

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JÚLIA BORGES DE MACEDO

NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E LIPÍDICAS PARA LIBERAÇÃO
DIRECIONADA DE QUERCETINA NO CÂNCER DE CÓLON

PONTA GROSSA

2024

JÚLIA BORGES DE MACEDO

NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E LIPÍDICAS PARA LIBERAÇÃO
DIRECIONADA DE QUERCETINA NO CÂNCER DE CÓLON

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste como requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Priscileila Colerato Ferrari

PONTA GROSSA

2024


M141 Macedo, Júlia Borges de
Nanopartículas magnéticas e lipídicas para liberação direcionada de
quercetina no câncer de cólon / Júlia Borges de Macedo. Ponta Grossa, 2024.
102 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari.

1. Sistemas de liberação. 2. Câncer colorretal. 3. Nanopartículas
magnéticas. 4. Quercetina. 5. Otimização de formulações. I. Ferrari, Priscileila
Colerato. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e
Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615

	<p>PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS</p> <p>Associação Ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa</p>	
---	---	---

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO **02/2024** DA MESTRANDA **JÚLIA BORGES DE MACEDO**, REALIZADA NO DIA 05 DE ABRIL DE 2024, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos cinco dias do mês de abril de dois mil e vinte e quatro, às 9h30, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão aberta, via videoconferência, sob a presidência da Professora Doutora Priscileila Colerato Ferrari, reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda **JÚLIA BORGES DE MACEDO**, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pela Professora Doutora Priscileila Colerato Ferrari (UEPG/PR), demais Doutores: (membros titulares): José Ricardo de Arruda Miranda (UNESP - Instituto de Biociências de Botucatu/SP) e Patricia Mathias Doll Boscardin (UEPG/PR); (membros suplentes): Juliana Bonametti Olivato (UEPG/PR) e Marlus Chorilli (UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem o exame de defesa de dissertação de mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: “**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E LIPÍDICAS PARA LIBERAÇÃO DIRECIONADA DE QUERCETINA NO CÂNCER DE CÓLON**”. Encerrado o exame de defesa procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata APROVADA. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim, Paulo Maury Redkva, Secretário Setorial dos Programas de Pós-Graduação na Área da Saúde.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim não

Novo título: _____




Priscileila Colerato Ferrari - Presidente
(UEPG/PR)

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSE RICARDO DE ARRUDA MIRANDA
Data: 05/04/2024 14:21:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

José Ricardo de Arruda Miranda - Titular
(UNESP/SP)



Patricia Mathias Doll Boscardin - Titular
(UEPG/PR)



Paulo Maury Redkva
Secretário Setorial

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Fone (42) 2102-8937 Email – ppqcf@uepg.br
Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Bloco M
Ponta Grossa – Paraná – Brasil

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar comigo em todos os momentos, recarregando minha energia e me dando forças para sempre continuar o meu caminho, iluminado pelo Espírito Santo. À Nossa Senhora por sempre me dar o colo de mãe, me acolher nos momentos difíceis e me proteger com seu manto sagrado.

À toda minha família por me apoiarem até aqui, sempre me incentivando a continuar nos estudos e acreditando nos meus sonhos. Especialmente aos meus irmãos, Taís e Vitor, que juntos enfrentamos os desafios de estudar em outra cidade em busca dos nossos sonhos, trilhar esse caminho com vocês tornou tudo mais fácil. Obrigada por sempre me ouvirem falar demais, me incentivarem e comemorarem cada passo até aqui, vocês são tudo para mim.

Aos meus pais, Valéria e Joel, que merecem um agradecimento especial, esta dissertação é deles e por eles. Obrigada por tudo que fazem pela nossa família, serão sempre nossas inspirações e modelo de amor e serviço. Obrigada pelo exemplo, por nunca me deixarem desistir, por me mostrarem que posso conquistar tudo o que quiser e por darem todo o colo e amor que preciso. Pai, este trabalho é dedicado aos anos que juntos lutamos pelo câncer, sua força me deu forças para chegar aqui.

Aos meus amigos, Bruna, Laís, Karyn, Ana Beatriz, Anna Caroline, Paula, Eduardo, Antônio, Heloise, Danieli, Érica que sempre deixam tudo mais leve. Obrigada por me ouvirem, pelas conversas, pelas risadas, pelos conselhos e pela companhia nos momentos bons e não tão bons, juntos ou à distância, mas sempre presentes. Amigos tornam a vida mais bela, as risadas mais altas, as conversas mais gostosas, trazem abraços que curam e lágrimas que lavam a alma. O melhor da vida é ter um amigo para partilhá-la.

Às alunas de Iniciação Científica, Amábile e Julia, por toda a parceria e amizade dentro e fora do laboratório, nunca deixem de confiar no potencial de vocês. Obrigada pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho e por me acolherem nesse processo, terão sempre meu carinho especial, aprendi muito com vocês e espero ter contribuído no crescimento de cada uma, minhas primeiras coorientadas, voem alto.

Aos profissionais da UEPG. Em especial, à Aparecida pela paciência e pela ajuda no dia a dia dos experimentos no laboratório de tecnologia farmacêutica. Aos técnicos do Complexo de Laboratórios Multiusuários que me auxiliaram nas análises deste trabalho, principalmente a Michele e a Cris que incansavelmente me ajudaram na análise de potencial Zeta.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas UEPG/UNICENTRO pela oportunidade de realizar o mestrado. À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) por ser minha segunda casa, desde 2015, da graduação para residência e mestrado, agradeço pelo ensino superior público e de alta qualidade. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio com a bolsa de mestrado. E à Fundação Araucária pelo investimento na ciência e pela confiança no desenvolvimento desse projeto.

À minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a. Priscileila Colerato Ferrari, que me acolheu desde 2017 na iniciação científica e até agora não mediu esforços para me orientar e guiar na pesquisa científica. Obrigada pela oportunidade, pela paciência, pelos ensinamentos, pelos desafios superados, por estimular minha autonomia, por confiar no meu trabalho e, principalmente, por me ensinar a confiar no meu potencial e mostrar o quão longe posso chegar, serei eternamente grata. Sempre será minha inspiração na Tecnologia Farmacêutica, na docência, na pesquisa e na vida pela grande profissional que é.

Aos mestres Dr^a Patrícia Mazureki Campos e Dr. Luís Antônio Pinheiro, e Dr^a Patrícia Mathias Doll Boscardin e Dr. José Ricardo de Arruda Miranda, que prontamente aceitaram o convite para banca de qualificação e de defesa deste trabalho. Obrigada por dedicarem um pouco do tempo de vocês, pelos inúmeros ensinamentos, cada um em suas expertises, pelas contribuições neste trabalho, para o meu crescimento e por serem modelos de profissionais na área.

Por fim, agradeço aos inúmeros profissionais da educação que foram responsáveis pelo meu crescimento, desde a educação infantil até a pós-graduação. Obrigada por me mostrarem este caminho, por aceitarem essa profissão tão grandiosa e por serem quem são, cheguei até esta dissertação graças à cada um de vocês.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Sistemas de liberação nanoparticulados podem aumentar a efetividade terapêutica e reduzir a toxicidade do tratamento convencional do câncer de cólon ao aprimorar propriedades farmacocinéticas, como a absorção e a liberação a partir do direcionamento passivo e ativo do fármaco. O superparamagnetismo de nanopartículas magnéticas (NPM) aparece como alternativa promissora de terapia magneto térmica promovendo a morte de células tumorais por hipertermia com possibilidade de controle e direcionamento por campo magnético externo. Por outro lado, as nanopartículas lipídicas (NLS) são úteis para carrear antitumorais lipofílicos, como a quercetina (QC). A estratégia de funcionalização polimérica permite melhorar a estabilidade e o direcionamento de nanopartículas, por isso, este trabalho buscou desenvolver NPM e NLS revestidas com quitosana e quitosana conjugada ao ácido fólico (QSAF) para liberação de QC. Após a síntese de QSAF e seleção da melhor metodologia de funcionalização, foi conduzido um planejamento fatorial 3^2 , identificando os parâmetros que mais influenciam na produção de NPM e NLS e otimizando as formulações. Os sistemas foram caracterizados por microscopia de varredura, espalhamento dinâmico de luz e potencial Zeta, além da eficiência de encapsulação e teor de fármaco quantificados por métodos validados de espectrofotometria UV-Vis e cromatografia líquida de alta eficiência. O QSAF foi caracterizado confirmando a ligação entre os grupos funcionais (R-NH₂ e R-COOH) com uma eficiência de 72,92%. O método de funcionalização por agitação shaker e separação magnética de NPM-QS (FM3), e funcionalização *in situ* de NLS-QS em sonificador por gotejamento (FL3) obtiveram tamanhos de 483,57 nm (PDI 0,49) e 508,45 nm (PDI 0,53), com carga de 29,97 mV e 9,51 mV, respectivamente. Após o planejamento fatorial, notou-se que as NPMs têm o potencial Zeta influenciado positivamente pela concentração de QS, seguido da interação QS-temperatura com significância estatística. A otimização de resposta máxima de potencial Zeta e mínima de diâmetro médio ($d = 1$), permitiu selecionar a formulação com 2 mg.mL⁻¹ de QS preparada a 30°C. Por outro lado, a NLS selecionada como resposta otimizada máxima de potencial Zeta, EE e teor, e mínima de diâmetro médio e PDI, foi a formulação de 1 mg.mL⁻¹ de QS e 10 minutos de sonificador. As formulações otimizadas apresentaram tamanho de 122,32 nm (DP ± 8,56) e 352,83 nm (DP ± 62,8), PDI de 0,46 (DP ± 0,05) e 0,23 (DP ± 0,17), potencial Zeta de +30,78 mV (DP ± 0,8) e +14,2 mV (DP ± 5,9), para NPM e NLS, respectivamente. As EE obtidas foram de 80,45% (NPM-QS-QC), 54,4% (NPM-QSAF-QC), 69,73% (NLS-QC-QS) e 83,82% (NLS-QC-QSAF). O ensaio de dissolução demonstrou um controle de liberação expressivo para as NPM-QS-QC (até 6,4% em 24h) e liberação do tipo *burst* para as NLS-QC-QS (até 77,2% em 1h), com pouca variação entre polímero não conjugado e conjugado. Conforme os resultados discutidos neste estudo, o planejamento experimental permitiu discutir variáveis importantes na produção destas nanopartículas e definir os melhores parâmetros das formulações de NPMs e NLSs funcionalizadas com quitosana e quitosana-folato. Ainda há a necessidade de investigações mais aprimoradas, porém este estudo espera ter contribuído nos avanços da nanotecnologia biomédica e na discussão de sistemas magnéticos e lipídicos, demonstrando o potencial das formulações nanoparticuladas de quercetina no tratamento do câncer.

