	REFERÊNCIAS	125

1. INTRODUÇÃO

O câncer, também conhecido como neoplasia ou tumor maligno, denota um grupo de doenças em que as células sofrem um processo de mutação em seu material genético, tendo como resultado o crescimento desordenado (ESTANQUEIRO *et al.*, 2015). Dentre os tipos de câncer o colorretal (CCR) é responsável por cerca de 700.000 mortes mundiais por ano, sendo a terceira principal causa de mortes relacionadas ao câncer no mundo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022; BRODY, 2015; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2022).

Em 2021, de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer do Brasil (INCA), o número de novos casos de CCR no Brasil foi de aproximadamente 41.010 casos, sendo 20.540 novos casos em homens e 20.470 em mulheres, cenário esse que evidencia a necessidade de busca por alternativas terapêuticas no tratamento da doença (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2021).

O recurso terapêutico convencional para o tratamento do câncer é a terapia endovenosa. Porém, a falta de seletividade/especificidade dos agentes antineoplásicos e a distribuição dos mesmos para tecidos/órgãos saudáveis requer a administração em altas doses, o que pode resultar em efeitos adversos severos e toxicidade (ESTANQUEIRO *et al.*, 2015; WANG; HO; LIM, 2010). Entre os agentes antineoplásicos utilizados para o tratamento do CCR, o bevacizumabe (BVZ) se destaca como fármaco de primeira linha (FERRARA *et al.*, 2004).

O BVZ é um anticorpo monoclonal (mAb) do tipo imunoglobulina G1 (IgG1), produzido por biotecnologia do DNA recombinante e disponível no mercado em solução para infusão endovenosa. Seu mecanismo de ação consiste em inibição da ligação do VEGF (do inglês, *vascular endothelial growth factor*) aos seus receptores tirosina-quinase encontrados na superfície das células endoteliais (VEGFR-1 e VEGFR-2). A inativação do VEGF faz com que ocorra o bloqueio da cascata de sinalização e a consequente interrupção do suprimento sanguíneo aos tecidos tumorais (GARCIA *et al.*, 2020). A ação sistêmica do BVZ quando administrado pela via endovenosa pode desencadear diversos efeitos adversos, entre eles se destacam: hipertensão, cicatrização prejudicada, hemorragia, insuficiência cardíaca, perfuração gastrointestinal e proteinúria (KAZAZI-HYSENI; BEIJNEN; SCHELLENS, 2010).

A utilização de nanopartículas poliméricas como carreadores de fármacos apresenta várias vantagens como a vetorização e o favorecimento de acúmulo do fármaco no local

de ação ou absorção, devido ao seu tamanho reduzido, a compartimentalização do fármaco em ambiente restrito e a capacidade de modulação para atender necessidades específicas (DOS SANTOS *et al.*, 2021a; YUAN *et al.*, 2023).

A utilização de polissacarídeos no desenvolvimento de nanopartículas e micropartículas poliméricas apresenta diversas vantagens como baixo custo, biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, interação celular, interação/modificação química, segurança e vetorização de fármacos (DOS SANTOS *et al.*, 2021a; YUAN *et al.*, 2023; ZHENG *et al.*, 2022). O direcionamento destes sistemas pode ser modulado por meio de interações supramoleculares das partículas com a interface biológica, visando alcançar comportamento específico (CARVALHO *et al.*, 2021; FERREIRA *et al.*, 2020).

A goma gelana (GG) é um exopolissacarídeo aniônico obtido pela fermentação do microrganismo *Sphingomonas elodea*. Tem sido explorada no delineamento de sistemas utilizados no trato gastrointestinal (TGI), pois apresenta importante propriedade mucoadesiva, além de formar fortes redes estruturais na presença de cátions multivalentes (CARDOSO *et al.*, 2021a, 2021b; GOMES *et al.*, 2023; PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014).

A quitosana (QS) é um polissacarídeo natural e catiônico que tem sido amplamente aplicado na obtenção de sistemas de liberação de fármacos e para modificação de superfície de NPs visando o tratamento do CCR devido às suas notáveis propriedades de mucoadesividade e permeabilidade. Relatos ainda mostram que as NPs contendo QS aumentam a absorção do fármaco por meio da abertura das junções paracelulares. Além disso, a sensibilidade ao pH da QS pode favorecer a liberação do fármaco no tecido tumoral, uma vez que o ambiente tumoral é ácido devido a alteração das propriedades fisiológicas (CARVALHO *et al.*, 2021; FERREIRA *et al.*, 2020; SOOD *et al.*, 2022). É um polímero catiônico, atóxico, biocompatível e biodegradável. Apesar das inúmeras vantagens da QS, este polímero possui limitações para sistemas de liberação de fármacos destinados ao cólon devido à solubilidade em meio ácido, o que pode acarretar a liberação prematura do fármaco na porção inicial do TGI.

A região superior do TGI impõe muitas barreiras para que o fármaco, principalmente de origem proteica, chegue ao cólon. A associação de estratégias de encapsulação do fármaco em sistemas nanoestruturados e a incorporação destes sistemas em micropartículas tem sido explorada em nosso grupo de pesquisa (DOS SANTOS *et al.*, 2021b). A proteção do sistema, bem como a sua vetorização para o

cólon pode ser alcançada pela microencapsulação de nanocarreadores empregando polímeros degradados seletivamente pela microbiota colônica, representando também uma adequada estratégia para proteção da mesma frente às variações de pH do TGI (DOS SANTOS *et al.*, 2021a; ZHENG *et al.*, 2022).

