

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Maria Eduarda da Silva Saladine

**NANOSSISTEMAS POLIMÉRICOS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER DE
PULMÃO: O EFEITO CORONA PROTEICA**

São Carlos
2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Maria Eduarda da Silva Saladine

**NANOSSISTEMAS POLIMÉRICOS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER DE
PULMÃO: O EFEITO CORONA PROTEICA**

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

Orientadora: Dra. Ana Elisa Tognoli Leite Co-orientador:
Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo

São Carlos
2025

RESUMO

O câncer de pulmão é a principal causa de mortalidade por neoplasias, sendo a cisplatina amplamente utilizada no tratamento, apesar de sua baixa especificidade tumoral e elevada toxicidade sistêmica. Nanopartículas poliméricas de PLGA surgem como alternativa para melhorar a entrega do fármaco; contudo, em meios biológicos, interagem com proteínas, formando a corona proteica, capaz de alterar suas propriedades e efeitos biológicos. Este estudo avaliou a influência da carga superficial e do tempo de incubação na formação da corona proteica, bem como seus efeitos citotóxicos em células A549. Nanopartículas de PLGA, com e sem revestimento de quitosana, foram incubadas em meio contendo soro fetal bovino e caracterizadas quanto ao tamanho, potencial zeta, concentração proteica, morfologia e estrutura química. As nanopartículas apresentaram morfologia esférica, tamanho médio de 75 nm, potencial zeta de -18 mV e eficiência de encapsulação de 28%. A formação da corona proteica foi evidenciada pelo aumento de aproximadamente 30 nm no tamanho e pela alteração da carga superficial, sendo observada maior adsorção proteica em nanopartículas com carga positiva e maior interação proteica após 1 h de incubação. A presença da corona proteica resultou em maior viabilidade celular em comparação às nanopartículas sem corona e à cisplatina livre, embora estudos adicionais de liberação e internalização sejam necessários para esclarecer a menor citotoxicidade observada. Os resultados destacam a importância da corona proteica na modulação das interações biológicas de nanopartículas de PLGA e no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados mais seguros e eficazes para o tratamento do câncer de pulmão.

Palavras-chave: Câncer de pulmão, nanopartículas, corona proteica, cisplatina, PLGA, proteínas, carga e citotoxicidade.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Comparação da incidência (em número de casos) de tipos de câncer em homens e mulheres.....	7
Figura 2: Estrutura molecular da cisplatina.....	8
Figura 3: Mecanismo de ação da cisplatina.....	9
Figura 4: Processo de formação da corona proteica.....	11
Figura 5: Influência do tamanho da nanopartícula na formação da corona proteica.....	12
Figura 6: Derivatização da cisplatina com OPDA.....	17
Figura 7: Gráfico da curva padrão da cisplatina e equação da reta.....	18
Figura 8: Comparação gráfica do tamanho das NP_Br + e NP_Br - antes e após os períodos de incubação por análise de DLS e NTA.....	24
Figura 9: Comparação gráfica do tamanho das NP_Cis + e NP_Cis - antes e após os períodos de incubação por análise de DLS e NTA.....	24
Figura 10: Comparação gráfica da concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) em NP_Br + e NP_Br - antes e após os períodos de incubação por ensaio de BCA.....	26
Figura 11: Comparação gráfica da concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) em NP_Cis + e NP_Cis - antes e após os períodos de incubação por ensaio de BCA.....	27
Figura 12: Resultado da eletroforese de proteína (SDS-PAGE) das NP_Br- e NP_Br+.....	28
Figura 13: Resultado da eletroforese de proteína (SDS-PAGE) das NP_Cis- e NP_Cis+.....	28
Figura 14: Resultado das análises de AFM das amostras de (a) NP_Cis- antes da formação da corona proteica, (b) NP_Cis- após a formação da corona proteica, e (c) Amplitude da NP_Cis- após a formação da corona proteica.....	29
Figura 15: Resultado das análises de AFM das amostras de (a) NP_Cis- antes da formação da corona proteica, (b) NP_Cis- após a formação da corona proteica, e (c) Amplitude da NP_Cis- após a formação da corona proteica.....	30
Figura 16: Tabela de comparação de frequência e grupos funcionais presentes na análise de FTIR.	31
Figura 17: Resultado das análises de FTIR das amostras de (a) cisplatina, quitosana e nanopartículas antes da formação da corona proteica e, (b) nanopartículas após a formação da corona proteica.....	32

Figura 18: Resultado da análise de microespectroscopia Raman das amostras de cisplatina, quitosana e nanopartículas antes da formação da corona proteica.....	33
Figura 19: Resultado da análise de viabilidade celular em células A549 com NP_Br- e NP_Cis- sem corona proteica.....	34
Figura 20: Resultado da análise de viabilidade celular em células A549 com NP_Br-, NP_Br+, NP_Cis- e NP_Cis+ com corona proteica. A avaliação estatística dos dados foi feita por ANOVA e teste de Tukey	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Curva de diluição da cisplatina.....	17
Tabela 2: Comparação de tamanho e carga das nanopartículas antes e após o revestimento com quitosana.....	23
Tabela 3: Comparação do tamanho das NP_Br + e NP_Br - antes e após os períodos de incubação por análise de a) DLS e (b) NTA.....	23
Tabela 4: Comparação do tamanho das NP_Cis + e NP_Cis - antes e após os períodos de incubação por análise (a) DLS e (b) NTA.....	24
Tabela 5: Comparação da carga das NP_Br + e NP_Br - antes e após os períodos de incubação por análise de DLS.....	25
Tabela 6: Comparação da carga das NP_Cis + e NP_Cis - antes e após os períodos de incubação por análise de DLS.....	25
Tabela 7: Comparação da concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) em NP_Br + e NP_Br- antes e após os períodos de incubação por ensaio de BCA.....	26
Tabela 8: Comparação da concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) em NP_Cis + e NP_Cis - antes e após os períodos de incubação por ensaio de BCA.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
a. Câncer de pulmão.....	8
b. Tratamentos a base de platina.....	9
c. Nanotecnologia.....	10
d. Corona proteica.....	11
2. OBJETIVOS.....	15
a. Objetivos Gerais.....	15
b. Objetivos específicos.....	15
3. METODOLOGIA.....	16
a. Construção das nanopartículas.....	16
i. Síntese.....	16
ii. Revestimento com quitosana.....	16
iii. Formação da corona proteica.....	16
b. Análise da eficiência de encapsulação.....	17
i. Derivatização da cisplatina.....	17
ii. Eficiência da encapsulação do fármaco (EE%).....	19
c. Análises físico-químicas.....	19
i. Tamanho e potencial zeta.....	19
ii. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).....	20
d. Microscopia.....	20
i. Microscopia de Força atômica (AFM).....	20
e. Espectroscopia.....	20
i. Análise de Espectrofotometria de Ultravioleta (UV-VIS).....	20
ii. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	20
iii. Microespectroscopia Raman.....	21
f. Quantificação de proteínas.....	21
i. Ensaio de BCA.....	21
ii. SDS-PAGE.....	22
g. Ensaio de citotoxicidade (MTT).....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
a. Eficiência de encapsulação (EE%).....	23
b. Revestimento com quitosana.....	23
c. Caracterização físico-química antes e após formação da corona proteica.....	24
d. Quantificação de proteínas.....	26
i. Ensaio de BCA.....	26
ii. Eletroforese SDS_PAGE.....	28
e. Microscopia de Força atômica.....	30
f. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	31
g. Microespectroscopia RAMAN.....	34
h. Ensaio de citotoxicidade (MTT).....	35
5. CONCLUSÃO.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

a. Câncer de pulmão

O câncer de pulmão é um grande desafio à saúde mundial, já que é a principal causa de morte por câncer, representando um total de 12,4% dos óbitos ocasionados por neoplasias, segundo dados do GLOBOCAN 2022. Este tipo de tumor ocupa a primeira colocação no ranking mundial de incidência entre homens (15,2%) e a segunda colocação entre as mulheres (9,4%), como apresentado na **Figura 1**, sendo também o primeiro em mortalidade no contexto geral (18,7%) (Ferray et al., 2024).

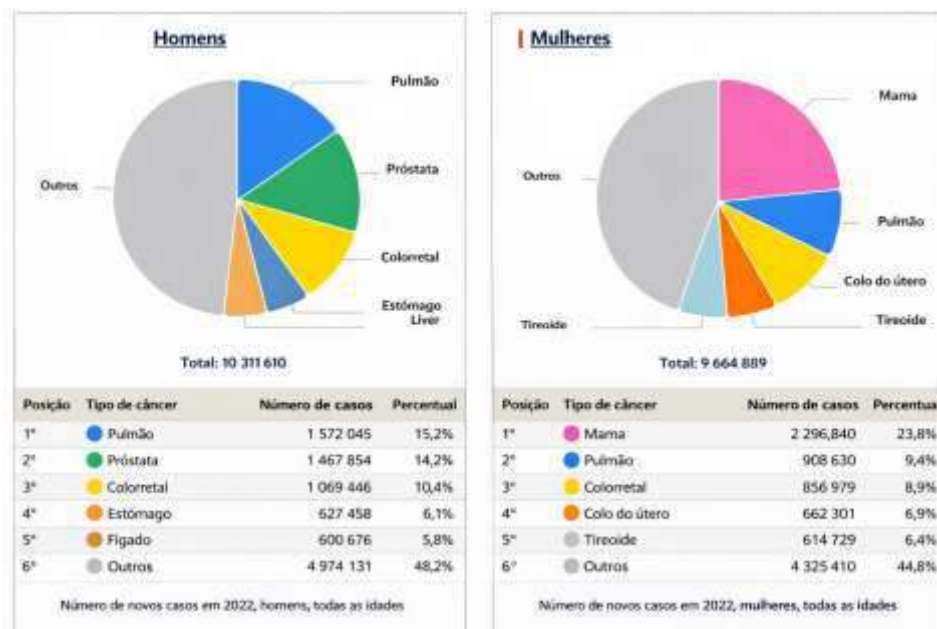


Figura 1: Comparação da incidência (em número de casos) dos tipos de câncer em homens e mulheres.
Fonte: (Ferray et al., 2024).

O câncer de pulmão é uma neoplasia que engloba o câncer pulmonar de células pequenas (*Small Cell lung cancer* – SCLC) e câncer de pulmão de células não pequenas (*Non-Small Cell Lung Cancer* - NSCLC). O segundo grupo é o de maior incidência, representando uma taxa de 85% dos tipos de câncer de pulmão. Este pode ainda ser dividido em subtipos histológicos que incluem principalmente o adenocarcinoma pulmonar (40%) e o carcinoma de células escamosas (25%) (Leiter; Veluswamy & Wisnivesky, 2023); (Li; Yan; He, 2023).

O SCLC representa aproximadamente 15% dos tumores malignos, com rápido crescimento e características metastáticas, necessitando de tratamento por quimioterapia e

radioterapia (Realli et al., 2019). Já o tratamento para NSCLC nos estágios I e II inclui a ressecção cirúrgica, juntamente a uma terapia auxiliar, enquanto nos estágios III e IV o tratamento baseia-se na quimioterapia e radioterapia (Li; Yan; He, 2023).

b. Tratamentos a base de platina

Dentre os principais tratamentos desta neoplasia do câncer de pulmão, destacam-se os fármacos a base de platina. A cisplatina é a primeira geração deste quimioterápico, apresentando efeitos terapêuticos em diversos tipos de tumores, entre eles o de mama, ovário, colorretal e de pulmão (Zhang et al., 2022). Entretanto sua inespecificidade causa efeitos também em células saudáveis, levando à uma toxicidade sistêmica. Esses fatores combinados ao desenvolvimento de resistência a este fármaco ao longo do tratamento, leva ao desenvolvimento de novos fármacos à base de platina, e também à necessidade de métodos que ainda possibilitasse o uso da cisplatina, porém reduzindo sua toxicidade (Zhang et al., 2022).

