

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA ENCAPSULADAS COM  
PACLITAXEL E FUNCIONALIZADAS COM BEVACIZUMABE PARA TERAPIA DO  
CARCINOMA PULMONAR**

BEATRIZ MARCHINI BINDÃO MARTINS

SÃO CARLOS

2024



BEATRIZ MARCHINI BINDÃO MARTINS

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA ENCAPSULADAS COM  
PACLITAXEL E FUNCIONALIZADAS COM BEVACIZUMAB PARA TERAPIA DO  
CARCINOMA PULMONAR

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado como requisito parcial para a  
obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia pela Universidade Federal de  
São Carlos.

Orientadora: Dra. Camila Fernanda Rodero

Coorientadora: Dra. Maria Cristina da Silva  
Pranchevicius

São Carlos

2024

## AGRADECIMENTOS

Ao curso de Biotecnologia da UFSCar: secretaria, coordenação e a todos os professores e técnicos que contribuíram para a minha formação como Biotecnologista.

À minha orientadora, Dra Camila Rodero, por todos os ensinamentos, paciência e esforço ao longo deste e de outros projetos. Obrigada por me apoiar e ser meu exemplo sempre.

À minha coorientadora, Dra Maria Cristina da Silva Pranchevicius.

A todos os membros do laboratório GNano (IFSC/USP). Em especial ao professor Valtencir Zucolotto, por ter aberto as portas do laboratório para mim.

À Dra. Angelica Mazuera - seu amor pela ciência é inspirador. Obrigada por compartilhá-lo comigo.

Aos meus pais, Pedro Luiz e Maria Cristina - sem vocês nada disso seria possível.

Às minhas amigas Larissa, Mariani e Marina, por dividirem a vida comigo. Cada conquista fica mais especial tendo vocês ao meu lado.

Às minhas companheiras de laboratório Mariane e Maria Vitória, por me acompanharem nos momentos bons e ruins e compartilharem cafés e docinhos.

Ao meu namorado, Rafael, por ser meu porto seguro durante essa jornada. Obrigada por sempre acreditar em mim.

Aos meus queridos amigos Gil, Rafaela e Ana Laura. Obrigada por tornarem essa caminhada mais leve e especial.

Por fim, por cada esforço silencioso, por cada superação invisível, agradeço a mim mesma.

## RESUMO

MARCHINI, B. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLGA encapsuladas com paclitaxel e funcionalizadas com bevacizumabe para terapia do carcinoma pulmonar.** 2025. 56 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2025.

O câncer de pulmão é uma neoplasia maligna de grande incidência e mortalidade, ocupando o segundo lugar entre os mais comuns no mundo, segundo a *International Agency for Research on Cancer*. O câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) representa cerca de 85% dos casos registrados. Mesmo com grandes avanços no tratamento tenham sido alcançados nos últimos anos, a nanomedicina representa uma importante ferramenta na abordagem de novas possibilidades terapêuticas, oferecendo alternativas para superar dificuldades comuns dos tratamentos convencionais. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar um sistema de liberação baseado em nanopartículas de PLGA funcionalizadas com bevacizumabe, um anticorpo monoclonal recombinante, para encapsulação e entrega do Paclitaxel, um quimioterápico que é considerado o avanço mais significativo na quimioterapia das últimas duas décadas para tratamento do carcinoma pulmonar. Duas metodologias de síntese (química e eletrostática) foram testadas de forma a avaliar a encapsulação do PTX e a ligação do BVZ. Com as formulações desenvolvidas, foram realizadas caracterizações físico-químicas comparando as duas técnicas, bem como as variações na concentração do fármaco e do anticorpo. As técnicas desenvolvidas neste trabalho demonstraram que a nanopartícula sintetizada via Síntese Química com menor quantidade de anticorpo apresentou maior estabilidade, com uma média de tamanho de 261,35 nm, PDI de 0,41, Potencial Zeta de -13,94,  $1,07 \cdot 10^{12}$  partículas/mL e aproximadamente 99,97% de Eficiência de Encapsulação do Paclitaxel e 99,94% de Eficiência de Ligação do bevacizumabe. Portanto, este trabalho demonstrou grande potencial para o desenvolvimento de diferentes técnicas de formação de nanopartículas, visando uma aplicação mais precisa no tratamento do câncer de pulmão.

**Palavras-chave:** nanopartículas de PLGA, paclitaxel, bevacizumabe, carcinoma pulmonar.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Síntese e metabolismo do PLGA.....	15
Figura 2 - Estrutura molecular do paclitaxel .....	17
Figura 3 - Esquema da Síntese Eletrostática.....	25
Figura 4 - Representação esquemática da reação NHS/EDC .....	26
Figura 5 - Representação da Síntese Química.....	26
Figura 6 - Estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta das NP E PLGA + PTX.....	29
Figura 7 - Estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta das NP E Branca PLGA.....	30
Figura 8 - Estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta das NP E BVZ 0,5.....	30
Figura 9 - Estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta das NP E Branca BVZ 0,5.....	31
Figura 10 - Estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta da NP E BVZ 1.....	31
Figura 11 - Estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta da NP E Branca BVZ 1.....	32
Figura 12 - Estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta das NP Q PLGA + PTX.....	33
Figura 13 - Estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta das NP Q Branca PLGA.....	33
Figura 14 - Estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta das NP Q BVZ 0,5.....	34
Figura 15 - Estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta da NP Q Branca BVZ 0,5.....	34
Figura 16 - Estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta da NP Q BVZ 1.....	35
Figura 17 - Estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta da NP Q Branca BVZ 1.....	35
Figura 18 - Distribuição de tamanho dos sistemas obtidos na Síntese Eletrostática.....	36

Figura 19 - Distribuição de tamanho dos sistemas obtidos na Síntese Química.....	38
Figura 20 - Microscopia de força atômica das NPs da Síntese Eletrostática.....	41
Figura 21 - Microscopia de força atômica das NPs da Síntese Química.....	41
Figura 22 - Cromatograma obtido para o Paclitaxel.....	44
Figura 23 - Espectros vibracionais na região do infravermelho para a síntese Eletrostática.....	45
Figura 24 - Espectros vibracionais na região do infravermelho para a síntese Química.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tamanho, PDI e Potencial Zeta das NP da Síntese Eletrostática.....	27
Tabela 2 - Tamanho, PDI e Potencial Zeta das NP da Síntese Química.....	28
Tabela 3 - Valores de tamanho e concentração de partículas por mL dos sistemas da Síntese Eletrostática.....	36
Tabela 4 - Valores de tamanho e concentração de partículas por mL dos sistemas da Síntese Química.....	37
Tabela 5 - Porcentagens da eficiência de encapsulamento para Sínteses Eletrostática e Química.....	39
Tabela 6 - Porcentagens da eficiência de encapsulamento para Sínteses Eletrostática e Química.....	40

## LISTA DE SIGLAS

BCA	Ácido bicinconínico
BVZ	Bevacizumab
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDC	1-Etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
NHS	N-hidroxisuccinimida
NP	Nanopartícula
NSCLC	<i>Non Small Cell Lung Cancer</i>
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
PDI	Índice de polidispersividade
PEI	Poliétilenoimina
PLGA	Poli Ácido Lático co-Glicólico
PTX	Paclitaxel
PVA	Acetato de Polivinila
SCLC	<i>Small Cell Lung Cancer</i>
VEGF	Fatores de Crescimento Endotelial Vascular

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1. CÂNCER DE PULMÃO.....	11
1.2. CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-PEQUENAS.....	11
1.3. ANGIOGÊNESE.....	12
1.4. NANOMEDICINA.....	13
1.5. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	14
1.6. PLGA.....	15
1.7. BEVACIZUMABE.....	16
1.8. PACLITAXEL.....	17
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>20</b>
3.1. SOLVENTES E REAGENTES.....	20
3.2. SÍNTESE POR CONJUGAÇÃO ELETROSTÁTICA.....	20
3.2.1. PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	20
3.2.2. FUNCIONALIZAÇÃO COM BVZ.....	21
3.3. SÍNTESE POR CONJUGAÇÃO QUÍMICA.....	21
3.3.1. PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	21
3.3.2. FUNCIONALIZAÇÃO COM BVZ.....	21
3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	22
3.4.1. DIÂMETRO HIDRODINÂMICO, ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE E POTENCIAL ZETA.....	22
3.4.2. ANÁLISE DE ESTABILIDADE.....	22
3.4.3. ANÁLISE DE RASTREAMENTO (NTA).....	22
3.4.4. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO PTX.....	22
3.4.5. EFICIÊNCIA DE LIGAÇÃO DO BVZ.....	23
3.4.6. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	23
3.4.7. PERFIL DE LIBERAÇÃO PTX.....	24
3.4.8. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	24
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
4.1. SÍNTESE E ESTRUTURA DAS NANOPARTÍCULAS.....	25
4.1.1. SÍNTESE POR CONJUGAÇÃO ELETROSTÁTICA.....	25
4.1.2. SÍNTESE POR CONJUGAÇÃO QUÍMICA.....	25
4.1.3. DIÂMETRO HIDRODINÂMICO, PDI E POTENCIAL ZETA.....	27
4.1.4. ANÁLISE DE ESTABILIDADE.....	29
4.1.5. ANÁLISE DE RASTREAMENTO (NTA).....	36
4.1.6. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO PTX.....	39
4.1.7. EFICIÊNCIA DE LIGAÇÃO DO BVZ.....	39
4.1.8. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	41
4.1.9. PERFIL DE LIBERAÇÃO PTX.....	42
4.1.10. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	44
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. CÂNCER DE PULMÃO**

O câncer de pulmão corresponde a 12% dos casos totais de câncer no mundo, o que o torna o tipo de câncer mais frequente e a maior causa de morte por câncer em homens e mulheres combinados (Bade, Cruz, 2020). O principal fator de risco da doença é o fumo de cigarros, que é responsável por cerca de 80% dos casos de câncer de pulmão no mundo (Testa et al, 2018). Existem ao menos 69 substâncias carcinogênicas na composição dos cigarros (Schabath; Coté, 2019), como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e nitrosaminas, e a ativação dessas pode resultar em metilação de genes, amplificação ou exclusão de segmentos de DNA, alterações na sequência de DNA ou ganhos ou perdas de cromossomos inteiros (Barta et al, 2019).

Ademais, outros fatores de risco importantes são cigarros eletrônicos, tabagismo passivo, poluição do ar e fatores genéticos. O câncer de pulmão apresenta dois subtipos histológicos principais: câncer pulmonar de células pequenas (*small-cell lung cancer* ou SCLC) e câncer pulmonar de células não-pequenas (*non-small cell lung cancer* ou NSCLC), responsáveis, respectivamente, por 15 e 85% dos casos registrados (Kriegsmann et al, 2020).

### **1.2. CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-PEQUENAS**

O NSCLC é classificado em 3 tipos principais: tumor de células grandes, adenocarcinoma e carcinoma escamoso (Duma, Santana-Vila, Molina, 2019). O carcinoma escamoso é responsável por 30% dos casos de câncer e são marcados pela presença dos marcadores imuno histoquímicos CK5, CK6, p40 e desmogleína-3, além de tenderem a surgir de células do epitélio das vias aéreas. Já o adenocarcinoma representa 40% dos casos da doença e se origina das células alveolares, tendendo a expressar marcadores imuno histoquímicos como TTF-1 e napsina A. Os tumores de células grandes, por sua vez, são compostos por células com citoplasmas volumosos e nucléolos grandes e representam cerca de 10% dos casos de câncer de pulmão.

A quantidade de tratamentos disponíveis depende tipo de célula histológica, estágio e condição clínica; no entanto, apesar dos bons resultados a curto prazo, os tratamentos convencionais, como cirurgia e radioterapia, apresentam uma baixa

taxa de resposta a longo prazo devido à sua falta de especificidade no tumor e à elevada citotoxicidade fora do alvo (García-Fernández et al, 2020). Nesse sentido, as nanopartículas atuam como *drug-delivery systems*, garantindo uma liberação específica dos fármacos com menor toxicidade.

### **1.3. ANGIOGÊNESE**

A angiogênese é o processo no qual novos vasos são formados a partir de vasos existentes, sendo uma resposta compensatória primária à diminuição da oxigenação tecidual. (Iruela-Arispe; Zovein, 2017; Thomas, 2016). Este processo pode ser classificado em dois tipos, sendo eles a angiogênese por brotamento e a angiogênese por intussuscepção (Chellappan et al, 2018). A angiogênese por brotamento é caracterizada pelo crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes e geralmente ocorre durante o desenvolvimento embrionário, enquanto a angiogênese por intussuscepção consiste no aumento da complexidade dos vasos sanguíneos recém-formados numa rede vascular.

Em tecidos saudáveis, não há angiogênese significativa, uma vez que os vasos sanguíneos são formados durante o desenvolvimento embrionário, em resposta à ovulação e na recuperação de ferimentos (Karlsson et al, 2018). Contudo, em tumores sólidos, novos vasos sanguíneos são formados como resposta à hipóxia do ambiente, uma vez que a hipóxia tumoral induz a regulação positiva de fatores de crescimento pró-angiogênicos nas células tumorais, como angiogenina e fatores de crescimento de fibroblastos e vasculares. Esses novos vasos favorecem a progressão da doença por contribuírem com o crescimento dos tumores e com o processo de metástase.

Diferentemente da constituição de vasos sanguíneos maduros em circunstâncias normais, os vasos presentes dentro do tumor são complexos, desordenados, irregulares e apresentam vazamentos, resultando em hipóxia e na entrega ineficaz de agentes antineoplásicos ao ambiente microscópico do tumor (Yang, Yan, Liu, 2018). Ambos os tipos de angiogênese - por brotamento ou por intussuscepção - são igualmente importantes no auxílio ao crescimento dos tumores, porque uma alta vascularização garantirá a sobrevivência e o crescimento do tumor e permitirá metástases para outras partes do corpo (Chellappan et al, 2018).

Dentre os fatores pró-angiogênicos secretados pelo tumor, os Fatores de Crescimento Endotelial Vascular (VEGFs) e, especialmente, VEGF-A, foram identificados como elementos essenciais na indução da angiogênese tumoral (Garcia et al, 2020). Os VEGFs se ligam às tirosina-quinases dos receptores do VEGF (VEGFR1-3) nas células endoteliais ativando sua via de sinalização, e por meio desses mecanismos, estimulam a proliferação e a sobrevivência das células endoteliais e aumentam a permeabilidade dos vasos, assim apoiando as demandas metabólicas do tumor em crescimento.

Dada a importância da angiogênese na biologia dos tumores, esforços no desenvolvimento de medicamentos nas últimas décadas têm sido dedicados a inibição da angiogênese, tendo o VEGF-A como um alvo terapêutico para a normalização da vasculatura tumoral (Garcia et al, 2020).

#### **1.4. NANOMEDICINA**

A nanomedicina consiste na integração da nanotecnologia à medicina, e possibilitou a ultrapassagem de limitações relativas aos tratamentos convencionais do câncer (Paras Mani Giri et al, 2023). A principal inovação nesta metodologia de tratamento é a incorporação dos nanomateriais (Chancino et al, 2014) e seu transporte exato até o local-alvo (Javad Sharifi-Rad et al, 2021). Dessa forma, garante-se um tratamento eficaz e seguro, uma vez que as nanopartículas podem ser projetadas com diversos agentes quimioterápicos e entregues diretamente no local do tumor (Ventola, 2012).

As nanopartículas são usadas como carreadores de fármacos; no caso do câncer, de quimioterápicos diretamente ao tumor (Javad Sharifi-Rad et al, 2021). O uso das nanopartículas como formas de *drug-delivery system* é muito eficiente por algumas características intrínsecas delas, como longo tempo de circulação, penetração intracelular aprimorada, eficiência de encapsulação, estabilidade fisiológica, liberação prolongada e controlada do fármaco e melhor biodisponibilidade (Kanwar et al, 2019; Paras Mani Giri et al, 2023). Para garantir que o carreamento do fármaco seja feito de forma eficiente, é necessário que a nanopartícula seja biocompatível, ou seja, que não cause resposta imune ou qualquer efeito negativo no organismo (Wilczewska, 2012).