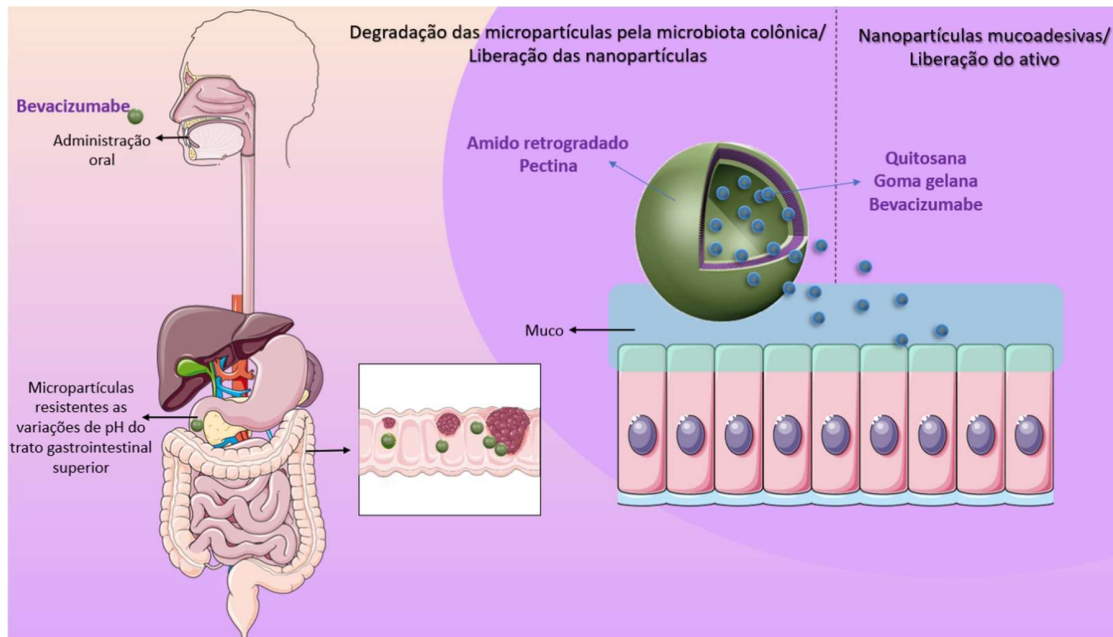
O amido é um polissacarídeo natural biodegradável e biocompatível, de baixo custo e muito utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia (RASHID *et al.*, 2011). Todavia, suas propriedades físico-químicas (por exemplo, elevada hidrofília) comprometem sua utilização em sistemas de liberação de fármacos (CARBINATTO *et al.*, 2012; CHUNG; LIM; LIM, 2006). Dessa forma, modificações químicas, enzimáticas ou físicas são realizadas com a finalidade de modificar tais propriedades. A modificação física por meio de retrogradação do amido, um processo hidrotérmico capaz de aumentar sua cristalinidade, faz com que ele se torne resistente as ações enzimáticas nos segmentos superiores do TGI e seja degradado pela microbiota colônica, além de diminuir a dispersibilidade em meio aquoso. Tais características fazem do amido retrogradado um bom candidato para compor os sistemas poliméricos para liberação no cólon (BAGLIOTTI MENEGUIN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014; CARDOSO *et al.*, 2021b; CRISTINA FREIRE *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2021b; MENEGUIN *et al.*, 2018; PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014).

A pectina (PEC) é um polissacarídeo natural complexo proveniente da casca de frutos cítricos capaz de formar agregados macromoleculares em meio ácido, além de exibir excelentes propriedades de biodegradabilidade, solubilidade aquosa, baixo custo, atoxicidade e biocompatibilidade. Estudos com blendas poliméricas de PEC juntamente com amido retrogradado, para administração oral da insulina, mostraram uma boa capacidade de proteção do fármaco na porção superior do TGI (MENEGUIN *et al.*, 2018).

Em face ao exposto, o objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de sistemas com propriedades colón-específicas e mucoadesivas para administração oral do BVZ no tratamento do CCR, associando duas estratégias, a primeira estratégia consiste no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas compostas de GG e BVZ com e sem modificação de superfície e com propriedades mucoadesivas a fim de aumentar o gradiente de concentração do BVZ na região do tumor. A microencapsulação destas nanopartículas tem como finalidade a proteção das mesmas frente às variações do ambiente fisiológico nas porções superiores do TGI (Figura 1). A escolha dos

polissacarídeos para compor as micropartículas (AR/PEC) baseou-se em resistência à degradação enzimática, baixa solubilidade em meio aquoso, biocompatibilidade, atoxicidade e biodegradabilidade específica pela microbiota e/ou enzimas colônicas para que possam liberar as nanopartículas no seu local de ação.

Figura 1. Representação gráfica das estratégias adotadas para desenvolvimento do projeto. Fonte: própria autora.



6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de NPs de goma gelana e BVZ, com e sem modificação de superfície com quitosana foi realizado com sucesso utilizando a técnica de complexação polieletrólítica, dispensando o uso de solventes orgânicos. O conjunto de dados mostrou a obtenção de NPs esféricas, com homogeneidade adequada, densidade de carga elevada e diâmetro na escala nanométrica. Em adição, as NPs mostraram boa estabilidade física ao longo de 120 dias e alta interação com a mucina, principalmente para nanopartículas modificadas com QSBP, que também exibiram maior permeação em mucosa intestinal suína.

Para avaliação da biocompatibilidade foram desenvolvidos modelos de esferóides de co-cultura quadrúpla, contendo células HCT116, HPMEC, fibroblastos e macrófagos. O modelo proposto mimetizou vários aspectos do microambiente tumoral do CCR, como a presença de matriz extracelular e núcleo necrótico, além de à organização espacial das células. Além disso, o modelo apresentou-se como uma estratégia potencial para triagem de alto rendimento, sendo adequado também para triagem de fármacos, nanopartículas e estratégias de quimioimunoterapia para o tratamento do CCR. As NPs exibiram citotoxicidade dependente de dose e tempo em modelos celulares 2D e 3D e atividade anti-angiogênica, reduzindo a expressão de CD31, demonstrando baixa viabilidade intratumoral e perda de matriz extracelular. Além disso, a atividade antiangiogênica das NPs foram confirmadas pela análise em CAM.

Para uma efetiva liberação cólon-específica do BVZ, foi realizado um estudo de microencapsulação das NPs. Para isso foram testadas blendas poliméricas contendo pectina de alta e baixa esterificação. As nano-in-micropartículas mostraram-se esféricas, com distribuição granulométrica homogênea, bom rendimento e diâmetro na faixa micrométrica. A capacidade de intumescimento das MPs foi maior em pH básico, bem como a degradação enzimática. As pectinas não apresentaram diferenças significativas pelas análises de degradação enzimática, intumescimento e erosão, dessa forma, as micropartículas com pectina de baixa metoxilação foram escolhidas para as análises de liberação do BVZ, devido a maior eficiência de incorporação do BVZ. O sistema multifuncional baseado em nano-in-micropartícula controlou as taxas de liberação do

BVZ, principalmente em pH ácido, sendo assim uma estratégia promissora para a entrega cólon específica do BVZ.