Palavras-chave: Sistemas de liberação. Câncer colorretal. Nanopartículas magnéticas. Quercetina. Otimização de formulações.

ABSTRACT

Drug delivery systems based on nanoparticles can improve pharmacokinetic aspects such as controlled release and release from passive and active drug targeting, increasing therapeutic efficacy and reducing toxicity in conventional colon cancer treatment. The superparamagnetism of magnetic nanoparticles (MNP) appears to be a potential alternative for magnetothermal therapy, inducing tumor cell death by hyperthermia with the ability to control and target by an external magnetic field. Solid lipid nanoparticles (SLN) are effective carriers of lipophilic anticancer agents such as quercetin (QC). The polymer functionalization technique improves the stability and targeting of nanoparticles; thus, this study aimed to develop MNP and SLN coated with chitosan and chitosan conjugated to folic acid (FA-CS) for QC release. After synthesizing FA-CS and selecting the optimum functionalization methods, a 3² factorial design was conducted to identify and optimize the parameters influencing the development of MNP and SLN. The systems were characterized using scanning microscopy, dynamic light scattering, Zeta potential, as well as validated UV-vis spectrophotometry and high-performance liquid chromatography methods to quantify encapsulation efficiency and drug loading. FA-CS was characterized, confirming the interaction between the functional groups (R-NH₂ and R-COOH) with a 72.92% efficiency. The functionalization method by shaker and magnetic separation of MNP-CS (FM3) and in situ functionalization of SLN-CS by sonicator (FL3) produced particles with sizes of 483.57 nm (PDI 0.49) and 508.45 nm (PDI 0.53), respectively, with a zeta of 29.97 mV and 9.51 mV. Following the factorial design, it was discovered that the MNPs' Zeta potential is positively influenced by the CS concentration, followed by the CS-temperature interaction, which has statistical relevance. To optimize the highest Zeta potential response and minimal mean diameter ($d = 1$), a formulation with 2 mg.mL⁻¹ of CS produced at 30°C was used. The SLN, on the other hand, was chosen as the formulation with the highest optimum response of Zeta potential, EE, and content and the lowest mean diameter and PDI, using 1 mg.mL⁻¹ of CS and 10 minutes of sonication. The optimized formulations had diameters of 122.32 nm (SD ± 8.56) and 352.83 nm (SD ± 62.8), PDI of 0.46 (SD ± 0.05) and 0.23 (SD ± 0.17), and Zeta potentials of +30.78 mV (SD ± 0.8) and +14.2 mV (SD ± 5.9) for MNP and SLN, respectively. The EE values obtained were 80.45% (MNP-CS-QC), 54.4% (MNP-FACS-QC), 69.73% (SLN-QC-CS), and 83.82% (SLN-QC-FACS). The dissolution assay demonstrated release control for MNP-CS-QC (up to 6.4% in 24 hours) and burst release for SLN-QC-CS (up to 77.2% in 1 hour), with minimal difference between non-conjugated and conjugated polymers. According to the findings of this study, the experimental design allowed for the discussion of critical variables in the manufacture of these nanoparticles, as well as the determination of the optimal parameters for the formulations of MNPs and SLNs functionalized with chitosan and chitosan-folate. Further research is needed, but this study aims to contribute to developments in biomedical nanotechnology and the debate of magnetic and lipid systems by highlighting the potential of quercetin nanoparticles.

Key words: Drug Delivery Systems. Colon cancer. Quercetin. Magnetic Nanoparticles. Formulation optimization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativas de incidência e mortalidade de câncer na população mundial, independente do sexo e idade (GLOBOCAN 2020).....	16
Figura 2 - Fases do desenvolvimento do câncer de cólon.	17
Figura 3 - Representação do perfil farmacocinético de sistemas liberação convencionais e prolongados.....	18
Figura 4 - Representação do efeito de permeabilidade e retenção aprimoradas de nanopartículas em células tumorais.	19
Figura 5 - Diferentes sistemas nanoparticulados de liberação e estratégias de direcionamento ativo e estímulos externos para carreamento de fármacos no câncer.	20
Figura 6 - Representação dos mecanismos de hipertermia magnética no tratamento do câncer. a) Histerese ou perda de relaxamento (dependendo da fase magnética e tamanho das NPMs) que resulta em hipertermia e subsequente necrose e/ou apoptose tumoral. b) Fenômeno térmico em nanoescala que regula os mecanismos bioquímicos das vias de apoptose das células cancerígenas.	22
Figura 7 – Representação esquemática da distribuição do fármaco em nanopartículas lipídicas sólidas. (a) no núcleo (b) no invólucro e (c) de forma homogênea na matriz.	24
Figura 8 - Desacetilação da quitina e síntese da quitosana.	25
Figura 9 – Mecanismos antitumorais da quercetina.	27
Figura 10 - Fluxograma das etapas de desenvolvimento da pesquisa.....	30
Figura 11 - Representação esquemática da reação de conjugação QSAF.....	41
Figura 12 - Espectros de FTIR quitosana-folato.....	43
Figura 13 - Micrografia FEG-SEM (A) e MEV-STEM (B).....	44
Figura 14 - Micrografias <i>FEG-SEM</i> das variações propostas no planejamento fatorial.	50
Figura 15 - Gráfico de Pareto do Planejamento Fatorial 3^2 Nanopartícula Magnética.	52
Figura 16 - Gráfico de Superfície de Resposta das variáveis resposta do planejamento fatorial 3^2 Nanopartícula Magnética.	53
Figura 17 - Micrografias das Nanopartículas Lipídicas Sólidas funcionalizadas por diferentes métodos.....	58

Figura 18 - Micrografias FEG-SEM das variações propostas no planejamento fatorial.	62
Figura 19 - Gráfico de Pareto do Planejamento Fatorial 3 ² Nanopartícula Lipídica Sólida.	64
Figura 20 - Gráfico de Superfície de Resposta das variáveis do planejamento fatorial 3 ² da NLS.....	65
Figura 21 - Micrografia das nanopartículas otimizadas.	71
Figura 22 - Estabilidade da quercetina em diferentes meios.....	73
Figura 23 - Espectro de varredura UV-Vis da quercetina em diferentes meios.....	74
Figura 24 - Espectro de varredura da solubilidade de quercetina no tempo 0 e 24 horas.	75
Figura 25 - Ensaio de liberação das nanopartículas magnéticas	76
Figura 26 - Ensaio de liberação da NLS-QC-QS em diferentes meios de dissolução.	78
Figura 27 - Ensaio de liberação das nanopartículas lipídicas sólidas em PBS pH 5,8 com tween80® 0,5% (p/v).	79
Figura 28 - Espectro de FTIR dos compostos puros.	80
Figura 29 - Difratoograma de Raio X dos compostos puros.....	81
Figura 30 - Validação da quantificação de QC por Espectrofotômetro UV-Vis.....	95
Figura 31 - Validação da quantificação de QC por CLUE.	97
Figura 32 - Validação da quantificação de AF por Espectrofotômetro UV-Vis.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis e fatores do planejamento experimental 3 ²	35
Tabela 2 - Níveis e fatores do planejamento experimental 3 ²	36
Tabela 3 - Resultados das formulações magnéticas desenvolvidas por diferentes métodos.....	45
Tabela 4 - Estabilidade durante 30 dias da FM3 conforme Potencial Zeta, Diâmetro médio e PDI.....	47
Tabela 5 - Resultados do planejamento fatorial 3 ² de nanopartículas magnéticas.	48
Tabela 6 - Coeficientes da regressão fatorial para as variáveis resposta.	51
Tabela 7 - Otimização de resposta do planejamento fatorial da NPM.....	54
Tabela 8 - Resultado dos diferentes métodos de desenvolvimento de NLS funcionalizada.	55
Tabela 9 - Resultados do planejamento fatorial 3 ² de Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	60
Tabela 10 - Coeficientes da regressão fatorial para as variáveis resposta.	63
Tabela 11 - Formulação otimizada de nanopartículas lipídicas sólidas funcionalizadas.	67
Tabela 12 - Resultado das nanopartículas otimizadas.....	67
Tabela 13 - Resultados de ANOVA para validar a significância do modelo.	95
Tabela 14 - Resultados da precisão do método de quantificação de QC em espectrofotômetro UV-vis.....	96
Tabela 15 - Resultados da exatidão do método de quantificação de QC em espectrofotômetro UV-vis.....	96
Tabela 16 - Resultados de ANOVA para validar a significância do modelo.	98
Tabela 17 - Resultados da precisão do método de quantificação de QC por CLUE.	99
Tabela 18 - Resultados da exatidão do método de quantificação de QC por CLUE.	99
Tabela 19 - Resultados da robustez do método de quantificação de QC por CLUE.	99
Tabela 20 - Resultados de ANOVA para validar a significância do modelo.	101
Tabela 21 - Resultados da precisão do método de quantificação de AF.	102
Tabela 22 - Resultados da exatidão do método de quantificação de AF.	102

