

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

ANA LAURA MORENO MARTINS SANCHEZ

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS PARA ENTREGA DIRECIONADA DE 5-
FLUOROURACIL NO TRATAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL**

SÃO CARLOS
2025

ANA LAURA MORENO MARTINS SANCHEZ

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS PARA ENTREGA DIRECIONADA DE 5-
FLUOROURACIL NO TRATAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado junto à Universidade Federal
de São Carlos como requisito para obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Camila Fernanda Rodero

Co-orientadora: Maria Cristina da Silva
Pranchevicius

SÃO CARLOS

2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente, pelo amor, apoio incondicional e pelas oportunidades, à minha família, em especial aos meus pais, Roseli e Felipe, e meu irmão, Gustavo. Obrigada por serem meu porto seguro, sem vocês nada seria possível.

Agradeço também ao meu namorado, Josué, por estar ao meu lado, me incentivar em tantos momentos desde o início e enxergar o meu melhor.

Agradeço também aos amigos que tenho ao meu lado desde a infância e que me trouxeram forças e alegria quando eu mais precisava. Obrigada, em especial, aos amigos que a universidade me trouxe, vocês transformaram essa etapa da minha vida em memórias inesquecíveis.

À minha orientadora Camila pelos aprendizados, confiança, amizade e orientação que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho e me tornar uma profissional e pesquisadora melhor.

Ao professor Valtencir Zucolotto e outros membros do Gnano, por todas as contribuições, ensinamentos, colaboração e por tornar a rotina no laboratório mais leve e divertida.

Agradeço à UFSCar por ter me acolhido durante todos esses anos, onde vivi momentos transformadores.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual o projeto não poderia ter sido realizado.

À banca examinadora pela disposição e por compartilhar seu conhecimento para a avaliação do trabalho.

É com imensa alegria e gratidão, que encerro um ciclo muito especial em minha trajetória. Esse trabalho representa para mim uma enorme realização e um ponto de partida para novos desafios que virão. Levo comigo cada ensinamento, cada pessoa e cada lembrança desta etapa inesquecível!

RESUMO

O câncer colorretal é o segundo mais letal, superado apenas pelo câncer de pulmão. No Brasil, é estimado que o número de casos cresça nos próximos três anos, sendo as mulheres, as mais afetadas. O 5-Fluorouracil (5-FU) é um dos fármacos mais utilizados no tratamento do câncer colorretal, porém causa muitos efeitos colaterais. Para contornar essas limitações, uma das ferramentas inovadoras é a utilização de um sistema de liberação controlada. As nanopartículas poliméricas de poliácido lático-glicólico (PLGA) estão entre os sistemas mais empregados para esse fim por ser um material biodegradável e biocompatível. Dessa forma, foram empregados três diferentes métodos de síntese para obtenção das nanopartículas (NPs): nanoprecipitação, emulsão simples e emulsão dupla. Os resultados demonstraram que as metodologias de síntese utilizadas foram adequadas para a obtenção de nanopartículas com tamanho inferior a 300 nm, PDI menor que 0,2 e potencial zeta negativo em torno de -30 mV, as imagens obtidas por MEV demonstram formas esféricas. Além disso, o 5-FU sugere uma liberação controlada e eficiente e, com a técnica de emulsão dupla, obteve-se uma eficiência de encapsulamento de 71,4%. A análise de FTIR mostrou que a incorporação do 5-FU não provocou alterações significativas nos grupos funcionais do PLGA, indicando preservação da estrutura química do carreador. Ademais, as NPs não foram citotóxicas às células CACO-2 na ausência do fármaco, mostrando boa biocompatibilidade com essas células e a microscopia confocal indicou que a maior parte delas foi internalizada. Dessa forma, esperamos que as nanopartículas com o 5-FU melhorem sua eficácia e direcionamento, de forma que os resultados possam contribuir para o desenvolvimento de terapias alternativas contra o câncer colorretal.

Palavras chave: Câncer colorretal; Síntese de nanopartículas; PLGA; 5-Fluorouracil

ABSTRACT

Colorectal cancer is the second most lethal, surpassed only by lung cancer. In Brazil, the number of cases is expected to increase over the next three years, with women being the most affected. 5-Fluorouracil (5-FU) is one of the most used drugs for colorectal cancer treatment, but it causes numerous side effects. To overcome these limitations, one innovative strategy is the use of controlled release systems. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) polymeric nanoparticles are among the most employed systems for this purpose due to their biodegradability and biocompatibility. Three different synthesis methods were used to obtain the nanoparticles (NPs): nanoprecipitation, single emulsion, and double emulsion. The results demonstrated that the synthesis methodologies employed were suitable for producing nanoparticles with sizes below 300 nm, PDI lower than 0.2, and a negative zeta potential around -30 mV, with SEM images showing spherical shapes. Furthermore, 5-FU suggests a controlled and efficient release, and with the double emulsion technique, an encapsulation efficiency of 71.4% was achieved. FTIR analysis showed that the incorporation of 5-FU did not cause significant changes in the functional groups of PLGA, indicating preservation of the carrier's chemical structure. Additionally, the NPs were not cytotoxic to CACO-2 cells in the absence of the drug, demonstrating good biocompatibility, and confocal microscopy indicated that most nanoparticles were internalized. Therefore, it is expected that 5-FU-loaded nanoparticles may improve drug efficacy and targeting, contributing to the development of alternative therapies against colorectal cancer.

Keywords: Colorectal cancer; Nanoparticle synthesis; PLGA; 5-Fluorouracil

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da síntese de nanopartículas com 5-FU encapsulado e sua atuação no tumor colorretal.....	11
Figura 2 - Formulações de nanopartículas poliméricas por dupla emulsão NPD_BR (esquerda) e NPD_5FU (direita).....	20
Figura 3 - Gráfico com os valores de Potencial Zeta (mV) de todas as formulações realizadas.....	22
Figura 4 - Gráfico de estabilidade das formulações por nanoprecipitação (NPN_BR; NPN_5FU) por 12 semanas com medidas de tamanho, PDI e potencial zeta	23
Figura 5 - Gráfico de estabilidade das formulações por emulsão simples (NPES_BR; NPES_5FU) por 12 semanas com medidas de tamanho, PDI e potencial zeta	23
Figura 6 - Gráfico de estabilidade das formulações por dupla emulsão (NPD_BR; NPD_5FU) por 12 semanas com medidas de tamanho, PDI e potencial zeta	23
Figura 7 - Distribuição de tamanho e concentração das nanopartículas NPN_BR (A), NPN_5FU (B), NPES_BR (C), NPES_5FU (D), NPD_BR (E), NPD_5FU (F)	25
Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura das NPN_BR (A), NPES_BR (B), NPD_BR (C) e NPD_5FU (D).....	26
Figura 9 - Espectros de infravermelho das nanopartículas NPD_BR e NPD_5FU...	27
Figura 10 - Perfil de liberação in vitro do 5-FU livre e encapsulado em NPD_5FU ..	28
Figura 11 - Viabilidade celular das células CACO-2 após 24h (A) e após 72h (B) de tratamento	30
Figura 12 - Imagens de microscopia confocal de controle de células CACO-2 (A) e células CACO-2 tratadas com NPD_5FU (B).....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulações utilizadas para a síntese de nanopartículas poliméricas por nanoprecipitação (NPN_BR; NPN_5FU).....	14
Tabela 2 - Formulações utilizadas para a síntese de nanopartículas poliméricas por emulsão simples (NPES_BR; NPES_5FU).....	14
Tabela 3 - Formulações utilizadas para a síntese de nanopartículas poliméricas por dupla emulsão (NPD_BR; NPD_5FU).....	15
Tabela 4 - Tamanho e PDI de nanopartículas poliméricas por nanoprecipitação, emulsão simples e dupla emulsão	21
Tabela 5 - Valores de tamanho e concentração de partículas por ml.....	24
Tabela 6 - Média dos valores de absorbância medidos em triplicata para a construção da curva padrão de 5-FU no UV-Vis	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 Obtenção das nanopartículas poliméricas	13
3.2 Caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas	15
3.2.1 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta	15
3.2.2 Análise de rastreamento das nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis – NTA).....	16
3.2.3 Morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	16
3.2.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ...	16
3.2.5 Determinação da eficiência de encapsulamento por método indireto por espectroscopia	17
3.2.6 Determinação do perfil de liberação	17
3.3 Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	18
3.3.1 Cultivo das células CACO-2.....	18
3.3.2 Viabilidade das células CACO-2 tratadas com as NPs.....	18
3.3.3 Cinética de internalização das nanopartículas por microscopia confocal.	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Características coloidais das nanopartículas poliméricas.....	20
4.2 Diâmetro hidrodinâmico e PDI	20
4.3 Potencial Zeta	21
4.4 Análise de estabilidade	22
4.5 Análise de rastreamento	24
4.6 Morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	25
4.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	26
4.8 Determinação do perfil de liberação do 5-FU	27
4.9 Eficiência de encapsulamento por espectroscopia no UV-vis.....	28

4.10 Viabilidade celular in vitro das células CACO-2 tratadas com NPs	29
4.11 Cinética de internalização das nanopartículas	30
5. CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal humano é um dos cânceres mais comuns em todo o mundo, apresentando entre um e dois milhões de novos casos diagnosticados a cada ano, com média de 700.000 mortes por ano (STEWART & WILD, 2014). Segundo os dados globais sobre a incidência de câncer para 2020, divulgados pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer da Organização Mundial da Saúde, a incidência do câncer colorretal ocupa o terceiro lugar (10% do total de casos) enquanto sua mortalidade ocupa o segundo lugar (9,4% do total) em número de mortes entre todos os tumores malignos, superado apenas pelo câncer de pulmão (SUNG et al., 2021). Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), a maior incidência do tumor é em mulheres e as maiores taxas de incidência são observadas na região Sudeste do país (INCA, 2022).