O objetivo do estudo foi alcançado com o desenvolvimento de sistemas multifuncionais com propriedades colón-específicas e mucoadesivas para administração oral do BVZ no tratamento do CCR, associando duas estratégias: o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas compostas de GG e BVZ com e sem modificação de superfície e com propriedades mucoadesivas a fim de aumentar o gradiente de concentração do BVZ na região do tumor e a microencapsulação destas nanopartículas para proteção do BVZ frente às variações do ambiente fisiológico nas porções superiores do TGI.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, K. Y.; IACOMINI, M.; SIMAS, F. F.; CORDEIRO, L. M. C. High methoxyl pectin from the soluble dietary fiber of passion fruit peel forms weak gel without the requirement of sugar addition. **Carbohydrate Polymers**, v. 246, p. 116616, 2020.
- AHMAD, N.; ALBASSAM, A. A.; FAIYAZ KHAN, M.; ULLAH, Z.; MOHAMMED BUHEAZAH, T.; SALMAN ALHOMOD, H.; ALI AL-NASIF, H. A novel 5-Fluorouracil multiple-nanoemulsion used for the enhancement of oral bioavailability in the treatment of colorectal cancer. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 5, p. 3704–3716, 2022.
- ALPER ÖZTÜRK1, A.; YENILMEZ, E.; ÖZARDA, M. G. Clarithromycin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecularweight and surface modification with chitosan on formulation, nanoparticle characterization and antibacterial Effects. **Polymers**, v. 11, n. 10, 2019.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Colorectal Cancer**. 2022. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer.html>>. Acesso em: 30 out. 2022.
- AMIDON, S.; BROWN, J. E.; DAVE, V. S. Colon-targeted oral drug delivery systems: Design trends and approaches. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 4, p. 731–741, 2015.
- ANDREANI, T.; MIZIARA, L.; LORENZÓN, E. N.; DE SOUZA, A. L. R.; KIILL, C. P.; FANGUEIRO, J. F.; GARCIA, M. L.; GREMIÃO, P. D.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B. Effect of mucoadhesive polymers on the in vitro performance of insulin-loaded silica nanoparticles: Interactions with mucin and biomembrane models. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 118–126, 2015.
- ARÉVALO-PÉREZ, R.; MADERUELO, C.; LANA O, J. M. Recent advances in colon drug delivery systems, **Journal of Controlled Release**, v.327, p. 703-7242020.
- ASGARI, K.; LABBAFI, M.; KHODAIYAN, F.; KAZEMI, M.; HOSSEINI, S. S. High-methylated pectin from walnut processing wastes as a potential resource: Ultrasound assisted extraction and physicochemical, structural and functional analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 1274–1282, 2020.
- ATANASIO, G. D. N.; FERRARI, P. F.; BAIÃO, A.; PEREGO, P.; SARMENTO, B.; PALOMBO, D.; CAMPARDELLI, R. Bevacizumab encapsulation into PLGA nanoparticles functionalized with immunouteroglobin-1 as an innovative delivery system for atherosclerosis. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2022.
- BADRAN, M. M.; ALOMRANI, A. H.; HARISA, G. I.; ASHOUR, A. E.; KUMAR, A.; YASSIN, A. E. Novel docetaxel chitosan-coated PLGA/PCL nanoparticles with magnified cytotoxicity and bioavailability. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1461–1468, 2018.
- BAGLIOTTI MENEGUIN, A.; STRINGHETTI FERREIRA CURY, B.; EVANGELISTA, R. C. Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 140–149, 2014.

- BAIÃO, A.; SOUSA, F.; OLIVEIRA, A. V.; OLIVEIRA, C.; SARMENTO, B. Effective intracellular delivery of bevacizumab: Via PEGylated polymeric nanoparticles targeting the CD44v6 receptor in colon cancer cells. **Biomaterials Science**, v. 8, n. 13, p. 3720–3729, 2020.
- BARBI, M. da S.; CARVALHO, F. C.; KIILL, C. P.; DA SILVA BARUD, H.; SANTAGNELI, S. H.; RIBEIRO, S. J. L.; GREMIÃO, M. P. D. Preparation and Characterization of Chitosan Nanoparticles for Zidovudine Nasal Delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 865–874, 2015.
- BATISTA-DUHARTE, A.; JORGE MURILLO, G.; PÉREZ, U. M.; TUR, E. N.; PORTUONDO, D. F.; MARTÍNEZ, B. T.; TÉLLEZ-MARTÍNEZ, D.; BETANCOURT, J. E.; PÉREZ, O. The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 627–633, 2016.
- BAULETH-RAMOS, T.; FEIJÃO, T.; GONÇALVES, A.; SHAHBAZI, M. A.; LIU, Z.; BARRIAS, C.; OLIVEIRA, M. J.; GRANJA, P.; SANTOS, H. A.; SARMENTO, B. Colorectal cancer triple co-culture spheroid model to assess the biocompatibility and anticancer properties of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 323, p. 398–411, 2020.
- BAUMAN, E.; FEIJÃO, T.; CARVALHO, D. T. O.; GRANJA, P. L.; BARRIAS, C. C. Xenofree pre-vascularized spheroids for therapeutic applications. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.
- BEMILLER, J. N. Gellans, Curdlan, Dextrans, Levans, and Pullulan. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**, n. Chapter 11, p. 271–278, 2019.
- BONI, F. I.; ALMEIDA, A.; LECHANTEUR, A.; SARMENTO, B.; CURY, B. S. F.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive nanostructured polyelectrolytes complexes modulate the intestinal permeability of methotrexate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 73–82, 2018.
- BONI, F. I.; CURY, B. S. F.; FERREIRA, N. N.; GREMIÃO, M. P. D. Ionic Cross Linking as a Strategy to Modulate the Properties of Oral Mucoadhesive Microparticles Based on Polysaccharide Blends. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 3, p. 407, 2021. a.
- BONI, F. I.; CURY, B. S. F.; FERREIRA, N. N.; TEIXEIRA, D. A.; GREMIÃO, M. P. D. Computational and experimental approaches for chitosan-based nano PECs design: Insights on a deeper comprehension of nanostructure formation. **Carbohydrate Polymers**, v. 254, 2021. b.
- BOURGUIGNON, T.; TORRANO, A. A.; HOUEL-RENAULT, L.; MACHELART, A.; BRODIN, P.; GREF, R. An original methodology to study polymeric nanoparticle-macrophage interactions: Nanoparticle tracking analysis in cell culture media and quantification of the internalized objects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 610, 2021.
- BRODY, H. Colorectal cancer. **Nature**, v. 521, n. 7551, p. S1, 2015.

CARBINATTO, F. M.; DE CASTRO, A. D.; CURY, B. S. F.; MAGALHÃES, A.; EVANGELISTA, R. C. Physical properties of pectin-high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 281–288, 2012.

CARBINATTO, F. M.; DE CASTRO, A. D.; EVANGELISTA, R. C.; CURY, B. S. F. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 27–34, 2014.

CARDOSO, A. P.; PINTO, M. L.; PINTO, A. T.; OLIVEIRA, M. I.; PINTO, M. T.; GONÇALVES, R.; RELVAS, J. B.; FIGUEIREDO, C.; SERUCA, R.; MANTOVANI, A.; MAREEL, M.; BARBOSA, M. A.; OLIVEIRA, M. J. Macrophages stimulate gastric and colorectal cancer invasion through EGFR Y1086, c-Src, Erk1/2 and Akt phosphorylation and smallGTPase activity. **Oncogene**, v. 33, n. 16, p. 2123–2133, 2014.

CARDOSO, V. M. de O.; BRITO, N. A. P. De; FERREIRA, N. N.; BONI, F. I.; FERREIRA, L. M. B.; CARVALHO, S. G.; GREMIÃO, M. P. D. Design of mucoadhesive gellan gum and chitosan nanoparticles intended for colon-specific delivery of peptide drugs. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 628, 2021. a.

CARDOSO, V. M. de O.; KIRALY, V. T. R.; BONI, F. I.; FERREIRA, N. N.; FERREIRA, L. M. B.; PEREIRA, F. M. V.; BORGES, J. C.; CURY, B. S. F.; GREMIÃO, M. P. D. Rational design of nanocarriers based on gellan gum/retrograded starch exploiting polyelectrolyte complexation and ionic cross-linking processes: A potential technological platform for oral delivery of bevacizumab. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 66, 2021. b.