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	CÂNCER DE CÓLON.....	16
3.2	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS NA TERAPIA DO CÂNCER ..	17
3.3	NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA	21
3.4	NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA	23
3.5	REVESTIMENTO DE NANOPARTÍCULAS COM QUITOSANA E ÁCIDO FÓLICO.....	24
3.6	QUERCETINA	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	MATERIAIS	29
4.2	FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL	30
4.3	SÍNTESE DO CONJUGADO DE ÁCIDO FÓLICO E QUITOSANA (QSAF) ...	31
4.3.1	Quantificação de ácido fólico por espectrofotometria UV-Vis	31
4.3.2	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada em Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR</i>)	32
4.4	DESENVOLVIMENTO DA NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA	32
4.4.1	Funcionalização das nanopartículas e Incorporação da quercetina	33
4.4.2	Incorporação da quercetina nas NPMs.....	34
4.4.3	Teor e Eficiência de Incorporação da quercetina nas NPMs	34
4.4.4	Planejamento fatorial 3 ² das NPMs	35
4.5	DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	35
4.5.1	Planejamento fatorial 3 ² das NLSs	36
4.5.2	Teor e Eficiência de Encapsulação da quercetina nas NLSs.....	37
4.6	ENSAIO DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i>	37
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4.8	CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DESENVOLVIDOS	39
4.8.1	Potencial Zeta e tamanho de partícula	39

4.8.2	Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (<i>Field Emission Gun Scanning Eletron Microscopy - FEG-SEM</i>)	39
4.8.3	Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo com detector <i>STEM</i> acoplado (<i>STEM-in-FEG-SEM - Scanning transmission electron microscopy</i>)	40
4.8.4	Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho por transformada em Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Sprectroscopy - FTIR</i>).....	40
4.8.5	Avaliação por difração de Raio-X (<i>X Ray Diffraction - DRX</i>).....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	SÍNTESE DE QUITOSANA-FOLATO	41
5.1.1	Eficiência de conjugação e teor de ácido fólico	41
5.1.2	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada em Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Sprectroscopy - FTIR</i>)	42
5.2	DESENVOLVIMENTO DA NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA	44
5.2.1	Eficiência de incorporação da QC em NPM-QS.	47
5.3	PLANEJAMENTO FATORIAL 3 ² NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA	47
5.4	DESENVOLVIMENTO DA NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA.....	54
5.5	PLANEJAMENTO FATORIAL 3 ² NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA.....	58
5.6	NANOPARTÍCULAS OTIMIZADAS	67
5.8	ENSAIO DE LIBERAÇÃO DA QUERCETINA	76
5.9	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	79
5.9.1	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada em Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Sprectroscopy - FTIR</i>)	80
5.9.2	Avaliação por difração de Raio-X (<i>X Ray Diffraction - DRX</i>).....	81
	REFERÊNCIAS	85
	APÊNDICE A – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DA QUERCETINA	93
	APÊNDICE B – VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO POR ESPECTROFOTÔMETRO UV-Vis.	100

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento celular anormal e acelerado que pode afetar diferentes órgãos e representa uma das principais causas de morbimortalidade mundial. Entre as maiores causas de mortalidade está o carcinoma colorretal (CCR), sendo a recidiva e a metástase fatores que influenciam diretamente na sobrevida dos pacientes. As estratégias terapêuticas tradicionais englobam a remoção cirúrgica, radioterapia e/ou quimioterapia conforme o estágio de desenvolvimento do tumor. Apesar dos avanços, a quimioterapia ainda apresenta como maior desafio a alta toxicidade não seletiva, afetando células saudáveis e comprometendo a efetividade e adesão terapêutica (Naeem *et al.*, 2020; Quadir *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a nanotecnologia farmacêutica surge como uma estratégia para a mitigar essas desvantagens da quimioterapia por meio de sistemas poliméricos, lipídicos e/ou magnéticos. Com isso, os sistemas de liberação de antitumorais são desenvolvidos visando melhorar as propriedades físico-químicas, a absorção, a liberação e o direcionamento específico do fármaco, reduzindo a toxicidade e aumentando a eficácia do tratamento (Naeem *et al.*, 2020; Quadir *et al.*, 2022; Wahab *et al.*, 2021).

O tamanho nanométrico das formulações de sistemas de liberação nanoparticulados permite um direcionamento passivo às células tumorais pelo denominado efeito EPR (*Enhanced Permeability and Retention Effect*), um fenômeno fisiológico do microambiente tumoral que permite um acúmulo direcionado de nanopartículas. Adicionalmente, estratégias de funcionalização do nanocarreador com moléculas ligantes seletivas propicia um direcionamento ativo para o interior de células cancerosas reduzindo o efeito citotóxico não seletivo da quimioterapia convencional. Como ligante estratégico para sistemas de liberação no CCR, destaca-se o ácido fólico devido à afinidade com receptores super expressos nas células de CCR (Seidu *et al.*, 2022; Wahab *et al.*, 2021; Wu, 2021).

Atualmente, a terapia magnetotérmica é uma alternativa terapêutica amplamente discutida na comunidade científica. Ela é viabilizada pela propriedade superparamagnética de nanopartículas magnéticas, que podem ser compostas por óxidos metálicos, óxido de ferro ou mistos como a ferrita de manganês. Ao serem expostas a um campo magnético externo, essas nanopartículas geram hipertermia,

podendo ser utilizadas para carregamento direcionado de antitumorais, rastreamento de células *in vivo* e na ressonância magnética (Soares *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2019).

Paralelamente, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) também oferecem vantagens para carrear e aumentar a biodisponibilidade de ativos lipídicos. Sua fácil obtenção, biocompatibilidade e alta capacidade de encapsulação são características atrativas para modular a cinética de liberação de antitumorais, reduzindo a toxicidade associada à quimioterapia (Talarico *et al.*, 2021).

Ademais, diversos estudos têm investigado fitoquímicos para o tratamento e prevenção do câncer, dada a capacidade desses compostos em modular a tumorigênese por meio de mecanismos diversos. A quercetina é um composto polifenólico que possui este potencial anticancerígeno, embora sua biodisponibilidade seja limitada pela alta lipofilicidade e baixa solubilidade. A encapsulação da quercetina em sistemas nanoestruturados visa superar estas dificuldades proporcionando uma alternativa terapêutica eficaz (Wang C. *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2020).

Considerando os pontos levantados, este estudo se propõe a desenvolver dois sistemas nanoparticulados distintos para liberação direcionada de quercetina. Tanto as nanopartículas magnéticas de MnFe_2O_4 quanto as nanopartículas lipídicas sólidas exibem propriedades intrínsecas interessantes que, quando revestidas com quitosana e funcionalizadas com ácido fólico, podem demonstrar potencial aplicação no tratamento direcionado do câncer de cólon.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver sistemas de liberação direcionada de quercetina para câncer de cólon a partir de nanopartículas magnéticas e lipídicas com revestimento polimérico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

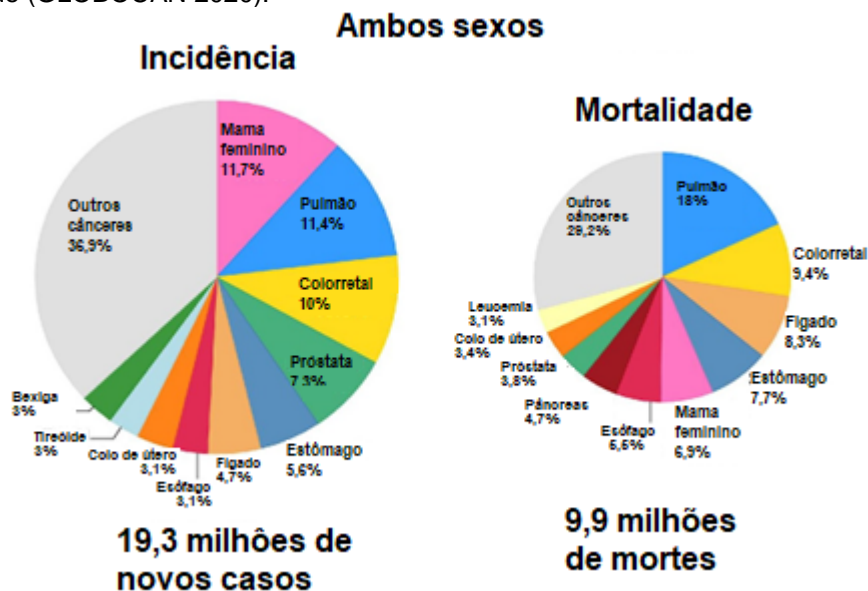
- Sintetizar e caracterizar o conjugado de quitosana-folato.
- Realizar o planejamento fatorial das nanopartículas magnéticas e lipídicas funcionalizadas com quitosana e com conjugado de quitosana-folato.
- Avaliar a eficiência de incorporação ou encapsulação da quercetina nas nanopartículas produzidas por métodos quantitativos validados.
- Caracterizar as nanopartículas por meio de análises físico-químicas, morfológicas, espectroscópicas e térmicas.
- Realizar o ensaio de liberação *in vitro* e avaliar o mecanismo de liberação por modelos matemáticos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CÂNCER DE CÓLON

Segundo as estatísticas globais do câncer (Globocan) divulgadas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, o câncer colorretal (CCR) é um dos maiores problemas de saúde em todo o mundo. Em 2020, foram registrados 19,3 milhões de novos casos e cerca de 10 milhões de mortes em decorrência dessa doença. Independentemente do sexo e idade (Figura 1), o câncer colorretal (10,0%) é o terceiro mais incidente e o segundo mais mortal (9,4%) (Sung *et al.*, 2021).