A molécula de cisplatina, ilustrada na **Figura 2**, entra na célula predominantemente por difusão passiva e após sua entrada seus grupos cloreto são substituídos por grupamentos hidroxila ou por moléculas de água, originando espécies carregadas positivamente. O processo de substituição destes grupos, também chamado de hidrólise, se deve principalmente às diferentes concentrações de íons cloreto presentes no citoplasma em comparação com o plasma sanguíneo (Teixeira, 2011).

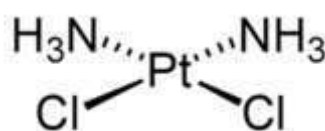


Figura 2: Estrutura molecular da cisplatina. Fonte: (Esteves, 2012).

A ação antitumoral deste fármaco se deve a sua interação com a molécula de DNA, o que induz a morte celular programada (Alderden; Hall; Hambley, 2006). Este efeito decorre da ligação preferencial da platina a um dos átomos de nitrogênio presente nas bases adenina ou guanina, sendo esta última a de maior estabilidade, pois há a possibilidade de se formar uma ponte de hidrogênio entre o oxigênio presente na guanina e grupo amina da cisplatina (Fontes; Almeida; Nader, 1997). Em consequência da ligação da cisplatina ao DNA, são formadas ligações cruzadas intrafita (quando ocorrem na mesma fita) e inter-fita (em fitas diferentes), assim altera-se a estrutura do DNA, lhe gerando danos, o que resulta na interrupção do ciclo celular e consequentemente morte celular (Zhang et al., 2022), como apresentado na **Figura 3**.

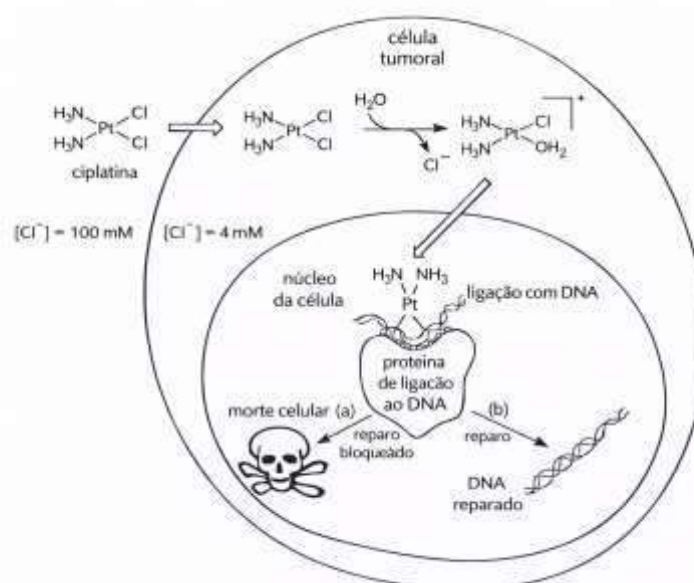


Figura 3: Mecanismo de ação da cisplatina. Fonte: (Alderden; Hall; Hambley, 2006).

Um estudo mostrou que células eucarióticas que possuem deficiência na atuação de enzimas de reparo, como ocorre em células tumorais, possuem maior sensibilidade à cisplatina em comparação com outras linhagens (Fontes; Almeida; Nader, 1997). Entretanto, embora as células tumorais apresentem maior sensibilidade à cisplatina, seus efeitos não se restringem a elas. A ativação da via apoptótica, associada aos danos celulares decorrentes do estresse oxidativo e da inflamação, afeta diversos tecidos, resultando principalmente em nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade (Yay et al., 2020).

Este processo é citado como principal mecanismo de ação da cisplatina no organismo, entretanto há também outros possíveis mecanismos que resultam na morte celular, entre eles a acidificação do citoplasma, interrupção da transcrição de RNA e inibição de proteínas oncogênicas (Zhang et al., 2022). Acredita-se ainda que os efeitos tóxicos observados com o uso da cisplatina, como a nefrotoxicidade, seja decorrente da ligação do complexo de platina com determinadas proteínas e também peptídeos, como a glutathiona, um tripeptídeo presente no meio intracelular que atua como sítio de ligação da platina (Fontes; Almeida; Nader, 1997).

c. Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma área que tem revolucionado o tratamento de neoplasias, possibilitando liberação e entrega controlada de moléculas em seu sítio de ação, assim diminuindo os efeitos adversos causados às células não tumorais (Melo et al., 2020). Um estudo

mostrou que terapias para o câncer de pulmão também foram beneficiadas por esta área, de forma que a utilização da cisplatina quando associada a nanopartículas apresentou elevada atividade antitumoral, redução dos efeitos citotóxicos em células não tumorais, maior controle de liberação do fármaco, além do aumento a seletividade da célula tumoral (Borges, 2021).

A síntese das nanopartículas pode ocorrer por diferentes métodos e diferentes materiais como metais, cerâmicas, lipídeos e polímeros, como o PLGA, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (Harish et al., 2022). Dentre os métodos utilizados, a nanoprecipitação, se baseia na adição de dois solventes miscíveis entre si, no qual o polímero utilizado e fármaco se dissolvem em apenas um desses solventes, o que resulta na formação de nanopartículas por separação de fases (Yadav; Sawant, 2010).

O princípio desta técnica se deve a formação de núcleos de pequenos agregados de moléculas que em seguida também se aglomeram até que seja alcançada a estabilidade coloidal, assim formando preferencialmente nanopartículas esféricas. Dentre as vantagens deste método, a possibilidade de gerar mudanças no tamanho e forma das partículas por alterações de concentração, técnica de preparação e solvente/ não solvente tornam esta técnica bastante atrativa (Schubert; Delaney; Schubert, 2011). Para a síntese de nanopartículas poliméricas, é comumente utilizado o PLGA, o qual já possui aprovação pela FDA (Food and Drug Administration) nos EUA e é degradado no organismo em produtos não tóxicos. Atualmente diversos trabalhos utilizam este polímero com o objetivo de realizar a entrega controlada de fármaco, dentre os tipos de PLGA disponíveis para esta aplicação, o PLGA 50:50 é o que possui uma biodegradação mais rápida (Alshetaili, 2021). Na síntese de nanopartículas geralmente está presente também um surfactante como o PVA (Álcool Polivinílico), utilizado com objetivo de se aumentar a estabilidade coloidal do sistema e diminuir a tensão superficial das nanopartículas, evitando sua agregação (Shkodra et al., 2019)

d. Corona proteica

As nanopartículas ao serem aplicadas no meio biológico são expostas à diversos fluidos como sangue e fluido linfático, nos quais estão presentes diversas biomoléculas (como proteínas, lipídios e outros metabólitos) que possuem a capacidade de se aderir à superfície das nanopartículas (Marques et al., 2023), conforme ilustrado na **Figura 4**. Essas biomoléculas adsorvidas nas nanopartículas lhe conferem uma nova identidade biológica, já que alteram suas

propriedades físico-químicas, sendo denominado esse fenômeno como corona proteica (Marques et al., 2023); (Piella; Bastús; Puentes, 2017).

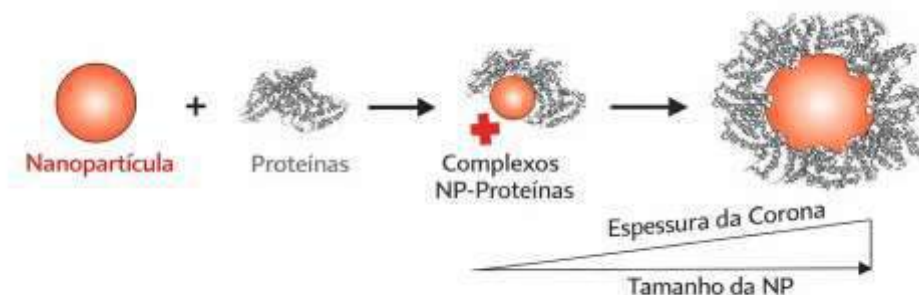


Figura 4: Processo de formação da corona proteica. Fonte: (Piella; Bastús; Puentes, 2017).

A composição da corona proteica influencia no comportamento da nanopartícula, assim alterando o tempo de retenção destas na circulação sanguínea (Marques et al., 2023). Um estudo realizado mostrou que opsoninas, como fatores do sistema complemento e imunoglobulinas (responsáveis por mediar a ligação das nanopartículas à macrófagos e fagócitos) aumentam a eliminação dessas nanopartículas do organismo, ou seja, estão relacionadas com um menor tempo de circulação. Já algumas proteínas como a albumina (uma glicoproteína rica em histidina, clusterina, Apo J, Apo A4 e Apo C3) age como disopsonina, assim prolongando o tempo de circulação das nanopartículas na corrente sanguínea (Marques et al., 2023).

A adsorção das proteínas é capaz de alterar também o processo de direcionamento de nanopartículas, uma propriedade explorada no contexto de entrega de fármacos (Bilardo et al., 2022), além de influenciar também nanotoxicidade de uma partícula (Franqui et al., 2019). Dentre as propriedades que direcionam a formação da corona proteica, está a carga superficial da nanopartícula (Bilardo et al., 2022). Foi demonstrado em um estudo que nanopartículas poliméricas (do tipo nanocápsulas) na presença de soro fetal bovino, apresentam maior adsorção de proteínas quando apresentam carga positiva em comparação com carga negativa. Tal fenômeno decorre das interações eletrostáticas entre as nanopartículas e proteínas plasmáticas, que em geral possuem uma carga negativa (Bilardo et al., 2022).

O tamanho da nanopartícula também é um fator decisivo no processo de formação da corona proteica, visto que partículas menores apresentam uma superfície mais curva, o que as torna menos acessíveis para as proteínas em função de efeitos estéricos (Bilardo et al., 2022), conforme apresentado na **Figura 5**.



Figura 5: Influência do tamanho da nanopartícula na formação da corona proteica. Fonte: (Bilardo et al., 2022).

Durante a formação da corona proteica, são formadas camadas de biomoléculas sobre a superfície das nanopartículas, estas que podem ser classificadas como corona dura e macia (Chakraborty et al., 2020). A corona dura possui uma maior adesão das proteínas à nanopartícula, as quais estão associadas por interações eletrostáticas, de Van Der Waals e também interações hidrofóbicas, com baixa constante de dissociação da nanopartícula. A corona macia por sua vez, possui uma menor adesão à nanopartícula, já que estão associadas indiretamente apenas pela interação proteína-proteína, com alta constante de dissociação (Chakraborty et al., 2020).

O tempo de exposição da nanopartícula às biomoléculas que formam a corona proteica também gera influência na dinâmica de formação da corona proteica, que pode ser explicado pelo “Efeito Vroman”, o qual em um sistema multiproteico complexo, ocorre inicialmente a adsorção de proteínas de alta mobilidade e baixo peso molecular à superfície da nanopartícula. Com o passar do tempo, estas proteínas são substituídas por proteínas mais estáveis e de menor mobilidade, as quais possuem maior afinidade de ligação à nanopartícula (Chakraborty et al., 2020); (Nienhaus; Nienhaus, 2019).