CARVAJAL, R. D.; NATHAN, P.; SACCO, J. J.; ORLOFF, M.; LEONEL, ; HERNANDEZ-AYA, F.; YANG, J.; LUKE, J. J.; BUTLER, M. O.; STANHOPE, S.; COLLINS, L.; MCALPINE, C.; HOLLAND, C.; SHAAD, ; ABDULLAH, E.; SATO, T. Phase I study of safety, tolerability, and efficacy of tebentafusp using a step-up dosing regimen and expansion in patients with metastatic uveal melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 40, n. 17, p. 1939–1948, 2022.

CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 1–17, 2010.

CARVALHO, S. G.; DOS SANTOS, A. M.; SILVESTRE, A. L. P.; MENEGUIN, A. B.; FERREIRA, L. M. B.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. New insights into physicochemical aspects involved in the formation of polyelectrolyte complexes based on chitosan and dextran sulfate. **Carbohydrate Polymers**, v. 271, 2021.

CARVALHO, S.; SILVEIRA, M. J.; DOMINGUES, M.; FERREIRA, B.; PEREIRA, C. L.; GREMIÃO, M. P.; SARMENTO, B. Multicellular Quadruple Colorectal Cancer Spheroids as an In Vitro Tool for Antiangiogenic Potential Evaluation of Nanoparticles. **Advanced Therapeutics**, v. 6, n. 4, 2023.

CASTRO, F.; LEITE PEREIRA, C.; HELENA MACEDO, M.; ALMEIDA, A.; JOSÉ SILVEIRA, M.; DIAS, S.; PATRÍCIA CARDOSO, A.; JOSÉ OLIVEIRA, M.;

SARMENTO, B. Advances on colorectal cancer 3D models: The needed translational technology for nanomedicine screening, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 175, 113824, 2021.

CATTIN, S.; RAMONT, L.; RÜEGG, C. Characterization and In Vivo Validation of a Three-Dimensional Multi-Cellular Culture Model to Study Heterotypic Interactions in Colorectal Cancer Cell Growth, Invasion and Metastasis. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, 2018.

CHEN, J.; CUI, Y.; MA, Y.; ZHANG, S. The gelation behavior of thiolated citrus high-methoxyl pectin induced by sodium phosphate dibasic dodecahydrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 277, p. 118849, 2022.

CHISTIYAKOV, D. A.; KILLINGSWORTH, M. C.; MYASOEDOVA, V. A.; OREKHOV, A. N.; BOBRYSHV, Y. V. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. **Laboratory Investigation**, v. 97, n. 1, p. 4–13, 2017.

CHUAH, L. H.; ROBERTS, C. J.; BILLA, N.; ABDULLAH, S.; ROSLI, R.; MANICKAM, S. Using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) to Decipher Mucoadhesion Propensity of Curcumin-Containing Chitosan Nanoparticles and Curcumin Release. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 35, n. 9, p. 1201–1207, 2014.

CHUNG, H.-J.; LIM, H. S.; LIM, S.-T. Effect of partial gelatinization and retrogradation on the enzymatic digestion of waxy rice starch. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 3, p. 353–359, 2006.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta Potential Measurement. Em: Micro and Nano Technologies. p. 63–70.

COSTA, A. L. R.; GOMES, A.; USHIKUBO, F. Y.; CUNHA, R. L. Gellan microgels produced in planar microfluidic devices. **Journal of Food Engineering**, v. 209, p. 18–25, 2017.

COSTA, E. C.; MOREIRA, A. F.; DE MELO-DIOGO, D.; GASPAR, V. M.; CARVALHO, M. P.; CORREIA, I. J. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis, **Environmental Science: Nano**, v.6, 2016.

CRISTINA FREIRE, A.; FERTIG, C. C.; PODCZECK, F.; VEIGA, F.; SOUSA, J. Starch-based coatings for colon-specific drug delivery. Part I: The influence of heat treatment on the physico-chemical properties of high amylose maize starches. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 3, p. 574–586, 2009.

CROUCH, S. P. M.; KOZLOWSKI, R.; SLATER, K. J.; FLETCHER, J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 160, n. 1, p. 81–88, 1993.

DANDAMUDI, M.; MCLOUGHLIN, P.; BEHL, G.; RANI, S.; COFFEY, L.;

CHAUHAN, A.; KENT, D.; FITZHENRY, L. Chitosan-coated plga nanoparticles encapsulating triamcinolone acetonide as a potential candidate for sustained ocular drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 10, 2021.

- DAS, M.; GIRI, T. K. Hydrogels based on gellan gum in cell delivery and drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, p. 101586, 2020.
- DIMANTOV, A.; GREENBERG, M.; KESSELMAN, E.; SHIMONI, E. Study of high amylose corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model system. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 5, n. 1, p. 93–100, 2004.
- DONGOWSKI, G.; LORENZ, A.; PROLL, J. The Degree of Methylation Influences the Degradation of Pectin in the Intestinal Tract of Rats and In Vitro. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 7, p. 1935–1944, 2002.
- DOS SANTOS, A. M.; CARVALHO, S. G.; FERREIRA, L. M. B.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. 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, 2022.
- DOS SANTOS, A. M.; CARVALHO, S. G.; MENEGUIN, A. B.; SÁBIO, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. 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, 2021. a.
- DOS SANTOS, A. M.; MENEGUIN, A. B.; AKHTER, D. T.; FLETCHER, N.; HOUSTON, Z. H.; BELL, C.; THURECHT, K. J.; GREMIÃO, M. P. D. Understanding the role of colon-specific microparticles based on retrograded starch/pectin in the delivery of chitosan nanoparticles along the gastrointestinal tract. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 158, p. 371–378, 2021. b.
- DYAWANAPELLY, S.; KOLI, U.; DHARAMDASANI, V.; JAIN, R.; DANDEKAR, P. Improved mucoadhesion and cell uptake of chitosan and chitosan oligosaccharide surface-modified polymer nanoparticles for mucosal delivery of proteins. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 6, n. 4, p. 365–379, 2016.
- ECKERMANN, C. W.; LEHLE, K.; SCHMID, S. A.; WHEATLEY, D. N.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. Characterization and modulation of fibroblast/endothelial cell co-cultures for the *in vitro* preformation of three-dimensional tubular networks. **Cell Biology International**, v. 35, n. 11, p. 1097–1110, 2011.
- ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 6, p. 557–570, 2012.
- ESTANQUEIRO, M.; AMARAL, M. H.; CONCEIÇÃO, J.; SOUSA LOBO, J. M. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 631–648, 2015.
- FERREIRA, L. M. B.; DOS SANTOS, A. M.; BONI, F. I.; DOS SANTOS, K. C.; ROBUSTI, L. M. G.; DE SOUZA, M. P. C.; FERREIRA, N. N.; CARVALHO, S. G.; CARDOSO, V. M. O.; CHORILLI, M.; CURY, B. S. F.; DE GODOI, D. R. M.; GREMIÃO, M. P. D. Design of chitosan-based particle systems: A review of the physicochemical foundations for tailored properties, **Carbohydrate Polymers**, v.250, 116968, 2020.