Este câncer acomete o segmento distal do reto e sigmoide, seguidos pelo ceco, cólon ascendente e transversal, sendo que os adenocarcinomas representam a quase totalidade dos cânceres colorretais. Ele se desenvolve ao longo de muitos anos pela interação de fatores ambientais e genéticos, suas mutações genéticas podem ser em oncogenes, genes supressores de tumor ou genes relacionados a mecanismos de reparo do DNA. Tais mutações causam uma proliferação celular anormal nas glândulas produtoras de muco que revestem o cólon e o reto que progridem para pólipos adenomatosos (BENSON, 2007). Caso os pólipos evoluam para câncer, podem formar um tumor na parede do reto ou cólon e, posteriormente, crescer em vasos sanguíneos ou linfáticos, aumentando a chance de metástase para outros locais anatômicos (TAURIELLO et al., 2017).

A escolha do tratamento para essa comorbidade depende de fatores como tamanho, localização, extensão do tumor, mas também das individualidades e saúde geral do paciente. O método mais empregado para o tratamento é a cirurgia de remoção do tumor que envolve o tecido saudável e seus gânglios linfáticos adjacentes (CHANDRAN et al., 2017). Atualmente, além da cirurgia, outros quatro principais estratégias são usadas para seu tratamento sendo elas a quimioterapia, a radioterapia, a imunoterapia e a terapia direcionada, enquanto no uso clínico prolongado de quimioterápicos, os pacientes apresentam efeitos colaterais tóxicos (BILLER et al., 2021).

Uma das maiores dificuldades da aplicação de quimioterápicos é a impossibilidade de distinção entre células saudáveis e células com atividade tumoral, as células com atividade normal também são atingidas e sofrem danos durante sua administração, comprometendo o bem-estar do paciente e suas atividades de rotina. Entre os principais efeitos colaterais observados estão a queda de cabelo, náusea, dificuldade para dormir, problemas oculares, diarreia e cansaço. O cansaço pode atrapalhar as atividades diárias continuamente e pode impedir que o paciente isole a experiência da quimioterapia do resto da vida (LOVE et al., 1989). Além disso, os fármacos quimioterápicos apresentam baixa solubilidade, e, conseqüentemente, uma baixa biodisponibilidade no corpo, demandando o emprego de altas doses para que os tratamentos convencionais tenham uma eficácia terapêutica significativa. Ainda que em quantidades elevadas, o fármaco pode não apresentar resultados satisfatórios e ainda levar ao aumento dos efeitos colaterais (LOVE et al., 1989).

O 5-Fluorouracil (5-FU) e oxaliplatina (L-OHP) são os quimioterápicos amplamente utilizados para tratar o câncer colorretal (LECH et al., 2016). Atualmente, o 5-FU, que é um análogo sintético do uracil, é empregado como uma quimioterapia de primeira linha no tratamento de vários tipos de câncer, como colorretal, mama, cabeça e pescoço, pâncreas e estômago, sendo o protagonista no tratamento do colorretal. Seu mecanismo de ação se baseia na inibição da atividade da timidilato sintase, o que interfere na síntese do DNA e inibe a proliferação de células cancerígenas pelo processo de apoptose (LONGLEY et al., 2003). Embora seja o quimioterápico mais aplicado para o tratamento de câncer colorretal, ele apresenta algumas limitações. Além dos efeitos colaterais comuns a maioria dos fármacos quimioterápicos já discutidos acima, em sua administração intravenosa, o 5-Fluorouracil resulta em graves danos toxicológicos ao sistema gastrointestinal (GI) e hematológico, e apresenta danos neurais, cardíacos e dermatológicos, o que se deve a sua toxicidade ao atingir as células não cancerígenas.

Em casos de câncer colorretal avançado, via oral, as taxas de resposta ao 5-FU são inferiores a 15% (CHANDRAN et al., 2017). Somado à alta toxicidade celular, a eficácia do 5-FU na quimioterapia do câncer também enfrenta outras barreiras como seu metabolismo rápido, uma meia-vida curta em torno de 10 a 20 minutos, seletividade inadequada para células cancerígenas e baixa biodisponibilidade, ou seja, a extensão e velocidade em que o fármaco adentra a

circulação sistêmica até atingir o local de ação é baixa (ENTEZAR-ALMAHDI et al., 2020).

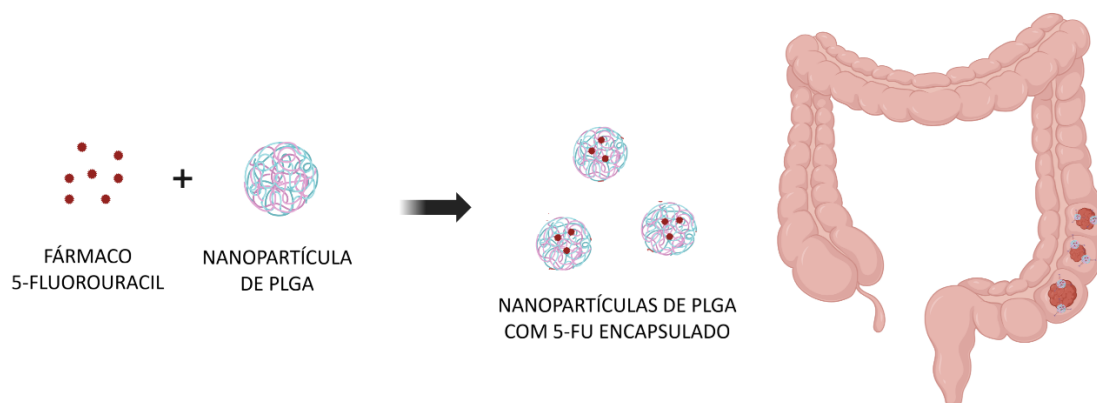
Para melhorar a atividade terapêutica dos quimioterápicos e reduzir os efeitos adversos, um mecanismo inovador é a utilização de um sistema de tecnologia sofisticada que garante o direcionamento do fármaco para o local específico do tumor e sua liberação controlada. O sistema de entrega de medicamentos ou Drug Delivery System (DDS), como é chamado, surgiu como um dos ramos da medicina moderna que busca direcionar e controlar a entrega de medicamentos através de tecnologias como as nanopartículas (VIEIRA et al., 2016). As nanopartículas são materiais com tamanhos na nanoescala, podendo ser inorgânicas, poliméricas, metálicas, lipídicas sólidas, entre outras. Seu tamanho em escala nanométrica e características de superfície possibilitam sua atuação na entrega e direcionamento de diversos compostos como pequenas drogas hidrofílicas e hidrofóbicas, vacinas e macromoléculas biológicas (DANHIER et al., 2012). Como mencionado anteriormente, os quimioterápicos causam efeitos indesejados por serem capazes de atravessar o endotélio celular devido às suas pequenas dimensões. Dessa forma, uma estratégia promissora é o encapsulamento desses fármacos em nanopartículas, cuja superfície pode ser alterada a fim de direcionar o nanocarreador especificamente para células cancerosas. A interação da nanopartícula com o quimioterápico o protege contra a degradação no organismo preservando sua atividade, melhora a absorção do fármaco no tecido tumoral e altera a farmacocinética dos fármacos (VIEIRA et al., 2016). A nanopartícula com o fármaco encapsulado apresenta uma maior dificuldade de atingir os tecidos saudáveis, devido ao pequeno espaçamento entre as células, entretanto nas regiões afetadas pelo tumor as células tumorais possuem um maior espaçamento entre si, permitindo a passagem e acúmulo das nanopartículas no tecido tumoral. Esta estratégia de vetorização é conhecida como efeito Enhanced Permeability and Retention (EPR) (VIEIRA et al., 2016).

Diversas nanopartículas naturais ou sintéticas são empregadas na nanomedicina e no tratamento de câncer, dentre elas as nanopartículas poliméricas como, por exemplo, as de poliácido láctico-glicólico (PLGA). O PLGA é um dos polímeros biodegradáveis que desperta mais interesse pela sua baixa toxicidade. Essa característica se deve aos compostos liberados durante sua metabolização, ácido láctico e ácido glicólico, ambos são monômeros endógenos e facilmente

metabolizados no organismo humano em produtos não tóxicos que são eliminados do organismo em forma de água e CO₂ pelo Ciclo de Krebs, via essencial ao corpo. O FDA (Food and Drug Administration) já registra o PLGA como um Drug Delivery System aprovado para fármacos no tratamento de diversas doenças humanas (DANHIER, et al., 2012). As nanopartículas podem ser obtidas por diferentes técnicas de acordo com o objetivo de aplicação, tais como emulsificação (simples ou dupla), nanoprecipitação, diálise e secagem por spray (REZVANTALAB et al., 2018).

Diante da ampla aplicação do fármaco 5-fluorouracil e da quimioterapia na terapia do câncer, o presente trabalho visa o desenvolvimento e obtenção de nanopartículas de poliácido lático-coglicólico (PLGA) por diferentes métodos de síntese para encapsulamento do 5-fluorouracil, representadas na **Figura 1**, propondo alternativas futuras para uma terapia com maior eficácia e bem-estar dos pacientes para o tratamento do câncer colorretal.

Figura 1 - Representação esquemática da síntese de nanopartículas com 5-FU encapsulado e sua atuação no tumor colorretal



Fonte: Autoria própria

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de poliácido lático-coglicólico (PLGA) com diferentes metodologias para a entrega direcionada do quimioterápico 5-FU.