Nesse sentido, o presente trabalho baseia-se na utilização do método de nanoprecipitação para síntese de nanopartículas poliméricas encapsuladas com a quimioterápico cisplatina, como potencial tratamento para o câncer de pulmão, visando uma entrega mais controlada do fármaco. O polímero escolhido para compor o sistema nanoestruturado foi o PLGA, um poliéster biodegradável já empregado na construção de sistemas para entrega de fármacos. O principal objetivo do trabalho foi verificar a influência da formação da corona proteica neste sistema nanoestruturado. Para tal, foram analisados fatores: a influência da carga na formação da corona proteica; A influência do tempo de incubação da

nanopartícula em meio suplementado com soro fetal bovino (FBS) adsorção das proteínas; A influência da corona proteica na citotoxicidade da nanopartícula.

2. OBJETIVOS

a. Objetivos Gerais

Analisar a influência da corona proteica em nanopartículas de PLGA encapsuladas com cisplatina coo potencial tratamento do câncer de pulmão.

b. Objetivos específicos

- i. Realizar a síntese de nanopartículas de PLGA branca (NP_Br) e com fármaco cisplatina (NP_Cis);
- ii. Verificar a estabilidade das nanopartículas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e calcular a eficiência de encapsulação da cisplatina por espectrofotometria de ultravioleta (UV-Vis);
- iii. Revestir amostras de síntese de NP_Br e NP_Cis com quitosana para obtenção de nanopartículas com carga positiva;
- iv. Incubar as nanopartículas em meio DMEM suplementado com 10% FBS em diferentes tempos (1h, 2h, 3h, 6h, 8h, 24h e 48h) para formação da corona proteica;
- v. Analisar o tamanho e carga das nanopartículas antes e após a formação da corona proteica por espalhamento de luz dinâmico;
- vi. Analisar o tamanho e concentração das nanopartículas antes e após a formação da corona proteica por Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA);
- vii. Analisar a morfologia das nanopartículas antes e depois da formação da corona proteica;
- viii. Analisar a composição química e estrutural da nanopartícula com e sem a corona proteica por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Microespectroscopia Raman;
- ix. Quantificar as proteínas que compõem a corona proteica presente nas nanopartículas por ensaio de BCA e SDS-PAGE;
- x. Verificar e comparar a citotoxicidade das nanopartículas antes e depois da formação da corona proteica.

3. METODOLOGIA

a. Construção das nanopartículas

i. Síntese

As nanopartículas carregadas com cisplatina (NP PLGA_Cis) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação baseando-se no método de DomínguezRíos (Dominguez-Rios et al., 2019). Resumidamente, 14 mg de poli(ácido láctico-coácido glicólico) (PLGA 50:50 - Evonik) foram dissolvidos em 1,5 mL de DMF (Dimetilformamida - Synth) por agitação em vortex. Em seguida, 10,5 mg de cisplatina (Sigma-Aldrich) foram adicionados à solução de PLGA. Esta solução orgânica foi adicionada a 10 mL de PVA (Álcool polivinílico - Sigma-Aldrich) previamente dissolvido em água Milli-Q (1% p/v) e agitada moderadamente por dez minutos à temperatura ambiente. Os excessos de DMF e PVA foram removidos por ultracentrifugação à 35.000 rpm (Thermo Sorvall Legend X1R), na temperatura de 4°C, por 30 minutos e o pellet formado foi diluído em água Milli-Q totalizando 1 mL de amostra. O sobrenadante foi armazenado para verificação da eficiência de encapsulação. Para a síntese da nanopartícula branca (NP_Br), a mesma metodologia foi utilizada, porém dispensando a adição da cisplatina durante a preparação da amostra.

ii. Revestimento com quitosana

Afim de obter nanopartículas com carga positiva, o PLGA foi recoberto com quitosana, a partir de 1 mL de síntese sob agitação magnética em eppendorf. Nesta amostra foi adicionada uma solução aquosa de 0,5mL de quitosana na concentração de 1mg/mL. Após a adição, a solução continuou em agitação magnética por 15 minutos e em seguida foi transferida para um tubo amicon de 10 kDa e levado a uma centrífuga à 5.000 rpm em intervalos de 15 minutos até a passagem de todo o sobrenadante pela membrana. Após isso, a amostra retida na membrana foi diluída em água Milli-Q, totalizando um volume de 1mL.

iii. Formação da corona proteica

Para análise do efeito corona, ambas as nanopartículas (branca e com fármaco) foram incubadas na proporção de 1:10 em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium adquirido da Vitrocell) suplementado em 10% com FBS em sete diferentes tempos (1h, 2h, 3h, 6h, 8h, 24h e 48h), à temperatura de 37°C (para simulação da temperatura corporal) e agitação de 200 rpm para impedir precipitação das nanopartículas.

Após os respectivos tempos de incubação, as amostras foram armazenadas à 4°C. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos para lavagens das proteínas livres que permanecem diluídas no meio. As nanopartículas com proteínas agregadas foram então diluídas em 500 µL de água Milli-Q com auxílio do vórtex e banho de ultra-som.

Para avaliar o efeito de formação da corona proteica em diferentes tempos de incubação das nanopartículas, foram feitas análises que buscavam avaliar principalmente a diferença no tamanho, carga e composição das nanopartículas com as proteínas plasmáticas agregadas. Para tal, as nanopartículas foram submetidas a análises físico-químicas (DLS, NTA) e análises de microscopia (AFM) e espectroscopia (FTIR, UV-VIS e Raman).

b. Análise da eficiência de encapsulação

i. Derivatização da cisplatina

A derivatização consiste na inserção de um anel aromático, proveniente do ofenilenodiamina (OPDA), na estrutura molecular da cisplatina para sua detecção em análise de espectrofotometria de ultravioleta (Mohit et al., 2013). O OPDA, ao se juntar a estrutura do fármaco, forma um composto derivatizado (**Figura 6**) capaz de ser detectado no comprimento de onda de 705 nm. Para o processo de derivatização foi utilizada uma solução de OPDA diluída em dimetilformamida (DMF) na concentração 2 mg/mL, privado de oxigênio e luz. Para a obtenção da curva de linearidade foi também preparada uma solução de cisplatina 10 µg/mL em tampão PBS pH 6,6 seguindo as diluições indicadas na Tabela 1. Foram adicionadas as duas soluções nos volumes indicados em eppendorfs de 2 mL que foram levados ao Thermo Shaker da agimaxx pelo tempo de 1h a 95°C sem agitação, após este tempo, as amostras foram retiradas do equipamento e em cada uma foi adicionado PBS em pH 6,6 e DMF nas concentrações indicadas.

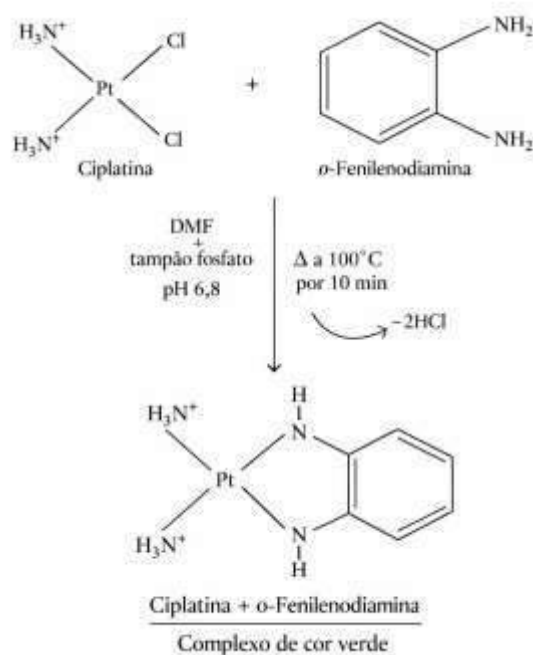


Figura 6: Derivatização da cisplatina com OPDA. Fonte: MOHIT, B. et al., 2013

Tabela 1: Curva de diluição da cisplatina.

Curva de diluição da cisplatina				
Concentração de cisplatina (µg/mL)	Cisplatina 10 µg/mL (µL)	OPDA 2 mg/mL (µL)	PBS pH 6,6 (µL)	DMF (µL)
0,2	40	200	460	1300
0,4	80	200	420	1300
0,8	160	200	440	1200
1,0	200	200	400	1200
1,2	240	200	460	1100
1,6	320	200	480	1000
2,0	400	200	400	1000

Além das amostras da curva de linearidade, foi preparado também o controle da curva, formado por 200 µL da solução de OPDA, 800 µL de PBS e 1 mL de DMF e a solução de derivatização da nanopartícula sintetizada, foi formada por 5 µL do sobrenadante solubilizado em DMF, 200 µL da solução de OPDA, 795 µL de PBS e 1 mL de DMF. A amostra destinada à derivatização do sobrenadante, assim como as amostras da curva, foi mantida no thermo shaker por 1h à 95 °C após a adição dos dois primeiros reagentes. Os dois últimos compostos foram adicionados somente após esse período. O controle, por sua vez, não passou pelo aquecimento, sendo apenas preparado pela adição direta dos reagentes. As amostras finais foram armazenadas em temperatura ambiente e privadas de luz por no máximo dois dias até a análise por UV-VIS.

ii. Eficiência da encapsulação do fármaco (EE%)

Para comprovação da eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas, a porcentagem de fármaco encapsulado na partícula foi avaliada pelo método indireto, no qual é feita análise em espectrofotômetro de ultravioleta do sobrenadante da síntese após a derivatização e a EE% das nanopartículas é calculada conforme a Equação 1.

Com os valores de absorbância das diferentes concentrações de cisplatina obteve-se a equação da reta (**Figura 7**). Para o cálculo indireto (análise pelo sobrenadante), foi utilizada a Equação 1 onde o fator “Concentração total de cisplatina” refere-se à concentração inicial de cisplatina na síntese (0,913 mg/mL).