Em relação ao tratamento de doenças pulmonares, os tratamentos convencionais são aplicados de forma sistemática ou diretamente nos pulmões via inalação; neste caso, a inalação de fármacos livres, com moléculas em forma de aerossol, e sua rápida liberação resulta em alta toxicidade pulmonar (Yetisgin, 2020). Além disso, a eficácia do medicamento é restrita pelo tamanho do aerossol, uma vez que moléculas com dimensões superiores a 5  $\mu\text{m}$  não conseguem atravessar o sistema respiratório superior, partículas na faixa de 1 a 5  $\mu\text{m}$  depositam-se principalmente no sistema respiratório inferior e as partículas menores que 1  $\mu\text{m}$  permanecem em suspensão no ar e são expiradas. Nesse sentido, os *drug-delivery systems* baseados em nanopartículas permitem maior biodisponibilidade, liberação controlada e menor dosagem e frequência de aplicação.

### **1.5. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**

As nanopartículas poliméricas são sintetizadas a partir de polímeros sintéticos ou naturais (Wilczewska, 2012), e apresentam estrutura sólida com tamanho variável entre 10 nm e 1  $\mu\text{m}$  (Kanwar et al, 2019). Elas podem ser carregadas com compostos ativos em seu interior ou que ficam adsorvidos na superfície do núcleo polimérico, sendo uma ferramenta eficiente na entrega de fármacos.

As vantagens das nanopartículas poliméricas como transportadores de fármacos incluem seu uso potencial para liberação controlada, a capacidade de proteção do fármaco e outras moléculas com atividade biológica contra o ambiente, melhora da biodisponibilidade e índice terapêutico (Carreiró et al, 2020). Outra característica vantajosa deste tipo de nanopartícula é sua estabilidade em fluidos biológicos, além da capacidade dos polímeros de encapsular o fármaco no interior da partícula ou de adsorvê-lo na membrana (Gagliardi et al, 2021).

Duas propriedades essenciais na escolha de polímeros para síntese das nanopartículas poliméricas são a citotoxicidade e a biodegradabilidade (Adhikari, 2021). Em relação à citotoxicidade, é importante que o polímero escolhido não interaja negativamente com os tecidos e órgãos do corpo, o que comprometeria a ação da nanopartícula. A biodegradabilidade, por outro lado, é significativa pois os polímeros biodegradáveis, após sua degradação, geram subprodutos inofensivos e

biocompatíveis (Idrees et al, 2020). Dessa forma, a utilização destes polímeros reduz os efeitos colaterais de um determinado medicamento, além de reduzirem efeitos inflamatórios e apresentarem boa permeabilidade.

### 1.6. PLGA

O PLGA (poli ácido lático co-glicólico) é um polímero biocompatível e biodegradável amplamente utilizado na síntese de nanopartículas e outras aplicações biomédicas (Danhier et al, 2012; Ghitman et al, 2020). Sua síntese ocorre por co-polimerização por abertura de anel dos dímeros cíclicos de ácido glicólico e ácido lático na presença de isopropóxido de alumínio ou alcóxido de estanho II como catalisadores de reação (Figura 1). As formas do PLGA são identificadas pela proporção dos polímeros usados na síntese; por exemplo, o PLGA 75:25 é composto por 75% de ácido lático e 25% de ácido glicólico (Sharma et al, 2016).

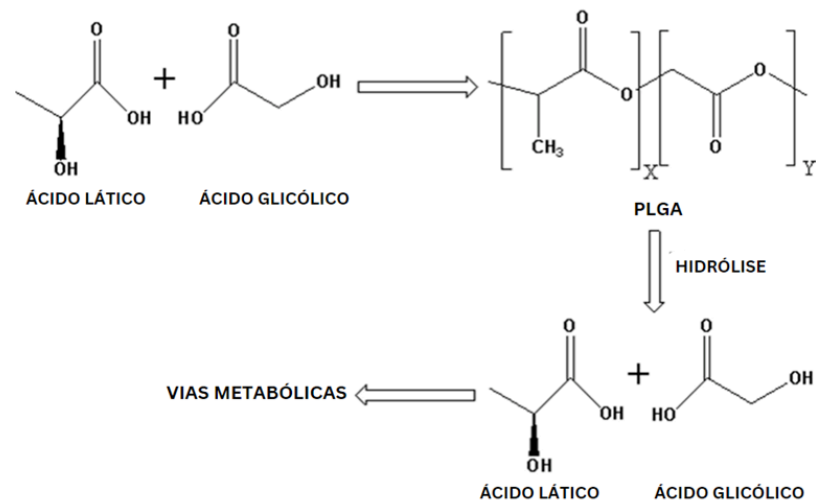


Figura 1: síntese e metabolismo do PLGA onde X e Y representam o número de unidades de ácido lático e ácido glicólico, respectivamente. Adaptado de Alvi et al, 2022.

Uma das principais vantagens do uso do PLGA em *drug-delivery systems* é sua baixa toxicidade sistêmica, uma vez que a hidrólise do polímero resulta em dois monômeros (ácido lático e ácido glicólico) que já são naturalmente metabolizados pelo corpo humano via ciclo de Krebs e eliminados na forma de água e dióxido de carbono (Danhier et al, 2012). O polímero também proporciona uma melhoria no efeito de permeabilidade e retenção, assegurando a administração sustentada e

controlada de fármacos no tratamento do câncer (Hock Ing Chiu et al., 2021). Além disso, promove um aumento na concentração de medicamentos na vasculatura tumoral e direciona a entrega por meio de superfície conjugada com ligantes de direcionamento.

Nanopartículas de PLGA com fármacos encapsulados são de especial interesse para administração intracelular de medicamentos devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e características de liberação prolongada (Khan et al, 2016). Já foi demonstrado na literatura (Fonseca, Simões, Gaspar, 2002) que a incorporação de paclitaxel nas nanopartículas de PLGA aumenta fortemente a sua eficácia antitumoral em comparação com o medicamento livre, sendo este efeito mais relevante para tempos de incubação prolongados com células.

### **1.7. BEVACIZUMABE**

Bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado do tipo IgG1, com peso molecular de 149 kDa, que se conecta ao fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) humano e impede a interação entre o VEGF-A e os receptores tirosina quinases do VEGF, impedindo a angiogênese tumoral (Sousa et al, 2017). É metabolizado através do catabolismo proteolítico em todo o organismo, incluindo nas células endoteliais, de maneira semelhante ao metabolismo e à via de excreção da imunoglobulina G endógena (Keating, 2014).

As células cancerígenas apresentam alta taxa metabólica, o que resulta em um ambiente em constante estado de hipóxia, uma vez que a demanda e o consumo de oxigênio são elevados (Kazazi-Hyseni, Beijnen, Schellens, 2010). Normalmente em tais condições, o fator induzível por hipóxia (HIF) se liga ao elemento de resposta à hipóxia presente no gene VEGF, induzindo assim a transcrição da proteína VEGF, a qual se liga aos receptores VEGF-A (Sousa et al, 2017). Esses receptores são expressos na superfície das células endoteliais e desempenham um papel crítico no favorecimento da angiogênese, estimulando o recrutamento e a proliferação de células endoteliais. O bevacizumabe bloqueia a interação entre o VEGF-A e seus receptores na superfície das células, inibindo assim a angiogênese, o que reduz o suprimento sanguíneo ao tumor e impede seu crescimento.

## 1.8. PACLITAXEL

O paclitaxel (PTX) é um diterpenoide pseudoalcaloide que consiste em um anel taxano e um grupo N-benzoilfenilisoserina (Alves et al, 2018). Este composto farmacêutico apresenta fórmula molecular  $C_{47}H_{51}NO_{14}$  (Figura 2) e peso molecular de 853 Da, pertencendo à classe dos taxanos e atuando como agente estabilizador de microtúbulos. O paclitaxel vem sendo amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer devido à sua capacidade de bloquear a progressão do ciclo celular. Também é usado em doenças coronárias, doenças de pele, fibrose renal e hepática, inflamação, e ensaios clínicos estão sendo conduzidos para doenças cerebrais degenerativas e regeneração de axônios (Zhu, Chen, 2019).

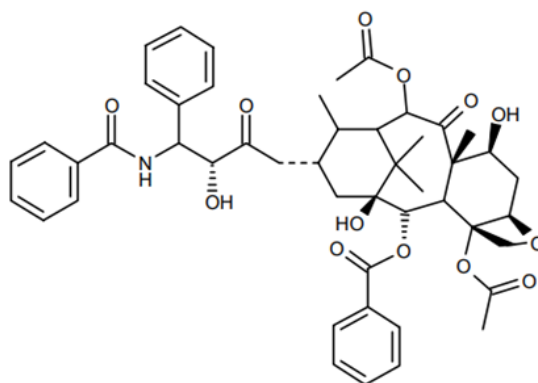


Figura 2: estrutura molecular do PTX. Fonte: MARKMAN, MEKHAIL, 2002.

Ao contrário de outros medicamentos anticancerígenos que se ligam à tubulina e impedem a montagem dos microtúbulos, o paclitaxel promove a junção da tubulina em microtúbulos e previne a dissociação destes, bloqueando a progressão do ciclo celular, prevenindo a mitose e inibindo o crescimento de células cancerígenas (Zhu, Chen, 2019). Os microtúbulos são os principais constituintes do citoesqueleto e estão presentes em todos os tipos celulares, inclusive nas células tumorais, e são polímeros proteicos longos, filamentosos e em forma de tubo, compostos por heterodímeros de tubulinas  $\alpha$  e  $\beta$  (Alqahtani, 2019). O paclitaxel se liga aos 31 aminoácidos iniciais na extremidade N-terminal da subunidade  $\beta$ -tubulina no microtúbulo, e essa união estabiliza os microtúbulos, intensificando a polimerização dessas estruturas, o que resulta no bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e no processo de morte celular.

É importante ressaltar que o PTX não afeta a síntese de DNA e RNA nas células cancerígenas nem danifica as moléculas de DNA, uma vez que atua no equilíbrio dinâmico dos microtúbulos e tubulinas (Yan-Hua et al, 2020). Além disso, o paclitaxel também pode restringir a angiogênese tumoral, uma vez que diminui a migração endotelial de células em concentrações de  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  M (Clemente et al, 2019). Estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* demonstraram que o paclitaxel impede a proliferação, motilidade e migração de células endoteliais ao interferir em diversas vias de sinalização celular envolvidas na angiogênese (Kargozar, 2020). Duas das proteínas-alvo mais importantes e bem definidas do paclitaxel são VEGF e FGF-2 em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs), e já foi comprovada a capacidade do paclitaxel em reduzir *in vitro* a expressão de Ang-1, um fator pró-vasculogênico e angiogênico (Hata et al, 2004), e induzir a expressão de TSP-1, um potente inibidor endógeno da angiogênese.

Devido à sua baixa solubilidade em água, o PTX é frequentemente formulado com etanol e Cremophor® (óleo de rícino polioxetilado), o qual vem sendo apontado como possível fonte dos efeitos colaterais associados ao paclitaxel, principalmente em relação à neurotoxicidade (Ramalingam, Belani, 2004). Nesse contexto, as nanoformulações de PTX são capazes de melhorar as propriedades farmacológicas do PTX sem a necessidade do uso de solventes como o Cremophor®, diminuindo assim o aparecimento de efeitos colaterais e mantendo a ação do fármaco.

A utilização conjunta de PTX e BVZ vem sendo testada com sucesso como forma de tratamento de diversos tipos de câncer (Miller et al, 2007; Bilger et al, 2022; Cortot et al, 2020; Funasaka et al, 2021), sobretudo visando a combinação das propriedades anticancerígenas de cada um dos compostos. Yanagisawa e colaboradores (2010) relataram que a ação antitumoral sinérgica do paclitaxel e bevacizumabe em conjunto pode ser decorrente do aumento na concentração de paclitaxel no tumor, resultante da diminuição da permeabilidade vascular quando administrado simultaneamente com o bevacizumabe.

Neste trabalho, foi proposta a síntese de nanopartículas de PTX funcionalizadas com BVZ, com a intenção de aumentar a eficácia do tratamento de NSCLC ao combinar a capacidade antiangiogênica de BVZ com a ação quimioterápica de PTX, além de melhorar a entrega direcionada, reduzir toxicidades e explorar a sinergia dos dois fármacos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de um sistema de liberação baseado em nanopartículas de PLGA encapsuladas com paclitaxel e funcionalizadas com bevacizumabe para tratamento do carcinoma pulmonar.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtenção das nanopartículas de PLGA e paclitaxel por conjugação química e eletrostática;
- Encapsulação do paclitaxel;
- Funcionalização das nanopartículas com bevacizumabe;
- Caracterização das nanopartículas por determinação do tamanho médio, carga superficial, morfologia, eficiência de encapsulação e perfil de liberação.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. SOLVENTES E REAGENTES**

- A. Paclitaxel – Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, EUA);
- B. Ultrafiltro de centrifugação Amicon® – Merck KGaA (Alemanha);
- C. Água ultrapura obtida no sistema MiliQ – Merck Millipore (Alemanha).
- D. Poli (ácido láctico-co-glicólico) 50:50 - Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, EUA);
- E. Acetona - Êxodo Científica (Sumaré, SP);
- F. Avastin® Bevacizumabe - Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemanha);
- G. Diclorometano - Sigma Aldrich Co (St Louis, MO, EUA);
- H. Poliacetato de Vinila - Sigma Aldrich Co (St Louis, MO, EUA);
- I. N-hidroxisuccinimida - Sigma Aldrich Co (St Louis, MO, EUA);
- J. 1-Etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida - Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, EUA);
- K. Solução Tampão PBS pH 7,4;
- L. Polietilenoimina - Sigma Aldrich Co (St Louis, MO, EUA).

#### **3.2. SÍNTESE POR CONJUGAÇÃO ELETROSTÁTICA**

##### **3.2.1. PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS**

As nanopartículas com fármaco foram preparadas por emulsificação-evaporação de solvente, na qual a difusão do solvente na fase aquosa leva à formação das NPs (Leroux et al, 1995). A fase orgânica foi composta por 1 mg de Paclitaxel dissolvido em 200  $\mu$ L de acetona e por 20 mg de PLGA 50:50 dissolvidos em 800  $\mu$ L de diclorometano (Liu et al, 2019). A fase orgânica foi adicionada gota a gota a 5 mL de solução de PVA 0,5% e 2 mg de polietilenoimina e a mistura foi sonicada em banho de gelo por 3 minutos a 300W. Por fim, a emulsão final foi agitada à temperatura ambiente (25° C) por 6 horas e lavadas. As nanopartículas brancas foram preparadas pela mesma metodologia, contudo sem a adição de paclitaxel.

### **3.2.2. FUNCIONALIZAÇÃO COM BVZ**

A funcionalização das nanopartículas com fármaco e brancas foi feita com duas quantidades diferentes de bevacizumabe. A primeira ocorreu pela mistura de 40  $\mu\text{L}$  de BVZ (Avastin® Roche, 25mg/mL) com as NPs em 960  $\mu\text{L}$  de PBS (pH 8) por 2 horas em geladeira; e a segunda, pela mistura de 20  $\mu\text{L}$  de BVZ com 980  $\mu\text{L}$  de PBS seguindo o mesmo procedimento anterior. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 4000 rpm para remoção de íons livres e BVZ não ligado.

### **3.3. SÍNTESE POR CONJUGAÇÃO QUÍMICA**

#### **3.3.1. PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS**

As nanopartículas com PTX foram preparadas por emulsificação-evaporação de solvente, na qual a difusão do solvente na fase aquosa leva à formação das NPs (Leroux et al, 1995). A fase orgânica foi composta por 1 mg de PTX dissolvido em 200  $\mu\text{L}$  de acetona e por 20 mg de PLGA 50:50 dissolvidos em 800  $\mu\text{L}$  de diclorometano (Liu et al, 2019). A fase orgânica foi adicionada gota a gota a uma solução de PVA 0,5% e a mistura foi sonicada em banho de gelo por 3 minutos a 300W. Por fim, a emulsão final foi agitada à temperatura ambiente (25° C) por 6 horas e lavadas. As nanopartículas brancas foram preparadas pela mesma metodologia, contudo sem a adição de paclitaxel.