2.2 Objetivos Específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- Síntese de nanopartículas poliméricas de poliácido lático-coglicólico (PLGA) brancas e com o fármaco 5-FU encapsulado pelos métodos de nanoprecipitação, emulsão simples e dupla emulsão;
- Estudo de caracterização das nanopartículas poliméricas desenvolvidas por técnicas de DLS, potencial zeta, NTA e FTIR ;
- Caracterização da morfologia dos nanossistemas por técnica de microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliação da eficiência de encapsulamento do fármaco 5-FU;
- Determinação do perfil de liberação do 5-FU;
- Avaliação da atividade antitumoral do fármaco livre e encapsulado;
- Análise da cinética de internalização das nanopartículas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas com poliácido lático-coglicólico sólidas (NPs) foram desenvolvidas no Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano) da Universidade de São Paulo (USP). Inicialmente, foram desenvolvidas diferentes formulações para análises e escolha da melhor opção para seguir com os ensaios

- (1) Nanopartícula polimérica branca obtida por nanoprecipitação com Kolliphor® P 188 (NPN_BR);
- (2) Nanopartícula polimérica contendo 5-Fluorouracil na concentração de 0,5 mg/ml obtida por nanoprecipitação com Kolliphor® P 188 (NPN_5FU);
- (3) Nanopartícula polimérica branca obtida por emulsão simples com PVA (NPES_BR);
- (4) Nanopartícula polimérica contendo 5-Fluorouracil na concentração de 0,25 mg/ml obtida por emulsão simples com PVA (NPES_5FU);
- (5) Nanopartícula polimérica branca obtida por dupla emulsão com PVA (NPD_BR);
- (6) Nanopartícula polimérica contendo 5-Fluorouracil na concentração de 0,5 mg/ml obtida por dupla emulsão com PVA (NPD_5FU);

O preparo das nanopartículas poliméricas por nanoprecipitação (NPN) foi realizado a partir de adaptações de Tawfik (2017), sendo que a fase aquosa foi composta por 2,0 ml de uma solução de Kolliphor® P 188 3% dissolvido em água ultrapura, enquanto a fase orgânica consistiu em 10 mg de poliácido lático-coglicólico (PLGA) adicionado a 2,0 ml de acetona. As fases foram preparadas separadamente em béqueres de 10 ml. A fase aquosa foi colocada em um agitador magnético e a fase orgânica foi adicionada rapidamente sobre ela com uma seringa equipada com agulha, formando instantaneamente uma solução esbranquiçada. A solução ficou sob agitação por 40 minutos para evaporação da acetona. Na formulação NPN_5FU, o fármaco foi previamente adicionado à fase orgânica e colocado no Vortex até sua completa dissolução. A formulação foi acondicionada em frasco adequado e mantida sob refrigeração a 4 °C.

Tabela 1 - Formulações utilizadas para a síntese de nanopartículas poliméricas por nanoprecipitação (NPN_BR; NPN_5FU)

Fase	Componentes	NPN_BR	NPN_5FU
Fase orgânica	PLGA	10 mg	10 mg
	5-FU	-	1 mg
	Acetona	1 ml	1 ml
Fase aquosa	Kolliphor® P 188	60 mg	60 mg
	Água ultrapura	2 ml	2 ml

Fonte: autoria própria

Para o preparo das nanopartículas poliméricas por emulsão simples (NPES), a fase aquosa foi composta por 4,0 ml de uma solução de Poly (Vinyl Alcohol) (PVA) 2% dissolvido em água ultrapura, enquanto a fase orgânica consistiu em 10 mg de poliácido lático-coglicólico (PLGA) adicionado a 1,0 ml de acetona. A fase orgânica foi rapidamente vertida sobre a fase aquosa, formando instantaneamente uma emulsão, que foi dispersa com a ajuda de um sonificador de ponta, em banho de gelo com 30% de amplitude por 1 minuto. A solução ficou sob agitação por 2 horas para evaporação da acetona; em seguida, foi centrifugada em tubo Amicon a 5000 rpm por 1h. O conteúdo retido no filtro foi ressuscitado em 4 ml de água ultrapura, acondicionado em frasco adequado e mantido sob refrigeração a 4 °C. Na formulação NPES_5FU, o fármaco foi previamente adicionado à fase orgânica e colocado no Vortex até sua completa dissolução.

Tabela 2 - Formulações utilizadas para a síntese de nanopartículas poliméricas por emulsão simples (NPES_BR; NPES_5FU)

Fase	Componentes	NPES_BR	NPES_5FU
Fase orgânica	PLGA	10 mg	10 mg
	5-FU	-	1 mg
	Acetona	1 ml	1 ml
Fase aquosa	PVA	80 mg	80 mg
	Água ultrapura	4 ml	4 ml

Fonte: autoria própria

As nanopartículas obtidas pela técnica de dupla emulsão foram preparadas a partir de adaptações do protocolo descrito por Khaledi (2020), com fase orgânica composta por 25 mg de PLGA em 1,5 mL de diclorometano, fase aquosa

interna 0,5 mL de água ultrapura e fase aquosa externa PVA 1% em 6,25 mL de água ultrapura. Ambas as emulsões foram realizadas com ultrassom de ponta em banho de gelo com amplitude de 30% por 3 minutos. A solução ficou sob agitação na capela de exaustão por 40 minutos para evaporação do solvente orgânico seguido de lavagem por centrifugação a 10.000 rpm durante 20 minutos. Na formulação NPD_5FU, o fármaco (1mg) foi previamente adicionado à fase aquosa interna e homogeneizado no Vortex até sua completa dissolução, os demais procedimentos foram iguais aos da nanopartícula sem o fármaco (branca). As formulações foram acondicionadas em frasco adequado e mantidas sob refrigeração a 4 °C.

Tabela 3 - Formulações utilizadas para a síntese de nanopartículas poliméricas por dupla emulsão (NPD_BR; NPD_5FU)

Fase	Componentes	NPD_BR	NPD_5FU
Fase orgânica	PLGA	25 mg	25 mg
	Diclorometano	1,5 ml	1,5 ml
Fase aquosa interna	Água ultrapura	0,5 ml	0,5 ml
	5 - FU	-	1 mg
Fase aquosa externa	PVA	62,5 mg	62,5 mg
	Água ultrapura	6,25 ml	6,25 ml

Fonte: autoria própria

3.2 Caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas

3.2.1 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta

A determinação do diâmetro médio hidrodinâmico foi realizada utilizando a técnica de DLS (Dynamic Light Scattering - DLS). Para obtenção do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, foi utilizado o equipamento Zetasizer (Malvern espectrômetro Nano ZS – Malvern Instruments, UK) que realiza medidas de DLS. As análises foram realizadas com um ângulo de dispersão de 90° e temperatura de 25°C em triplicata. Essa técnica também fornece o índice de polidispersividade (polydispersity index - PDI), um parâmetro importante de qualidade de cada síntese, seu valor mostra a distribuição das nanopartículas em cada formulação. O PDI pode variar de 0,1 a 1,0 sendo que nanopartículas com valor até 0,3 são consideradas monodispersas e acima de 0,7 já apresentam aglomeração (ASTETE & SABLIOV, 2006).

A carga superficial das nanopartículas foi realizada utilizando o mesmo equipamento, Zetasizer, através da medida da mobilidade eletroforética. O potencial zeta é uma medida que indica a carga (positiva ou negativa) presente na superfície das nanopartículas, sendo essa relacionada com a estabilidade eletrostática da formulação em meio aquoso e sua interação com membranas celulares. As medidas foram obtidas em triplicata, sendo que cada uma das leituras resultou de cem corridas.

Para os procedimentos acima, todas as amostras foram previamente diluídas em água ultrapura 100 vezes e os resultados obtidos pela média da triplicata.

3.2.2 Análise de rastreamento das nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis – NTA)

O método de Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) é utilizado para visualizar e analisar partículas em líquidos através da relação entre a taxa do movimento browniano e o tamanho da partícula. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, em triplicata e através do equipamento NS300 (Malvern) ZetaView[®]. As amostras foram diluídas em água ultrapura 1.000 vezes e injetadas no compartimento de amostras com seringas estéreis de 1 ml. A análise dos dados foi feita no software ZetaView 8.02.26. Foram obtidos dados de diâmetro e a concentração das nanopartículas em solução.

3.2.3 Morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as medidas, utilizou-se silício polido, que foi colado a um stub por um pedaço de fita dupla face condutora (fita carbono). Volumes de 10 µL de amostras diluídas 1.000 vezes foram depositados sobre o silício e estas gotas foram deixadas para secar no dessecador. Após completa secagem, as nanopartículas foram micrografadas usando um dispositivo ZEISS modelo SIGMA equipado com canhão de elétrons por emissão de campo (MEV-FEG).

3.2.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise em espectroscopia no infravermelho usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético e foi empregada para investigar ligações específicas presente das nanopartículas brancas e carregadas com o fármaco. Para essa análise e nas próximas etapas, somente as nanopartículas obtidas por dupla emulsão foram avaliadas. Em silício de 1 cm de diâmetro, foi colocado 10 uL das amostras de NPD_BR e NPD_5FU e essas foram levadas para dessecador a vácuo

por 30 minutos, esse procedimento foi realizado duas vezes, resultando em 20 uL de solução por sílicio. Foi utilizado espectrofotômetro Nicolet iS50 FT-IR (Thermo Fischer Scientific) com resolução 4 cm⁻¹, no intervalo de 500 a 4.000 cm⁻¹ e cada espectro foi obtido a partir da média de 128 medidas.

3.2.5 Determinação da eficiência de encapsulamento por método indireto por espectroscopia

Para obtenção da eficiência de encapsulamento (EE %) do fármaco 5-FU, inicialmente foi construída uma curva de calibração por espectroscopia no UV-Vis a 265 nm em triplicata. Em balões volumétricos de 10 mL, foram preparadas cinco diluições do fármaco em água ultrapura em concentrações crescentes: 2, 6, 11, 13 e 15 µg/ml. Todas as diluições foram medidas a 265 nm, valor característico do pico de absorção do 5-FU (NAIR et al., 2011), e os valores de absorbância registrados para a construção da curva padrão.