- FERREIRA, N. N.; M.B. FERREIRA, L.; MIRANDA-GONÇALVES, V.; REIS, R. M.; SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. C.; BALTAZAR, F.; GREMIÃO, M. P. D. Alginate hydrogel improves anti-angiogenic bevacizumab activity in cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 119, p. 271–282, 2017.
- GARCIA, J.; HURWITZ, H. I.; SANDLER, A. B.; MILES, D.; COLEMAN, R. L.; DEURLOO, R.; CHINOT, O. L. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook, **Cancer treatment reviews**, v.86, 102017, 2020.
- GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1–9, 2008.
- GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. **Journal of Biomolecular Techniques**, 2010.
- GISINA, A. M.; KIM, Ya. S.; GABASHVILI, A. N.; TSVETKOVA, A. V.; VAKHRUSHEV, I. V.; YARYGIN, K. N.; LUPATOV, A. Yu. Expression of Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) in Tumor Spheroids of Human Colorectal Adenocarcinoma Cells. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 170, n. 1, p. 135–141, 2020.
- GOMES, D.; BATISTA-SILVA, J. P.; SOUSA, A.; PASSARINHA, L. A. Progress and opportunities in Gellan gum-based materials: A review of preparation, characterization and emerging applications, **Carbohydrate Polymers**, v.311, 120782, 2023.
- GOULET, D. R.; WATSON, M. J.; TAM, S. H.; ZWOLAK, A.; CHIU, M. L.; ATKINS, W. M.; NATH, A. Toward a Combinatorial Approach for the Prediction of IgG Half-Life and Clearance. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 46, n. 12, p. 1900–1907, 2018.
- GUSTAFSON, H. H.; HOLT-CASPER, D.; GRAINGER, D. W.; GHANDEHARI, H. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. **Nano Today**, v. 10, n. 4, p. 487–510, 2015.
- HAIBE, Y.; KREIDIEH, M.; EL HAJJ, H.; KHALIFEH, I.; MUKHERJI, D.; TEMRAZ, S.; SHAMSEDDINE, A. Resistance Mechanisms to Anti-angiogenic Therapies in Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 2020.
- HANI, U.; HONNAVALLI, Y. K.; BEGUM, M. Y.; YASMIN, S.; OSMANI, R. A. M.; ANSARI, M. Y. Colorectal cancer: A comprehensive review based on the novel drug delivery systems approach and its management. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, p. 102532, 2021.
- HTOON, A.; SHRESTHA, A. K.; FLANAGAN, B. M.; LOPEZ-RUBIO, A.; BIRD, A. R.; GILBERT, E. P.; GIDLEY, M. J. Effects of processing high amylose maize starches under controlled conditions on structural organisation and amylase digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 236–245, 2009.

HTOON, A.; SHRESTHA, A. K.; FLANAGAN, B. M.; LOPEZ-RUBIO, A.; BIRD, A. R.; GILBERT, E. P.; GIDLEY, M. J. Effects of processing high amylose maize starches under controlled conditions on structural organisation and amylase digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 236–245, 2009.

HUA, S.; MARKS, E.; SCHNEIDER, J. J.; KEELY, S. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.11, n.5, p.1117-1132, 2015.

IMPERIALE, J. C.; NEJAMKIN, P.; DEL SOLE, M. J.; LANUSSE, C. E.; SOSNIK, A. Novel protease inhibitor-loaded Nanoparticle-in-Microparticle Delivery System leads to a dramatic improvement of the oral pharmacokinetics in dogs. **Biomaterials**, v. 37, p. 1–12, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, B. (INCA). **O que é o câncer?** 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Colorectal cancer**. 2022. Disponível em: <<https://www.iarc.who.int/cancer-type/colorectal-cancer/>>. Acesso em: 30 out. 2022.

ISADORA BONI, F.; NORONHA FERREIRA, N.; FERNANDA RODERO, C.; FRANCIANE LEÃO, A.; STRINGHETTI FERREIRA CURY, B.; PALMIRA DAFLON GREMIÃO, M. Multilayered polymer coating modulates mucoadhesive and biological properties of camptothecin-loaded lipid nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 635, 2023.

JENNEWEIN, M.; BUBEL, M.; GUTHÖRL, S.; METZGER, W.; WEIGERT, M.; POHLEMANN, T.; OBERRINGER, M. Two- and three-dimensional co-culture models of soft tissue healing: pericyte-endothelial cell interaction. **Cell and Tissue Research**, v. 365, n. 2, p. 279–293, 2016.

JIANG, P.; JACOBS, K. M.; OHR, M. P.; SWINDLE-REILLY, K. E. Chitosan Polycaprolactone Core-Shell Microparticles for Sustained Delivery of Bevacizumab. **Molecular Pharmaceutics**, v. 17, n. 7, p. 2570–2584, 2020.

JUAREZ-MORENO, K.; CHÁVEZ-GARCÍA, D.; HIRATA, G.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Monolayer (2D) or spheroids (3D) cell cultures for nanotoxicological studies? Comparison of cytotoxicity and cell internalization of nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, v. 85, p. 105461, 2022.

KAISER, M.; PEREIRA, S.; POHL, L.; KETELHUT, S.; KEMPER, B.; GORZELANNY, C.; GALLA, H.-J.; MOERSCHBACHER, B. M.; GOYCOOLEA, F. M. Chitosan encapsulation modulates the effect of capsaicin on the tight junctions of MDCK cells. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10048, 2015.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392–401, 2006.

KAZAZI-HYSENI, F.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. Bevacizumab. **The Oncologist**, v. 15, n. 8, p. 819–825, 2010.