Figura 7: Gráfico da curva padrão da cisplatina e equação da reta.

$$EE(\%) = \frac{\text{concentração total de cisplatina} - \text{concentração de cisplatina no sobrenadante}}{\text{Concentração total de cisplatina}} \times 100$$

Equação 1: Equação para cálculo da eficiência de encapsulação (EE%).

c. Análises físico-químicas

i. Tamanho e potencial zeta

As medidas do diâmetro hidrodinâmico assim como do potencial zeta foram realizadas em um Zetasizer Malvern em cubeta de poliestireno para medidas de tamanho e cubeta de capilar dobrável para análise do potencial zeta. Para as análises apenas das nanopartículas se utilizou a diluição aquosa de 1:100, já nas análises da nanopartícula com a corona proteica aderida à sua superfície utilizou-se uma diluição aquosa de 2:10, em ambas totalizando 1 mL de solução, sendo executadas três análises das quais obteve-se a média como resultado.

ii. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A análise de rastreamento de nanopartículas foi realizada no equipamento NTA NanoSight300 (Malvern), as nanopartículas sem corona proteica aderida foram diluídas em água Milli-Q na proporção de 1:1000 μL , enquanto que aquelas com corona proteica aderida utilizaram uma diluição de 30:1000 μL , ambas totalizando 1 mL de amostra que foi inserida no aparelho por meio de uma seringa de 1 mL. Antes da passagem da amostra, o equipamento passou pelo procedimento de limpeza recomendado utilizando-se água Milli-Q filtrada (em filtro micropore de 0,22 μm) e isopropanol 4%. O equipamento foi configurado para realizar três capturas durante 60 segundos, o limiar de detecção utilizado foi de 20 a 80 partículas por frame com uma detecção de no máximo quatro ruídos por frame.

d. Microscopia

i. Microscopia de Força atômica (AFM)

A amostra foi preparada com a adição de 10 μL da síntese da nanopartícula (em diluição aquosa de 1000 vezes) sobre uma lâmina de silício seguido de secagem em estufa a 40°C e em seguida armazenada a temperatura ambiente. O equipamento utilizado foi o microscópio de força atômica Nanosurf FlexAFM e para as análises foram feitas varreduras de reconhecimento com resolução de 256 px, com aumento de 10 μm e 5 μm . As imagens obtidas foram tratadas pelo programa “Gwyddion”.

e. Espectroscopia

i. Análise de Espectrofotometria de Ultravioleta (UV-VIS)

A análise de espectrofotometria de ultravioleta foi realizada no aparelho HITACHI U-2900 Spectrophotometer sendo realizada a análise nos comprimentos de onda de 800 nm a 500 nm. Foi utilizada uma cubeta de quartzo lavada com álcool 70% e água destilada antes da aplicação das amostras, sendo a cubeta lavada com água destilada no intervalo entre as medidas. Cada amostra foi analisada em quadruplicata para obtenção de uma média de absorbância utilizada para o cálculo da eficiência de encapsulação.

ii. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Para análise das amostras por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizado o equipamento Cary 630 FTIR - Agilent Technologies. As amostras de nanopartículas foram analisadas sem diluição e utilizando-se 3 μL de cada amostra. Foram

analisadas também amostras de cisplatina 1 mg/mL e quitosana 1 mg/mL, sendo a primeira diluída em DMF e a última diluída em água Milli-Q. Os dados obtidos foram tratados pelo software Origin.

iii. Microespectroscopia Raman

Para análise das nanopartículas por espectroscopia Raman, foi utilizado o equipamento RENISHAW inVia Raman Microscope, as medidas da amostra de quitosana foram realizadas com os seguintes parâmetros: 600 a 3200 cm^{-1} , laser de 532nm, 50% de potência do laser, tempo de incidência do laser de 10 segundos e 10 acumulações, já as demais amostras seguiram os mesmos parâmetros, exceto potência de 100% de potência do laser e utilização de 5 acumulações.

As amostras de nanopartículas foram analisadas sem diluição, sendo depositadas sobre uma placa de silício utilizando-se um volume de 10 μL e levadas para estufa a 40°C para secagem das amostras, este processo foi repetido quatro vezes para cada amostra. Foram analisadas também amostras de cisplatina 1 mg/mL e quitosana 1 mg/mL, sendo a primeira diluída em DMF e a última diluída em água Milli-Q. Os dados obtidos foram tratados pelo software Origin.

f. Quantificação de proteínas

i. Ensaio de BCA

Para quantificação das proteínas aderidas à nanopartícula que formam a corona proteica, foi realizado o ensaio de BCA (ácido bicinconínico), para tal, foi utilizado o “BCA Protein Assay Kit” adquirido da Thermo Scientific (Ref: 23225). Inicialmente foi feita uma curva de calibração com diferentes concentrações de BSA (Bovine Serum Albumin) em PBS, após isso foi preparada a solução reveladora contendo os reagentes B e A (disponibilizados pelo kit) na proporção de 1:50 respectivamente. Tanto a curva de calibração, quanto às amostras a serem analisadas foram depositadas em uma placa de 96 poços, de forma a serem adicionados 25 μL da amostra/curva de calibração e 200 μL do revelador, após isso, a placa foi deixada em descanso por 30 minutos, protegida de luz à 37°C para ocorrência da reação colorimétrica seguido pela análise no comprimento de luz de 652 nm. Para o cálculo da concentração de proteínas presentes, em cada amostra houve o desconto da absorbância encontrada no controle (formado apenas pela nanopartícula desprovida da corona e o revelador). Os testes foram realizados em triplicata de forma que, em cada um, foi preparada uma nova curva de calibração.

ii. SDS-PAGE

Para análise qualitativa das proteínas presentes na corona, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida, de forma que os géis de corrida e empilhamento foram preparados com SDS (dodecilsulfato de sódio) 10%. As amostras foram coradas com azul de Coomassie e levadas à temperatura de 100°C por 5 minutos antes de sua aplicação no gel. Para esta análise foi utilizado o gel contendo 15 poços, nos quais foram aplicados 10 µL de amostra e a mesma quantidade do marcador de peso molecular (Thermo Scientific - Ref: 26610). O gel foi descorado em água. As imagens do gel foram obtidas com o aplicativo de celular “CamScanner”.

g. Ensaio de citotoxicidade (MTT)

Células A549 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂. Para o ensaio de MTT, 1×10^4 células foram semeadas por poço em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão. Em seguida, as células foram tratadas com NP_Br⁺, NP_Br⁻, NP_Cis⁺ e NP_Cis⁻ (com formação da corona proteica e sem), nas concentrações de 50 a 500 µg/mL, por 24 h e 48 h. Após cada tempo de incubação, foi adicionado MTT (0,5 mg/mL) e as células foram incubadas por 1 h. O formazan formado foi dissolvido em DMSO e a absorbância foi medida a 570 nm em leitor de microplacas. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao controle sem tratamento. Os gráficos de viabilidade celular foram feitos pelo software Graphpad Prism.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

a. Eficiência de encapsulação (EE%)

Após a síntese das amostras de NP_Cis, o sobrenadante da síntese após a lavagem das nanopartículas por ultracentrifugação foi derivatizado e a absorbância daquela amostra no comprimento de onda de 705 nm foi verificada.

Inicialmente foi calculada a média das absorbâncias (analisadas com quatro réplicas), resultando em uma absorbância de 0,50575, a qual foi inserida na equação da reta descrita na **Figura 7**.

$$y = 0,3009 x + 0,015$$

$$0,50575 = 0,3009 x + 0,015$$

$$x = 1,63 \mu g$$

$$x = 0,00163 mg$$

O resultado desta equação é a concentração de cisplatina no sobrenadante, valor este que deve ser multiplicado pelo fator de diluição e inserido na **Equação 1**. A concentração total de cisplatina (0,913 mg/mL) corresponde a massa de cisplatina no volume total da solução preparada durante a síntese.

$$EE(\%) = \frac{\text{concentração total de cisplatina} - \text{concentração de cisplatina no sobrenadante}}{\text{Concentração total de cisplatina}} \times 100$$

$$EE(\%) = \frac{0,913 - (0,00163 \times 400)}{0,913} \times 100$$

$$EE(\%) = 28\%$$

Tal análise foi ainda realizada em triplicata, resultando em uma média de 28% de encapsulação da cisplatina na nanopartícula.

b. Revestimento com quitosana

Para análise da influência da carga superficial da nanopartícula na formação da corona proteica, foi necessário que a nanopartícula de PLGA, que possui uma carga negativa, fosse recoberta com algum material que tornasse sua carga positiva, sendo também compatível com sua superfície negativa que impede sua propriedade mucoadesiva, consequentemente diminuindo a disponibilidade do fármaco (Alshetali, 2021).

A quitosana é um polissacarídeo produzido por meio da desacetilação da quitina e foi escolhida para o revestimento do PLGA no presente trabalho. Tal torna sua carga superficial positiva, assim permitindo o aumento da mucoadesão e captação celular (Alshetali, 2021).

Foram analisadas por DLS as nanopartículas de PLGA branca e com cisplatina, antes e após seu revestimento com quitosana com objetivo de se analisar a diferença em seu tamanho e potencial zeta, o resultado pode ser visualizado na **Tabela 2**.

Tabela 2: Comparação de tamanho e carga das nanopartículas antes e após o revestimento com quitosana.

	Antes do revestimento com quitosana		Após o revestimento com quitosana	
	NP_Br	NP_Cis	NP_Br	NP_Cis
Tamanho (nm)	71,27 ± 1,24	76,73 ± 15,16	97,52 ± 18,59	106,925 ± 17,36
Carga (mV)	-18,05 ± 2,97	-17,24 ± 7,46	31,76 ± 14,61	37,27 ± 2,15

Os resultados da análise indicam que o revestimento das nanopartículas com quitosana ocorreu de forma desejada, pois percebe-se um certo aumento em seu tamanho e uma grande variação na carga, que após o revestimento torna-se expressivamente positiva.

c. Caracterização físico-química antes e após formação da corona proteica

A análise de tamanho das nanopartículas antes e após sua incubação em um meio multiproteico é uma forma de se observar a formação da corona proteica, analisando ainda sua variação de acordo com a carga superficial (potencial zeta) da nanopartícula. A análise de tamanho pode ser feita por diferentes métodos, neste trabalho, foram utilizados dois métodos, a medida de diâmetro hidrodinâmico por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), os resultados estão indicados nas **Tabelas 3 e 4** e nas **Figuras 8 e 9**. Neste contexto são referidas como nanopartículas positivas, aquelas revestidas com quitosana, e como nanopartículas negativas, aquelas sem esse recobrimento.

Tabela 3: Comparação do tamanho das NP_Br + e NP_Br - antes e após os períodos de incubação por análise de (a) DLS e (b) NTA.

Tamanho (nm) - DLS			Tamanho (nm) - NTA		
NP_Br	NP_Positiva	NP_Negativa	NP_Br	NP_Positiva	NP_Negativa
	95,8 ± 13,5	73,0 ± 5,5		125,3 ± 39,2	112,2 ± 22,2
1h	165,0 ± 69,0	99,3 ± 20,4	1h	187,4 ± 36,5	155,5 ± 37,6
2h	135,7 ± 38,1	98,5 ± 12,0	2h	185,9 ± 29,8	150,1 ± 45,4
3h	105,1 ± 9,8	94,1 ± 7,7	3h	174,8 ± 17,1	132,4 ± 15,8
6h	105,8 ± 2,7	96,0 ± 5,0	6h	165,3 ± 7,4	119,4 ± 16,3
8h	115,2 ± 11,3	95,5 ± 5,2	8h	133,2 ± 15,0	120,3 ± 11,3
24h	142,6 ± 49,6	97,4 ± 6,5	24h	143,7 ± 10,4	120,9 ± 13,7
48h	172,8 ± 54,2	130,8 ± 45,9	48h	138,6 ± 41,0	158,1 ± 57,6

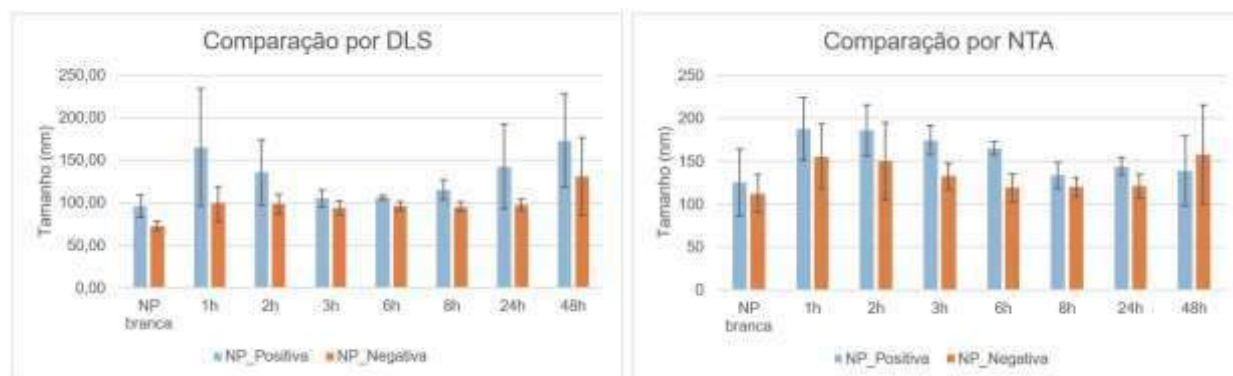


Figura 8: Comparação gráfica do tamanho das NP_Br + e NP_Br - antes e após os períodos de incubação por análise de DLS e NTA.