As amostras NPD_BR e NPD_5FU foram lavadas por centrifugação durante 20 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante da NPD_5FU foi diluído 50 vezes em água ultrapura e seu valor de absorbância medido utilizando o sobrenadante da nanopartícula branca (NPD_BR) como baseline. O valor obtido foi plotado na curva e a eficiência calculada de acordo com a Fórmula 1. A centrifugação é capaz de separar o fármaco encapsulado do que está livre sendo então calculado por quantificação indireta:

$$EE\% = \frac{[5FU\ total - 5\ FU\ livre]}{5\ FU\ total} \times 100 \quad (1)$$

Fórmula 1. Cálculo da eficiência de encapsulamento do 5-FU.

O total de ativo (5-FU total) corresponde à concentração de 5-FU colocada no início da síntese, e a porção não encapsulada (5-FU livre) corresponde a porção coletada durante a centrifugação.

3.2.6 Determinação do perfil de liberação

Com o objetivo de avaliar o perfil de liberação do 5-Fluorouracil das nanopartículas, o 5-FU livre e as nanopartículas foram diluídas a uma concentração final de 0,2 mg/ml de 5-FU. As NPs e 5-FU livre foram incubados à 37 °C sob constante agitação de 1.000 rpm com coletas de 1 ml em intervalos pré-determinados (30 min, 2h, 8h, 12h, 16h, 24h, 30h, 36h, 48h, 60h, 72h, 78h, 90h, 100h, 116h, 122 e 124h). A concentração do 5-FU foi determinada por UV-vis através do método indireto e a

porcentagem de liberação foi calculada com base na quantidade de fármaco no sobrenadante em comparação com a quantidade encapsulada.

Adicionalmente, o estudo de liberação foi conduzido em células de Franz com membranas sintéticas, utilizadas como permeadores cutâneos, empregando-se solução receptora de PBS pH 7,4 mantida a 37 °C, de forma a simular as condições fisiológicas do meio biológico.

3.3 Ensaios biológicos *in vitro*

3.3.1 Cultivo das células CACO-2

O cultivo das células CACO-2 (adenocarcinoma de cólon humano) foi feito em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de glutamina, a 37°C e incubada em estufa com 5% de CO₂. As células foram subcultivadas a cada 3 dias, usando raspador de células para desagregá-las da garrafa de cultivo. Após a coleta, as células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos e ressuspensas em meio de cultivo. O número de células viáveis para o cultivo e plaqueamento foi determinado em um contador automático usando alíquotas da suspensão celular com quantidade equivalente de solução de Azul de Tripán a 0,4%, em que as células não viáveis foram as que incorporaram o corante.

3.3.2 Viabilidade das células CACO-2 tratadas com as NPs

A avaliação da viabilidade foi realizada pelo método de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT). As células foram transferidas para placas de 96 poços, na concentração de 1x10⁴ células por poço e incubadas por 24h a 37°C. Após esse período, o meio de cultura foi removido dos poços, e os grupos experimentais foram adicionados nos poços, sendo três diferentes grupos: NPD_BR, NPD_5FU e 5-FU livre. Os tratamentos foram realizados em dois tempos de incubação distintos: 24h e 72h. Após incubação, o tratamento foi retirado e foi aplicado o meio com solução de MTT, sendo novamente incubadas por 1h à 37°C. Em seguida, o meio contendo MTT foi removido e 200 uL por poço de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado para dissolver os cristais de formazan. A absorbância foi lida em leitor de placa Spectra Max® M3 (Molecular Advance) no comprimento de onda de 570 nm.

3.3.3 Cinética de internalização das nanopartículas por microscopia confocal

A cinética de internalização das nanopartículas foi avaliada através da microscopia confocal. Para esta etapa, a nanopartícula NPD_5FU foi funcionalizada

com um marcador fluorescente (3,3'-Diocetadecyloxacarboocyanine perchlorate - DIO). As células CACO-2 foram cultivadas em placas de 24 poços ($1,5 \times 10^5$ células vivas/poço) contendo lamínulas de vidro estéreis e tratadas com as nanopartículas NPD_5FU com concentrações não citotóxicas das nanopartículas fluorescentes (1×10^{10} partículas/ml) por um período de 4h. Além do marcador DIO para as nanopartículas, também foi utilizado o marcador de membrana CellMask™ Deep Red diluído 1.000 vezes e o marcador de núcleo Hoechst 33342 (1ug/ml). Posteriormente, sua localização subcelular foi analisada com microscópio confocal LSM 900 (Zeiss).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características coloidais das nanopartículas poliméricas

Para a preparação das nanopartículas poliméricas, os componentes de cada uma das fases, aquosa e orgânica, foram escolhidos com base em suas propriedades e capacidade de formar uma formulação estável e eficiente para o encapsulamento e liberação controlada de quimioterápicos. Em todas as formulações, a fase orgânica foi constituída de poliácido lático-coglicólico (PLGA) e solventes orgânicos como a acetona ou diclorometano. O PLGA foi escolhido devido à sua baixa toxicidade e por se tratar de um polímero biodegradável, além de formar nanopartículas uniformes e bem estruturadas. Ele é amplamente utilizado por sua capacidade de solubilização de fármacos hidrofílicos, como o 5-fluorouracil e estabilidade em condições de armazenamento prolongado (DANHIER et al., 2012). Os tensoativos Poloxamer 188 e Poly(Vinyl Alcohol) (PVA) foram escolhidos devido à sua capacidade de estabilizar a emulsão e reduzir a tensão superficial, características essenciais para a encapsulamento do fármaco. A formulação final dentre as nanopartículas foi estabelecida com base em sua estabilidade por mais de 40 dias e nas características do fármaco estudado, selecionando a formulação mais eficiente e estável para seu transporte e liberação controlada, a qual está representada na **Figura 2**.

Figura 2 - Formulações de nanopartículas poliméricas por dupla emulsão NPD_BR (esquerda) e NPD_5FU (direita)



Fonte: Autoria própria

4.2 Diâmetro hidrodinâmico e PDI

Para cada nanopartícula obtida, foram analisados o diâmetro hidrodinâmico (tamanho) e o índice de polidispersão (PDI) pela técnica de dispersão de luz dinâmica. Os resultados obtidos foram organizados na **Tabela 4** abaixo.

Tabela 4 - Tamanho e PDI de nanopartículas poliméricas por nanoprecipitação, emulsão simples e dupla emulsão

NPs	Tamanho (nm)	PDI
NPN_BR	168,8 +/- 1,82	0,113 +/- 0,016
NPN_5FU	117,7 +/- 1,10	0,115 +/- 0,014
NPES_BR	176,2 +/- 2,84	0,127 +/- 0,030
NPES_5FU	166,8 +/- 2,50	0,056 +/- 0,025
NPD_BR	249,2 +/- 3,50	0,134 +/- 0,027
NPD_5FU	233,8 +/- 3,81	0,100 +/- 0,023

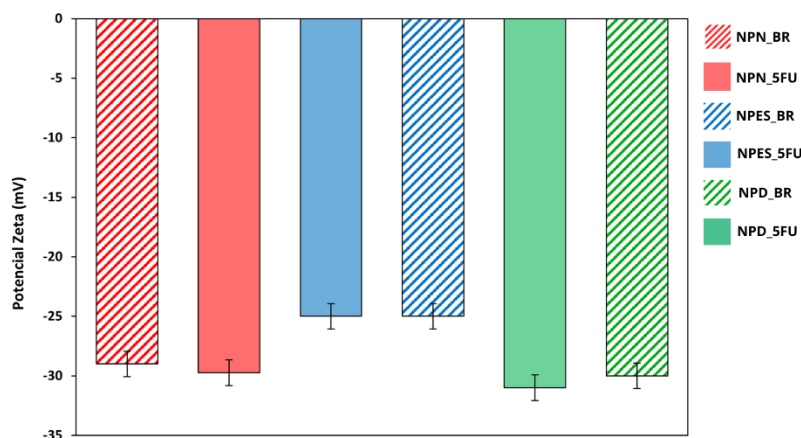
Fonte: autoria própria

Os resultados indicam que as nanopartículas apresentam dimensões ideais, um parâmetro crucial na quimioterapia, pois partículas com tamanho adequado favorecem a internalização celular, a circulação prolongada e a eficiência na entrega do fármaco às células tumorais (DANHIER et al., 2012). As nanopartículas obtidas por dupla emulsão apresentaram um tamanho mais elevado (superior a 200 nm), possivelmente explicado por sua organização em duas camadas, característica típica desse método de síntese (PANIGRAHI et al., 2021). Os valores de PDI também apresentaram bons resultados, exceto nas nanopartículas com fármaco obtidas por emulsão simples, que apresentaram PDI inferiores a 0,1. O ideal é que estejam entre 0,1 e 1, sendo que índices próximos de 0,1 indicam elevada homogeneidade e distribuição uniforme de tamanhos, características que favorecem a estabilidade coloidal, a reprodutibilidade e o desempenho biológico das nanopartículas (ASTETE & SABLIOV, 2006; DANHIER et al., 2012).

4.3 Potencial Zeta

O potencial zeta é um parâmetro definido pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* - IUPAC que mede o potencial eletrostático das nanopartículas em relação à sua dupla camada elétrica e o líquido. Esse parâmetro representa uma força superficial repelente que mantém as partículas separadas e contribui para a estabilidade da formulação em meio aquoso e sua interação com membranas celulares (RAHMAN et al., 2010). Os resultados estão ilustrados abaixo na **Figura 3**, a qual traz os valores específicos para cada síntese avaliada, isso nos permitiu uma análise mais precisa e detalhada.