- KEUM, N.; GIOVANNUCCI, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 12, p. 713–732, 2019.
- KIZILAY, E.; KAYITMAZER, A. B.; DUBIN, P. L. Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 167, n. 1–2, p. 24–37, 2011.
- KLEGERMAN, M. E.; NAJI, A. K.; HAWORTH, K. J.; ZOU, Y.; GOLUNSKI, E.; PENG, T.; BRITTON, G. L.; HUANG, S. L.; HOLLAND, C. K.; MCPHERSON, D. D. Ultrasound-enhanced bevacizumab release from echogenic liposomes for inhibition of atheroma progression. **Journal of Liposome Research**, v. 26, n. 1, p. 47–56, 2016.
- KONCINA, E.; HAAN, S.; RAUH, S.; LETELLIER, E. Prognostic and predictive molecular biomarkers for colorectal cancer: Updates and challenges, **Cancers**, v.12, n.2, 2020.
- KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. III. Drug release from glassy poly(HEMA-co-NVP) copolymers. **Journal of Controlled Release**, v. 1, n. 2, p. 89–98, 1984.
- KUMAR, R.; ISLAM, T.; NURUNNABI, M. Mucoadhesive carriers for oral drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 351, p. 504–559, 2022.
- KUNZ-SCHUGHART, L. A.; SCHROEDER, J. A.; WONDRAK, M.; VAN REY, F.; LEHLE, K.; HOFSTAEDTER, F.; WHEATLEY, D. N. Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells in vitro. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 290, n. 5, p. C1385–C1398, 2006.
- LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D. Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications, **Biotechnology Advances**, v.35, n.6, p.782-791, 2017.
- LERTKIATMONGKOL, P.; LIAO, D.; MEI, H.; HU, Y.; NEWMAN, P. J. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). **Current Opinion in Hematology**, v. 23, n. 3, p. 253–259, 2016.
- LI, J. N.; XIE, F.; WANG, Y. Synergistic effects of bevacizumab in combination with β -elemene on subcutaneous xenografts derived from HCT-116 human colon cancer cells. **Translational Cancer Research**, v. 9, n. 2, p. 1001–1011, 2020.
- LI, W.; LI, Y.; LIU, Z.; KERDSAKUNDEE, N.; ZHANG, M.; ZHANG, F.; LIU, X.; BAULETH-RAMOS, T.; LIAN, W.; MÄKILÄ, E.; KEMELL, M.; DING, Y.; SARMENTO, B.; WIWATTANAPATAPEE, R.; SALONEN, J.; ZHANG, H.; HIRVONEN, J. T.; LIU, D.; DENG, X.; SANTOS, H. A. Hierarchical structured and programmed vehicles deliver drugs locally to inflamed sites of intestine. **Biomaterials**, v. 185, p. 322–332, 2018.
- LIANG, J.; CHENG, Q.; HUANG, J.; MA, M.; ZHANG, D.; LEI, X.; XIAO, Z.; ZHANG, D.; SHI, C.; LUO, L. Monitoring tumour microenvironment changes during anti-angiogenesis therapy using functional MRI. **Angiogenesis**, v. 22, n. 3, p. 457–470, 2019.

- LOPES, L. C.; SIMAS-TOSIN, F. F.; CIPRIANI, T. R.; MARCHESI, L. F.; VIDOTTI, M.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Effect of low and high methoxyl citrus pectin on the properties of polypyrrole based electroactive hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 11–18, 2017.
- LUO, Y.; WANG, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.64, p.353-367, 2014.
- MA, F. K.; LI, J.; KONG, M.; LIU, Y.; AN, Y.; CHEN, X. G. Preparation and hydrolytic erosion of differently structured PLGA nanoparticles with chitosan modification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, n. 1, p. 174–179, 2013.
- MACEDO, M. H.; BARROS, A. S.; MARTÍNEZ, E.; BARRIAS, C. C.; SARMENTO, B. All layers matter: Innovative three-dimensional epithelium-stroma-endothelium intestinal model for reliable permeability outcomes. **Journal of Controlled Release**, v. 341, p. 414–430, 2022.
- MACHADO CRUZ, R.; SANTOS-MARTINEZ, M. J.; TAJBER, L. Impact of polyethylene glycol polymers on the physicochemical properties and mucoadhesivity of itraconazole nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 144, n. July, p. 57–67, 2019.
- MANGIR, N.; DIKICI, S.; CLAEYSSSENS, F.; MACNEIL, S. Using *ex ovo* chick chorioallantoic membrane (CAM) assay to evaluate the biocompatibility and angiogenic response to biomaterials. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 5, n. 7, p. 3190–3200, 2019.
- MARCOS, X.; PÉREZ-CASAS, S.; LLOVO, J.; CONCHEIRO, A.; ALVAREZ LORENZO, C. Poloxamer-hydroxyethyl cellulose- α -cyclodextrin supramolecular gels for sustained release of griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 500, n. 1–2, p. 11–19, 2016.
- MARKOWITZ, S. D.; BERTAGNOLLI, M. M. Molecular Basis of Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 25, p. 2449–2460, 2009.
- MARTENS, T. F.; VERCAUTEREN, D.; FORIER, K.; DESCHOUT, H.; REMAUT, K.; PAESEN, R.; AMELOOT, M.; ENGBERSEN, J. F.; DEMEESTER, J.; DE SMEDT, S. C.; BRAECKMANS, K. Measuring the intravitreal mobility of nanomedicines with single-particle tracking microscopy. **Nanomedicine**, v. 8, n. 12, p. 1955–1968, 2013.
- MARTÍNEZ-PÉREZ, B.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; TAPIA-TAPIA, M.; CISNEROS-TAMAYO, R.; ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L.; ALCALÁ-ALCALÁ, S.; MENDOZA-MUÑOZ, N.; PIÑÓN-SEGUNDO, E. Controlled-release biodegradable nanoparticles: From preparation to vaginal applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 115, p. 185–195, 2018.
- MARTINS, C.; CHAUHAN, V. M.; SELO, A. A.; AL-NATOUR, M.; AYLOTT, J. W.; SARMENTO, B. Modelling protein therapeutic co-formulation and co-delivery with PLGA nanoparticles continuously manufactured by microfluidics. **Reaction Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 2, p. 308–319, 2020.

MARTINS, C.; PACHECO, C.; MOREIRA-BARBOSA, C.; MARQUES- MAGALHÃES, Â.; DIAS, S.; ARAÚJO, M.; OLIVEIRA, M. J.; SARMENTO, B. Glioblastoma immuno-endothelial multicellular microtissue as a 3D in vitro evaluation tool of anti-cancer nano-therapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 353, p. 77–95, 2023.

MATOS, A. I.; CARREIRA, B.; PERES, C.; MOURA, L. I. F.; CONNIOT, J.; FOURNIOLS, T.; SCOMPARIN, A.; MARTÍNEZ-BARRIOCANAL, Á.; ARANGO, D.; CONDE, J. P.; PRÉAT, V.; SATCHI-FAINARO, R.; FLORINDO, H. F. Nanotechnology is an important strategy for combinational innovative chemo- immunotherapies against colorectal cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 307, p. 108–138, 2019.

MEHTA, G.; HSIAO, A. Y.; INGRAM, M.; LUKER, G. D.; TAKAYAMA, S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 2, p. 192–204, 2012.

MENEGUIN, A. B.; BEYSSAC, E.; GARRAIT, G.; HSEIN, H.; CURY, B. S. F. Retrograded starch/pectin coated gellan gum-microparticles for oral administration of insulin: A technological platform for protection against enzymatic degradation and improvement of intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 123, p. 84–94, 2018.

MORBIDELLI, L.; DONNINI, S.; ZICHE, M. Role of Nitric Oxide in the Modulation of Angiogenesis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 7, p. 521–530, 2003.

NAEEM, M.; AWAN, U. A.; SUBHAN, F.; CAO, J.; HLAING, S. P.; LEE, J.; IM, E.;

JUNG, Y.; YOO, J.-W. Advances in colon-targeted nano-drug delivery systems: challenges and solutions. **Archives of Pharmacal Research**, v. 43, n. 1, p. 153–169, 2020.