Figura 1 - Estimativas de incidência e mortalidade de câncer na população mundial, independente do sexo e idade (GLOBOCAN 2020).

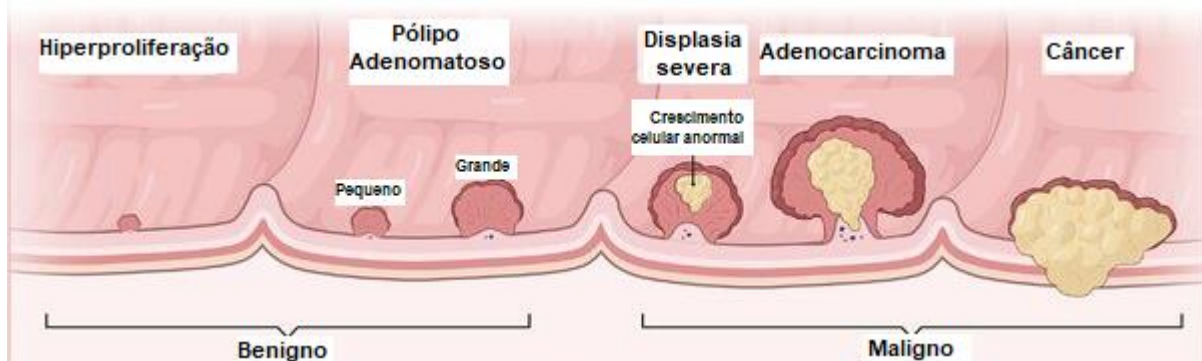


Fonte: Adaptado de SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

O câncer é constituído por um grupo de doenças de alta morbimortalidade caracterizado pelo crescimento anormal e descontrolado de células de diferentes órgãos podendo atingir a circulação sanguínea e/ou linfática, resultando em metástases. Trata-se de uma doença multifatorial podendo surgir devido a predisposição genética ou fatores ambientais como idade, hábitos de vida, exposição a carcinógenos, radiação ionizante e/ou doenças concomitantes (Farinha *et al.*, 2022; Quadir *et al.*, 2022).

Apesar do câncer de cólon (CC) e colorretal (CCR) frequentemente serem mencionados juntos devido à proximidade anatômica, é importante observar que o cólon e o reto se distinguem fisiologicamente pelo suprimento sanguíneo, drenagem linfática e inervação. Especificamente, o CC surge por alterações no epitélio colônico, levando a formação de pólipos adenomatosos que, ao sofrerem mutações genéticas e epigenéticas (Figura 2), podem evoluir para tumores malignos com potencial metastático e baixas taxas de sobrevivência (Farinha *et al.*, 2022; Krasteva; Georgieva, 2022).

Figura 2 - Fases do desenvolvimento do câncer de cólon.



Fonte: Adaptado de ZHU, X.; LI, S. Ferroptosis, Necroptosis, and Pyroptosis in Gastrointestinal Cancers: The Chief Culprits of Tumor Progression and Drug Resistance. **Advanced Science**, v. 10, n. 26, 12 set. 2023.

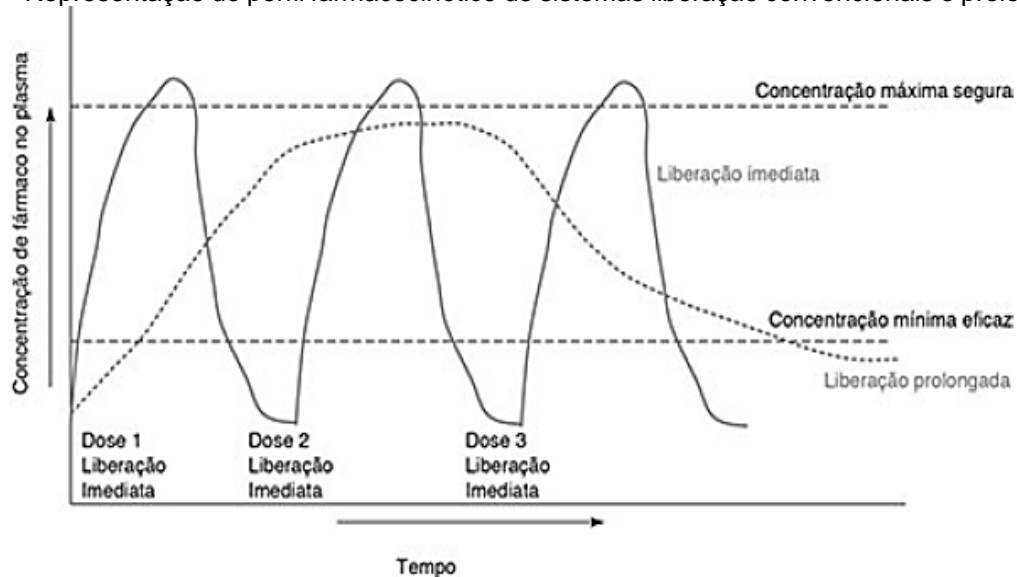
O estágio de desenvolvimento em que o CC é diagnosticado determina o tipo de tratamento adequado. As opções terapêuticas incluem a remoção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia e/ou imunoterapia. A eficácia e adesão da quimioterapia são afetadas pelos efeitos adversos indesejáveis, baixa especificidade, citotoxicidade inespecífica e perfis farmacocinéticos inadequados. Diante disso, há um investimento significativo em pesquisas relacionadas a agentes quimioterápicos alternativos e tecnologias inovadoras, visando o desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras, com o objetivo de melhorar a adesão e eficácia terapêutica (Farinha *et al.*, 2022; Krasteva; Georgieva, 2022; Quadir *et al.*, 2022; Wahab *et al.*, 2021).

3.2 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS NA TERAPIA DO CÂNCER

Sistemas de liberação modificada de fármacos são formulações farmacêuticas que oferecem uma administração controlada de agentes terapêuticos no organismo por meio de diferentes vias de administração, otimizando o perfil

farmacocinético, evitando flutuações na concentração do ativo, reduzindo a frequência de doses administradas e os efeitos colaterais (Figura 3). Neste contexto, os avanços da tecnologia farmacêutica na terapia do câncer podem ser empregados para controle da liberação de antitumorais, proporcionando a entrega direcionada do ativo, minimizando efeitos adversos e otimizando a adesão e eficácia terapêutica (Jain, 2020).

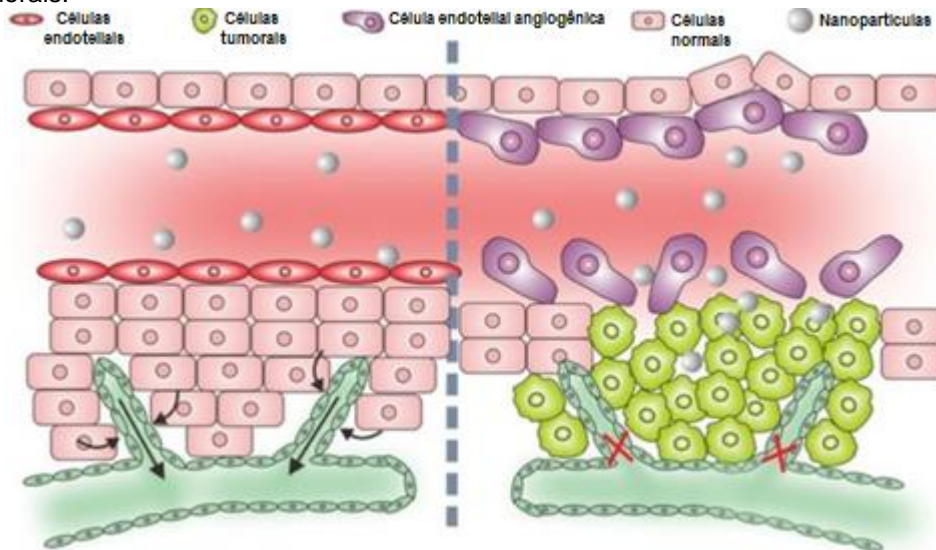
Figura 3 - Representação do perfil farmacocinético de sistemas liberação convencionais e prolongados.



Fonte: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4 ed. São Paulo: Elsevier Editora Ltda, 2016.

Características únicas das células cancerígenas e do microambiente tumoral são cruciais para estratégias no desenvolvimento de formas farmacêuticas direcionadas. O direcionamento passivo é propiciado pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) que pode ser explicado pelas adaptações fisiopatológicas do microambiente tumoral (Figura 4). Estudos demonstraram que nanopartículas podem penetrar nas células tumorais, pelo fenômeno da angiogênese caracterizado pelo aumento da vascularização e fenestrações no endotélio vascular, e permanecer retidas devido à supressão da drenagem linfática. Entretanto, o desafio da nanomedicina se concentra na alta heterogeneidade do efeito EPR nos diferentes tipos de tumores e estágios de desenvolvimento (Quadir *et al.*, 2022; Veselov *et al.*, 2022; Wu, 2021).

Figura 4 - Representação do efeito de permeabilidade e retenção aprimoradas de nanopartículas em células tumorais.