#### **3.3.2. FUNCIONALIZAÇÃO COM BVZ**

Na Síntese Química, a funcionalização das nanopartículas com e sem o fármaco ocorreu através de uma reação carbodiimida: 2 mM de EDC e 5 mM de NHS foram acrescentados à 2mL de nanopartículas. A solução permaneceu em agitação por 4 horas a 25°C e, em seguida, centrifugada para retirar o excesso de EDC e NHS, sendo assim foram coletadas nanopartículas.

Por fim, a ligação do BVZ ocorreu pela incubação das NPs em PBS pH 7,4 juntamente com duas quantidades diferentes de BVZ (40 e 20  $\mu\text{L}$ ) por 18 horas em geladeira. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 4000 rpm para remoção de íons livres e BVZ não ligado.

### **3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS**

#### **3.4.1. DIÂMETRO HIDRODINÂMICO, ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE E POTENCIAL ZETA**

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas foi realizado através do Zetasizer (Malvern espectrômetro Nano ZS – Malvern Instruments, UK) com base na dispersão de luz (Dynamic Light Scattering - DLS). O DLS mede o diâmetro hidrodinâmico das partículas ao determinar a velocidade dos movimentos brownianos de uma partícula em suspensão. As análises foram realizadas em triplicata e à temperatura de 25°C.

Para a determinação do tamanho, PDI e potencial zeta das nanopartículas, as amostras das NPs foram diluídas 1000x em água Milli-Q. O diâmetro médio de cada formulação, o seu PDI e o potencial zeta foram obtidos a partir da média proveniente de três medidas e analisadas em triplicata.

#### **3.4.2. ANÁLISE DE ESTABILIDADE**

As NPs foram mantidas sob refrigeração a 4°C e tiveram suas medidas de potencial Zeta, PDI e Diâmetro Hidrodinâmico realizadas semanalmente durante 5 meses.

#### **3.4.3. ANÁLISE DE RASTREAMENTO (NTA)**

A análise de rastreamento foi obtida no equipamento Malvern NanoSight NS300 com o objetivo de verificar o diâmetro e a concentração das nanopartículas por volume (mL). Para isso, as amostras foram diluídas 1000x em água milli-Q. A captura e análise dos dados foi realizada no software ZetaView 8.02.26 e os vídeos das amostras foram captados por câmera EMCCD 215S. Todas as medições foram realizadas em triplicata e a temperatura ambiente.

#### **3.4.4. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO PTX**

A eficiência de encapsulamento do PTX foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um método analítico já validado no grupo de pesquisa (Gnano). Foram coletados os sobrenadantes das lavagens das amostras de PLGA-PTX, que foram passados em filtro 0,22 µm deixando apenas o PTX não encapsulado (livre) passar pelo filtro. Esse líquido foi coletado em vial para

quantificação em CLAE, utilizando o equipamento Agilent 1260 Infinity II. O cálculo da porcentagem da eficiência de encapsulamento (% EE) foi realizado através da fórmula:

$$EE (\%) = \frac{(\text{Quantidade total de composto inicial} - \text{Quantidade de composto livre (HPLC)})}{\text{Quantidade total de composto inicial}} \times 100$$

Fórmula 1. Cálculo da eficiência de encapsulamento do PTX.

### **3.4.5. EFICIÊNCIA DE LIGAÇÃO DO BVZ**

A quantidade de bevacizumabe ligada à superfície das nanopartículas foi determinada indiretamente através de ensaios BCA, que consiste em um método de quantificação proteica. Após o preparo das nanopartículas com BVZ, foi realizada a centrifugação com um ultrafiltro de centrifugação Amicon® e o sobrenadante foi recolhido e analisado para determinação indireta da quantidade de BVZ ligada às nanopartículas, por meio do Ensaio BCA. As soluções dos reagentes foram preparadas e, após a adição das nanopartículas, incubadas por 30 minutos à 39°C e, em seguida, inseridas para leitura no leitor de placa no comprimento de onda de 562 nm.

### **3.4.6. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA**

A estrutura das nanopartículas foi analisada por meio de imagens de microscopia de força atômica (AFM). O princípio básico do AFM é que uma ponta afiada nanométrica montada em um cantilever flexível é escaneada através de uma superfície, e as forças de interação dependentes da distância entre a ponta e a amostra são usadas para detectar a proximidade da superfície e para construir uma imagem enquanto a ponta segue os contornos da superfície (Hammond; Ryadnov; Hoogenboom, 2020). Para serem analisadas, as nanopartículas foram diluídas 1000 vezes, depositadas em silício e secas à temperatura ambiente sob vácuo.

### **3.4.7. PERFIL DE LIBERAÇÃO PTX**

Com o objetivo de avaliar o perfil de liberação do PTX das nanopartículas de PLGA, foram concentradas de forma a obter 1 mg/mL de paclitaxel para permitir a leitura. Volumes de 200 µL das amostras foram diluídos em 200 µL de PBS pH 7.4 0,5% SDS e incubados a 37 °C sob constante agitação 1000 rpm no Thermo-Shaker (Agimaxx); alíquotas do sobrenadante foram coletadas em intervalos pré-determinados (0,5 h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 24h). A concentração do PTX foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência através de método analítico previamente validado e a porcentagem de liberação foi calculada com base na quantidade de paclitaxel no sobrenadante em comparação com a quantidade presente na nanopartícula.

### **3.4.8. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

As alterações nos grupos funcionais dos materiais ativos (PTX e BVZ) e do sistema carreador (PLGA) foram detectadas usando espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier utilizando um espectrofotômetro Nicolet iS50 FTIR (Thermo Fischer Scientific), com resolução 4 cm<sup>-1</sup>, no modo transmitância, em atmosfera saturada com nitrogênio, no intervalo de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>. As nanopartículas foram analisadas sem diluição, colocadas sob substrato de silício e secas à temperatura ambiente. Cada espectro foi obtido a partir da média de 128 medidas, sendo analisadas as nanopartículas brancas, as carregadas com PTX e as nanopartículas funcionalizadas com o anticorpo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. SÍNTESE E ESTRUTURA DAS NANOPARTÍCULAS

#### 4.1.1. SÍNTESE POR CONJUGAÇÃO ELETROSTÁTICA

Para a preparação das NPs, foram selecionados os componentes da fase orgânica com base em suas propriedades, interação com o solvente e capacidade de formar um sistema estável e eficiente para o encapsulamento do PTX e ligação do BVZ. Nesta síntese, PEI foi adicionado para ajustar o potencial zeta das nanopartículas para melhor conjugação eletrostática ao bevacizumabe, uma vez que as nanopartículas feitas apenas com PLGA têm carga positiva (Liu et al, 2019). Além disso, a adição de PEI à nanopartícula permite que os grupos carboxila do BVZ se liguem aos grupos amina expostos do PEI (Ferreira et al., 2017). A Figura 3 ilustra a metodologia de Síntese por Conjugação Eletrostática.

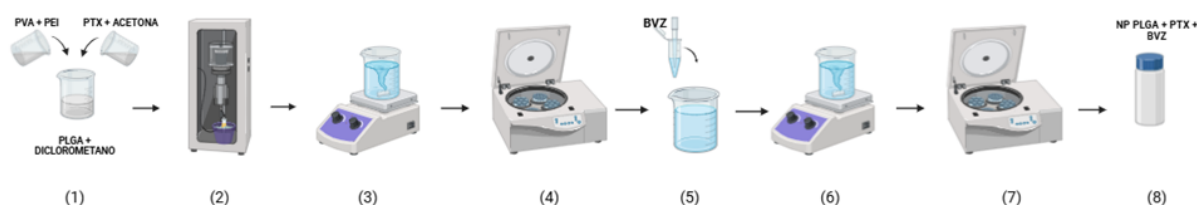


Figura 3: Representação da Síntese Eletrostática. (1) Mistura das soluções: PVA + PEI, PTX + Acetona, PLGA + Diclorometano. (2) Sonicação em banho de gelo. (3) Agitação por 6 horas. (4) Centrifugação. (5) Diluição das NPs em PBS 7.4 e adição do BVZ. (6) Agitação por 18 horas. (7) Centrifugação. (8) Obtenção da nanopartícula de PLGA e PTX funcionalizada com BVZ. Fonte: elaborado pela autora.

Foram obtidos 6 sistemas de nanopartículas: NP PLGA + PTX (não funcionalizada), NP PLGA branca (sem paclitaxel e sem funcionalização), NP E BVZ 1 (1mg/mL de paclitaxel e 1mg/mL de BVZ), NP E Branca BVZ 1 (sem paclitaxel e com 1mg/mL de BVZ), NP E BVZ 0,5 (1mg/mL de paclitaxel e 0,5 mg/mL de BVZ) e NP E Branca BVZ 0,5 (sem paclitaxel e com 0,5 mg/mL de BVZ).

#### 4.1.2. SÍNTESE POR CONJUGAÇÃO QUÍMICA

Na conjugação eletroquímica, não houve adição de PEI, sendo acrescentado apenas PVA à solução inicial. No entanto, a conjugação do bevacizumabe se deu através de uma reação com NHS e EDC, formando uma ligação estável.

O EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) atua como um agente de acoplamento usado para ativar grupos carboxílicos presentes na nanopartícula,

convertendo-os em intermediários reativos. Este intermediário é transitório e pode reagir rapidamente com nucleófilos, como grupos amina (-NH<sub>2</sub>), formando uma ligação amida estável. No entanto, sem estabilização, o intermediário formado pelo EDC pode hidrolisar rapidamente em soluções aquosas, diminuindo a eficiência da reação (Ferreira et al., 2017). A N-hidroxissuccinimida (NHS) é frequentemente adicionada à reação para melhorar sua eficiência e estabilidade. O NHS reage com o intermediário ativado pelo EDC, formando um éster de NHS, que reage com os grupos amina disponíveis no anticorpo, formando ligações amida covalentes (Figura 4). Este éster é mais estável em solução do que o intermediário inicial de EDC, permitindo maior tempo para que a reação ocorra.

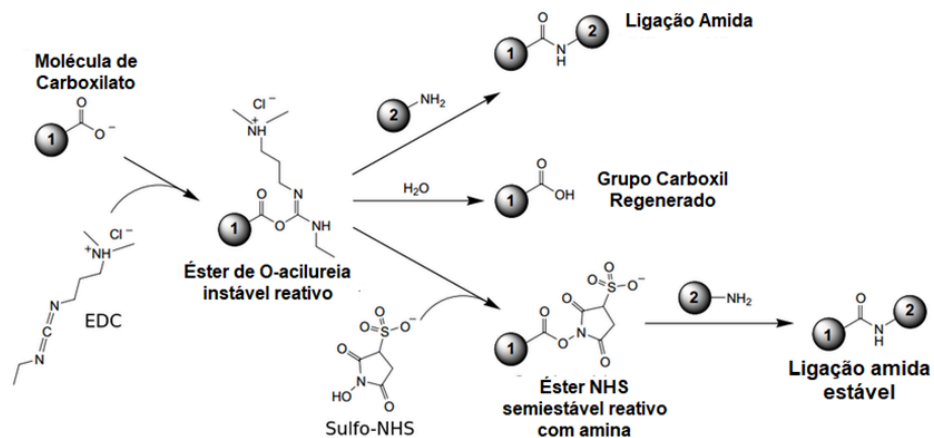


Figura 4: Representação esquemática da reação NHS/EDC. Fonte: adaptado de Karve (2011).

A Figura 5 ilustra a metodologia de Síntese por Conjugação Química.

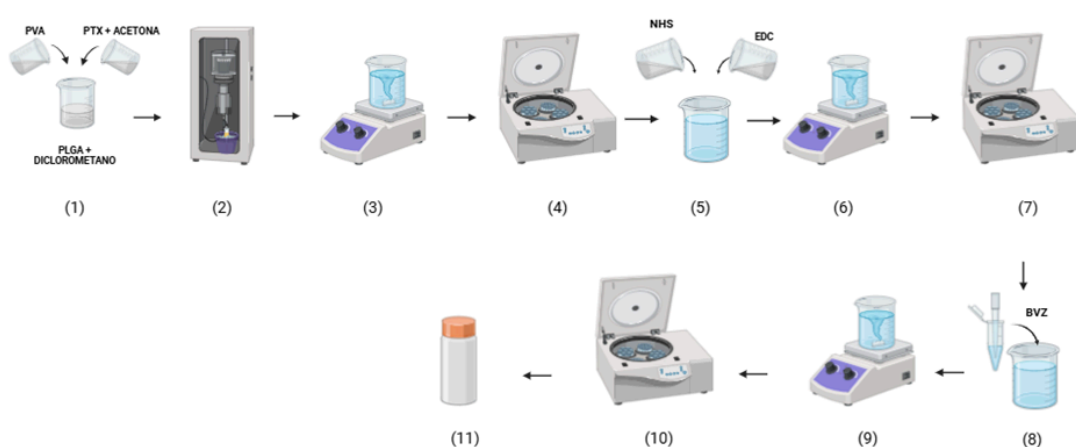


Figura 5: Representação da Síntese Química. (1) Mistura das soluções: PVA, PTX + Acetona, PLGA + Diclorometano. (2) Sonicação em banho de gelo. (3) Agitação por 6 horas. (4)

Centrifugação. (5) Adição de soluções de NHS e EDC. (6) Agitação por 4 horas. (7) Centrifugação. (8) Adição de BVZ. (9) Agitação por 18 horas. (10) Centrifugação. (11) Obtenção da nanopartícula de PLGA e PTX funcionalizada com BVZ. Fonte: elaborado pela autora.

Foram obtidos 6 novos sistemas de nanopartículas: NP PLGA + PTX (não funcionalizada), NP PLGA branca (sem paclitaxel e sem funcionalização), NP Q BVZ 1 (1mg/mL de paclitaxel e 1mg/mL de BVZ), NP Q Branca BVZ 1 (sem paclitaxel e com 1mg/mL de BVZ), NP Q BVZ 0,5 (1mg/mL de paclitaxel e 0,5 mg/mL de BVZ) e NP Q Branca BVZ 0,5 (sem paclitaxel e com 0,5 mg/mL de BVZ).

#### 4.1.3. DIÂMETRO HIDRODINÂMICO, PDI E POTENCIAL ZETA

Os sistemas obtidos via conjugação Eletrostática e conjugação Química foram analisados semanalmente, durante 5 meses, para diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta através da técnica de dispersão de luz dinâmica. Os resultados obtidos na conjugação Eletrostática estão dispostos na Tabela 1, e os obtidos na conjugação Química, na Tabela 2.

NP	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
E PLGA PTX	294,70 ± 11,74	0,40 ± 0,03	35,39 ± 0,65
E PLGA Branca	248,71 ± 7,28	0,28 ± 0,02	33,55 ± 1,87
E BVZ 1	478,55 ± 99,86	0,66 ± 0,05	24,11 ± 1,93
E Branca BVZ 1	220,50 ± 13,87	0,34 ± 0,03	32,85 ± 1,41
E BVZ 0,5	305,55 ± 32,25	0,41 ± 0,04	31,22 ± 0,72
E Branca BVZ 0,5	251,20 ± 10,99	0,33 ± 0,03	34,8 ± 0,51

Tabela 1: Tamanho, PDI e Potencial Zeta médios das NP da Síntese Eletrostática. Fonte: elaborado pela autora.