NALBACH, L.; MÜLLER, D.; WRUBLEWSKY, S.; METZGER, W.; MENGER, M. D.; LASCHKE, M. W.; AMPOFO, E. Microvascular fragment spheroids: Three- dimensional vascularization units for tissue engineering and regeneration. **Journal of Tissue Engineering**, v. 12, p. 204173142110355, 2021.

NUNES, S. S.; MIRANDA, S. E. M.; DE OLIVEIRA SILVA, J.; FERNANDES, R. S.; DE ALCÂNTARA LEMOS, J.; DE AGUIAR FERREIRA, C.; TOWNSEND, D. M.; CASSALI, G. D.; OLIVEIRA, M. C.; BRANCO DE BARROS, A. L. pH-responsive and folate-coated liposomes encapsulating irinotecan as an alternative to improve efficacy of colorectal cancer treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112317, 2021.

ÖHLUND, D.; ELYADA, E.; TUVESON, D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 8, p. 1503–1523, 2014.

PAI, R. V.; MONPARA, J. D.; VAVIA, P. R. Exploring molecular dynamics simulation to predict binding with ocular mucin: An in silico approach for screening mucoadhesive materials for ocular retentive delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 309, n. February, p. 190–202, 2019.

PAN, C. F.; ZHANG, X.; WANG, J. W.; YANG, T.; ZHONG, L. L. D.; SHEN, K. P. Weichang'an formula inhibits tumor growth in combination with bevacizumab in a murine model of colon cancer—making up for the deficiency of bevacizumab by inhibiting VEGFR-1. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal**

of **Pharmaceutics**, v. 309, n. 1–2, p. 44–50, 2006.

PEPPAS, N. A. Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering design and mathematical modeling helped the field mature. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 5–9, 2013.

PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75–81, 2014.

PEZZELLA, F. Pharmacogenetics implementation in the clinics: information and guidelines for germline variants. **Cancer Drug Resistance**, 2019.

PICONE, C. S. F.; CUNHA, R. L. Chitosan-gellan electrostatic complexes: Influence of preparation conditions and surfactant presence. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 695–703, 2013.

PIERCE, A.; ZHENG, Y.; WAGNER, W. L.; SCHELLER, H. V.; MOHNEN, D.; ACKERMANN, M.; MENTZER, S. J. Visualizing pectin polymer-polymer entanglement produced by interfacial water movement. **Carbohydrate Polymers**, v. 246, p. 116618, 2020.

PINTO, M. L.; RIOS, E.; DURÃES, C.; RIBEIRO, R.; MACHADO, J. C.; MANTOVANI, A.; BARBOSA, M. A.; CARNEIRO, F.; OLIVEIRA, M. J. The two faces of tumor-associated macrophages and their clinical significance in colorectal cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

PITARRESI, G.; CRAPARO, E. F.; PALUMBO, F. S.; CARLISI, B.; GIAMMONA, G. Composite nanoparticles based on hyaluronic acid chemically cross-linked with α,β -polyaspartylhydrazide. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1890–1898, 2007.

PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 286–295, 2014.

PREZOTTI, F. G.; SIEDLE, I.; BONI, F. I.; CHORILLI, M.; MÜLLER, I.; CURY, B. S. F. Mucoadhesive films based on gellan gum/pectin blends as potential platform for buccal drug delivery. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 25, n. 2, p. 159–167, 2020.

QURESHI, M.; AQIL, Mohd.; IMAM, S. S.; AHAD, A.; SULTANA, Y. Formulation and Evaluation of Neuroactive Drug Loaded Chitosan Nanoparticle for Nose to Brain Delivery: In-vitro Characterization and In-vivo Behavior Study. **Current Drug Delivery**, v. 16, n. 2, p. 123–135, 2018.

RASHID, I.; AL-REMAWI, M.; LEHARNE, S. A.; CHOWDHRY, B. Z.; BADWAN, A. A novel multifunctional pharmaceutical excipient: Modification of the permeability of starch by processing with magnesium silicate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n. 1–2, p. 18–26, 2011.

RODRIGUES, S.; CARDOSO, L.; DA COSTA, A.; GRENHA, A. Biocompatibility and Stability of Polysaccharide Polyelectrolyte Complexes Aimed at Respiratory Delivery. **Materials**, v. 8, n. 9, p. 5647–5670, 2015

- ROSENTHAL, R.; GÜNZEL, D.; FINGER, C.; KRUG, S. M.; RICHTER, J. F.; SCHULZKE, J.-D.; FROMM, M.; AMASHEH, S. The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier. **Biomaterials**, v. 33, n. 9, p. 2791–2800, 2012.
- SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Resistant Starch: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, n. 1, p. 1–17, 2006.
- SAMPATHI, S.; HARIBHAU, C. J.; KUCHANA, V.; JUNNUTHULA, V.; DYAWANAPPELLY, S. Nanosuspension encapsulated chitosan-pectin microbeads as a novel delivery platform for enhancing oral bioavailability. **Carbohydrate Polymers**, v. 319, 2023.
- SANTOS, A. M. Dos; MENEGUIN, A. B.; FONSECA-SANTOS, B.; CHAVES DE SOUZA, M. P.; BARBOZA FERREIRA, L. M.; SÁBIO, R. M.; CHORILLI, M.; DAFLON GREMIÃO, M. P. The role of stabilizers and mechanical processes on physico-chemical and anti-inflammatory properties of methotrexate nanosuspensions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, p. 101638, 2020.
- SCHATZ, C.; DOMARD, A.; VITON, C.; PICHOT, C.; DELAIR, T. Versatile and Efficient Formation of Colloids of Biopolymer-Based Polyelectrolyte Complexes, **Biomacromolecules**, v.5, p.1882-1892, 2004.
- SHELLERER, V. S.; CRONER, R. S.; WEINLÄNDER, K.; HOHENBERGER, W.; STÜRZL, M.; NASCHBERGER, E. Endothelial cells of human colorectal cancer and healthy colon reveal phenotypic differences in culture. **Laboratory Investigation**, v. 87, n. 11, p. 1159–1170, 2007.
- SEO, N.; POLOZOVA, A.; ZHANG, M.; YATES, Z.; CAO, S.; LI, H.; KUHNS, S.; MAHER, G.; MCBRIDE, H. J.; LIU, J. Analytical and functional similarity of Amgen biosimilar ABP 215 to bevacizumab. **mAbs**, v. 10, n. 4, p. 678–691, 2018.
- SIDDIQUI, I. A.; SANNA, V.; AHMAD, N.; SECHI, M.; MUKHTAR, H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1348, n. 1, p. 20–31, 2015.
- SIGNORELLO, L.; PUCCIARELLI, S.; BONACUCINA, G.; POLZONETTI, V.; CESPI, M.; PERINELLI, D.; PALMIERI, G.; PETTINARI, R.; PETTINARI, C.; FIORENTINI, G.; VINCENZETTI, S. Quantification, Microbial Contamination, Physico-chemical Stability of Repackaged Bevacizumab Stored Under Different Conditions. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 113–119, 2014.
- SILVA, T.; REIS, J.; TEIXEIRA, J.; BORGES, F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Ageing Research Reviews**, v. 15, p. 116–145, 2014.
- SKILES, M. L.; HANNA, B.; RUCKER, L.; TIPTON, A.; BROUGHAM-COOK, A.; JABBARZADEH, E.; BLANCHETTE, J. O. ASC Spheroid Geometry and Culture Oxygenation Differentially Impact Induction of Preangiogenic Behaviors in Endothelial Cells. **Cell Transplantation**, v. 24, n. 11, p. 2323–2335, 2015.