Tabela 4: Comparação do tamanho das NP_Cis + e NP_Cis - antes e após os períodos de incubação por análise (a) DLS e (b) NTA.

Tamanho (nm) - DLS			Tamanho (nm) - NTA		
	NP_Positiva	NP_Negativa		NP_Positiva	NP_Negativa
NP_Cis	111,9 ± 15,0	74,7 ± 6,5	NP_Cis	173,4 ± 53,6	109,1 ± 21,7
1h	137,0 ± 1,8	88,9 ± 3,1	1h	172,6 ± 7,1	110,0 ± 23,2
2h	123,4 ± 11,1	91,5 ± 4,7	2h	182,9 ± 23,5	143,9 ± 19,6
3h	135,6 ± 19,8	87,8 ± 0,9	3h	149,0 ± 32,6	114,1 ± 28,0
6h	123,2 ± 35,1	86,9 ± 4,8	6h	145,9 ± 18,8	111,5 ± 9,3
8h	96,4 ± 17,3	93,2 ± 7,2	8h	143,8 ± 19,6	120,9 ± 2,4
24h	126,8 ± 53,3	96,9 ± 9,9	24h	122,0 ± 9,4	128,0 ± 8,0
48h	116,6 ± 46,7	84,7 ± 5,8	48h	124,0 ± 39,8	108,8 ± 0,8

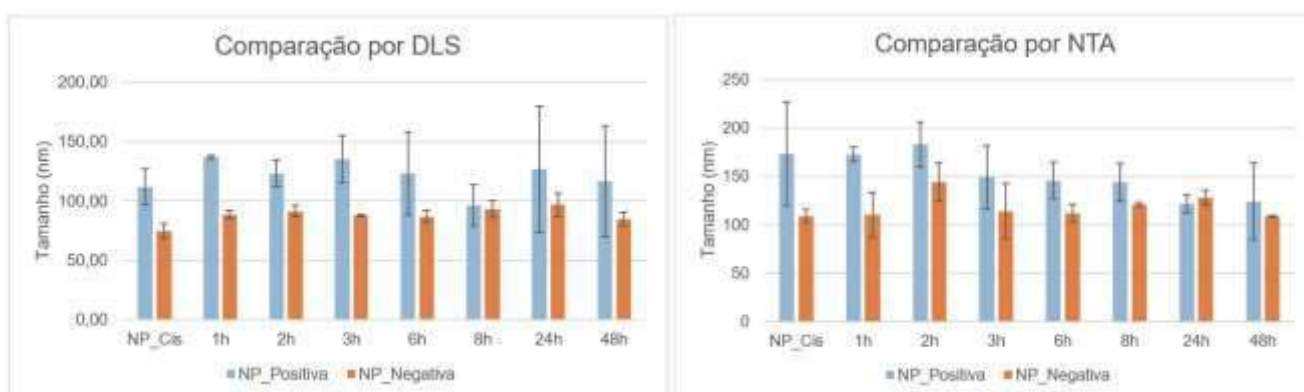


Figura 9: Comparação gráfica do tamanho das NP_Cis + e NP_Cis - antes e após os períodos de incubação por análise de DLS e NTA.

A análise apresentada acima, mostra que em todas as nanopartículas (com carga positiva ou negativa), independente do método de análise, apresentaram um aumento em seu tamanho após a incubação, assim indicando a formação da corona proteica.

Podemos observar que em ambos os métodos de análise, as nanopartículas com carga positiva apresentam um maior tamanho em praticamente todos os períodos de incubação (tanto em NP_Br, quanto em NP_Cis), indicando uma maior adsorção de proteínas em comparação às nanopartículas com carga negativa. Assim estando de acordo com dados teóricos que inferem

uma maior adsorção proteica em nanopartículas de carga positiva em função da carga geralmente negativa dessas proteínas (Bilardo et al., 2022).

Tabela 5: Comparação da carga das NP_Br + e NP_Br - antes e após os períodos de incubação por análise de DLS.

a)	Carga (mV) - DLS	
	NP_Positiva	NP_Negativa
NP_Br	29,89 ± 11,5	-18,08 ± 3,9
1h	-5,64 ± 0,4	-6,92 ± 1,5
2h	-6,91 ± 1,0	-8,41 ± 1,3
3h	-7,67 ± 0,8	-9,10 ± 1,1
6h	-8,29 ± 2,0	-9,08 ± 2,1
8h	-9,22 ± 1,7	-9,68 ± 3,4
24h	-10,97 ± 1,8	-10,17 ± 2,3
48h	-7,28 ± 2,2	-8,57 ± 1,3

Tabela 6: Comparação da carga das NP_Cis + e NP_Cis - antes e após os períodos de incubação por análise de DLS.

	Carga (mV) - DLS	
	NP_Positiva	NP_Negativa
NP_Cis	35,82 ± 1,8	-14,79 ± 7,7
1h	-7,74 ± 1,4	-10,97 ± 2,7
2h	-6,86 ± 0,9	-11,47 ± 1,9
3h	-8,05 ± 2,7	-10,17 ± 2,0
6h	-8,40 ± 2,1	-10,95 ± 1,3
8h	-8,59 ± 2,2	-10,94 ± 1,6
24h	-11,06 ± 1,1	-12,19 ± 0,8
48h	-8,98 ± 2,1	-11,93 ± 3,0

É possível perceber também que a carga das nanopartículas, especialmente com carga positiva, se altera após a incubação, como apresentado nas **Tabelas 5 e 6**. Observa-se que após a incubação (independente da variação de tempo), todas as nanopartículas (com ou sem a presença de cisplatina) apresentam uma carga negativa, o que mais uma vez corrobora a teoria apresentada por Bilardo et al., 2022, na qual é dito que as proteínas presentes no soro fetal bovino em sua maioria possuem carga negativa, o que induz uma maior adsorção em nanopartículas com carga positiva, assim justificando a grande variação de carga apresentada por essas nanopartículas antes e após a incubação.

d. Quantificação de proteínas

i. Ensaio de BCA

Além das medidas de tamanho, a concentração de proteínas também pode indicar variações na formação da corona proteica em nanopartículas, desta forma, os resultados podem ser analisados nas **Tabelas 7 e 8** e nos **Figuras 10 e 11**.

Tabela 7: Comparação da concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) em NP_Br + e NP_Br - antes e após os períodos de incubação por ensaio de BCA.

Tempo de incubação	NP Branca	
	Concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) - BCA	
	NP_Positiva	NP_Negativa
1h	94,17 $\pm$ 19,0	106,29 $\pm$ 18,2
2h	98,09 $\pm$ 51,0	85,54 $\pm$ 19,7
3h	84,18 $\pm$ 39,7	73,15 $\pm$ 7,8
6h	70,72 $\pm$ 42,2	70,08 $\pm$ 26,5
8h	72,93 $\pm$ 36,2	72,96 $\pm$ 23,8
24h	54,95 $\pm$ 30,0	52,75 $\pm$ 24,5
48h	72,18 $\pm$ 42,9	38,54 $\pm$ 29,5

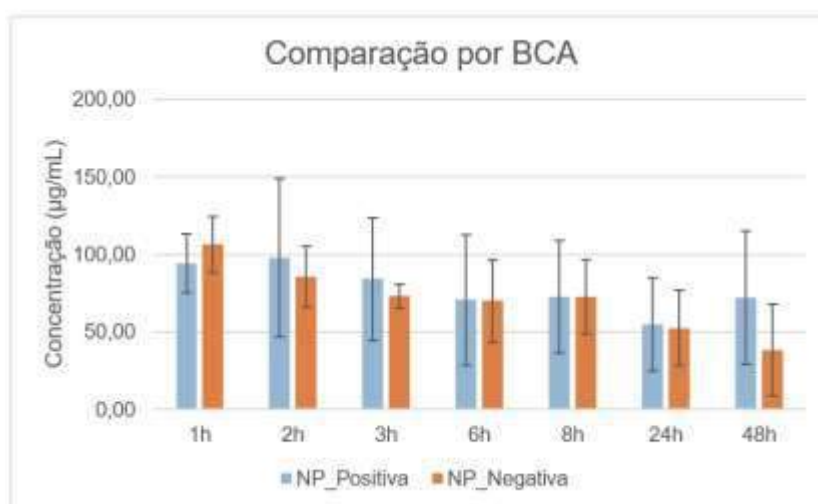


Figura 10: Comparação gráfica da concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) em NP_Br + e NP_Br - antes e após os períodos de incubação por ensaio de BCA.

Tabela 8: Comparação da concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) em NP_Cis + e NP_Cis - antes e após os períodos de incubação por ensaio de BCA.

Tempo de incubação	NP Cisplatina	
	Concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) - BCA	
	NP_Positiva	NP_Negativa
1h	102,47 $\pm$ 32,4	68,36 $\pm$ 54,9
2h	91,29 $\pm$ 52,3	71,81 $\pm$ 50,2
3h	87,21 $\pm$ 64,4	87,82 $\pm$ 64,7
6h	87,11 $\pm$ 54,3	79,71 $\pm$ 76,9
8h	87,26 $\pm$ 82,5	109,44 $\pm$ 69,4
24h	82,31 $\pm$ 55,7	72,43 $\pm$ 65,0
48h	91,51 $\pm$ 63,1	97,42 $\pm$ 72,6

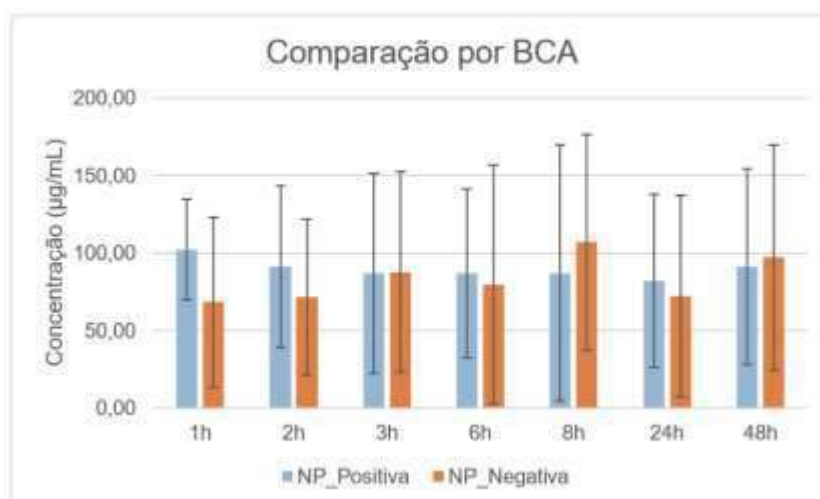


Figura 11: Comparação gráfica da concentração de proteínas (µg/mL) em NP_Cis + e NP_Cis - antes e após os períodos de incubação por ensaio de BCA.

A partir desses resultados, é possível perceber que assim como na análise por tamanho, a concentração de proteínas não é proporcional ao aumento do tempo de incubação. Nesta análise é possível observar que diferentes cargas superficiais apresentam pouca interferência na variação da concentração proteica (tanto em NP_Br, quanto em NP_Cis), já que estes dados possuem grande variação (diferente dos dados obtidos pela análise de tamanho).