<b>NP</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
Q PLGA PTX	255,90 ± 7,28	0,31 ± 0,01	-27,99 ± 0,50
Q PLGA Branca	243,40 ± 6,54	0,30 ± 0,04	-27,63 ± 0,70
Q BVZ 1	402,75 ± 89,08	0,59 ± 0,10	3,44 ± 0,41
Q Branca BVZ 1	278,40 ± 28,12	0,40 ± 0,04	-16,71 ± 0,90
Q BVZ 0,5	261,35 ± 38,21	0,42 ± 0,05	-13,94 ± 0,77
Q Branca BVZ 0,5	295,00 ± 14,01	0,44 ± 0,04	-19,78 ± 0,99

Tabela 2: Tamanho, PDI e Potencial Zeta médios das NP da Síntese Química. Fonte: elaborado pela autora.

O valor do índice de polidispersividade indica a distribuição das nanopartículas na formulação, sendo utilizado como um parâmetro de qualidade para cada síntese (Musielak et al, 2022). O valor do PDI pode variar de 0 a 1, sendo que nanopartículas com valor até 0,3 são consideradas monodispersas e acima de 0,7 já apresentam aglomeração. O potencial zeta, por sua vez, consiste na medição do potencial eletrostático na dupla camada elétrica envolvendo uma nanopartícula em solução (Clogston; Patri, 2010). Nanopartículas com potencial zeta entre -10 e +10 mV são consideradas aproximadamente neutras, enquanto nanopartículas com potenciais zeta maiores que +30 mV ou menores que -30 mV são considerados fortemente catiônicos e fortemente aniônicos, respectivamente.

Os valores de diâmetro obtidos em ambas as sínteses foram ligeiramente maiores que os encontrados por Liu e colaboradores (2019) ao aplicarem as mesmas metodologias na síntese de nanopartículas de PLGA com dexametasona revestidas com Bevacizumab. Embora a diferença de tamanho possa ser explicada pela diferença do fármaco aplicado, é importante considerar que a técnica de DLS tende a fornecer um diâmetro hidrodinâmico médio dos maiores centros de espalhamento: já foi constatado que medições DLS convencionais são incapazes de medir com precisão misturas de partículas com uma grande diferença na relação entre os diâmetros do partículas (Hoo et al., 2008; Souza; Ciminelli; Mohallem, 2016; Chidea et al, 2010). Conforme as nanopartículas se agregam, os resultados obtidos são ligeiramente diferentes dos diâmetros físicos. Esses erros são mais evidentes nos resultados de amostras mistas com tamanhos diferentes, nos quais

as medidas de DLS podem apresentar valores até cinco vezes maiores que outras técnicas (Souza; Ciminelli; Mohallem, 2016).

Em relação à aplicabilidade, as nanopartículas devem ter diâmetro hidrodinâmico superior a 100 nm para evitar depuração renal e inferior a 300 nm para evitar a captação celular pelo sistema fagocitário mononuclear (Aline et al, 2021). Nas duas metodologias de Síntese, observa-se que as nanopartículas funcionalizadas com 0,5 mg/mL de Bevacizumabe obtiveram os valores de resultados mais próximos do ideal (entre 100 e 300 nm). É provável que, em comparação com a outra concentração de BVZ analisada (1 mg/mL), tal concentração foi ideal para ligar o anticorpo à nanopartícula de maneira a diminuir a interação entre eles, o que resulta em agregação e, conseqüentemente, tamanhos maiores de nanopartícula.

#### 4.1.4. ANÁLISE DE ESTABILIDADE

A estabilidade foi realizada nos 6 sistemas propostos para cada síntese, sendo avaliados em tamanho, PDI e potencial zeta ao longo de cinco meses mantidos sob refrigeração a 4°C. Os resultados da estabilidade dos sistemas obtidos na Síntese Eletrostática (E) encontram-se nas Figuras 6 a 11.

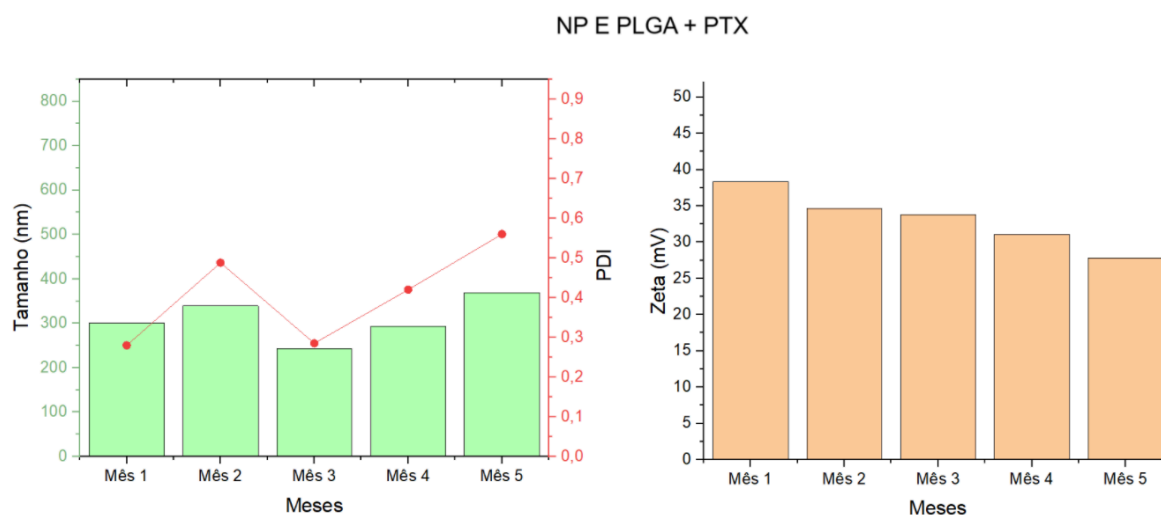


Figura 6: média de estabilidade de tamanho, PDI e potencial zeta das NP E PLGA + PTX.

Fonte: elaborado pela autora.

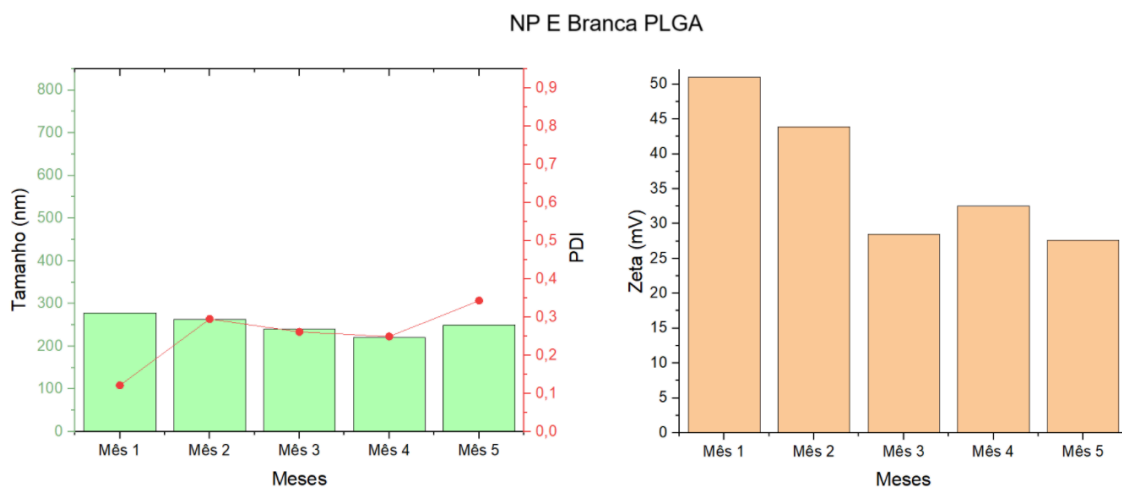


Figura 7: média de estabilidade de tamanho, PDI e potencial zeta das NP E Branca PLGA.

Fonte: elaborado pela autora.

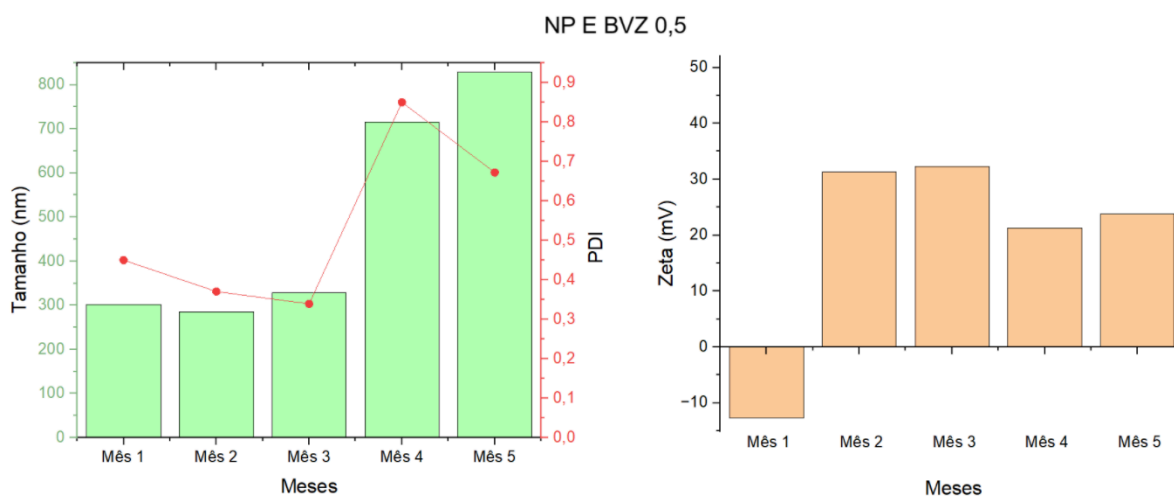


Figura 8: estabilidade de tamanho, PDI e potencial zeta das NP E BVZ 0,5. Fonte: elaborado

pela autora.

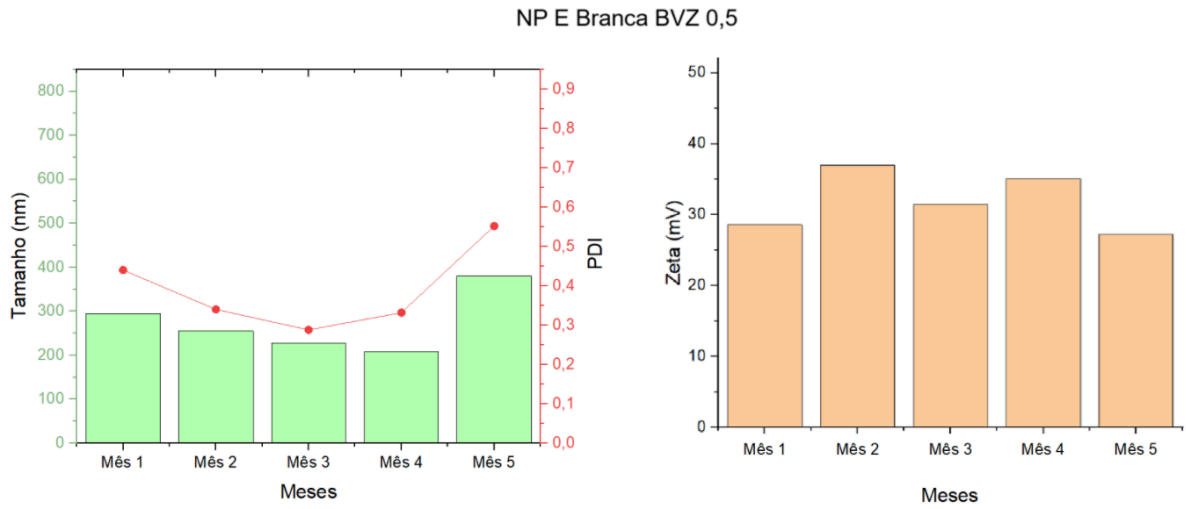


Figura 9: estabilidade de tamanho, PDI e potencial zeta das NP E Branca BVZ 0,5. Fonte: elaborado pela autora.

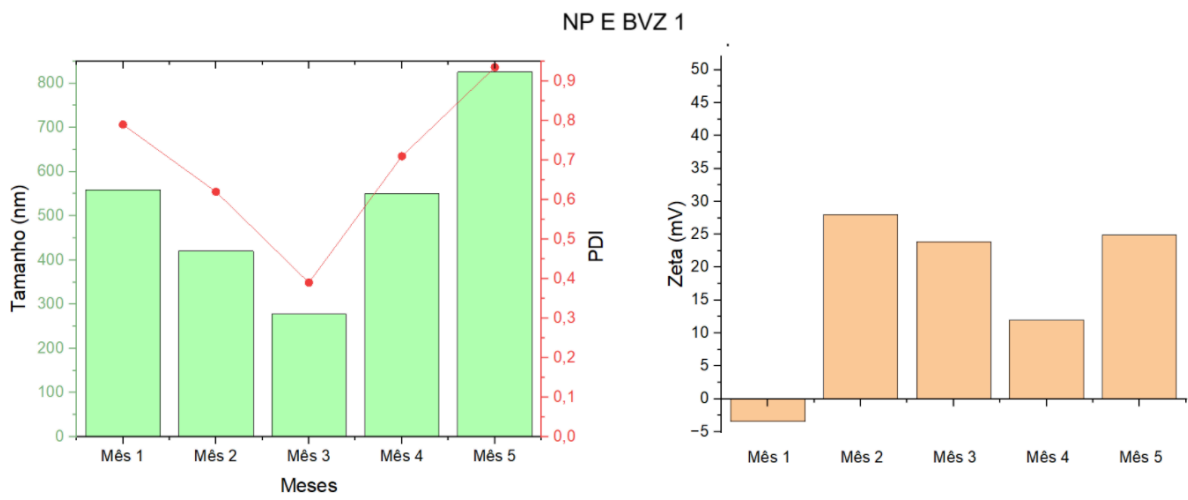


Figura 10: estabilidade de tamanho, PDI e potencial zeta da NP E BVZ 1. Fonte: elaborado pela autora.

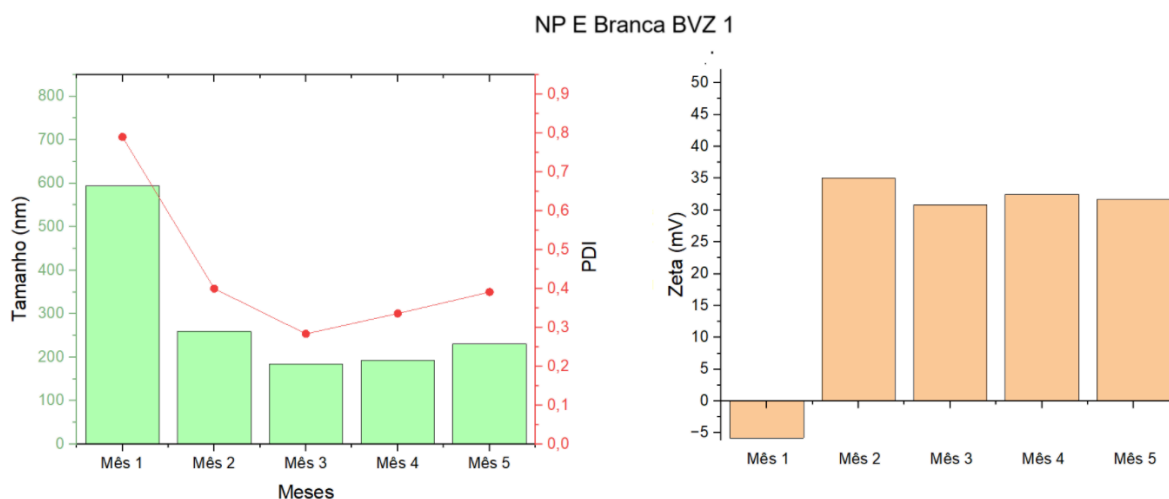


Figura 11: estabilidade de tamanho, PDI e potencial zeta da NP E Branca BVZ 1. Fonte: elaborado pela autora.