Figura 3 - Gráfico com os valores de Potencial Zeta (mV) de todas as formulações realizadas



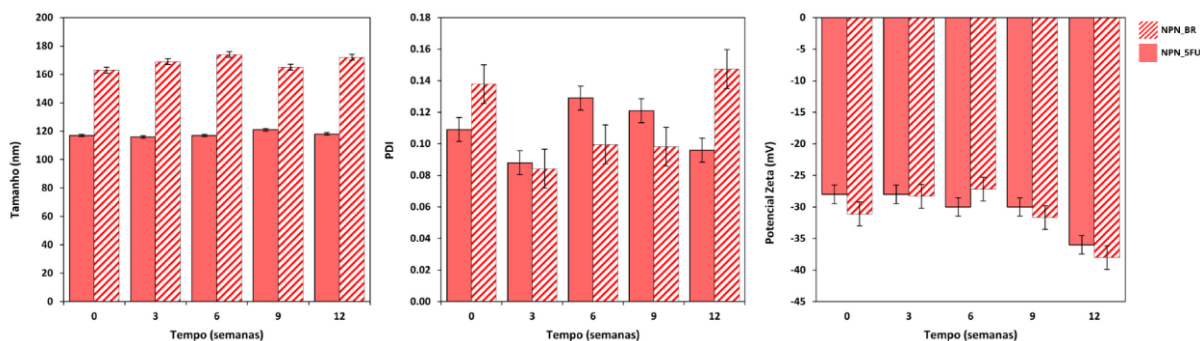
Fonte: autoria própria

Nas sínteses realizadas, foi notada uma variação do potencial zeta na faixa de -25 a -31 mV, portanto, mostra uma distribuição homogênea das partículas em suspensão e uma repulsão eletrostática entre elas, já que cargas iguais tendem a se repelir. Os resultados obtidos estão dentro de um intervalo no qual as amostras apresentam uma boa estabilidade em suspensão. Segundo POMPEU (2018), os valores ideais de potencial zeta para garantir uma boa estabilidade coloidal devem ser mais positivos que +30 mV ou mais negativos que -30 mV, dessa forma as nanopartículas obtidas por emulsão dupla (NPD_BR e NPD_5FU) demonstram resultados mais próximos do ideal.

4.4 Análise de estabilidade

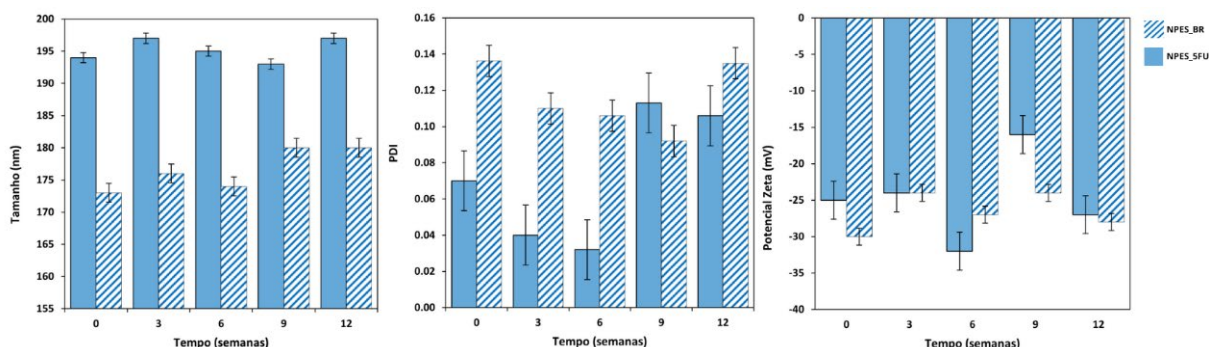
A análise de estabilidade de cada uma das nanopartículas sintetizadas foi avaliada durante 12 semanas, as quais estão indicadas nas **Figuras 4, 5 e 6**. Tal análise é importante para garantir que as formulações manterão as características desejadas a longo prazo, o que indica suas condições de armazenamento e manutenção. Foi avaliado o tamanho das partículas, o PDI e o potencial zeta semanalmente. O objetivo foi escolher a formulação mais estável para ser utilizada na encapsulamento do 5-fluorouracil.

Figura 4 - Gráfico de estabilidade das formulações por nanoprecipitação (NPN_BR; NPN_5FU) por 12 semanas com medidas de tamanho, PDI e potencial zeta



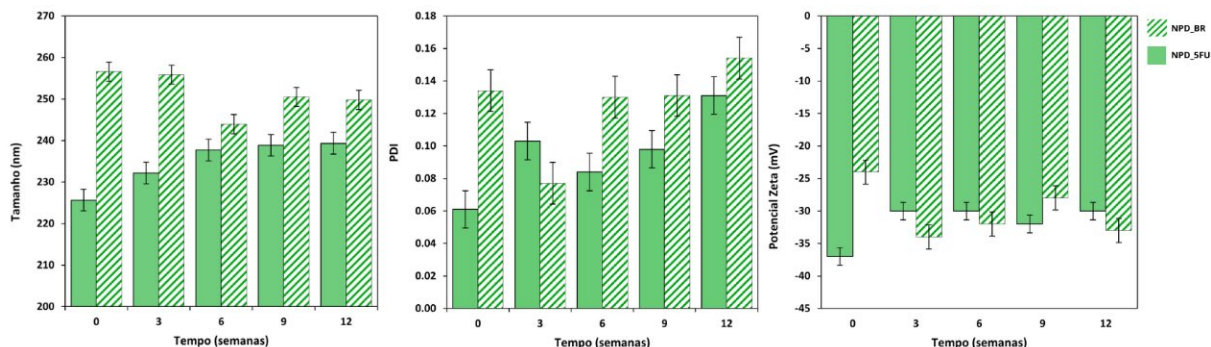
Fonte: Autoria própria

Figura 5 - Gráfico de estabilidade das formulações por emulsão simples (NPES_BR; NPES_5FU) por 12 semanas com medidas de tamanho, PDI e potencial zeta



Fonte: Autoria própria

Figura 6 - Gráfico de estabilidade das formulações por dupla emulsão (NPD_BR; NPD_5FU) por 12 semanas com medidas de tamanho, PDI e potencial zeta



Fonte: Autoria própria

Os resultados apresentados nos gráficos acima mostram que as nanopartículas avaliadas apresentaram estabilidade consistente durante as doze semanas de estudo. O estudo de estabilidade indicou que as metodologias de síntese utilizadas foram satisfatórias em relação ao tamanho das partículas obtidas.

Nas nanopartículas obtidas por emulsão simples, é possível notar que seu PDI ficou abaixo do esperado em comparação com as demais sínteses, enquanto seu potencial zeta foi o que apresentou maiores oscilações e valores inferiores. Já naquelas sintetizadas por nanoprecipitação e dupla emulsão, os valores de PDI e potencial zeta demonstraram resultados melhores, sendo a dupla emulsão com valores de potencial zeta mais próximos do esperado -30 mV.

4.5 Análise de rastreamento

Na análise de rastreamento, as medições forneceram dados dos tamanhos médio e concentração das nanopartículas. Ela foi realizada como complemento aos resultados obtidos por DLS discutidos anteriormente, proporcionando informações adicionais sobre a concentração das partículas, tamanho e homogeneidade da amostra (**Figura 7**). Todas as medidas foram realizadas em triplicata e suas médias estão indicadas na **Tabela 5** abaixo.

Tabela 5 - Valores de tamanho e concentração de partículas por ml

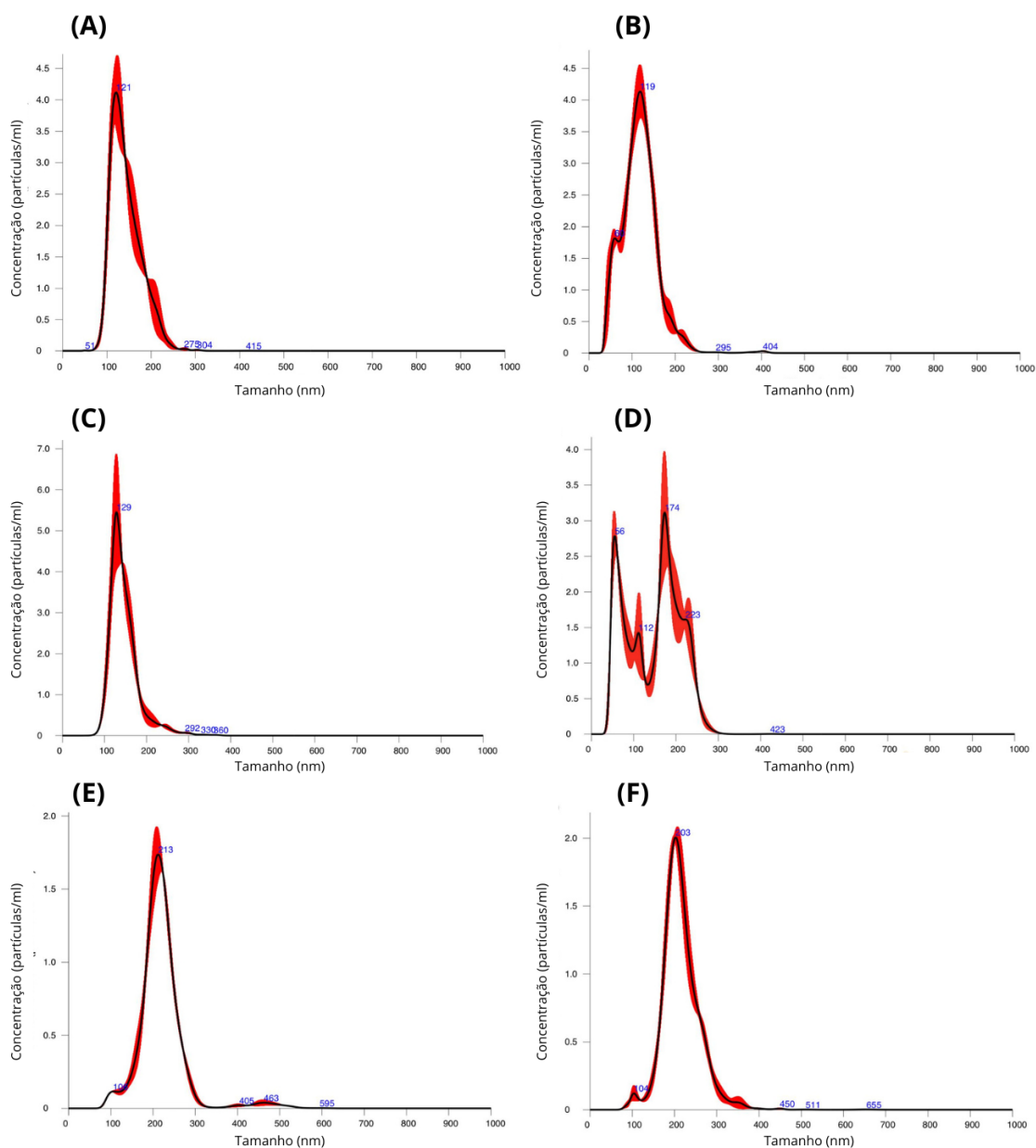
NPs	Tamanho (nm)	[Partículas/ml]
NPN_BR	143,5 +/- 2,7	$2,92 \times 10^{12} \pm 5,44 \times 10^{10}$
NPN_5FU	117,4 +/- 2,1	$3,65 \times 10^{12} \pm 1,39 \times 10^{11}$
NPES_BR	146,8 +/- 2,4	$3,16 \times 10^{12} \pm 2,76 \times 10^{11}$
NPES_5FU	147,0 +/- 0,5	$3,56 \times 10^{12} \pm 5,23 \times 10^{10}$
NPD_BR	219,7 +/- 0,9	$1,44 \times 10^9 \pm 7,25 \times 10^7$
NPD_5FU	215,6 +/- 1,4	$1,65 \times 10^{12} \pm 5,29 \times 10^{10}$