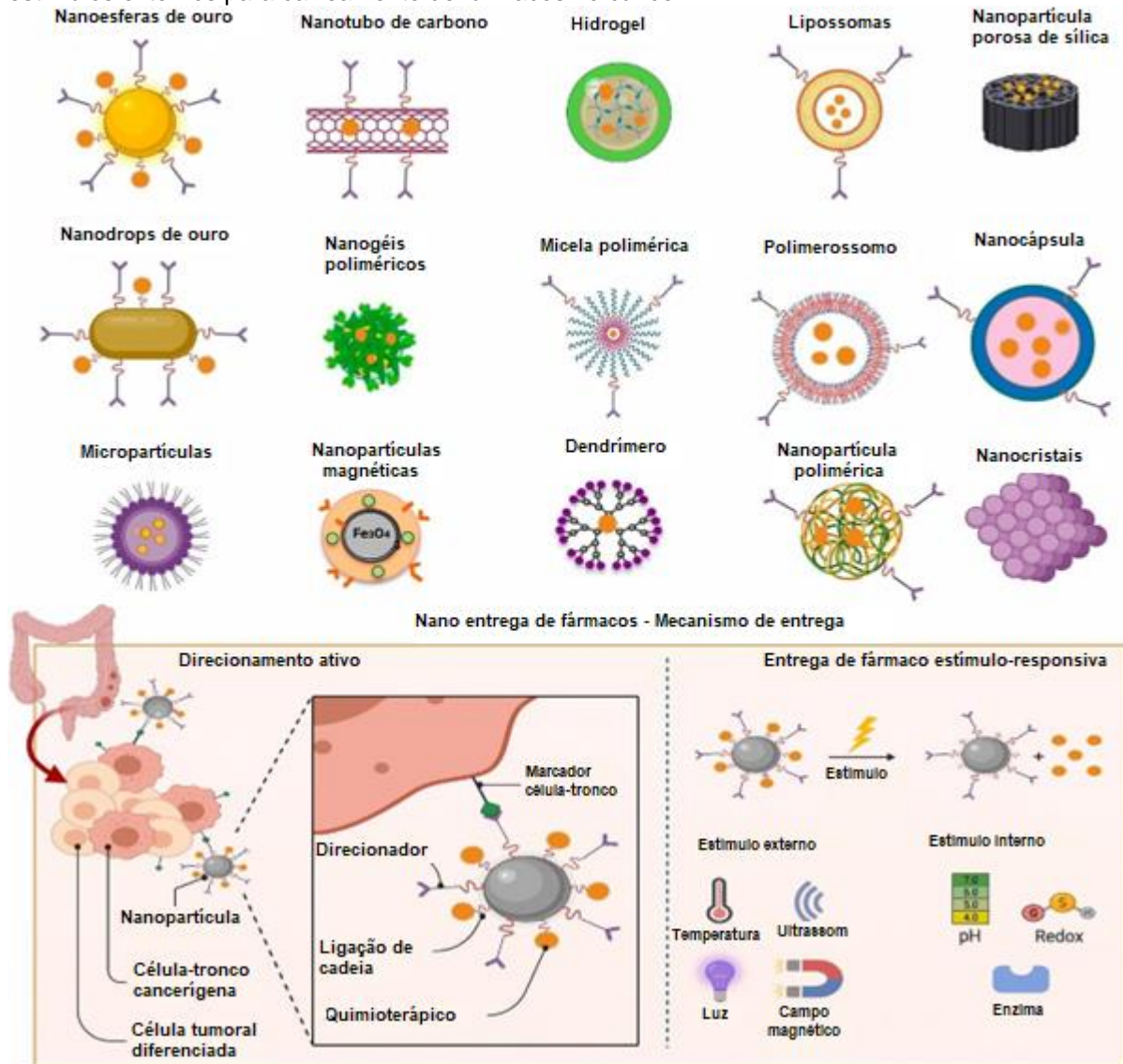


Fonte: Adaptado de XIE, X. *et al.* Challenges and Opportunities from Basic Cancer Biology for Nanomedicine for Targeted Drug Delivery. **Current Cancer Drug Targets**, v. 19, n. 4, p. 257–276, 21 mar. 2019.

Com isso, a nanotecnologia tem representado um avanço significativo na busca por melhorias na administração de quimioterápicos. Além do tamanho nanométrico, outras estratégias são empregadas na funcionalização da superfície de nanopartículas com diferentes macromoléculas biomiméticas e ligantes para o direcionamento ativo de nanocarreadores. Além disso, diversos estudos buscam nanopartículas teranósticas, que combinam tratamento e diagnóstico, possibilitando monitorar a progressão da doença, a cinética de entrega do fármaco e os resultados terapêuticos de maneira simultânea (Beh *et al.*, 2021; Wahab *et al.*, 2021).

Diversos tipos de nanocarreadores como nanopartículas poliméricas, lipídicas, micelas, lipossomas, dendrímeros, nanopartículas inorgânicas mesoporosas, óxidos metálicos, metais puros e nanomateriais de carbono (Figura 5) têm sido propostos para aplicação na terapia do câncer. Entre os exemplos mais notáveis estão o medicamento Abraxane®, uma formulação de nanopartículas à base de albumina para a entrega de paclitaxel, e o Doxil®, uma formulação de lipossomas para a entrega de doxorubicina (Khan; Albalawi; Pottou, 2022; Krasteva; Georgieva, 2022).

Figura 5 - Diferentes sistemas nanoparticulados de liberação e estratégias de direcionamento ativo e estímulos externos para carregamento de fármacos no câncer.



Fonte: Adaptado de WAHAB, S. *et al.* Current trends and future perspectives of nanomedicine for the management of colon cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 910, nov. 2021.

Ademais, vale ressaltar que sistemas de liberação susceptíveis a estímulos externos também têm se destacado como estratégias na indução da morte de células cancerosas. Dentre esses, destacam-se a terapia fotodinâmica que envolve a interação entre fotossensibilizadores e a aplicação de luz; a terapia fototérmica, que converte a energia luminosa em calor; e a terapia magnetotérmica que, por meio do superparamagnetismo de nanomateriais, direciona e superaquece regiões tumorais.

Do mesmo modo, o uso de polímeros responsivos a alterações de pH ou temperatura também têm demonstrado resultados promissores e potenciais na terapia oncológica uma vez que tumores apresentam um ambiente mais ácido com

temperaturas mais elevadas em comparação com células saudáveis (Krasteva; Georgieva, 2022).

3.3 NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA

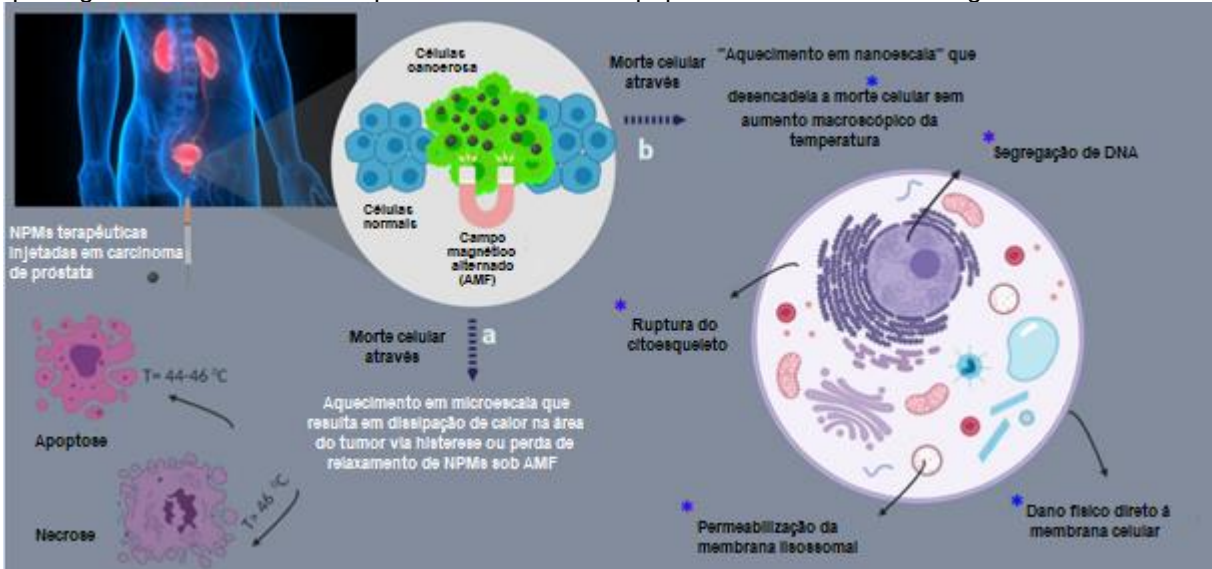
As nanopartículas magnéticas (NPM) são nanomateriais que têm recebido considerável atenção devido às aplicações biomédicas promissoras, principalmente para o tratamento e/ou diagnóstico do câncer. Para esta finalidade, as nanopartículas de óxidos metálicos são altamente recomendadas devido à sua maior biocompatibilidade e não toxicidade biológica e ambiental quando comparadas com as sintetizadas por metais puros (Darroudi *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2019).

Esses nanomateriais, com diâmetro variando de 10 a 100 nm, apresentam propriedades aprimoradas como uma grande área de superfície, melhoria na solubilidade de fármacos hidrofóbicos, boa estabilidade, facilidade de funcionalização e síntese. Há diversos métodos para sintetizar NPMs como o método hidrotermal, de co-precipitação, decomposição térmica e microemulsão. A maioria desses métodos é conveniente, sustentável e de baixo custo. Estratégias de revestimento de superfície com diferentes macromoléculas são cruciais para garantir a biocompatibilidade, reduzir a potencial toxicidade e assegurar a estabilidade para aplicações na área da nanomedicina (Aghajanzadeh *et al.*, 2020; Darroudi *et al.*, 2021).