Em relação às nanopartículas obtidas via Síntese Eletrostática, é possível observar que as nanopartículas brancas, independente da conjugação com bevacizumab, apresentaram tamanhos em sua maioria constantes, com poucos desvios. Para esta Síntese, a característica mais notável foi o tamanho expressivo das nanopartículas conjugadas com o bevacizumabe ao final do período de 5 meses, os quais ultrapassaram os 750 nm. Uma possível explicação para este comportamento, além das explicações citadas em tópicos anteriores, é a possibilidade do bevacizumabe de sofrer agregação. Acredita-se que as áreas hidrofóbicas na sequência de aminoácidos da superfície sejam o local mais provável de agregação, a qual representa a forma mais comum de instabilidade em medicamentos proteicos (Giannos et al, 2018). A agregação, na qual duas ou mais unidades monoméricas podem se ligar entre si, é um fenômeno indesejável que leva à diminuição da eficácia do produto disponível, potencializando a imunogenicidade e outros efeitos colaterais nos pacientes. Uma vez que a técnica de DLS tende a considerar agregados como nanopartículas, é possível que o tamanho elevado seja, na verdade, consequência de um agregado de moléculas (Souza; Ciminelli; Mohallem, 2016).

As figuras 12 a 17 representam os sistemas obtidos na Síntese Química.

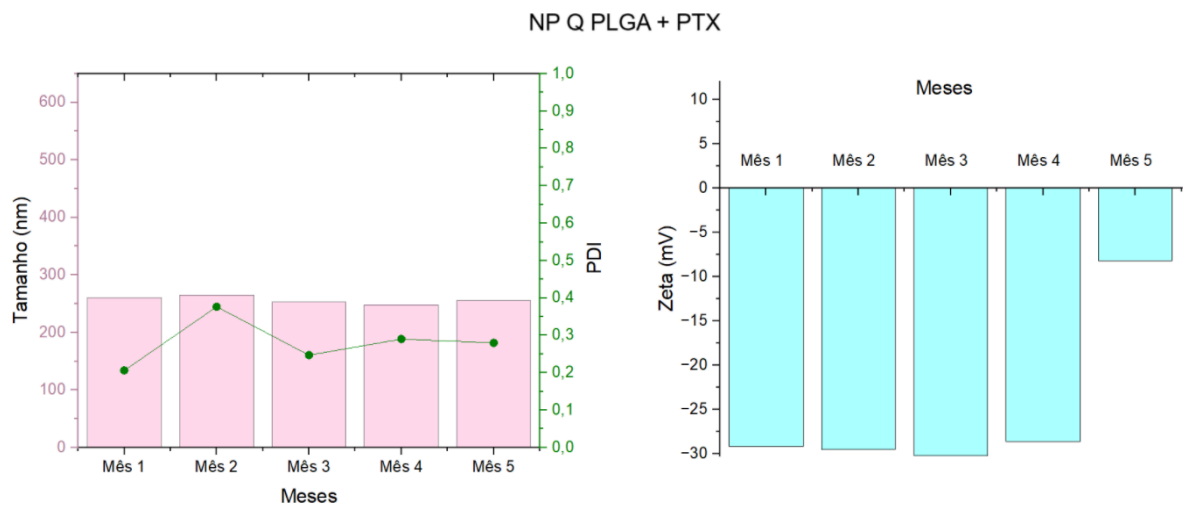


Figura 12: estabilidade de tamanho, PDI e potencial zeta das NP Q PLGA + PTX. Fonte: elaborado pela autora.

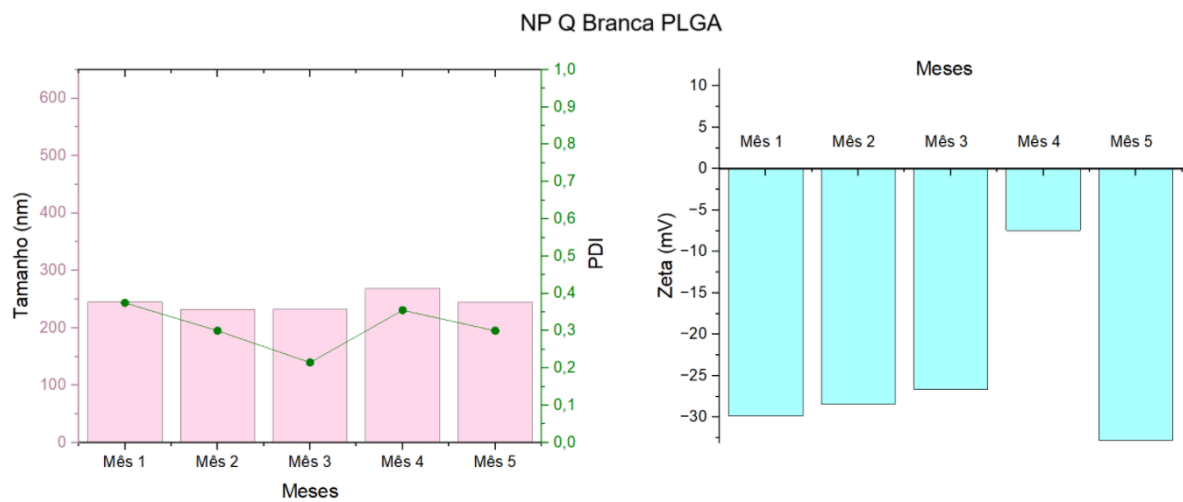


Figura 13: estabilidade de tamanho, PDI e potencial zeta das NP Q Branca PLGA. Fonte: elaborado pela autora.

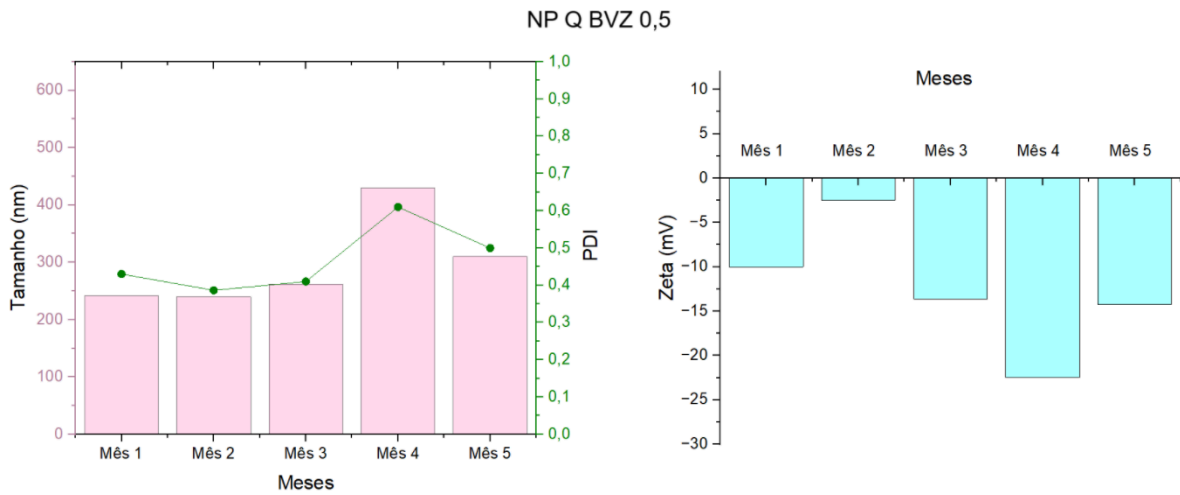


Figura 14: estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta da NP Q BVZ 0,5. Fonte: elaborado pela autora.

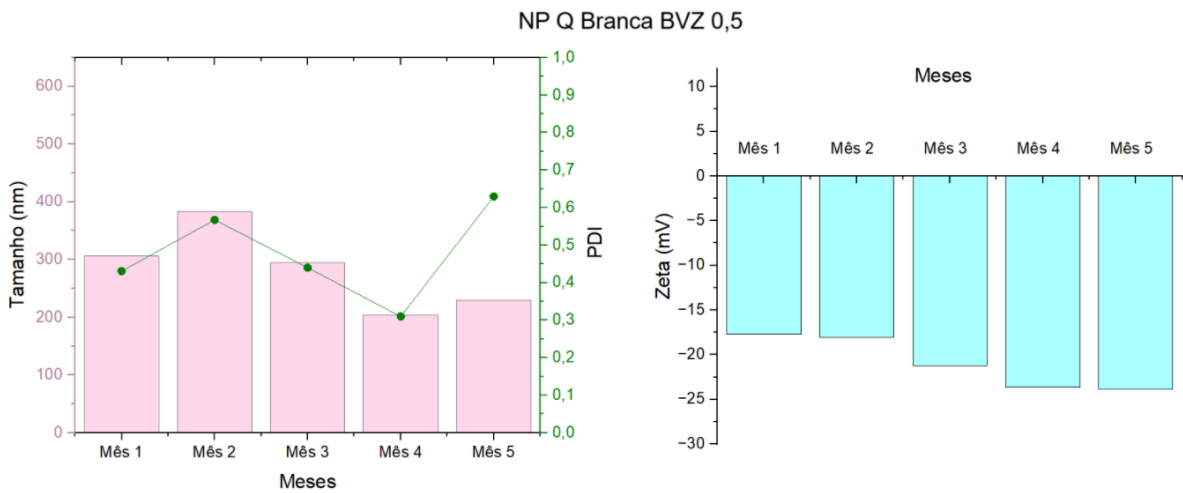


Figura 15: estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta da NP Q Branca BVZ 0,5. Fonte: elaborado pela autora.

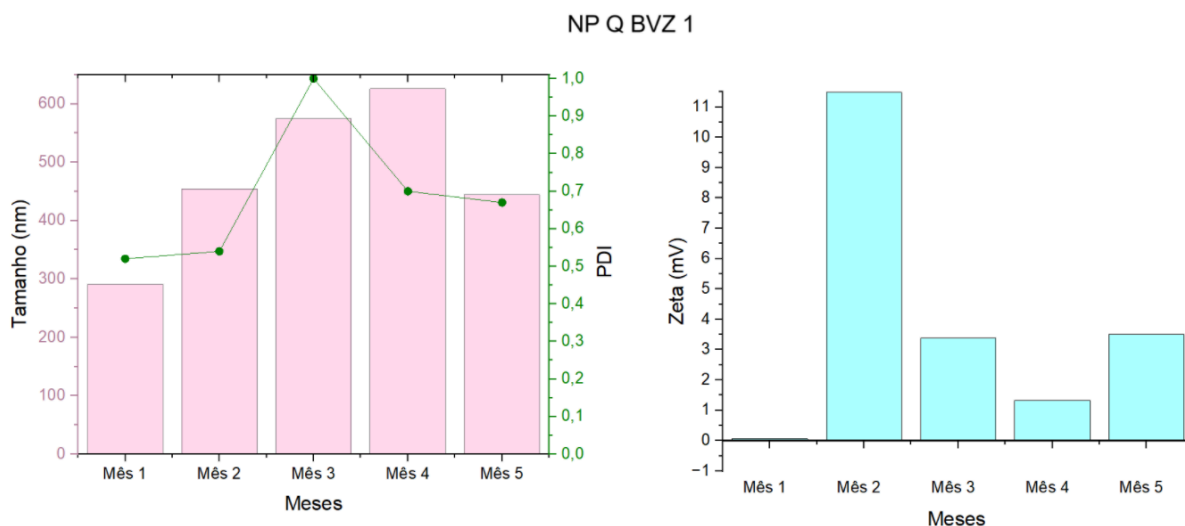


Figura 16: estabilidade de tamanho, PDI e potencial Zeta da NP Q BVZ 1. Fonte: elaborado pela autora.

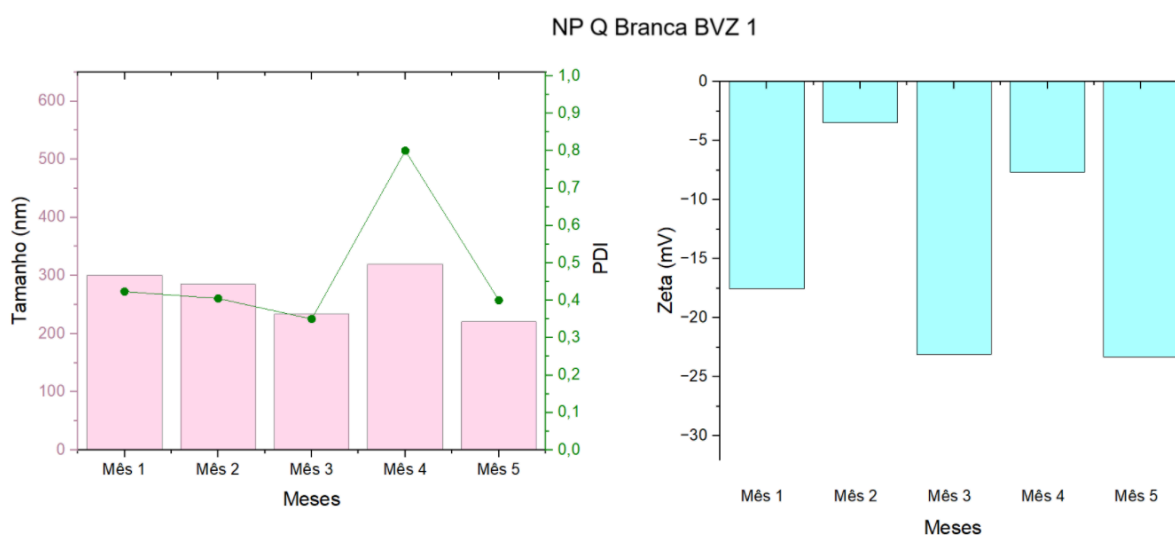


Figura 17: estabilidade de tamanho, PDI e Potencial Zeta da NP Q Branca BVZ 1. Fonte: elaborado pela autora.

Quando comparados aos sistemas obtidos na Síntese Eletrostática, é possível observar que as médias dos tamanhos dos sistemas funcionalizados com BVZ são menores na Síntese Química. Isso pode ser justificado pela ausência da PEI na formulação, uma vez que, devido à sua carga positiva, este pode interagir fortemente com a carga negativa das nanopartículas, ou com outros grupos negativos na superfície, causando uma agregação ou crescimento das partículas (Steitz, 2006). Uma vez que a síntese Química não apresenta tal composto, seu tamanho ficaria menor.

#### 4.1.5. ANÁLISE DE RASTREAMENTO (NTA)

Foi utilizada a técnica de Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) para a obtenção de informações detalhadas sobre o tamanho e a concentração (partículas/mL) das nanopartículas. Os resultados obtidos para cada sistema da Síntese Eletrostática, juntamente com os gráficos correspondentes de concentração, estão apresentados na Tabela 3 e Figura 18.

NP	Tamanho (nm)	Concentração de partículas / mL
E PLGA PTX	216,60 ± 9,00	1,26.10 <sup>12</sup> ± 5,17.10 <sup>10</sup>
E PLGA Branca	197,70 ± 1,42	1,22.10 <sup>12</sup> ± 2,43.10 <sup>10</sup>
E BVZ 1	193,1 ± 3,86	1,23.10 <sup>12</sup> ± 5,89.10 <sup>10</sup>
E Branca BVZ 1	185,2 ± 8,30	1,21.10 <sup>12</sup> ± 1,21.10 <sup>10</sup>
E BVZ 0,5	204,67 ± 4,91	1,37.10 <sup>12</sup> ± 5,20.10 <sup>10</sup>
E Branca BVZ 0,5	190,80 ± 4,00	1,31.10 <sup>12</sup> ± 3,82.10 <sup>10</sup>

Tabela 3: Valores de tamanho e concentração de partículas por mL dos sistemas da Síntese Eletrostática. Fonte: Elaborado pela autora.