Desta forma, é possível inferir que a carga da nanopartícula e seu tempo de incubação, para aquelas que carregam ou não o fármaco, não gera grande influência na concentração de proteínas, mas sim no tamanho e carga das proteínas que interagem com a nanopartícula.

ii. Eletroforese SDS_PAGE

Um segundo método utilizado na identificação da corona proteica, é a eletroforese de proteína (SDS-PAGE), que possibilita a separação de proteínas em função de seu peso molecular. Neste trabalho, esse método foi utilizado como forma de confirmar a presença da corona proteica nos diferentes tempos de incubação das NP_Br+, NP_Br, NP_Cis+ e NP_Cis-. A **Figura 12** apresenta o resultado da corrida das amostras de NP_Br, enquanto a **Figura 13** apresenta a corrida das amostras de NP_Cis.

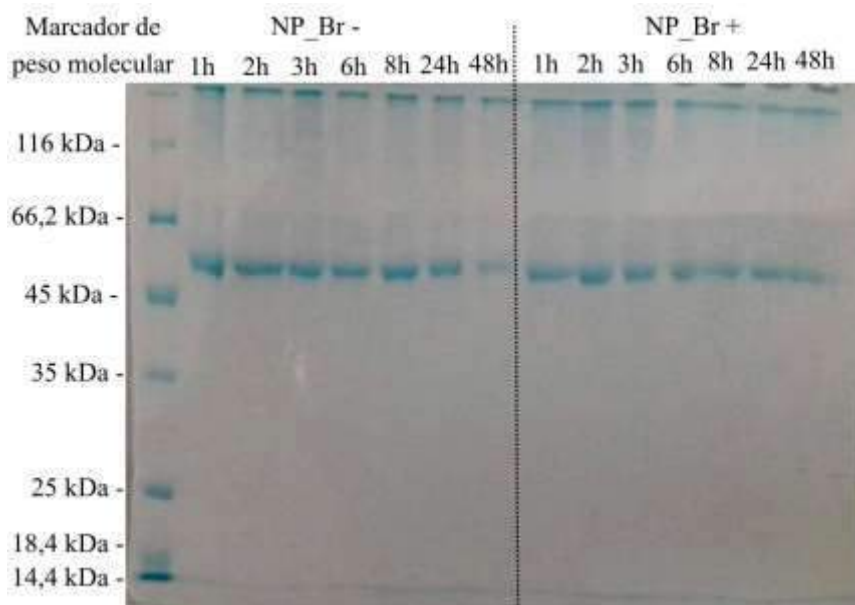


Figura 12: Resultado da eletroforese de proteína (SDS-PAGE) das NP_Br- e NP_Br+.

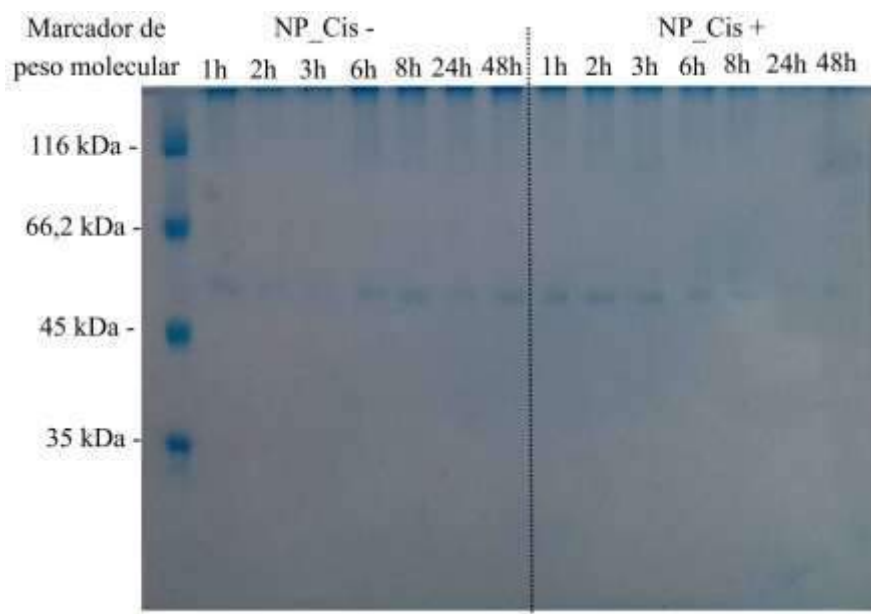


Figura 13: Resultado da eletroforese de proteína (SDS-PAGE) das NP_Cis- e NP_Cis+.

Na **Figura 12** é possível observar claramente as bandas correspondentes as proteínas que formam a corona proteica, as quais aparentam uma maior intensidade no período de incubação de 1h e decaem até o período de 48h (tanto nas NP_Br-, quanto nas NP_Br+). As bandas identificadas no gel apresentam um peso molecular entre 45 kDa e 66,2 kDa, desta forma é possível inferir que esta banda seja referente à albumina, a proteína mais abundante no plasma sanguíneo e que possui um peso molecular de aproximadamente 66,5 kDa.

Na **Figura 13**, apesar de uma maior dificuldade de visualização, ainda é possível observar a presença da formação da corona proteica nas amostras e a sua localização entre as

bandas de 66,2 e 45 kDa, assim como uma maior intensidade nas bandas das amostras referentes as nanopartículas positivas, corroborando com os resultados anteriores. As últimas bandas do marcador de peso molecular (25 kDa, 18,4 kDa e 14,4 kDa) não puderam ser observadas, acredita-se que este problema ocorreu em função do processo de coloração e descoloração do gel.

Após a realização da caracterização físico-química e de concentração proteica, foi necessário selecionado o período de incubação de 1 hora que resultou em uma maior adsorção de proteínas para realização das análises de microscopia, espectroscopia e viabilidade celular.

e. Microscopia de Força atômica

As nanopartículas contendo cisplatina (NP_Cis+ e NP_Cis-) foram analisadas por Microscopia de Força Atômica (AFM) com intuito de verificar sua morfologia comparando as mesmas antes e após a formação da corona proteica. Na **Figura 14** são apresentadas as NP_Cis- e na **Figura 15** as NP_Cis+.

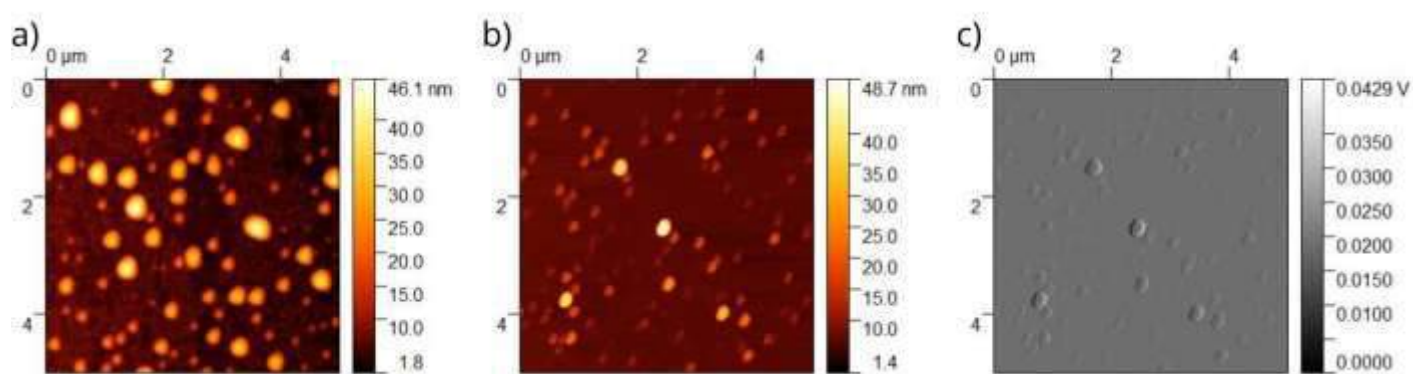


Figura 14: Resultado das análises de AFM das amostras de (a) NP_Cis- antes da formação da corona proteica, (b) NP_Cis- após a formação da corona proteica, e (c) Amplitude da NP_Cis- após a formação da corona proteica.

Ao analisarmos a **Figura 14**, podemos concluir que a nanopartícula possui um formato esférico e o mantém após a formação da corona proteica, além disso há pouca variação em seu tamanho. Como já esperado, não é possível visualizar a corona proteica, pois o material polimérico utilizado na síntese (PLGA) somado ao tamanho e morfologia das nanopartículas torna difícil sua visualização, sendo necessárias técnicas mais rebuscadas para identificação da corona proteica.

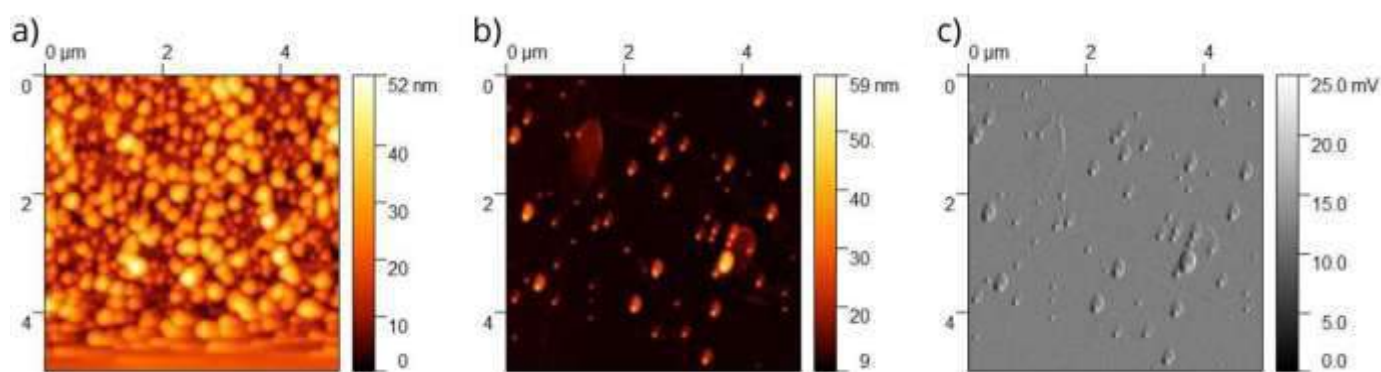


Figura 15: Resultado das análises de AFM das amostras de (a) NP_Cis- antes da formação da corona proteica, (b) NP_Cis- após a formação da corona proteica, e (c) Amplitude da NP_Cis- após a formação da corona proteica.

Analisando **Figura 15**, é possível perceber que quase não há variação da morfologia da nanopartícula antes e após a formação da corona proteica, havendo apenas uma pequena variação de seu tamanho nessas duas condições. Entretanto, diferente da imagem anterior, nesta é possível visualizarmos um ponto central na nanopartícula cercada por um revestimento, o qual podemos inferir que se refere à corona proteica. Levando em conta esta hipótese, podemos validar mais uma vez a informação de que nanopartículas com carga positiva possuem uma maior adsorção de proteínas, visto que nas NP_Cis- a corona não pôde ser identificada por esta mesma técnica.

f. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada a fim de caracterizar a composição química das amostras de nanopartículas (NP_Br+, NP_Br-, NP_Cis+ e NP_Cis-) antes e após a formação da corona proteica. A análise de amostras de quitosana e cisplatina serviram como base para comparação dos grupos funcionais presentes nas nanopartículas. Como base teórica para análise dos resultados foram utilizados os trabalhos de Pavia, et al., 2010 e De Souza, 2016, sendo uma tabela baseada no primeiro, apresentada na **Figura 16**.