Além disso, as NPMs apresentam capacidade de acumular e direcionar o fármaco por meio de um campo magnético externo, característica atrativa que contribui para a redução de efeitos adversos de quimioterápicos e o aumento da eficácia terapêutica. A associação com polímeros pode auxiliar no desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos com um maior controle da taxa de liberação e maior estabilidade da formulação permitindo uma alternativa terapêutica combinada, quimioterapia direcionada e hipertermia magnética (Darroudi *et al.*, 2021).

A propriedade de superparamagnetismo presente nas NPMs é caracterizada pela hipertermia magnética quando expostas a um campo magnético alternado (Figura 6). Esse fenômeno é resultado do relaxamento magnético dentro da partícula (relaxamento de Néel) ou da rotação da própria partícula (relaxamento browniano) (Ansari *et al.*, 2022; Etemadi; Plieger, 2020).

Figura 6 - Representação dos mecanismos de hipertermia magnética no tratamento do câncer. a) Histerese ou perda de relaxamento (dependendo da fase magnética e tamanho das NPMs) que resulta em hipertermia e subsequente necrose e/ou apoptose tumoral. b) Fenômeno térmico em nanoescala que regula os mecanismos bioquímicos das vias de apoptose das células cancerígenas.



Fonte: Adaptado de ETEMADI, H.; PLIEGER, P. G. Magnetic Fluid Hyperthermia Based on Magnetic Nanoparticles: Physical Characteristics, Historical Perspective, Clinical Trials, Technological Challenges, and Recent Advances. **Advanced Therapeutics**, v. 3, n. 11, p. 2000061, nov. 2020.

As nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SIPONs) já são aprovadas pela agência reguladora dos Estados Unidos para o uso como agentes de contraste em ressonância magnética oral (ferumoxsil) e para o tratamento de anemia (ferumoxitol). Neste cenário, a nanomedicina tem investido consideravelmente na hipertermia magnética de SIPONs para o tratamento do câncer, com ênfase na apoptose direcionada de células tumorais e na potencialização da resposta à radioterapia e/ou quimioterapia (Ansari *et al.*, 2022; Luengo *et al.*, 2022).

Diversos grupos de pesquisadores já relataram o desenvolvimento de sistemas carreadores de quimioterápicos usando NPMs. Um estudo conduzido por Dabaghi, Quaas e Hilger (2020) demonstrou uma eficácia superior de uma abordagem termoquimioterapêutica que resultou na erradicação do tumor de cólon (HT-29) por meio da aplicação intratumoral do sistema Fe_3O_4 -Quitossana-5-FU associado a hipertermia magnética, quando comparado com a terapia única de 5-FU (Dabaghi; Quaas; Hilger, 2020).

A associação de Mn^{2+} em óxidos de ferro demonstrou otimizar a liberação de calor em maior intensidade. Contudo, vale ressaltar que, a hipertermia leve (42°C) apresenta benefícios terapêuticos, mas deve ser rigorosamente controlada, pois temperaturas acima de 46°C podem resultar em necrose celular e danos irreversíveis

aos tecidos saudáveis circundantes. Além disso, a ativação por outros estímulos, como a luz infravermelho próximo (NIR), também foi proposta para um controle preciso da hipertermia (Ansari *et al.*, 2022; Luengo *et al.*, 2022).

Diversos grupos de pesquisadores já relataram o desenvolvimento de sistemas carreadores de quimioterápicos usando NPMs como terapia combinada. Entretanto, ainda são poucos os relatos promissores com ferrita de manganês ($MnFe_2O_4$) especificamente. Recentemente, Cintra *et al.* (2022) desenvolveram um sistema de liberação de doxorubicina por meio da hipertermia de magnetolipossomas de $MnFe_2O_4$ direcionados por folato, e, demonstraram efetivo controle de liberação e ação citotóxica em melanoma murino (Cintra *et al.*, 2022)

3.4 NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA

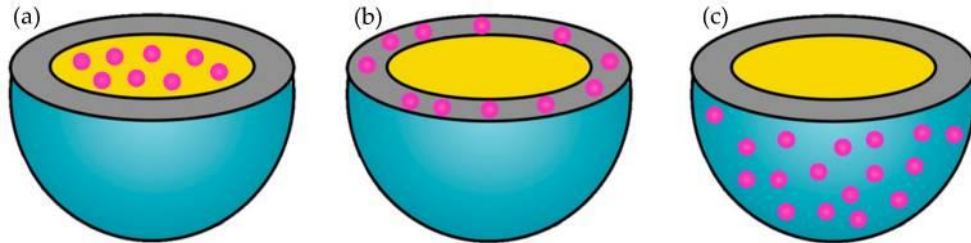
As nanopartículas lipídicas, amplamente empregadas, podem ser desenvolvidas a partir de lipídios sólidos, conhecidas como nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), lipídios líquidos, denominadas nanoemulsões, e uma mistura de lipídios líquidos e sólidos como os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Em comparação com outros nanocarreadores, as nanopartículas lipídicas oferecem vantagens como maior biocompatibilidade, facilidade de escalabilidade de produção e a capacidade de carrear ativos, tanto lipofílicos quanto hidrofílicos, com controle de liberação permitindo sua administração por meio de diferentes vias (Ghasemiyeh; Mohammadi-Samani, 2018).

A administração parenteral, em particular para terapia do câncer, têm sido a via mais adequada e mais estudada. Um marco importante foi estabelecido por Yang *et al.* (1999), que conduziram o primeiro ensaio *in vivo* de NLS carregadas com camptotecina, demonstrando um aumento no tempo de residência do antitumoral no cérebro, coração e células reticulo-endoteliais (Yang *et al.*, 1999). Mais recentemente, em 2016, Wang J., Wang Y. e Meng X também obtiveram resultados satisfatórios ao aumentar o potencial anticancerígeno da cisplatina quando incorporada em NLS com quitosana (Wang J.; Wang Y.; Meng, 2016). Além disso, NLS em tratamentos antitumorais também permitiria a administração oral de antitumorais o que implicaria em terapias mais simples e convenientes para os pacientes (Bayón-Cordeiro; Alkorta; Arana, 2019).

Contrapondo, algumas desvantagens também são relatadas para NLS, como a baixa capacidade de carga e eficiência de encapsulação do fármaco com possível expulsão do fármaco e agregação de partículas. A funcionalização de superfície com polímeros e/ou ligantes têm sido uma estratégia empregada para melhorar a interação com direcionamento a células cancerígenas e o controle da liberação de fármacos com encapsulação polimérica das NLSs (Pandey *et al.*, 2021).

Como já citado, NLSs permitem a incorporação de múltiplas drogas – tanto hidrofílicas quanto lipofílicas. Dependendo da composição e do método de preparo, o fármaco pode ser incorporado no núcleo, no invólucro e de forma homogênea na matriz (Figura 7). Essas distribuições podem ser discernidas a partir de características dos perfis de liberação e modelos matemáticos aplicados (Bayón-Cordeiro; Alkorta; Arana, 2019; Talarico *et al.*, 2021).

Figura 7 – Representação esquemática da distribuição do fármaco em nanopartículas lipídicas sólidas. (a) no núcleo (b) no invólucro e (c) de forma homogênea na matriz.



Fonte: BAYÓN-CORDERO, L.; ALKORTA, I.; ARANA, L. Application of Solid Lipid Nanoparticles to Improve the Efficiency of Anticancer Drugs. **Nanomaterials**, v. 9, n.3, p. 474, 2019.

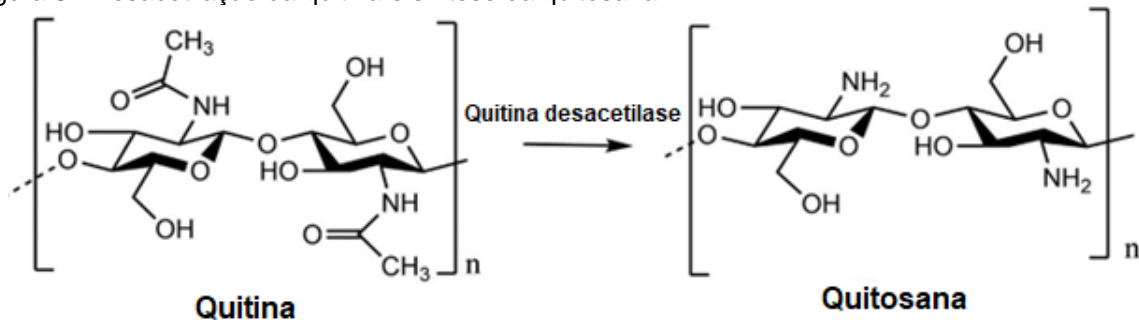
3.5 REVESTIMENTO DE NANOPARTÍCULAS COM QUITOSANA E ÁCIDO FÓLICO

Além da vantagem de direcionamento passivo pelo tamanho nanométrico, a nanomedicina têm aprimorado a abordagem terapêutica do câncer com uma estratégia promissora que envolve o revestimento de nanopartículas tanto para um direcionamento ativo quanto para maior estabilidade de formulações. Nesse cenário, a quitosana (QS) e o ácido fólico (AF) surgem contribuindo com propriedades únicas para otimizar o tratamento (Ebrahimnejad *et al.*, 2022).