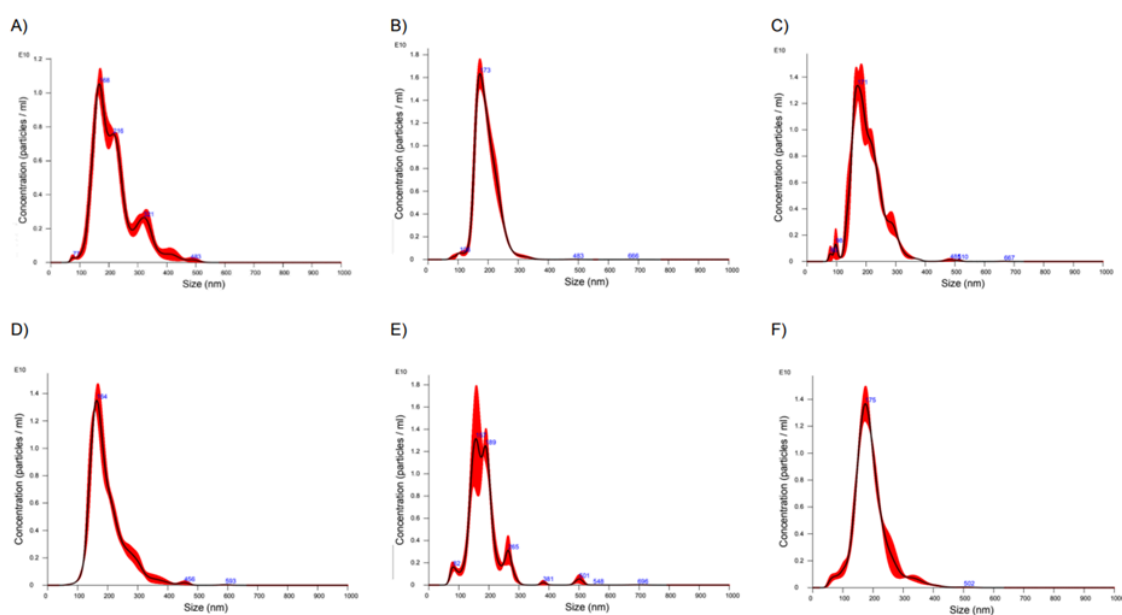


Figura 18: Distribuição de tamanho das NP PLGA+PTX (A), NP E BVZ 1 (B), NP E BVZ 0,5 (C), PLGA Branca (D), NP E Branca BVZ 1 (E), NP E Branca BVZ 0,5 (F) da Síntese Eletrostática obtida pela técnica análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). Fonte: elaborado pela autora.

O tamanho médio das nanopartículas dos seis sistemas de Síntese Eletrostática definido pelo NTA é menor que o tamanho médio encontrado ao analisá-los com a técnica de DLS. A distribuição do tamanho das partículas determinada pelo NTA é uma análise mais direta, pois se baseia no acompanhamento de partículas individuais, sem depender do ajuste de curvas empregado no DLS (Chan et al, 2017). Além disso, as avaliações do tamanho do NTA são menos propensas a serem impactadas pela polidispersidade, uma vez que o software é baseado no rastreamento de partículas únicas, enquanto as técnicas típicas de DLS colocam uma forte tendência nas partículas maiores presentes na amostra (Hole et al, 2013). Dessa forma, as medidas de tamanho definidas pelo NTA revelam-se mais confiáveis, e corroboram com os descritos na literatura (Liu et al, 2019).

A distribuição de tamanho dos sistemas da Síntese Eletrostática indica populações de nanopartículas com pouca variação de tamanho entre elas (190,8 nm a 216,6 nm), uma informação importante para a realização de futuros estudos celulares e que revela um baixo nível de agregação das nanopartículas (Filipe, Hawe, Wim, 2010).

Os resultados e gráficos de concentração para os sistemas da Síntese Química estão dispostos na Tabela 4 e Figura 19.

<b>NP</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>Concentração de partículas / mL</b>
Q PLGA PTX	209,10 ± 2,50	1,37.10 <sup>12</sup> ± 2,82.10 <sup>10</sup>
Q PLGA Branca	193,5 ± 4,00	1,46.10 <sup>12</sup> ± 1,42.10 <sup>11</sup>
Q BVZ 1	176,7 ± 15,20	1,96.10 <sup>12</sup> ± 1,10.10 <sup>11</sup>
Q Branca BVZ 1	170,50 ± 6,00	1,26.10 <sup>12</sup> ± 9,92.10 <sup>10</sup>
Q BVZ 0,5	154,00 ± 9,30	1,07.10 <sup>12</sup> ± 6,76.10 <sup>10</sup>
Q Branca BVZ 0,5	162,80 ± 5,10	1,21.10 <sup>12</sup> ± 6,73.10 <sup>10</sup>

Tabela 4: Valores de tamanho e concentração de partículas por mL dos sistemas da Síntese Química. Fonte: Elaborado pela autora.

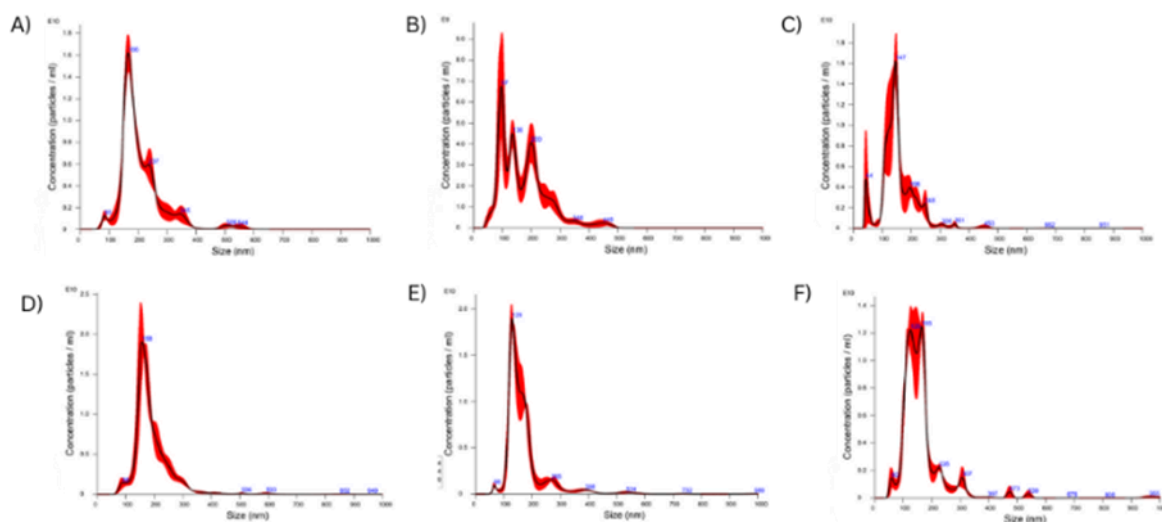


Figura 19: Distribuição de tamanho das NP PLGA+PTX (A), NP Q BVZ 1 (B), NP Q BVZ 0,5 (C), PLGA Branca (D), NP Q Branca BVZ 1 (E), NP Q Branca BVZ 0,5 (F) da Síntese Química obtida pela técnica análise de rastreamento de nanopartículas. Fonte: elaborado pela autora.

É possível observar que, em relação à distribuição de tamanho, os sistemas de nanopartículas carregadas com fármacos e conjugadas com BVZ (NP Q BVZ 1 e NP Q BVZ 0.5, itens B e C da Figura 13, respectivamente) da Síntese Química são mais variáveis que os sistemas equivalentes da Síntese Eletrostática. Uma possível explicação para a maior variabilidade no tamanho das nanopartículas da Síntese Química é a ausência do PEI na metodologia de Síntese. A polietilenoimina é um polímero catiônico altamente ramificado que pode promover uma estabilização eletrostática mais eficiente durante a formação das nanopartículas (Yu et al, 2016). Essa estabilização reduz as chances de agregação das partículas, levando a uma distribuição de tamanho mais uniforme. Uma vez que a Síntese Química foi feita sem o polímero, é esperada a formação de populações de NPs de tamanhos variáveis.

Outra possível explicação para a concentração de tamanho variável das NP Q BVZ 1 e NP Q BVZ 0.5 é o impacto das reações químicas mediadas por NHS e EDC durante a conjugação do BVZ. A reação mediada por EDC e NHS é amplamente utilizada para a ativação de grupos carboxílicos presentes na superfície das nanopartículas, permitindo a conjugação com moléculas que possuem grupamentos amina, como proteínas (Karve et al, 2016). Nesse processo, o EDC ativa os grupos carboxílicos, formando um intermediário reativo, que é rapidamente

estabilizado pelo NHS, resultando em um éster de succinimida. Esse éster é mais estável e altamente reativo com nucleófilos, facilitando a ligação com moléculas como o bevacizumab. No entanto, a heterogeneidade na densidade e na distribuição dos grupos carboxílicos na superfície das nanopartículas pode levar a níveis variados de conjugação (Moore et al, 2015), resultando em partículas com espessuras de revestimento diferentes ou em modificações heterogêneas, o que influencia diretamente a variação no tamanho final das nanopartículas.

#### 4.1.6. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO PTX

As eficiências de encapsulação do Paclitaxel para os sistemas obtidos nas Sínteses Eletrostática e Química foram determinadas via HPLC, através da análise dos sobrenadantes resultantes após a lavagem das nanopartículas. As porcentagens de eficiência de encapsulamento (%EE) do PTX obtidas para cada sistema estão dispostas na Tabela 5.

Síntese Eletrostática		Síntese Química	
NP	%EE	NP	%EE
E PLGA + PTX	99,993	Q PLGA + PTX	99,974
E BVZ 1	99,952	Q BVZ 1	99,962
E BVZ 0,5	99,983	Q BVZ 0,5	99,978

Tabela 5: porcentagens da eficiência de encapsulamento para Sínteses Eletrostática e Química.

Fonte: elaborado pela autora.

As altas eficiências de encapsulamento obtidas indicam que os métodos propostos para cada síntese são adequados para encapsulação do Paclitaxel. Considerando a hidrofobicidade elevada do PLGA e do PTX, eficiências de encapsulação elevadas eram esperadas (Mu, Feng, 2008).

#### 4.1.7. EFICIÊNCIA DE LIGAÇÃO DO BVZ

A eficiência de ligação (%EL) do Bevacizumabe em cada sistema das duas sínteses foi verificada através de Ensaio de Ácido Bicinconínico, um ensaio colorimétrico baseado na redução de íons  $\text{Cu}^{2+}$  para  $\text{Cu}^+$  na presença de ligações peptídicas (Otieno; Krause; Rusling, 2016), seguido pela quantificação

espectrofotométrica dos complexos coloridos formados pela quelação de duas moléculas de BCA com cada íon  $\text{Cu}^+$ , o que causa uma mudança de cor de verde para púrpura absorvida em 562 nm (Menzel; Bernkop-Schnürch, 2017).

Os ensaios foram realizados utilizando as soluções de sobrenadantes resultantes da lavagem de cada nanopartícula. A quantificação foi feita de maneira indireta, comparando a concentração inicial de BVZ em cada sistema à concentração encontrada após a realização dos ensaios. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 6.

Síntese Eletrostática			Síntese Química		
NP	Concentração final de BVZ no sobrenadante ( $\mu\text{g/mL}$ )	%EL	NP	Concentração final de BVZ no sobrenadante ( $\mu\text{g/mL}$ )	%EL
NP E BVZ 1	0,81	99,91	NP Q BVZ 1	0,27	99,97
NP E BVZ 0,5	0,2	99,99	NP Q BVZ 0,5	0,28	99,94

Tabela 6: porcentagens da eficiência de encapsulamento para Sínteses Eletrostática e Química.

Fonte: elaborado pela autora.

Sobre a ação conjunta dos dois fármacos, sua eficácia já foi comprovada na literatura (Anvisa, 2010; Redondo et al, 2020; Sandler et al, 2006), embora ainda existam dúvidas sobre os mecanismos exatos de atividade. A teoria mais amplamente conhecida para explicar a atividade antitumoral da combinação é que a normalização do microambiente tumoral resultante das alterações vasculares após o tratamento antiangiogênico podem melhorar a administração do fármaco, explicando a melhor resposta (Jain, 2013). A normalização vascular melhora o suprimento de sangue e a oxigenação no tumor e reduz a pressão do fluido intersticial, de modo que a administração e a penetração de agentes terapêuticos no tecido tumoral melhoram. Outra explicação foi proposta por Cesca e colaboradores (2015), que sugerem que as alterações na arquitetura do microambiente tumoral induzidas pelo bevacizumabe, juntamente com a melhor distribuição do paclitaxel, podem explicar a significativa potencialização antitumoral pela combinação. A melhora na

biodistribuição do PTX diminui sua concentração em tecidos saudáveis, o que pode diminuir os efeitos colaterais sistêmicos e toxicidades associadas ao quimioterápico.

#### 4.1.8. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A técnica de AFM foi utilizada para avaliar a topografia das amostras. As imagens das nanopartículas obtidas na Síntese Eletrostática estão dispostas na figura 20, e as da Síntese Química, na figura 21.

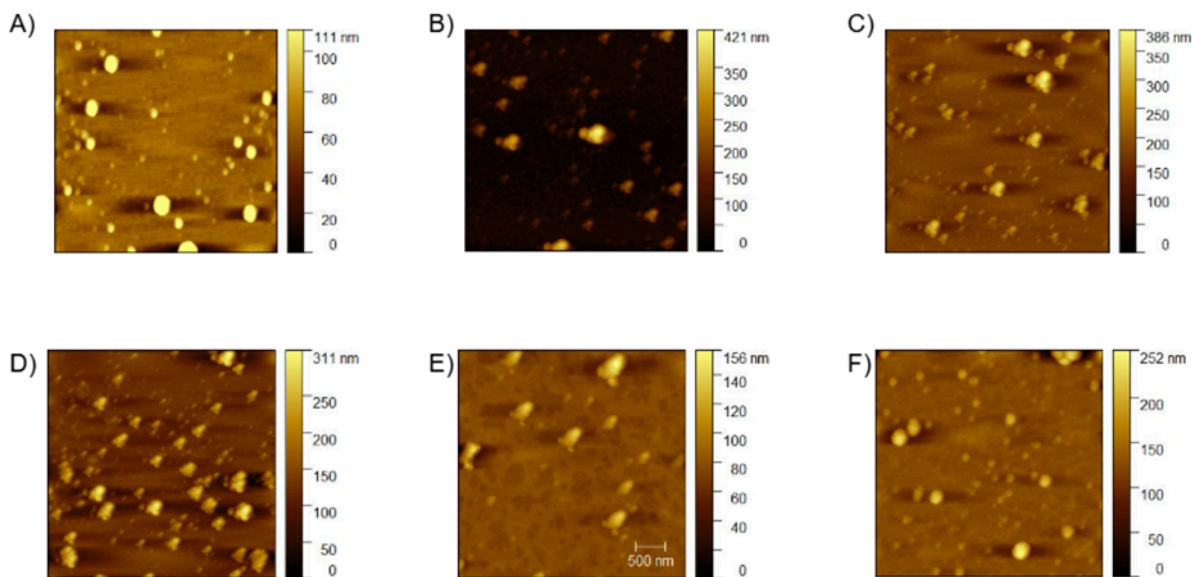


Figura 20: Microscopia de força atômica das NPs (A) E PLGA + PTX, (B) E PLGA Branca, (C) E BVZ 1, (D) E Branca BVZ 1, (E) E BVZ 0,5, (F) E Branca BVZ 0,5.