SLIOGERYTE; GAVARA. Vimentin Plays a Crucial Role in Fibroblast Ageing by Regulating Biophysical Properties and Cell Migration. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1164, 2019.

SOOD, A.; GUPTA, A.; BHARADWAJ, R.; RANGANATH, P.; SILVERMAN, N.; AGRAWAL, G. Biodegradable disulfide crosslinked chitosan/stearic acid nanoparticles for dual drug delivery for colorectal cancer. **Carbohydrate Polymers**, v. 294, p. 119833, 2022.

SOUSA, F.; CRUZ, A.; PINTO, I. M.; SARMENTO, B. Nanoparticles provide long-term stability of bevacizumab preserving its antiangiogenic activity. **Acta Biomaterialia**, v. 78, p. 285–295, 2018.

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.

SOUSA, F.; SARMENTO, B.; NEVES-PETERSEN, M. T. Biophysical study of bevacizumab structure and bioactivity under thermal and pH-stresses. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 127–136, 2017.

STEILING, W.; BRACHER, M.; COURTELLEMONT, P.; DE SILVA, O. The HET-CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. **Toxicology in Vitro**, v. 13, n. 2, p. 375–384, 1999.

SUARATO, G.; LI, W.; MENG, Y. Role of pH-responsiveness in the design of chitosan-based cancer nanotherapeutics: A review. **Biointerphases**, v. 11, n. 4, p. 04B201, 2016.

SUR, S.; RATHORE, A.; DAVE, V.; REDDY, K. R.; CHOUHAN, R. S.; SADHU, V. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. **Nano-Structures and Nano-Objects**, v. 20, p. 100397, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100397>

SWIDSINSKI, A.; LOENING-BAUCKE, V.; THEISSIG, F.; ENGELHARDT, H.; BENGMARK, S.; KOCH, S.; LOCHS, H.; DORFFEL, Y. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. **Gut**, v. 56, n. 3, p. 343–350, 2007.

TORCHILIN, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 137–172, 2001.

UNGER, R. E.; KRUMP-KONVALINKOVA, V.; PETERS, K.; KIRKPATRICK, C. J. In Vitro Expression of the Endothelial Phenotype: Comparative Study of Primary Isolated Cells and Cell Lines, Including the Novel Cell Line HPMEC-ST1.6R. **Microvascular Research**, v. 64, n. 3, p. 384–397, 2002.

VAKHRUSHEV, I. V.; NEZHURINA, E. K.; KARALKIN, P. A.; TSVETKOVA, A. V.; SERGEEVA, N. S.; MAJOUGA, A. G.; YARYGIN, K. N. Heterotypic Multicellular Spheroids as Experimental and Preclinical Models of Sprouting Angiogenesis. **Biology**, v. 11, n. 1, p. 18, 2021.

- VILELA, J. A. P.; PERRECHIL, F. D. A.; PICONE, C. S. F.; SATO, A. C. K.; CUNHA, R. L. Da. Preparation, characterization and in vitro digestibility of gellan and chitosan-gellan microgels. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 54–62, 2015.
- WANG, C.; HO, P. C.; LIM, L. Y. Wheat germ agglutinin-conjugated PLGA nanoparticles for enhanced intracellular delivery of paclitaxel to colon cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, n. 1–2, p. 201–210, 2010.
- WANG, S.; LI, C.; COPELAND, L.; NIU, Q.; WANG, S. Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 5, p. 568–585, 2015.
- WENGER, A.; KOWALEWSKI, N.; STAHL, A.; MEHLHORN, A. T.; SCHMAL, H.; STARK, G. B.; FINKENZELLER, G. Development and characterization of a spheroidal coculture model of endothelial cells and fibroblasts for improving angiogenesis in tissue engineering. **Cells Tissues Organs**, v. 181, n. 2, p. 80–88, 2005.
- YILMAZ, T.; MALDONADO, L.; TURASAN, H.; KOKINI, J. Thermodynamic mechanism of particulation of sodium alginate and chitosan polyelectrolyte complexes as a function of charge ratio and order of addition. **Journal of Food Engineering**, v. 254, p. 42–50, 2019.
- YOU, X.; KANG, Y.; HOLLETT, G.; CHEN, X.; ZHAO, W.; GU, Z.; WU, J. Polymeric nanoparticles for colon cancer therapy: overview and perspectives. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 48, p. 7779–7792, 2016.
- YU, J.; HSU, Y.-C.; LEE, J.-K.; CHENG, N.-C. Enhanced angiogenic potential of adipose-derived stem cell sheets by integration with cell spheroids of the same source. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, n. 1, p. 276, 2022.
- YUAN, H.; GUO, C.; LIU, L.; ZHAO, L.; ZHANG, Y.; YIN, T.; HE, H.; GOU, J.; PAN, B.; TANG, X. Progress and prospects of polysaccharide-based nanocarriers for oral delivery of proteins/peptides, **Carbohydrate Polymers**, v.312, 120838, 2023.
- ZHANG, J.; ZHU, X.; JIN, Y.; SHAN, W.; HUANG, Y. Mechanism Study of Cellular Uptake and Tight Junction Opening Mediated by Goblet Cell-Specific Trimethyl Chitosan Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, p. 1520–1532, 2014.
- ZHANG, L.; SUN, M.; GUO, R.; JIANG, Z.; LIU, Y.; JIANG, X.; YANG, C. Chitosan surface-modified hydroxycamptothecin loaded nanoparticles with enhanced transport across caco-2 cell monolayer. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v.6, p.2912-2920, 2006.
- ZHANG, M.; LIU, J.; LIU, G.; XING, Z.; JIA, Z.; LI, J.; WANG, W.; WANG, J.; QIN, L.; WANG, X.; WANG, X. Anti-vascular endothelial growth factor therapy in breast cancer: Molecular pathway, potential targets, and current treatment strategies, **Cancer Letters**, v.520, p.422-433, 2021.
- ZHENG, Z.; PAN, X.; LUO, L.; ZHANG, Q.; HUANG, X.; LIU, Y.; WANG, K.; ZHANG, Y. Advances in oral absorption of polysaccharides: Mechanism, affecting factors, and improvement strategies, **Carbohydrate Polymers**, v.282, 119110, 2022.

ZUCHOWSKA, A.; BUTA, A.; DABROWSKI, B.; JASTRZEBSKA, E.; ZUKOWSKI, K.; BRZOZKA, Z. 3D and 2D cell models in a novel microfluidic tool for evaluation of highly chemically and microbiologically pure graphene oxide (GO) as an effective drug carrier. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 302, 2020.