Ligação	Grupo Funcional	Frequência (cm ⁻¹)
C-H	Alcanos	2850-3000
C=O	Cetonas	1705-1725
C-O	Álcoois, éteres, ésteres, ácidos carboxílicos	1000-1300
O-H	Ácidos carboxílicos e ligações de hidrogênio	3200-3400
N-H	Aminas primárias e secundárias e amidas	1550-1640 3100-3500
C-N	Aminas	1000-1350

Figura 16: Tabela de comparação de frequência e grupos funcionais presentes na análise de FTIR. Fonte: Adaptada de (Pavia, et al., 2010).

Na **Figura 17** é possível observar os resultados obtidos com a análise de FTIR. Na **Figura 17-a** observa-se o resultado da amostra das de cisplatina, quitosana e as amostras de nanopartículas antes da formação da corona proteica. As bandas destacadas entre os comprimentos de onda de 3100-3500 cm⁻¹ e 1550-1640 cm⁻¹ são condizentes às bandas de ligação N-H (grupo amina). É possível notar a banda de 3100-3500 cm⁻¹ com maior destaque no gráfico da cisplatina, já que o grupamento amina faz parte da estrutura da cisplatina, e a mesma com menor intensidade nas NP_Cis. Nas NP_Br e na quitosana há também uma banda nesta região, a qual também indica a presença de grupos O-H (com comprimento de onda de 3200-3400), mais especificamente ácidos carboxílicos e ligações de hidrogênio, os quais fazem parte da composição do PLGA (presente em todas as nanopartículas) e da quitosana.

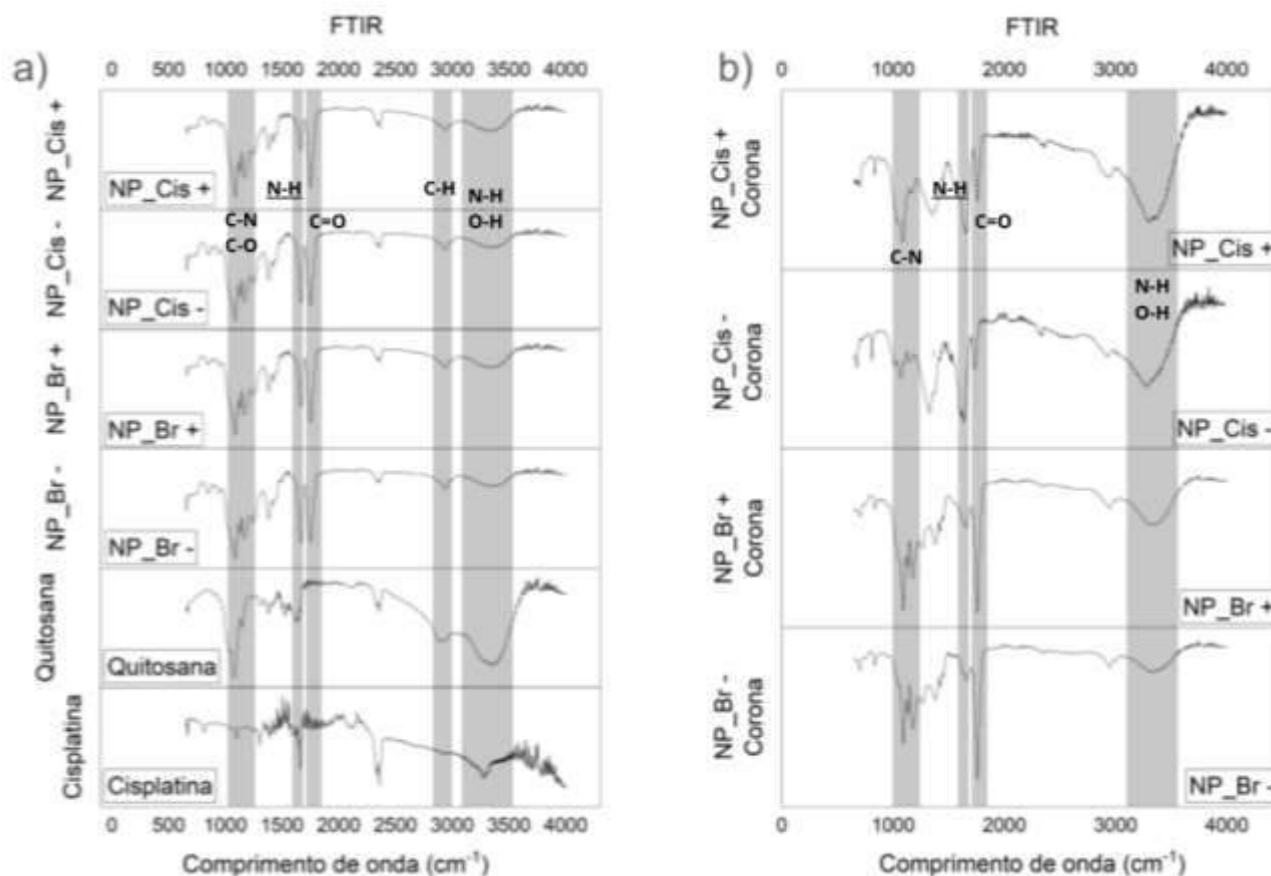


Figura 17: Resultado das análises de FTIR das amostras de (a) cisplatina, quitosana e nanopartículas antes da formação da corona proteica e, (b) nanopartículas após a formação da corona proteica.

A banda destacada mostrando a região de ligação C-N (comprimento de $1000-1350\text{ cm}^{-1}$) indica a presença de grupos amina na amostra de quitosana, porém sua detecção nas demais amostras, além daquelas que possuem quitosana em sua formulação pode ser explicada pelo fato de que as bandas desta região também estão relacionadas com a presença de ligações C-O ($1000-1300\text{ cm}^{-1}$), esta que compõem a estrutura tanto do PLGA, quanto da quitosana.

A ligação C=O indicada pelas bandas de comprimento de $1705-1725\text{ cm}^{-1}$ aparece em todas as amostras de nanopartículas, visto que na estrutura das nanopartículas compostas por PLGA, há presença da função orgânica cetona, a qual também faz parte, porém em menor número, da estrutura da quitosana. A ligação CH por sua vez foi detectada em todas as amostras (exceto na cisplatina), pois tanto a quitosana, quanto a cisplatina (que também fazem parte das demais amostras) possuem carbono em sua estrutura.

As nanopartículas após a formação da corona proteica (como apresentado na **Figura 17-b**) possuem as mesmas bandas que as nanopartículas antes da adsorção das proteínas, porém é possível perceber que algumas bandas aparecem com maior intensidade, como ocorre com as bandas das ligações C=O, C-N e C-H, o que pode ser explicado pela presença de proteínas nas amostras, que possuem em sua estrutura as funções orgânicas amina e carboxila.

g. Microespectroscopia RAMAN

As nanopartículas não revestidas com a corona proteica foram analisadas microespectroscopia Raman, assim como a cisplatina e a quitosana, porém esta análise não pôde ser repetida para as nanopartículas após a formação da corona proteica em função de problemas técnicos com o equipamento utilizado. Desta forma, esta análise foi utilizada para verificação da estrutura química das amostras de nanopartículas utilizadas neste trabalho.

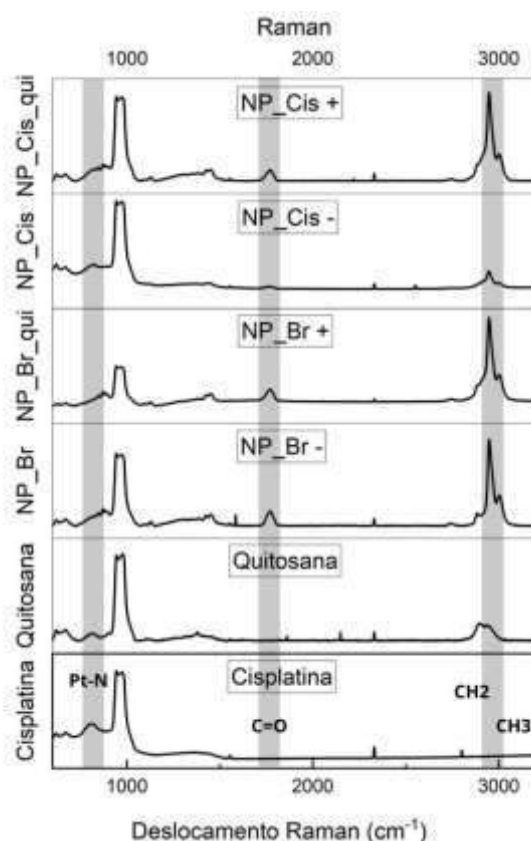


Figura 18: Resultado da análise de microespectroscopia Raman das amostras de cisplatina, quitosana e nanopartículas antes da formação da corona proteica.

A **Figura 18** apresenta o resultado obtido com a análise, na qual é possível observar de forma clara os picos nas regiões de 2947 e 2998 cm^{-1} que indicam respectivamente a presença de grupos CH_2 e CH_3 , estes que fazem parte da estrutura do PLGA, assim como da quitosana. Outra ligação presente na molécula do PLGA, é a ligação $\text{C}=\text{O}$ de grupos éster, a qual pode ser observada na região de 1760 cm^{-1} , desta forma, o pico pode ser observado apenas nas nanopartículas, pois estas possuem a molécula de PLGA em sua formulação (La Verde et al., 2022).

Já o pico observado no comprimento de onda de 505-522 cm^{-1} indica o estriamento Pt-N, ligação esta que compõem a estrutura da cisplatina, assim reforçando o aparecimento do pico com maior intensidade apenas nas nanopartículas carregadas, principalmente a NP_Cis- (Torres et al., 2018), como indicado nos espectros acima

h. Ensaio de citotoxicidade (MTT)

O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método MTT comparando as nanopartículas com e sem formação da corona proteica. As células A549 foram expostas às NP_Br e NP_Cis positivas e negativas pelo período de 24h e 48h, conforme apresentado na **Figura 19**.

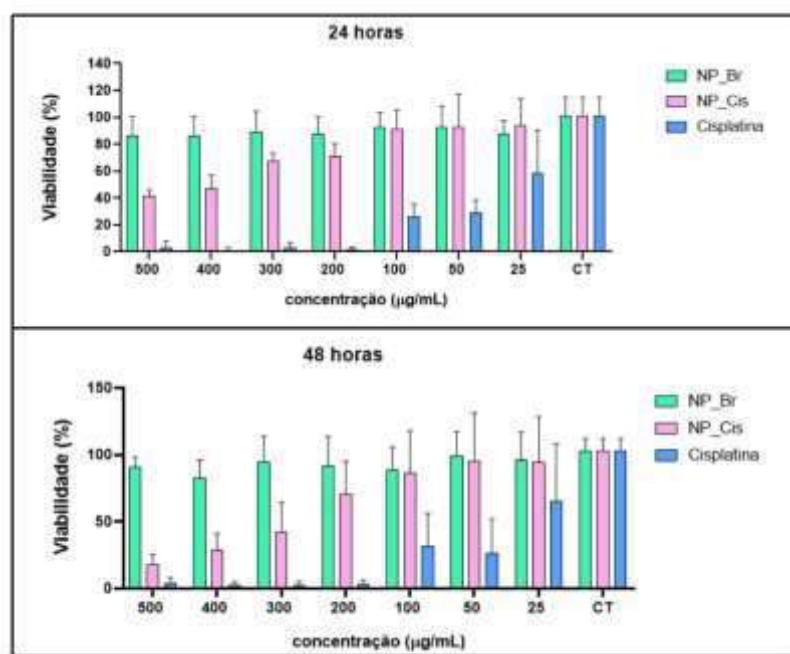


Figura 19: Resultado da análise de viabilidade celular em células A549 com NP_Br- e NP_Cis- sem corona proteica.