Fonte: autoria própria

Os dados proporcionam um melhor entendimento do tamanho e concentração das nanopartículas, somado a isso tais resultados são um importante indicativo para os ensaios *in vitro*, auxiliando na definição do volume e concentração a serem utilizados nos ensaios.

A amostra da partícula sintetizada por emulsão simples, carregada com o fármaco (NPES_5FU), apresentou baixa homogeneidade. Conforme mostrado na **Figura 7 (D)**, essa formulação exibiu nanopartículas com diferentes tamanhos e variações em sua distribuição e concentração. Tais características são indesejáveis em sistemas nanoestruturados, indicando que essa amostra apresentou desempenho inferior em comparação às demais.

Figura 7 - Distribuição de tamanho e concentração das nanopartículas NPN_BR (A), NPN_5FU (B), NPES_BR (C), NPES_5FU (D), NPD_BR (E), NPD_5FU (F)



Fonte: Autoria própria

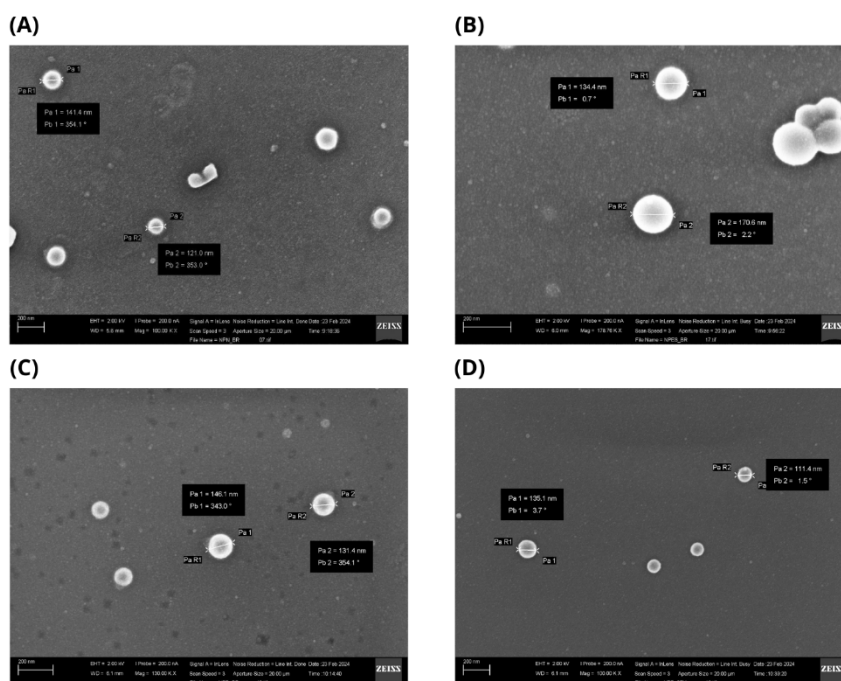
4.6 Morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das nanopartículas foi avaliada por MEV, indicando qual sua forma diante do método de síntese empregado. A análise de tamanho da partícula branca sintetizada por nanoprecipitação resultou em média em 131,2 nm, entretanto, na **Figura 8 (A)** é possível observar que nem todas são esféricas. Já aquela obtida

por emulsão simples, na **Figura 8 (B)**, apresentou o tamanho de 219,7 nm, mas é observada uma amostra com aglomeração e variação de tamanhos.

Foi constatado que as NPs sintetizadas por dupla emulsão apresentam uma forma esférica uniforme. Nesse método de síntese, além da nanopartícula branca, a NP com o 5-FU também foi analisada para comparação de morfologia após incorporação do fármaco. A NPD_BR apresentou em média 138,8 nm enquanto a NPD_5FU obteve 123,3 nm, o que indica que o encapsulamento do quimioterápico não alterou significativamente o tamanho da partícula. Tais valores são menores quando comparados às medidas obtidas pelas técnicas de DLS, um resultado já esperado, uma vez que a microscopia analisa amostras secas, sem a camada de hidratação em volta da partícula, como apontado por Hoo et al. (2008).

Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura das NPN_BR (A), NPES_BR (B), NPD_BR (C) e NPD_5FU (D)

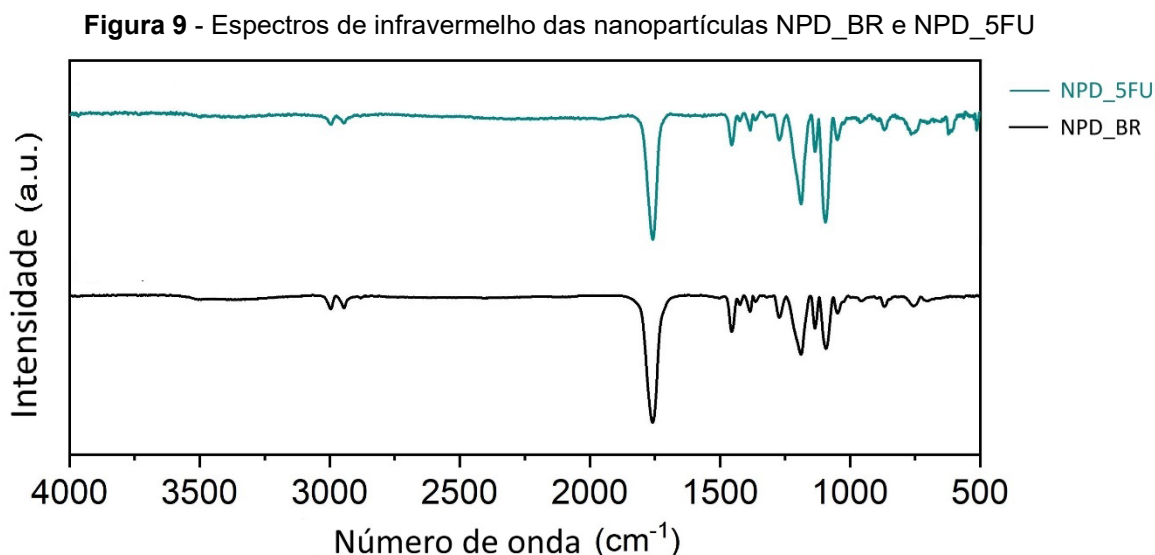


Fonte: Autoria própria

4.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Considerando os resultados da caracterização e o fato de o quimioterápico utilizado (5-FU) ser um fármaco hidrofílico, optou-se por realizar os ensaios complementares de caracterização (FTIR, perfil de liberação, eficiência de encapsulamento e ensaios *in vitro*) somente com as nanopartículas sintetizadas por dupla emulsão.

A técnica de espectroscopia foi utilizada na região do infravermelho para determinar a interação no nível de grupos funcionais das formulações obtidas. Desse modo, foram avaliados os espectros de FTIR das nanopartículas branca e carregada sintetizadas por emulsão dupla. A **Figura 9** apresenta uma comparação entre os espectros de transmitância para ambas.



Fonte: Autoria própria

O fármaco 5-FU exibe picos devido ao grupo cetônico cíclico, ao grupo amino secundário, ao alongamento C = C e ao grupo C – F (PATEL et al., 2011). A análise de FTIR da nanopartícula NPD_5FU foi feita para avaliar possíveis alterações na presença de grupos funcionais após a incorporação do fármaco. A **Figura 9** mostrou que o espectro da NPD_5FU foi bastante semelhante ao da formulação sem o fármaco, NPD_BR, indicando que a incorporação do fármaco não gerou mudanças significativas no ambiente do carreador.

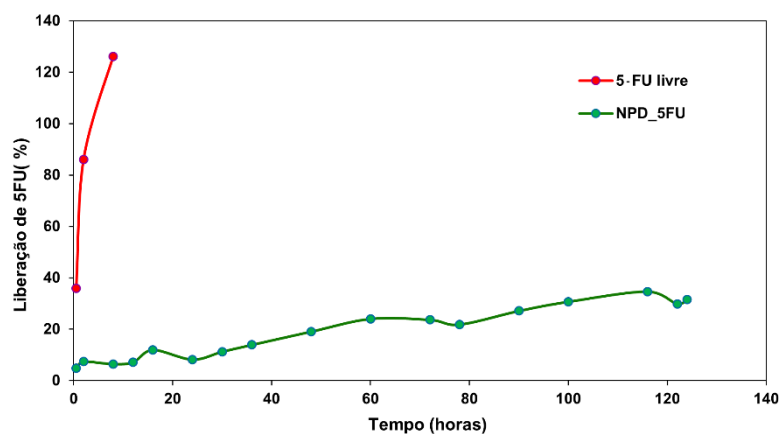
Nos espectros, foram observados grupos característicos do PLGA nas NPs em 1745 cm⁻¹, esta banda pode ser atribuída à vibração de alongamento dos grupos carbonila, entre 1450 e 1360 cm⁻¹, as bandas se devem às vibrações de flexão CH, além das bandas em 1180 e 1080cm⁻¹ de vibrações de alongamento C-O-C (TRYBA et al., 2022).