A QS é um polissacarídeo natural catiônico com característica hidrofílica derivado da desacetilação parcial da quitina. A quitina é abundantemente encontrada em fontes renováveis, sendo extraída da parede celular de fungos e de exoesqueletos de invertebrados como peixes e crustáceos. A composição química da QS consiste

em uma cadeia linear de amino-polissacarídeos composta por β -(1-4)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosose e 2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranosose ligadas de forma aleatória (Figura 8). Normalmente, é comercializada com grau de desacetilação de 60 a 100% e peso molecular de 20 a 1200 kDa (Hu; Luo, 2021; Rizeq *et al.*, 2019; Kulkarni *et al.*, 2022).

Figura 8 - Desacetilação da quitina e síntese da quitosana.



Fonte: Adaptado de KULKARNI, N. *et al.* Advances in the colon-targeted chitosan based multiunit drug delivery systems for the treatment of inflammatory bowel disease. **Carbohydrate Polymers**, jul. 2022.

Destaca-se como um excelente excipiente farmacêutico devido à biocompatibilidade, não toxicidade e degradação pela microflora intestinal. Além disso, a agência reguladora dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration* (FDA), aprovou o uso da quitosana como dietético, na engenharia de tecidos e na produção de medicamentos, sendo amplamente estudada na área biomédica e no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (Hoang *et al.*, 2021; Rizeq *et al.*, 2019; Hu; Luo, 2021).

Na terapia do câncer, a QS é empregada em nanossistemas para o tratamento de diversos tipos de câncer, como câncer de mama, cólon, pulmão e cérebro. Dentre as vantagens a QS oferece benefícios na supressão do crescimento tumoral, função adjuvante imunológico, e potencial anti-inflamatório. Outras características também são exploradas pela nanotecnologia, como a rápida dissolução em pH ácido do microambiente tumoral e a liberação colônica através de enzimas microbianas (Rizeq *et al.*, 2019).

Por outro lado, o ácido fólico (AF), também conhecido como vitamina B9, desempenha um papel crucial na seleção direcionada de células cancerosas. Devido à sua alta afinidade pelos receptores de folato (FR), frequentemente superexpressos em vários tipos de câncer, o AF possibilita que as nanopartículas alcancem seletivamente as células tumorais. Assim, a combinação de quitosana e ácido fólico é

uma estratégia promissora que permite um revestimento de nanopartículas resultando em maior estabilidade da formulação, com controle de liberação quimioterápicos e com direcionamento ativo para as células cancerosas (Ebrahimnejad *et al.*, 2022).

3.6 QUERCETINA

Fitoquímicos polifenólicos têm sido amplamente utilizados para recuperação e promoção da saúde devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, neuroprotetivas e imunossupressoras. A quercetina (QC) é um exemplo promissor desses fitoquímicos, encontrado em diversas plantas dietéticas e medicinais como frutas vermelhas, uvas, cebolas, tomates, nozes, *Ginkgo biloba* e *Hypericum perforatum* (Pinheiro R.; Pinheiro M.; Neves, 2021; Yang *et al.*, 2020).

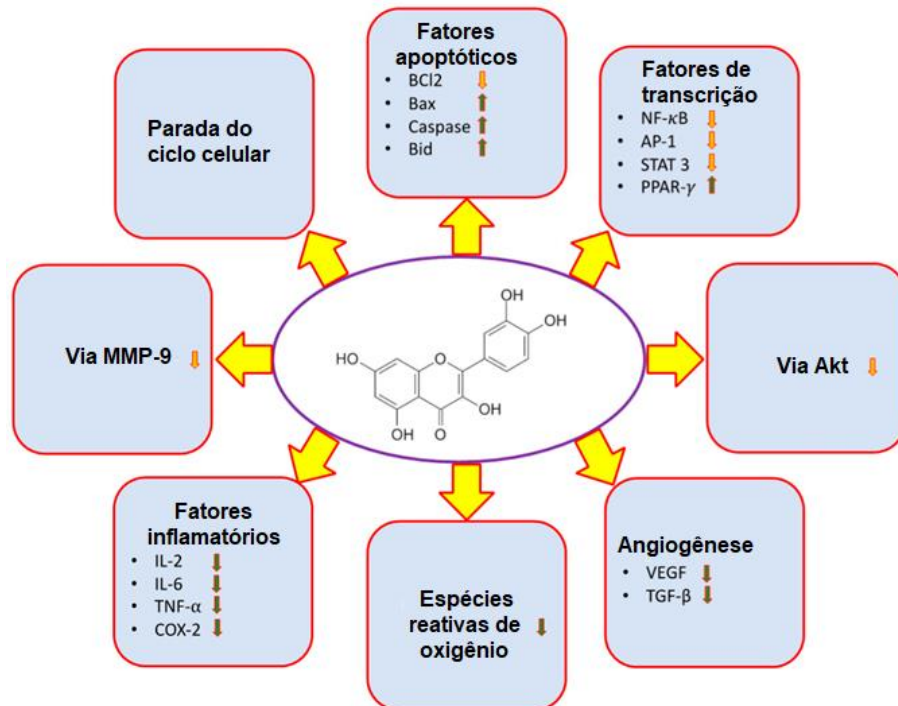
Muitos flavonoides como a QC (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona) são amplamente estudados pela capacidade de modular a tumorigênese. A QC tem demonstrado efeitos inibitórios no crescimento de diversas células tumorais, agindo através de uma variedade de mecanismos que regulam vias de sinalização específicas (Figura 9). Isso inclui a redução da expressão de oncogenes e espécies reativas de oxigênio, a indução da apoptose e necrose, a inibição do ciclo celular das células tumorais e a supressão da angiogênese no microambiente tumoral (Almatroodi *et al.*, 2021; Ghanbari-Movahed *et al.*, 2022; Pinheiro R.; Pinheiro M.; Neves, 2021; Yang *et al.*, 2020).

Além do uso da QC para tratamento do câncer, ela também tem demonstrado propriedades de quimioprevenção no câncer de pulmão, cólon e de próstata. No câncer de pulmão, por exemplo, a QC interfere na via de sinalização do receptor de hidrocarboneto aril (AhR), inibindo a ativação de enzimas que transformam pró-carcinógenos. No câncer de próstata, a QC diminui a expressão do receptor de andrógeno (AR), retardando a progressão da doença (Hussain *et al.*, 2021; Pinheiro R.; Pinheiro M.; Neves, 2021).

Especificamente no câncer de cólon, a QC já demonstrou induzir apoptose através da inibição da via NF- κ B, regulação positiva de Bax e negativa de Bcl-2, e reduzir a expressão de proteínas ErbB2 e ErbB3, inibindo o crescimento. Ainda, em um estudo de Priego *et al.* (2008), a quercetina aumentou a quimio-radiossensibilidade em modelos de xenoenxerto de camundongos, sendo uma alternativa de terapia

adjuvante (Almatroodi *et al.*, 2021; Hussain *et al.*, 2021; Pinheiro R.; Pinheiro M.; Neves, 2021; Priego *et al.*, 2008).

Figura 9 – Mecanismos antitumorais da quercetina.



Fonte: Adaptado de ALMATROODI, S. A. *et al.* Potential Therapeutic Targets of Quercetin, a Plant Flavonol, and Its Role in the Therapy of Various Types of Cancer through the Modulation of Various Cell Signaling Pathways. **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1315, 1 mar. 2021.

No entanto, apesar das atividades farmacológicas promissoras, a administração da QC enfrenta desafios relacionados à baixa solubilidade, biodisponibilidade oral limitada, baixa estabilidade e alta depuração. Por isso, a nanotecnologia tem buscado aumentar a biodisponibilidade da QC através de nanopartículas poliméricas, lipídicas, metálicas e magnéticas, maximizando assim o seu potencial terapêutico em diferentes doenças (Hussain *et al.*, 2021; Pinheiro R.; Pinheiro M.; Neves, 2021).

Outro desafio importante é definir uma dose anticancerígena efetiva e não tóxica da QC. Srivastava *et al.* (2016), em seus estudos, testaram diferentes concentrações de (10, 20, 50, 100 e 250 μM) em diferentes tipos de câncer, identificando a atividade citotóxica significativa por diferentes mecanismos mesmo na menor concentração. Em outro experimento, os pesquisadores demonstraram inibição significativa do crescimento tumoral em camundongos portadores de adenocarcinoma de mama com administração de 1 mg.kg^{-1} de quercetina (Srivastava *et al.*, 2016).

Considerando todos os aspectos levantados, sobre as nanopartículas magnéticas e lipídicas como sistemas de liberação de antitumorais, direcionamento passivo pelo efeito EPR, e ativo pela superexpressão de receptores de folato, além das propriedades terapêuticas da quercetina, este estudo buscou desenvolver sistemas inovadores para o tratamento do câncer de cólon. Não foram encontrados na literatura, estudos com nanopartículas MnFe_2O_4 revestidas com quitosana ou quitosana-folato para liberação de quercetina, assim como não foram encontrados estudos de NLS com a formulação proposta neste trabalho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