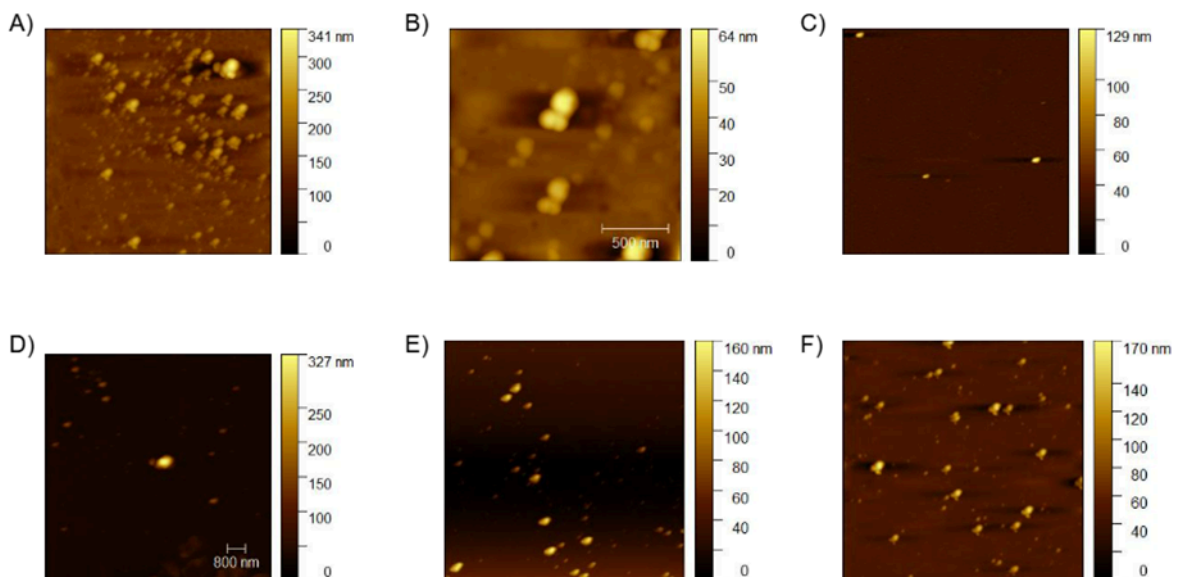


Figura 21: Microscopia de força atômica das NPs (A) Q PLGA + PTX, (B) Q PLGA Branca, (C) Q BVZ 1, (D) Q Branca BVZ 1, (E) Q BVZ 0,5, (F) Q Branca BVZ 0,5.

Para ambas as sínteses, os sistemas obtidos apresentam tendências esféricas, com tamanhos variáveis de 327 a 64 nm dependendo da formulação. Partículas esféricas são geralmente desejáveis em sistemas de liberação controlada devido à melhor estabilidade e comportamento uniforme. Além disso, é possível notar que, de forma geral, há uma dispersão heterogênea de nanopartículas em cada imagem.

Em relação aos tamanhos das nanopartículas, os tamanhos obtidos pela escala de AFM em todos os sistemas variam em relação aos tamanhos verificados nas análises de DLS. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de as amostras estarem secas. Conforme discutido previamente, a técnica de DLS é ideal para verificar a dispersão geral das partículas, contudo apresenta limitações, uma vez que pode interpretar aglomerados como partículas de maior tamanho.

#### 4.1.9. PERFIL DE LIBERAÇÃO PTX

Os perfis de liberação do Paclitaxel das nanopartículas E e Q, como mostrado no Gráfico 1, foram obtidos pela agitação das nanopartículas em solução de em PBS (pH 7,4) com 0,5% de SDS ao longo de 23 horas.

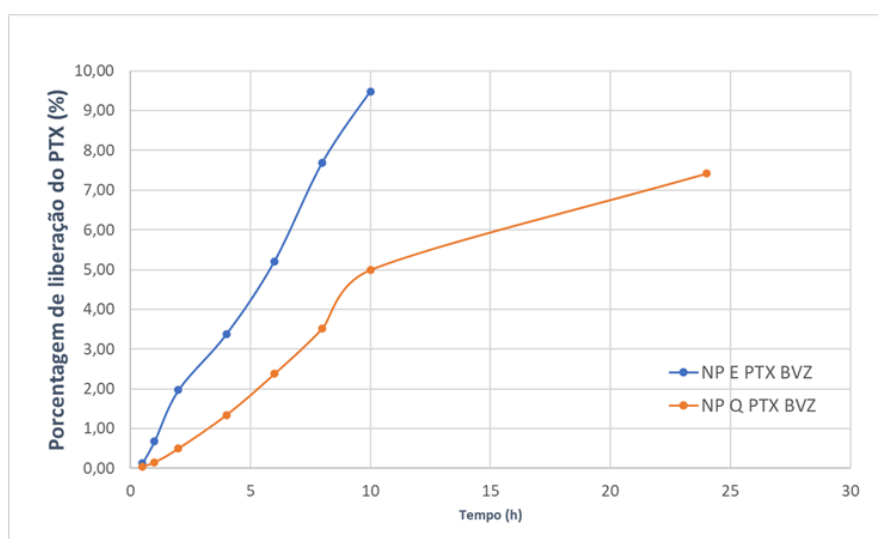


Gráfico 1: Porcentagem de Liberação do PTX x Tempo.

A determinação do perfil de liberação *in vitro* do PTX encapsulado nas nanopartículas funcionalizadas possibilitou uma estimativa da quantidade de fármaco liberada em função do tempo. A porcentagem de liberação obtida para a síntese Eletrostática foi de aproximadamente 9,5% em 10 horas e, para a síntese Química, 8,5% em 23 horas. O perfil de liberação encontrado para ambos os sistemas é mais sustentado, ocorrendo uma lenta liberação durante os períodos analisados.

A influência de funcionalização no controle de liberação de fármacos em nanopartículas já foi observada na literatura (Oliveira et al, 2010; Varshosaz; Davoudi; Rasoul-Amini, 2018). A baixa taxa de liberação do fármaco pode ser explicada pela natureza hidrofílica promovida pela presença do BVZ quimicamente ligado à superfície das NPs, de modo que a taxa de liberação mais lenta observada pode ser atribuída ao tempo necessário para o meio receptor conseguir atravessar a camada proteica superficial e permitir que o fármaco contido no interior da matriz de PLGA possa se difundir e ser liberado ao meio. Nesse caso, a presença do Bevacizumabe cria uma barreira física que retarda a liberação do fármaco.

Outra possível explicação para a baixa taxa de liberação obtidas para ambos os tipos de síntese é a hipótese de que o paclitaxel tenha sido encapsulado predominantemente no núcleo da nanopartícula, e não próximo à superfície (Fonseca, Simões, Gaspar, 2002). O paclitaxel é uma molécula hidrofóbica, o que favorece sua forte interação com a matriz hidrofóbica do PLGA. Por isso, além da possibilidade do encapsulamento ter ocorrido em regiões bem interiores da nanopartícula, a interação entre o fármaco e o polímero pode também reduzir a difusão do fármaco para o meio aquoso, resultando em uma taxa de liberação lenta.

Os cálculos e as medições foram realizados através de método analítico previamente validado no grupo de pesquisa Gnano. O cromatograma e a curva analítica estão representados nas Figuras 22 e Gráfico 2. O perfil do cromatograma exibido equivale ao ponto máximo da curva de calibração (200µg/mL) e revela um pico máximo de paclitaxel obtido em 6,3 minutos, sem presença de outros picos prejudiciais para a calibração. A curva analítica utilizada para a elaboração do gráfico de liberação apresenta um  $R^2$  de 0,9983, o que mostra confiabilidade do método e uma correlação linear entre os dados experimentais e a reta de calibração adequada.

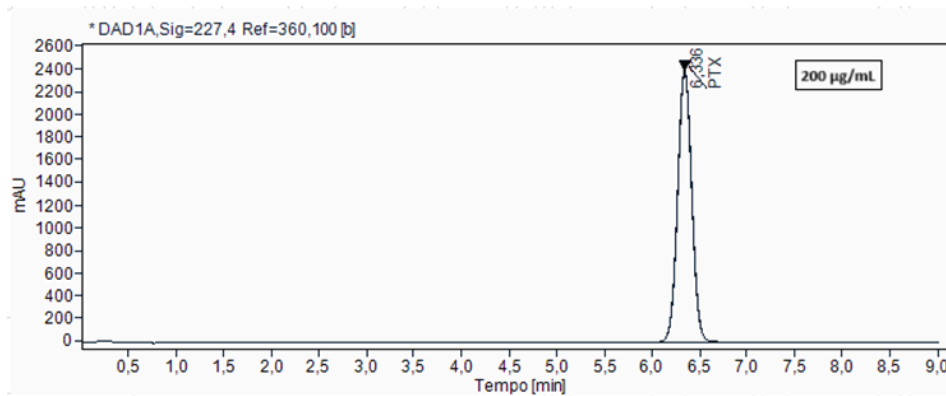


Figura 22: cromatograma obtido para o Paclitaxel. Fonte: gerado pelo equipamento.

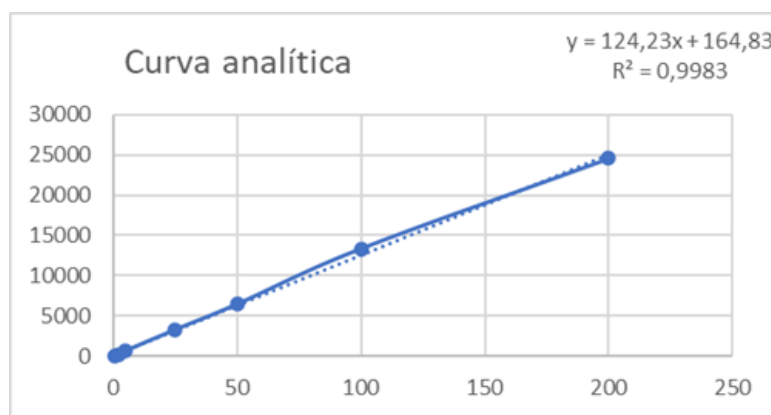


Gráfico 2: curva analítica obtida para o PTX.

#### 4.1.10. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

A técnica de espectroscopia foi utilizada na região do infravermelho para determinar a interação no nível de grupos funcionais dos materiais ativos (PTX e BVZ) e do sistema carreador (PLGA). As Figura 23 e 24 apresentam os espectros de transmitância das NPs brancas, com PTX e com PTX+BVZ para as Sínteses Eletrostática e Química, respectivamente.

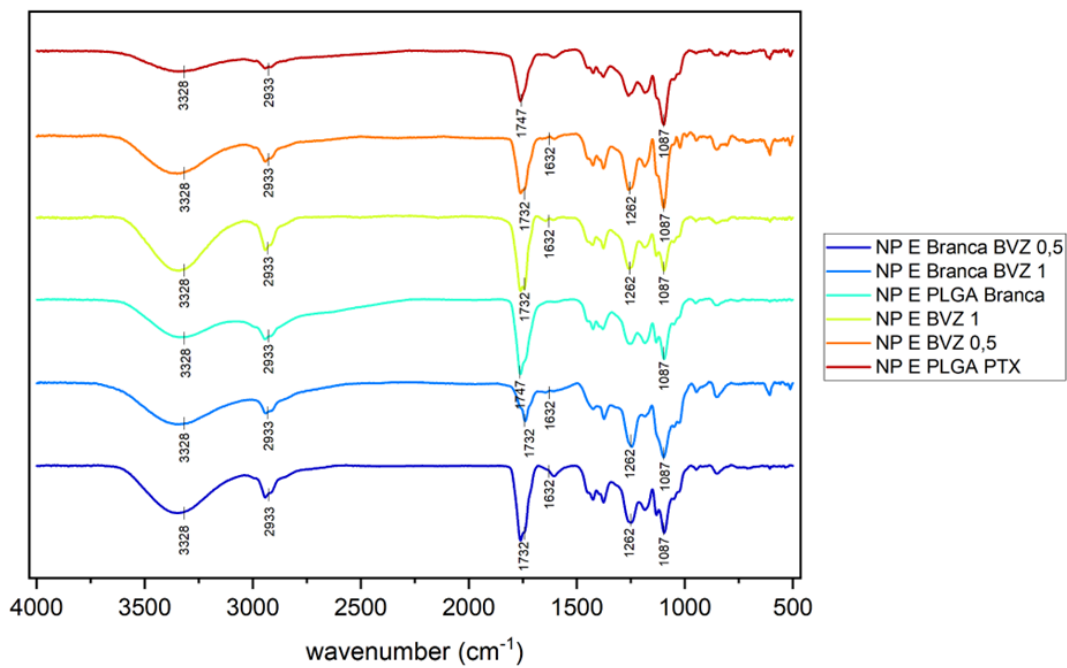


Figura 23: Espectros vibracionais na região do infravermelho para a síntese Eletrostática. Fonte: elaborado pela autora.

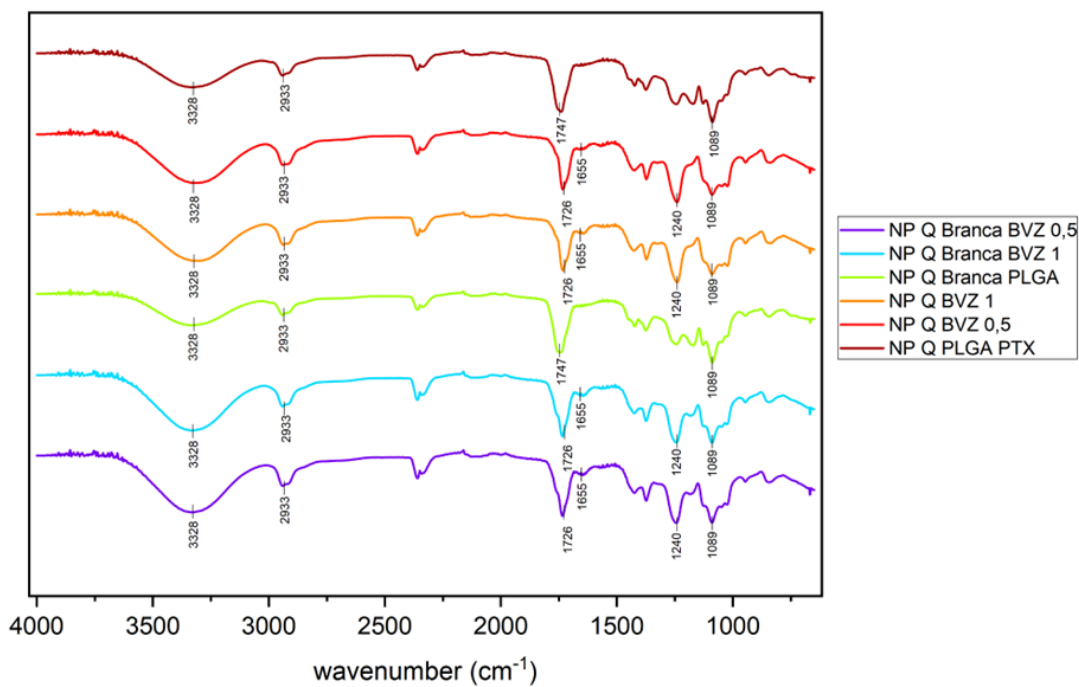


Figura 24: Espectros vibracionais na região do infravermelho para a síntese Química. Fonte: elaborado pela autora.

Os sistemas desenvolvidos para ambas as sínteses apresentaram comportamentos similares nas análises de FTIR. A presença do Bevacizumabe nos sistemas NP E BVZ 1, NP E BVZ 0,5, NP Q BVZ 1 e NP Q BVZ 0,5 pode ser inferida pelas bandas em torno de 1632 e 1655  $\text{cm}^{-1}$ , as quais estão associadas às vibrações de estiramento C=O (carbonila) das ligações peptídicas, conhecidas como a banda Amida I, que são características das estruturas secundárias de proteínas (Haris, 1999). Além disso, em todas as nanopartículas observadas, há aparecimento de bandas em aproximadamente 1747  $\text{cm}^{-1}$ , e tal região do espectro de FTIR está associada ao estiramento do grupo carbonila (C=O) presente em polímeros como PLGA (Higuchi et al, 2019). Contudo, nas análises das nanopartículas contendo BVZ da síntese Eletrostática (NP E BVZ 1 e NP E BVZ 0,5) e Química (NPP Q BVZ 1 e NP Q BVZ 0,5), ocorreu o aparecimento de bandas adicionais em torno de 1732  $\text{cm}^{-1}$  e 1726  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, sendo que nas nanopartículas contendo apenas PLGA e Paclitaxel, tais bandas não aparecem. É possível que tenha ocorrido uma interação dos grupos éster do PLGA com os grupos amida do bevacizumabe, principalmente durante a formulação de nanopartículas. Embora a interação primária entre o bevacizumabe e o PLGA não seja muito forte em termos de ligação covalente, pode ocorrer uma interação de Van der Waals ou uma ligação de hidrogênio. A presença de grupos éster do PLGA poderia causar um leve deslocamento nas bandas de absorção, influenciando a região de absorção dos grupos C=O.