4.8 Determinação do perfil de liberação do 5-FU

O perfil de liberação do 5-FU *in vitro* a partir da NPD_5FU foi avaliado no pH de 7,4, para mimetizar o pH fisiológico do sangue. É possível observar uma

rápida liberação do fármaco livre (100%), em torno de 8h, observado na **Figura 10**. Enquanto isso, a liberação de 5-FU na nanopartícula foi sustentada em cerca de 30% até o último tempo analisado (124h). A liberação prolongada sugere uma liberação controlada e eficiente em todo o sistema. Além disso, a liberação do fármaco livre demonstra que não há interação desse com a membrana utilizada no experimento. O benefício do sistema de liberação prolongada propicia uma redução de dose do medicamento e mantem as concentrações do fármaco em uma janela terapêutica por um período mais longo (QURESHI et al., 2017).

Figura 10 - Perfil de liberação in vitro do 5-FU livre e encapsulado em NPD_5FU



Fonte: autoria própria

4.9 Eficiência de encapsulamento por espectroscopia no UV-vis

Para a construção da curva de calibração com cinco pontos, foi realizado o procedimento em triplicata conforme descrito na seção de metodologia com as cinco diluições do fármaco em água ultrapura em concentrações crescentes: 2, 6, 11, 13 e 15µg/ml. Todas as diluições foram medidas a 265 nm e os valores de absorbância registrados estão registrados na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Média dos valores de absorbância medidos em triplicata para a construção da curva padrão de 5-FU no UV-Vis

Concentração (µg/ml)	Absorbância (Abs)
2	0,184
6	0,384
11	0,623
13	0,691
15	0,773

Fonte: autoria própria

Com os valores acima, foi construída uma curva de calibração cuja equação de reta é $y = 0,0454x + 0,1038$, com $R^2 = 0,997$.

Os cálculos da concentração de fármaco presente no sobrenadante foram realizados através da equação da reta acima, sendo que a absorbância obtida no sobrenadante da NPD_5FU foi de 0,149.

Os valores foram plotados na curva construída previamente para definir a quantidade de fármaco encapsulado por quantificação indireta. O total de ativo corresponde à concentração de 5-FU colocada no início da síntese, e a porção não encapsulada corresponde a porção coletada durante a centrifugação e quantificada por espectrofotometria no UV-Vis. Nos cálculos, também deve ser considerado o fator de diluição utilizado, o de 50 vezes.

Com a realização dos cálculos para a formulação NPD_5FU, temos que:

$$EE\% = \frac{[1mg - 0,286mg]}{1mg} \times 100$$
$$EE\% = 71,4\%$$

Pelos resultados, pode-se inferir que a formulação NPD_5FU apresentou uma boa taxa de encapsulamento de 5-FU de 71,4%.

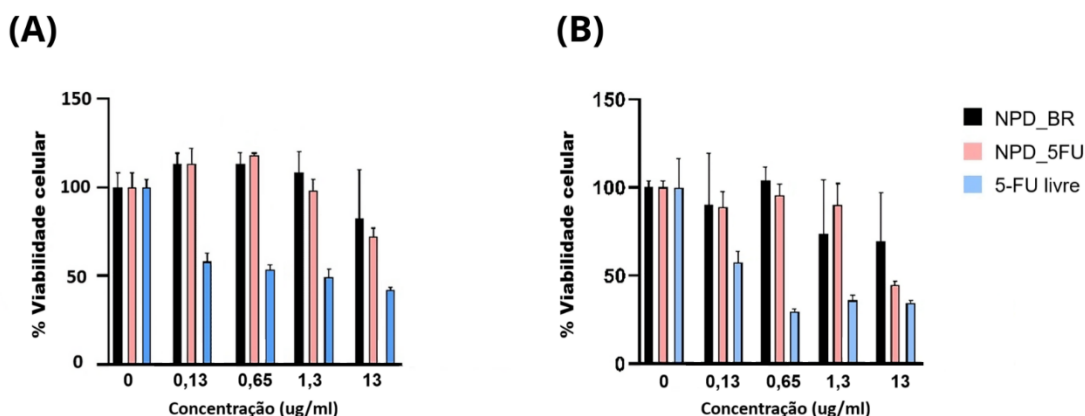
As formulações obtidas por nanoprecipitação e emulsão simples não foram analisadas e quantificadas por espectrofotometria no UV-Vis uma vez que os resultados obtidos durante sua caracterização indicaram que a emulsão dupla alcançou melhores características. Somado a isso, pelo descrito na literatura, fármacos hidrofílicos, como o 5-FU, apresentam maior eficiência quando a técnica de dupla emulsão é aplicada, pois a presença de duas fases aquosas facilita o encapsulamento e evita a rápida difusão do fármaco para a fase externa (PANIGRAHI et al., 2021).

4.10 Viabilidade celular *in vitro* das células CACO-2 tratadas com NPs

O desempenho biológico *in vitro* do sistema nanoestruturado foi avaliado no modelo celular CACO-2. Assim, os resultados de viabilidade celular apresentado na **Figura 11** demonstra os efeitos da exposição das células aos tratamentos. Após 24h de exposição não houve redução significativa da viabilidade celular quando tratadas com as NPs, enquanto em 72h já ocorre uma redução da viabilidade que

indica efeitos deletérios nas células. Como esperado, a citotoxicidade do 5-FU livre é maior, apresentando uma maior morte celular e, conseqüentemente, menor viabilidade. Já na partícula branca, ou seja, sem fármaco NPD_BR a viabilidade celular se manteve alta, indicando que ela não é citotóxica para a célula. Ao comparar a partícula com 5-FU encapsulado, NPD_5FU, e o fármaco livre observa-se que o 5-FU livre apresenta uma maior citotoxicidade, o que era esperado uma vez que a nanopartícula promove uma liberação mais controlada.

Figura 11 - Viabilidade celular das células CACO-2 após 24h (A) e após 72h (B) de tratamento



Fonte: Autoria própria

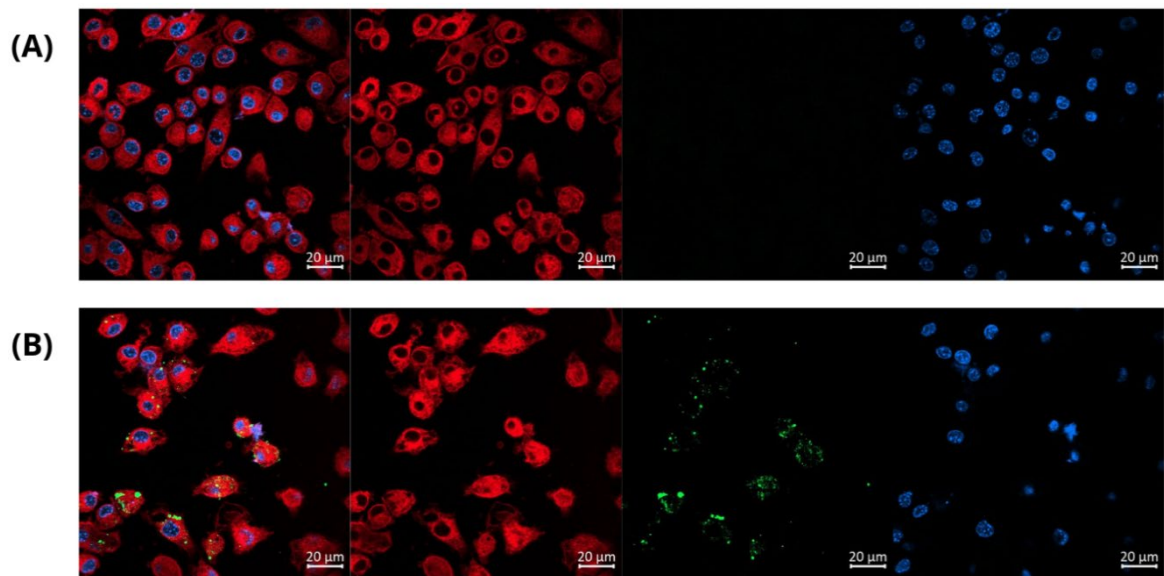
4.11 Cinética de internalização das nanopartículas

Pela microscopia confocal, foi possível observar a localização subcelular das nanopartículas aplicadas. Na **Figura 12 (A)**, está representado o controle, células nas quais as nanopartículas não foram adicionadas, dessa forma apenas os marcadores de membrana CellMask™ Deep Red e o marcador de núcleo Hoechst 33342 emitem fluorescência vermelha e azul, respectivamente, enquanto há uma ausência de fluorescência verde referente ao marcador DIO das nanopartículas. Já na **Figura 12 (B)** é possível observar a presença de fluorescência de todos os marcadores. A maioria das nanopartículas está nas células, mostrando que foram internalizadas encontrando-se na região citoplasmática das células.

A confirmação da internalização celular é um aspecto fundamental para o sucesso de nano sistemas, pois garante que o fármaco encapsulado atinja o compartimento intracelular, onde pode exercer sua atividade terapêutica. Estudos prévios demonstram que nanopartículas poliméricas, como as de PLGA, são internalizadas principalmente por processos de endocitose, acumulando-se no

citoplasma antes da liberação do fármaco (CARTIERA et al., 2009). Além disso, a microscopia confocal é uma técnica muito utilizada para acompanhar a internalização de partículas, permitindo visualizar sua localização dentro das células. Esses resultados sugerem que as nanopartículas produzidas penetraram nas células, o que é essencial para que o fármaco encapsulado seja liberado no local de ação (DANHIER et al., 2012).