Com base no resultado apresentado acima, é possível perceber a drástica redução da viabilidade celular com o uso da cisplatina livre mesmo em baixas concentrações, como 50 µg/mL. O carregamento de cisplatina por nanopartículas de PLGA reduz seu efeito citotóxico, tornando-o mais dependente da concentração do fármaco e do tempo de incubação. Para avaliar a influência da formação da corona proteica na citotoxicidade, foram escolhidos quatro valores centrais de concentração (50, 100, 200 e 300 µg/mL) para aplicação das nanopartículas com corona proteica formada após o período de incubação de 1h. Os resultados são apresentados na **Figura 20**.

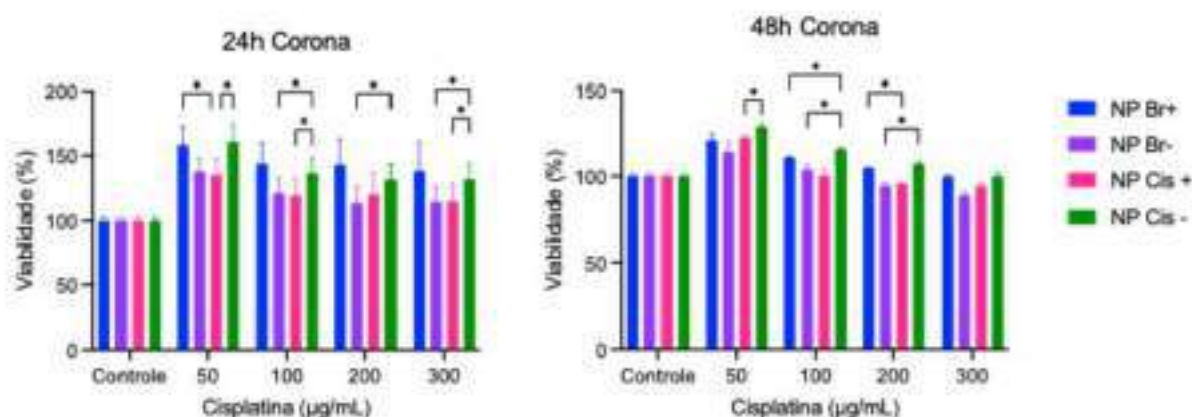


Figura 20: Resultado da análise de viabilidade celular em células A549 com NP_Br-, NP_Br+, NP_Cis- e NP_Cis+ com corona proteica. A avaliação estatística dos dados foi feita por ANOVA e teste de Tukey.

Analisando-se os resultados descritos acima, é possível perceber uma redução de forma geral na citotoxicidade das nanopartículas com a presença da corona proteica. No tempo inicial de incubação de 24h todas as amostras apresentam alta viabilidade em relação ao controle, já no período de 48h há uma pequena redução na viabilidade, porém os tais valores ainda se mantêm altos em comparação com o controle. Comparando-se a viabilidade entre as nanopartículas em ambos os períodos de incubação, percebe-se que os valores se mantêm próximos, com poucos grupos apresentando variações significativas (destacadas acima das colunas do gráfico), diferente do que ocorre com as nanopartículas sem a corona proteica, as quais demonstram uma grande variação de toxicidade comparando-se as nanopartículas com e sem o fármaco.

De forma geral, é possível inferir que a corona proteica atua na redução da toxicidade das nanopartículas descritas neste trabalho, assim como já abordado em outros estudos (Jafari et al., 2020), porém mais análises devem ser realizadas com intuito de se entender como atuam as proteínas adsorvidas na redução da citotoxicidade. Para tal, é necessário ainda a realização de testes de internalização celular e liberação de fármaco de forma a se comparar a atuação das nanopartículas com e sem a corona proteica formada.

5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos da caracterização físico-química, foi possível constatar a influência da carga das nanopartículas na adsorção de proteínas, de forma geral, a partir de análise de tamanho, potencial zeta e concentração proteica, verificou-se que nanopartículas com carga superficial positiva geram maior adsorção proteica, o que está de acordo com os demais estudos disponíveis na literatura. Estes mesmos testes, mostraram ainda que o tempo de incubação das nanopartículas em um meio multiproteico (como DMEM suplementado com 10% FBS), também gera influência na formação da corona proteica. Nesses casos observou-se uma maior adsorção proteica nos períodos iniciais e finais.

As análises de microscopia e espectroscopia, assim como a eletroforese de proteínas, indicaram a presença da corona proteica nas nanopartículas, de forma que alguns destes resultados mostraram ainda uma maior adsorção proteica em nanopartículas com carga positiva. Por fim, o ensaio de MTT em células A549 demonstrou uma redução da citotoxicidade das nanopartículas com formação da corona proteica, como já descrito em outros trabalhos, porém os mecanismos de atuação das proteínas nestes fenômenos ainda devem ser elucidados, para isso, serão ainda realizados testes de internalização das nanopartículas e de liberação do fármaco.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERDEN, R. A.; HALL, M. D.; HAMBLEY, T. W. The discovery and development of cisplatin. *Journal of Chemical Education*, v. 83, n. 5, p. 728, 2006.
- ALSHETAILI, Abdullah S. Gefitinib loaded PLGA and chitosan coated PLGA nanoparticles with magnified cytotoxicity against A549 lung cancer cell lines. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 28, n. 9, p. 5065-5073, 2021.
- BILARDO, Roberta; et al. Influência da química de superfície e da morfologia de nanopartículas na formação da coroa proteica. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 14, n. 4, p. e1788, 2022.
- BORGES, J. H. A nanotecnologia associada a cisplatina no tratamento e diagnóstico do câncer: mecanismo de ação, preparo e toxicidade. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia). Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac, [S. l.], 2021.
- CHAKRABORTY, Debolina; ETHIRAJ, K. R.; MUKHERJEE, Amitava. Understanding the relevance of protein corona in nanoparticle-based therapeutics and diagnostics. *RSC Advances*, v. 10, n. 45, p. 27161-27172, 2020.
- DE SOUZA, Juliana Bié Ferreira. Título do documento. Belo Horizonte: Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, 2016.
- DOMINGUEZ-RIOS, Rossina; et al. Cisplatin-loaded PLGA nanoparticles for HER2 targeted ovarian cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 178, p. 199-207, 2019.
- ESTEVES, F. L. Investigação teórica do mecanismo de ação de compostos binucleares de platina (II). Juiz de Fora, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/2048/1/lucasfagundesesteves.pdf>. Acesso em: [data de acesso não fornecida].
- FERRAY, J.; ERVIK, M.; LAM, F.; LAVERSANNE, M.; COLOMBET, M.; MERY, L.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today>.
- FONTES, A. P. S.; ALMEIDA, S. G. de; NADER, L. de A. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. *Química Nova*, v. 20, n. 4, p. 398–406, 1997. doi:10.1590/S010040421997000400010.

FRANQUI, Lidiane S.; et al. Interação do óxido de grafeno com o meio de cultura celular: avaliação da formação da coroa de proteína do soro fetal bovino para avaliação da nanotoxicidade in vitro e nanobiointerações. *Materials Science and Engineering: C*, v. 100, p. 363-377, 2019.

HARISH, Vancha; et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: bioimaging, biosensing, drug delivery, tissue engineering, antimicrobial, and agro-food applications. *Nanomaterials*, v. 12, n. 3, p. 457, 2022.

JAFARI, Samira; et al. Human plasma protein corona decreases the toxicity of pillar-layer metal–organic framework. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 14569, 2020.

LA VERDE, Giuseppe; et al. Caracterização de nanopartículas de PLGA revestidas com ácido hialurônico por espectroscopia Raman de superfície aprimorada. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 1, p. 601, 2022.

LEITER, A.; VELUSWAMY, R. R.; WISNIVESKY, J. P. The global burden of lung cancer: current status and future trends. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 20, p. 624-639, 2023. DOI: 10.1038/s41571-023-00798-3.

LI, Yuting; YAN, Bingshuo; HE, Shiming. Advances and challenges in the treatment of lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 169, 2023, p. 115891. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115891>.

MARQUES, Cintia; et al. Identification of the proteins determining the blood circulation time of nanoparticles. *ACS Nano*, v. 17, n. 13, p. 12458-12470, 2023. Acesso em: 25 fev. 2025.

MELO, R.; et al. As nanopartículas como ferramenta biológica: uma revisão exploratória. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 7, p. 1-18, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/341559438_As_nanopartículas_como_ferramentas_biologicas_uma_revisao_exploratoria.

MOHIT, B.; et al. Development and validation of a simple and sensitive spectrometric method for estimation of cisplatin hydrochloride in tablet dosage forms: application to dissolution studies. *International Scholarly Research Notices*, v. 2013, Article ID 936254, 8 p., 2013. doi:10.1155/2013/936254.

NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. Ulrich. Towards a molecular-level understanding of the protein corona around nanoparticles—recent advances and persisting challenges. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, v. 10, p. 11-22, 2019.

PAVIA, Donald L. et al. Introdução à espectroscopia. Learning, 2010.

PIELLA, Jordi; BASTÚS, Neus G.; PUNTES, Víctor. Size-dependent protein–nanoparticle interactions in citrate-stabilized gold nanoparticles: the emergence of the protein corona. *Bioconjugate Chemistry*, v. 28, n. 1, p. 88-97, 2017. Acesso em: 25 fev. 2025.

REALLI, V.; TREROTOLA, M.; GUERRA, E.; ALBERTI, S. Abandoning the notion of non-small cell lung cancer. *Trends in Molecular Medicine*, v. 25, n. 7, p. 585-594, jul. 2019. DOI: 10.1016/j.molmed.2019.04.012. Epub 30 mai. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31155338/>.

SCHUBERT, Stephanie; DELANEY JR, Joseph T.; SCHUBERT, Ulrich S. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter*, v. 7, n. 5, p. 1581-1588, 2011.

SHKODRA, B. et al. Effect of surfactant on the size and stability of PLGA nanoparticles encapsulating a protein kinase C inhibitor. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 566, p. 756-764, 2019.

TORRES, Marjorie; et al. Raman and infrared studies of platinum-based drugs: cisplatin, carboplatin, oxaliplatin, nedaplatin, and heptaplatin. *The Journal of Physical Chemistry A*, v. 122, n. 34, p. 6934-6952, 2018.

YADAV, Khushwant S.; SAWANT, Krutika K. Modified nanoprecipitation method for preparation of cytarabine-loaded PLGA nanoparticles. *AAPS Pharmscitech*, v. 11, n. 3, p. 1456-1465, 2010.

YAY, Arzu; et al. Espectroscopia Raman: uma nova abordagem experimental para avaliar danos teciduais induzidos por cisplatina. *Talanta*, v. 207, p. 120343, 2020.

ZHANG, C.; XU, C.; GAO, X.; YAO, Q. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics*, v. 12, n. 5, p. 2115-2132, 2022. doi: 10.7150/thno.69424. Disponível em: <https://www.thno.org/v12p2115.htm>.