Devido à dificuldade de identificação de bandas de paclitaxel nas amostras, a incorporação do fármaco à nanopartícula foi verificada e confirmada através de eficiência de encapsulação e análise de liberação.

## 5. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de um sistema de liberação baseado em nanopartículas de PLGA encapsuladas com paclitaxel e funcionalizadas com bevacizumabe para tratamento do carcinoma pulmonar. As duas Sínteses propostas - Eletrostática e Química - revelaram-se eficientes em termos de encapsulação do Paclitaxel e capacidade de funcionalização do bevacizumabe, sendo as nanopartículas morfologicamente esféricas. De forma geral, o sistema que se revelou o mais adequado para futuros estudos e aplicações *in vitro* devido ao tamanho e PDI médios foram os sistemas Q BVZ 0,5 e E BVZ 0,5, o que mostra que, apesar de metodologias de preparo diferentes, as nanopartículas com a concentração de 0,5 mg de BVZ por mL de nanopartícula são as mais estáveis. O tamanho elevado das nanopartículas com maior concentração do anticorpo sugere que possíveis interações possam estar ocorrendo entre os mesmos, o que aponta que tal concentração precisa de um aprofundamento de estudos para otimizar a síntese de forma a diminuir o tamanho da nanopartícula. Portanto, a síntese das nanopartículas foi bem sucedida; como próximos passos, são necessários estudos celulares para confirmar a atividade anticancerígenas esperada dos sistemas desenvolvidos, de forma a confirmar ainda mais suas aplicações terapêuticas.

## 6. REFERÊNCIAS

ADHIKARI, Chandan. Polymer nanoparticles-preparations, applications and future insights: A concise review. **Polymer-plastics technology and materials**, v. 60, n. 18, p. 1996-2024, 2021.

ALINE et al. Organic Nanocarriers for Bevacizumab Delivery: An Overview of Development, Characterization and Applications. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 4127–4127, 7 jul. 2021.

ALQAHTANI, Fulwah Yahya et al. Paclitaxel. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**, v. 44, p. 205-238, 2019.

ALVES, R. C. et al. Characteristics, Properties and Analytical Methods of Paclitaxel: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 110–118, 2 fev. 2018.

ALVI, Maria et al. PLGA-based nanoparticles for the treatment of cancer: current strategies and perspectives. **AAPS Open**, v. 8, n. 1, p. 12, 2022.

Avastin® (bevacizumabe): o medicamento deve ser prescrito para o tratamento de câncer de mama metastático somente em combinação com o paclitaxel. ANVISA, 2010. Disponível em: <  
[https://antigo.anvisa.gov.br/alertas/-/buscar?tagsName=avastin#:~:text=Ag%C3%AAncia%20Nacional%20de%20Vigil%C3%A2ncia%20Sanit%C3%A1ria&text=Avastin%C2%AE%20\(bevacizumabe\)%3A%20o.do%20c%C3%A2ncer%20de%20mama%20metast%C3%A1tico.>](https://antigo.anvisa.gov.br/alertas/-/buscar?tagsName=avastin#:~:text=Ag%C3%AAncia%20Nacional%20de%20Vigil%C3%A2ncia%20Sanit%C3%A1ria&text=Avastin%C2%AE%20(bevacizumabe)%3A%20o.do%20c%C3%A2ncer%20de%20mama%20metast%C3%A1tico.>). Acesso em 07 de jan. de 2024.

BADE, Brett C.; CRUZ, Charles S. Dela. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention. **Clinics in chest medicine**, v. 41, n. 1, p. 1-24, 2020.

BARTA, J. A.; POWELL, C. A.; WISNIVESKY, J. P. Global Epidemiology of Lung Cancer. **Annals of global health**, v. 85, n. 1, 1 jan. 2019.

BILGER, Geoffroy et al. Paclitaxel–bevacizumab combination in advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (NSCLC): AVATAX, a retrospective

multicentric study. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 14, p. 17588359221099399, 2022.

CANCINO, Juliana; MARANGONI, Valeria S ; ZUCOLOTTO, Valtencir. Nanotechnology in medicine: concepts and concerns. **Química Nova**, v. 37, n. 3, 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/dcxWV4RTSSjxDK3SsbdR8rR/?lang=pt>>. Acesso em: 17 ago. 2023.

CARREIRÓ, Filipa et al. Polymeric nanoparticles: Production, characterization, toxicology and ecotoxicology. **Molecules**, v. 25, n. 3731, 2020.

CESCA, M. et al. Bevacizumab-Induced Inhibition of Angiogenesis Promotes a More Homogeneous Intratumoral Distribution of Paclitaxel, Improving the Antitumor Response. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 15, n. 1, p. 125–135, 1 jan. 2016.

CHAN, Michelle Y. et al. Particle sizing of nanoparticle adjuvant formulations by dynamic light scattering (DLS) and nanoparticle tracking analysis (NTA). **Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols**, p. 239-252, 2017.

CHICEA, D. et al. Nanoparticles and nanoparticle aggregates sizing by DLS and AFM. **Journal of optoelectronics and advanced materials**, v. 4, n. 9, p. 1310-1315, 2010.

CHIKAKO FUNASAKA et al. The efficacy and safety of paclitaxel plus bevacizumab therapy in breast cancer patients with visceral crisis. **The Breast**, v. 58, p. 50–56, 10 abr. 2021.

CLEMENTE, Nausicaa et al. Paclitaxel-loaded nanosponges inhibit growth and angiogenesis in melanoma cell models. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 776, 2019.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta Potential Measurement. **Methods in molecular biology**, p. 63–70, 19 out. 2010.

CORTOT, Alexis B. et al. Weekly paclitaxel plus bevacizumab versus docetaxel as second-or third-line treatment in advanced non-squamous non–small-cell lung

cancer: Results of the IFCT-1103 ULTIMATE study. **European Journal of Cancer**, v. 131, p. 27-36, 2020.

DANHIER, Fabienne et al. Paclitaxel-loaded micelles enhance transvascular permeability and retention of nanomedicines in tumors. **International journal of pharmaceutics**, v. 479, n. 2, p. 399-407, 2015.

DANHIER et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 505–522, 1 jul. 2012.

DI FILLIPO, L.D. **Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com bevacizumabe para veiculação de docetaxel no tratamento de glioblastoma multiforme**. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Araraquara, 62 p, 2021.

DINESH KUMAR CHELLAPPAN et al. The role of bevacizumab on tumour angiogenesis and in the management of gynaecological cancers: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 1127–1144, 1 jun. 2018.

DUMA, N.; SANTANA-DAVILA, R.; MOLINA, J. R. Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 8, p. 1623–1640, ago. 2019.

FERREIRA, C. S. et al. Uso de nanobastões de ouro para o desenvolvimento de aulas práticas de nanotecnologia. **Química Nova**, 14 fev. 2017.

FILIPPE, V.; HAWES, A.; WIM JISKOOT. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, 3 mar. 2010.

FONSECA, C.; SIMÕES, S; GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. **Journal of Controlled Release**, v. 83, n. 2, p. 273–286, 1 out. 2002.

GAGLIARDI, Agnese; GIULIANO, Elena; EEDA VENKATESWARARAO; *et al.* Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. **Frontiers**

in **Pharmacology**, v. 12, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.601626/full>>. Acesso em: 17 ago. 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. 102017–102017, 1 jun. 2020.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, Coral; FORNAGUERA, Cristina; BORRÓS, Salvador. Nanomedicine in non-small cell lung cancer: from conventional treatments to immunotherapy. **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1609, 2020.

GHITMAN, J. et al. Review of hybrid PLGA nanoparticles: Future of smart drug delivery and theranostics medicine. **Materials & Design**, v. 193, p. 108805–108805, 1 ago. 2020.

GIANNOS, S. A. et al. Formulation Stabilization and Disaggregation of Bevacizumab, Ranibizumab and Aflibercept in Dilute Solutions. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 4, 28 fev. 2018.

HAMMOND, K.; RYADNOV, M. G.; HOOGENBOOM, B. W. Atomic force microscopy to elucidate how peptides disrupt membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1863, n. 1, p. 183447, jan. 2021.

HARIS, P. I. Characterization of protein structure and stability using Fourier transform infrared spectroscopy. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v. 5, n. 1, p. 15–25, 1 jan. 1999.

HATA, Kohkichi et al. Evaluation of the antiangiogenic effect of Taxol in a human epithelial ovarian carcinoma cell line. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 53, p. 68-74, 2004.

HE, Fanglian. Bradford protein assay. Bio-protocol, p. e45-e45, 2011.

HIGUCHI, J. et al. Polymer Membranes Sonocoated and Electrosprayed with Nano-Hydroxyapatite for Periodontal Tissues Regeneration. **Nanomaterials**, v. 9, n. 11, p. 1625–1625, 15 nov. 2019.

HOCK ING CHIU et al. Cytotoxicity of targeted PLGA nanoparticles: a systematic review. **RSC Advances**, v. 11, n. 16, p. 9433–9449, 1 jan. 2021.

HOLE, P. et al. Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using nanoparticle tracking analysis (NTA). **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 12, 18 nov. 2013.

HOO, C. M. et al. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. S1, p. 89–96, 19 jun. 2008.

IDREES, H. et al. A Review of Biodegradable Natural Polymer-Based Nanoparticles for Drug Delivery Applications. **Nanomaterials**, v. 10, n. 10, p. 1970–1970, 5 out. 2020.

JAIN, Rakesh K. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 17, p. 2205-2218, 2013.

JAVAD SHARIFI-RAD; Q; JAYANTA KUMAR, P; *et al.* Paclitaxel: Application in Modern Oncology and Nanomedicine-Based Cancer Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 1–24, 2021.

KARGOZAR, Saeid et al. Nanotechnology for angiogenesis: opportunities and challenges. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 14, p. 5008-5057, 2020.

KARLSSON, Johan; VAUGHAN, Hannah J.; GREEN, Jordan J. Biodegradable polymeric nanoparticles for therapeutic cancer treatments. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 9, p. 105-127, 2018.

KARVE, Shirang et al. Formulation of diblock polymeric nanoparticles through nanoprecipitation technique. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 55, p. 3398, 2011.

KAZAZI-HYSENI, F.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. Bevacizumab. **The Oncologist**, v. 15, n. 8, p. 819–825, 1 ago. 2010.

KEATING, Gillian M. (2014). Bevacizumab: A Review of Its Use in Advanced Cancer. **Drugs**, 74(16), 1891–1925.

KHAN, Ilyas et al. PLGA nanoparticles and their versatile role in anticancer drug delivery. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 33, n. 2, 2016.

KRIEGSMANN, M. et al. Deep Learning for the Classification of Small-Cell and Non-Small-Cell Lung Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1604, 1 jun. 2020.

LEROUX, Jean-Christophe et al. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 41, p. 14-14, 1995.

M. LUISA IRUELA-ARISPE; ZOVEIN, A. C. Angiogenesis. **Elsevier eBooks**, p. 85-89.e2, 1 jan. 2017.

MARKMAN, M; MEKHAIL, T. Paclitaxel in cancer therapy. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 3, n. 6, p. 755-766, 2002.

MENZEL, C.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Enzyme decorated drug carriers: Targeted swords to cleave and overcome the mucus barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 124, p. 164–174, 24 out. 2017.

MILLER, K. et al. Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 26, p. 2666–2676, 26 dez. 2007.

MOORE, C. J. et al. Controlling colloidal stability of silica nanoparticles during bioconjugation reactions with proteins and improving their longer-term stability, handling and storage. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 10, p. 2043–2055, 1 jan. 2015.

MU, L.; FENG, S. S. Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol®) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers. **Journal of Controlled Release**, v. 76, n. 3, p. 239–254, 1 out. 2001.

MUSIELAK, E.; AGNIESZKA FELICZAK-GUZIK; NOWAK, I. Optimization of the Conditions of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Synthesis. **Molecules**, v. 27, n. 7, p. 2202–2202, 28 mar. 2022.

OLIVEIRA, J; GNOATTO, J; AGUIRRE, T. Nanopartículas de sílica (NPSiO<sub>2</sub>) utilizadas para o tratamento de distúrbios associados ao sistema nervoso central (SNC). **Química Nova**, v. 46, n. 4, p. 362-374, 2023.

OTIENO, B. A.; KRAUSE, C. E.; RUSLING, J. F. Bioconjugation of Antibodies and Enzyme Labels onto Magnetic Beads. **Methods in Enzymology**, p. 135–150, 2016.

PARAS MANI GIRI; BANERJEE, Anurag ; BUDDHADEV LAYEK. A Recent Review on Cancer Nanomedicine. **Cancers**, v. 15, n. 8, p. 2256–2256, 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6694/15/8/2256>>. Acesso em: 17 ago. 2023.

PETITJEAN, A. et al. Cost-effectiveness of bevacizumab plus paclitaxel versus paclitaxel for the first-line treatment of HER2-negative metastatic breast cancer in specialist oncology centers in France. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, 11 fev. 2019.

RAMALINGAM, Sakkaraiappan; BELANI, Chandra P. Paclitaxel for non-small cell lung cancer. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 5, n. 8, p. 1771-1780, 2004.

REDONDO, A. et al. Primary results from CECILIA, a global single-arm phase II study evaluating bevacizumab, carboplatin and paclitaxel for advanced cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 159, n. 1, p. 142–149, out. 2020.

SANDLER, A. et al. Paclitaxel–Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non–Small-Cell Lung Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 24, p. 2542–2550, 13 dez. 2006.

SANDLER, Alan et al. Paclitaxel–carboplatin alone or with bevacizumab for non–small-cell lung cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 24, p. 2542-2550, 2006.

SCHABATH, M. B.; COTÉ, M. L. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 28, n. 10, p. 1563–1579, 1 out. 2019.

SCHMIDT, N. et al. Long-term delivery of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) from nanoporous silica nanoparticles improves the survival of spiral ganglion neurons in vitro. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0194778–e0194778, 27 mar. 2018.

SHARMA, S. et al. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 30–40, 1 jun. 2016.

SOUSA, F. et al. A new paradigm for antiangiogenic therapy through controlled release of bevacizumab from PLGA nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 16 jun. 2017.

SOUZA, Taiane GF; CIMINELLI, Virgínia ST; MOHALLEM, Nelcy Della Santana. A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2016. p. 012039.

STEITZ, B. et al. Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection: Size distribution, colloidal properties and DNA interaction. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, n. 1, p. 300–305, 21 dez. 2006.

TESTA, U.; CASTELLI, G.; PELOSI, E. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. **Cancers**, v. 10, n. 8, p. 248–248, 27 jul. 2018.

TEWARI, Krishnansu S. et al. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 8, p. 734-743, 2014.

THOMAS, K. A. Angiogenesis. **Elsevier eBooks**, p. 102–116, 1 jan. 2016.

VENTOLA, C Lee. The nanomedicine revolution: part 1: emerging concepts. **P & T : a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 37, n. 9, p. 512–25, 2012.

WILCZEWSKA, Agnieszka Z; KATARZYNA NIEMIROWICZ; MARKIEWICZ, Karolina H; et al. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 5, p. 1020–1037, 2012.

YANAGISAWA, M. et al. Bevacizumab improves the delivery and efficacy of paclitaxel. **Anti-Cancer Drugs**, v. 21, n. 7, p. 687–694, ago. 2010.

YANG, J.; YAN, J.; LIU, B. Targeting VEGF/VEGFR to Modulate Antitumor Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 3 maio 2018.

YAN-HUA, Y. A. N. G.; JIA-WANG, M. A. O.; XIAO-LI, T. A. N. Research progress on the source, production, and anti-cancer mechanisms of paclitaxel. **Chinese journal of natural medicines**, v. 18, n. 12, p. 890-897, 2020.

YETISGIN et al. Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2193–2193, 8 maio 2020.

YU, K. et al. Role of Four Different Kinds of Polyethylenimines (PEIs) in Preparation of Polymeric Lipid Nanoparticles and Their Anticancer Activity Study. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 7, p. 872–882, 1 jan. 2016.

ZHU, Linyan; CHEN, Liqun. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. **Cellular & molecular biology letters**, v. 24, n. 1, p. 40, 2019.