Figura 12 - Imagens de microscopia confocal de controle de células CACO-2 (A) e células CACO-2 tratadas com NPD_5FU (B)



Fonte: Autoria própria

5. CONCLUSÕES

Foram desenvolvidas e avaliadas diferentes formulações de nanopartículas de PLGA para o encapsulamento e a entrega controlada de 5-Fluorouracil (5-FU), visando seu uso como estratégia inovadora no tratamento do câncer colorretal.

Todas as formulações apresentaram alta estabilidade (superior a 80 dias), baixa polidispersidade e elevado potencial zeta negativo, entretanto as NPs obtidas por emulsão simples apresentaram um desempenho inferior, com menor valor de PDI e potencial zeta, enquanto aquelas sintetizadas por emulsão dupla apresentaram os melhores resultados, com potencial zeta em torno de -30 mV. A morfologia das NPs obtidas por dupla emulsão apresentou formato esférico e uniforme. Enquanto, as NPs sintetizadas por nanoprecipitação mostraram irregularidades na forma, enquanto as produzidas por emulsão simples exibiram aglomeração e ampla variação de tamanhos; nesse contexto, tais características mostram o desempenho de cada uma delas como sistemas carreadores, então é possível inferir que a melhor escolha é a nanopartículas por dupla emulsão.

Como o quimioterápico empregado, 5-FU, é um fármaco hidrofílico optou-se por seguir os demais ensaios de caracterização (FTIR, perfil de liberação, eficiência de encapsulamento e ensaios *in vitro*) com as nanopartículas sintetizadas por dupla emulsão. Uma vez que, pelo descrito na literatura, fármacos hidrossolúveis apresentam maior eficiência quando a técnica de dupla emulsão é aplicada, pois a presença de duas regiões aquosas facilita o encapsulamento e evita a rápida difusão do fármaco para a fase externa.

A análise por FTIR confirmou a manutenção dos grupos funcionais do polímero após a incorporação do fármaco, demonstrando a preservação da estrutura química do carreador.

Na metodologia avaliada, foi alcançada uma alta eficiência de encapsulamento (71,4%) e o perfil de liberação demonstrou que, enquanto o fármaco livre foi totalmente liberado em 8h, o sistema NPD_5FU promoveu liberação sustentada (~30% em 124 h), indicando o potencial de uma liberação controlada e mais eficiente, o que contribui para a redução de efeitos colaterais adversos do 5-FU.

Pelos ensaios biológicos com células CACO-2, é possível inferir que as nanopartículas brancas não apresentaram citotoxicidade, enquanto as NPD_5FU

reduziram a viabilidade celular de forma mais lenta e controlada em comparação ao 5-FU livre, evidenciando o efeito da liberação sustentada do fármaco. Já na análise por microscopia confocal, foi observado a internalização das nanopartículas, demonstrando sua capacidade de penetração e interação celular.

Conclui-se que a estratégia de síntese proposta foi bem-sucedida, indicando que nanopartículas de PLGA carregadas com 5-FU podem representar uma alternativa promissora para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada no tratamento do câncer colorretal.

REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. Colorectal cancer facts & figures 2020–2022. Atlanta: American Cancer Society, 2020.

ASTETE, C. E.; SABLIOV, C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 17, n. 3, p. 247–289, 2006.

BENSON, A. B. Epidemiology, disease progression and economic burden of colorectal cancer. *Journal of Managed Care Pharmacy*, v. 13, n. 6, p. 5–8, 2007.

BILLER, L. H.; SCHRAG, D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *JAMA*, v. 325, n. 7, p. 669–685, 2021.

CARTIERA, M. S. et al. The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials*, v. 30, n. 14, p. 2790–2798, 2009.

CARVALHO SILVA, R. et al. Influence of nanostructure composition on its morphometric characterization by different techniques. *Microscopy Research and Technique*, v. 77, n. 9, p. 691–696, 2014.

CHANDRAN, S. P. et al. Nano drug delivery strategy of 5-fluorouracil for the treatment of colorectal cancer. *Journal of Cancer Research and Practice*, v. 4, n. 2, p. 45–48, 2017.

CHU, L. et al. Nose-to-brain delivery of temozolomide-loaded PLGA nanoparticles functionalized with anti-Epha3 for glioblastoma targeting. *Drug Delivery*, v. 25, n. 1, p. 1634–1641, 2018.

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

ENTEZAR-ALMAHDI, E. et al. Recent advances in designing 5-fluorouracil delivery systems: a stepping stone in the safe treatment of colorectal cancer. *International Journal of Nanomedicine*, v. 15, p. 5445–5458, 2020.

FERREIRA, N. N. et al. Nose-to-brain delivery of biomimetic nanoparticles for glioblastoma targeted therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 17, n. 1, p. 484–499, 2024.

FORD VERSYPT, A. N.; PACK, D. W.; BRAATZ, R. D. Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres – a review. *Journal of Controlled Release*, v. 165, p. 29–37, 2013.

GUIMARÃES, P. P. G. et al. Development of sulfadiazine-decorated PLGA nanoparticles loaded with 5-fluorouracil and cell viability. *Molecules*, v. 20, p. 879–899, 2015.

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, p. 89–96, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br>. Acesso em: 06 jul. 2025.

KHALEDI, S. et al. Preparation and characterization of PLGA–PEG–PLGA polymeric nanoparticles for co-delivery of 5-fluorouracil and chrysin. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 31, n. 9, p. 1107–1126, 2020.

LECH, G. et al. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: recent therapeutic advances. *World Journal of Gastroenterology*, v. 22, p. 1745–1755, 2016.

LONGLEY, D. B.; Harkin, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3 (5), 330–338.

LOVE, R. R. et al. Side effects and emotional distress during cancer chemotherapy. *Cancer*, v. 63, n. 3, p. 604–612, 1989.

MENDES, L. P. Sistemas nanoestruturados multicompartimentais para coencapsulamento e liberação controlada de paclitaxel e genisteína: desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antitumoral in vivo. 2012.

NAIR, K.; LEKHA, A.; NAIR, S. Biological evaluation of 5-fluorouracil nanoparticles for cancer chemotherapy and its dependence on the carrier, PLGA. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, p. 1685–1697, 2011.

ÖCAL, H.; KARAKUZU, O.; DUMAN, M. 5-fluorouracil-loaded PLA/PLGA PEG–PPG–PEG polymeric nanoparticles: formulation, in vitro characterization and cell culture studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 40, n. 4, p. 560–567, 2014.

PANDEY, A. N.; RAJPOOT, K.; JAIN, S. K. Using 5-fluorouracil-encored PLGA nanoparticles for the treatment of colorectal cancer: the in-vitro characterization and cytotoxicity studies. *Nanomedicine Journal*, v. 7, p. 211–224, 2020.

PANIGRAHI, D.; SAHU, P. K.; SWAIN, S.; VERMA, R. K. Quality by design prospects of pharmaceuticals application of double emulsion method for PLGA loaded nanoparticles. *SN Applied Sciences*, v. 3, n. 6, p. 638, 2021.

PATEL, D. M.; JANI, R. H.; PATEL, C. N. Design and evaluation of colon targeted modified Pulsincap delivery of 5-fluorouracil according to circadian rhythm. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, v. 1, n. 3, p. 172–178, 2011.

PERES, L. B. et al. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 136, p. 928–935, 2016.

POMPEU, L. D. et al. Evaluation of stability of aqueous dispersions using zeta potential data. *Disciplinarum Scientia. Série: Naturais e Tecnológicas*, v. 19, n. 3, p. 381–388, 2018.

PORTELA, A. et al. Highly sensitive SERS analysis of the cyclic Arg-Gly-Asp peptide ligands of cells using nanogap antennas. *Journal of Biophotonics*, v. 10, p. 294–302, 2016.

QURESHI, O.; NAQVI, S.; SAMIM, M. Sustained release docetaxel-incorporated lipid nanoparticles with improved pharmacokinetics for oral and parenteral administration. *Journal of Microencapsulation*, v. 34, n. 3, p. 250–261, 2017.

RAHMAN, M. D. et al. Effect of chemical treatment on rice husk (RH) reinforced polyethylene (PE) composites. *BioResources*, v. 5, p. 854–869, 2010.

REZVANTALAB, S. et al. PLGA-based nanoparticles in cancer treatment. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, p. 1260, 2018.

STEWART, B.; WILD, C. P. (Ed.). *World cancer report 2014*. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2014.

SU, S. et al. Porphyrin immobilized nanographene oxide for enhanced and targeted photothermal therapy of brain cancer. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 2, p. 1357–1366, 2016.

SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAURIELLO, D. V. F. et al. Determinants of metastatic competency in colorectal cancer. *Molecular Oncology*, v. 11, n. 1, p. 97–119, 2017.

TAWFIK, E. et al. Prolonged exposure of colon cancer cells to 5-fluorouracil nanoparticles improves its anticancer activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 25, n. 2, p. 206–213, 2017.

TRYBA, A. M. et al. Surface functionalization of poly (l-lactide-co-glycolide) membranes with RGD-grafted poly (2-oxazoline) for periodontal tissue engineering. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 13, n. 1, p. 4, 2022.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. *Einstein (São Paulo)*, v. 14, n. 1, p. 99–103, 2016.

WANG, Y. et al. Targeted delivery of 5-fluorouracil to HT-29 cells using high efficient folic acid-conjugated nanoparticles. *Drug Delivery*, v. 22, n. 2, p. 191–198, 2015.

WIN, K. Y.; FENG, S. S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, v. 26, n. 15, p. 2713–2722, 2005.

WU, H. et al. Kaempferol can reverse the 5-Fu resistance of colorectal cancer cells by inhibiting PKM2-mediated glycolysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 7, p. 3544, 2022.