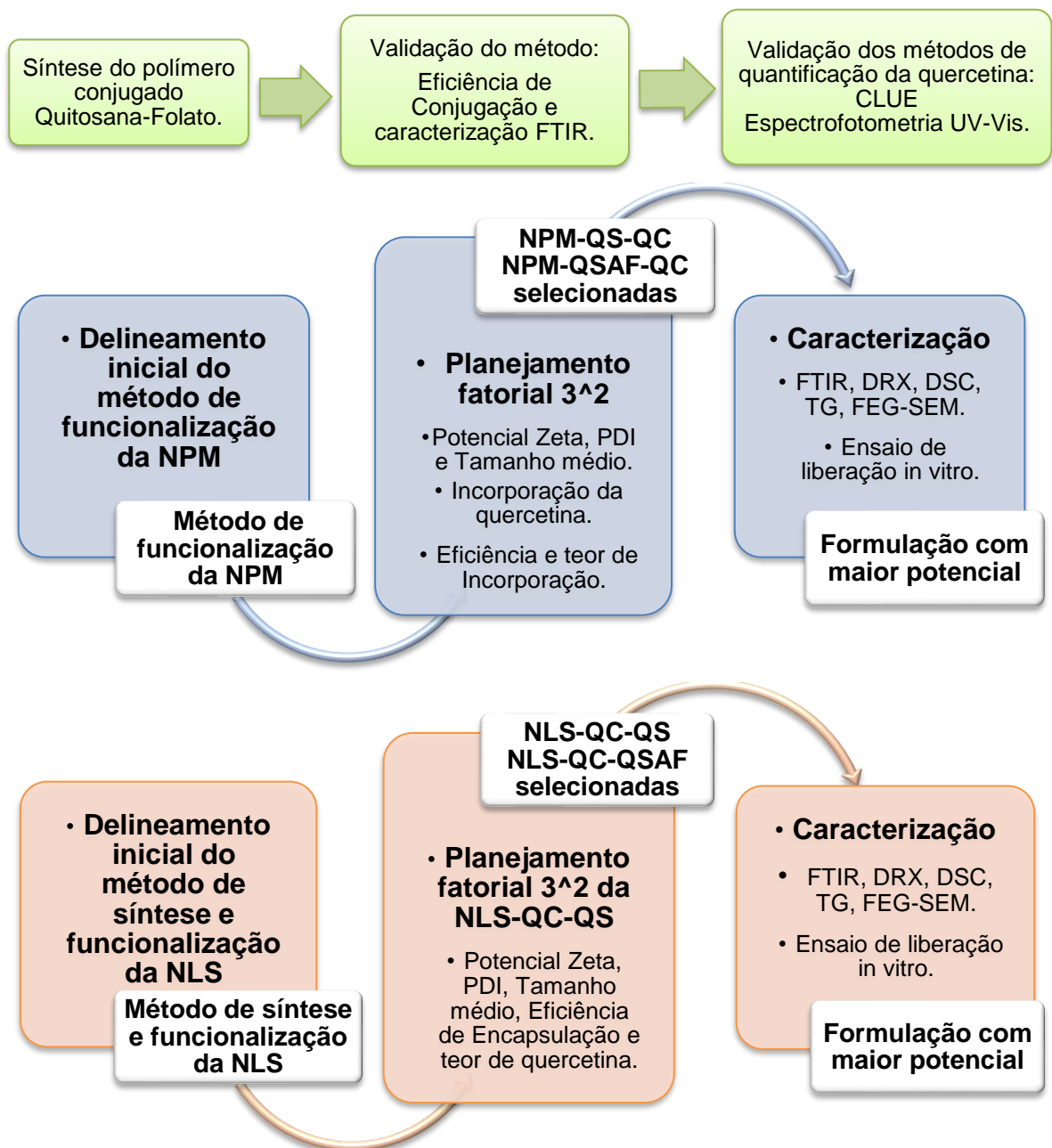
4.1 MATERIAIS

- Quercetina ($\geq 95\%$, SIGMA-ALDRICH Brasil Ltda, Cotia, Brasil)
- Quitosana (baixo peso molecular, SIGMA-ALDRICH Brasil Ltda, Cotia, Brasil)
- Ácido fólico ($\geq 97\%$, SIGMA-ALDRICH Brasil Ltda, Cotia, Brasil)
- EDC (SIGMA-ALDRICH Brasil Ltda, Cotia, Brasil)
- Ácido esteárico (REATEC Reagen Produtos para Laboratórios Ltda, Colombo, Brasil)
- Polietilenoglicol (PEG 4000)
- Monooleato de sorbitano (Span[®] 80)
- Monooleato de sorbitano etoxilado (Tween[®] 80)
- KBr (Biotec EIRELI-ME, São José dos Pinhais, Brasil)
- NaOH (Vetec Quimica Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil)
- Água destilada (modelo 724/2-A, FANEM LTDA, São Paulo, Brasil)
- Água ultrapura (Milli-Q[®], MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos)
- Dimetil Sulfoxido (DMSO, NEON Comercial Ltda, Suzano, Brasil)
- Ácido acético Glacial (Biotec EIRELI-ME, São José dos Pinhais, Brasil)
- Metanol grau HPLC (Lichrosolv Reag. Ph Eur Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH Brasil Ltda, Cotia, Brasil)
- Soro fetal bovino (Vitrocell Com. de produtos para laboratório Ltda, Campinas, Brasil)
- Piruvato (SIGMA-ALDRICH Brasil Ltda, Cotia, Brasil)
- L-GLUTAMINA (SIGMA-ALDRICH Brasil Ltda, Cotia, Brasil)
- MTT (SIGMA-ALDRICH Brasil Ltda, Cotia, Brasil)
- SRB (SIGMA-ALDRICH Brasil Ltda, Cotia, Brasil)
- FILTRO PARA SERINGA PTFE (polietrafluretileno) (0,2 μm x 13 mm, Cromafil[®])
- TUBO PARA CENTRÍFUGA (Amicon[®] Ultra 10.000 MW Millipore, Bedford, MA, EUA)

4.2 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

Este estudo consiste no desenvolvimento de nanopartículas magnéticas (NPMs) e nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) revestidas com quitosana-folato (QSAF) para liberação direcionada de quercetina em células de câncer de cólon. O fluxograma experimental deste trabalho está sintetizado na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma das etapas de desenvolvimento da pesquisa.



Fonte: A autora.

Inicialmente, o polímero de revestimento quitosana-folato foi sintetizado e os métodos de quantificação deste estudo foram validados conforme a Resolução 166/2017 da ANVISA. Em seguida, os métodos de desenvolvimento das nanopartículas foram selecionados buscando o menor diâmetro médio, menor índice de polidispersão e maior potencial Zeta (em módulo), tanto para as nanopartículas magnéticas quanto as nanopartículas lipídicas sólidas.

Com o melhor método escolhido, foi feito um planejamento fatorial 3^2 para otimização da formulação com uma quantidade limitada de experimentos, conforme as variáveis resposta definidas. As formulações selecionadas foram caracterizadas por métodos quantitativos, microscópicos e físico-químicos. Ainda, foi analisado o ensaio de liberação *in vitro* das formulações finais para melhor caracterizar o sistema desenvolvido e concluir com a formulação de maior potencial.

4.3 SÍNTESE DO CONJUGADO DE ÁCIDO FÓLICO E QUITOSANA (QSAF)

Para a funcionalização e direcionamento das nanopartículas foi realizada a conjugação do ácido fólico (AF) com a quitosana por método adaptado de Nejadshafiee *et al.* (2019) e Profirio e Pessine (2018).

Resumidamente, uma solução de AF (0,73 g) e cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) (0,69 g) em DMSO anidro (50 mL) foi agitada até dissolução total à temperatura ambiente. A solução obtida foi adicionada gota a gota à solução de QS (0,5% p/v) em 100 mL de ácido acético 0,1 M (pH 4,7) e agitada à temperatura ambiente protegido da luz por 24 h. Ao final da reação, o pH foi corrigido para 9,0 pela adição de NaOH 1 M para precipitação do conjugado.

O conjugado QSAF foi então coletado por centrifugação a 5000 rpm por 15 min seguido de lavagem com água destilada e posterior liofilização. O sobrenadante foi reservado para posterior quantificação. Este conjugado foi utilizado para funcionalização das NPMs e revestimento das NLSs.

4.3.1 Quantificação de ácido fólico por espectrofotometria UV-Vis

Para caracterização do conjugado, LI *et al.* (2011), Profirio e Pessine (2018) e Yang *et al.* (2010) descrevem métodos de espectrofotometria UV-Vis que foram

adaptados neste estudo para quantificar o ácido fólico conjugado na quitosana. A validação do método foi detalhada no Apêndice B deste trabalho.

A quantificação do ácido fólico no conjugado de quitosana-folato foi determinada de forma indireta por meio da quantificação do sobrenadante após centrifugação do precipitado a partir do método validado de quantificação em Espectrofotômetro UV-Vis (M51, BEL ENGINEERING, Monza, Itália). O sobrenadante foi coletado e diluído (1:200 v/v) no mesmo solvente da reação (DMSO:0,1 M ácido acético na proporção 1:2 (v/v) com correção de pH até 9 pela adição de NaOH 1 M).

A leitura de absorvância (y) e concentração de AF livre (x) foram calculados a partir da equação da curva de calibração do método validado anteriormente. Já o AF conjugado (AFc) e a eficiência de conjugação (Ec) foram calculados seguindo as equações a seguir, com correção do fator de diluição.

$$AFc = [AF_{teórico}] - [AF_{livre}] \quad (1)$$

AF: ácido fólico; AFc: ácido fólico conjugado; AF_{teórico}: ácido fólico adicionado na reação; AF_{livre}: ácido fólico quantificado;

$$EC (\%) = \frac{[AF_{teórico}] - [AF_{livre}]}{[AF_{teórico}]} \times 100 \quad (2)$$

EC: eficiência de conjugação; AF_{teórico}: ácido fólico adicionado na reação; AF_{livre}: ácido fólico quantificado;

4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada em Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR*)

Para confirmar a conjugação entre a quitosana e o ácido fólico, o composto foi analisado em *FTIR*, modelo IR Prestige-21 com acessório de refletância difusa (SHIMADZU, Quito, Japão). As análises foram realizadas com 4 mg de QSAF e 196 mg de KBr em intervalo de 400 a 4000 cm⁻¹, 32 scan.min⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹.

4.4 DESENVOLVIMENTO DA NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA

As nanopartículas magnéticas (NPM) foram gentilmente cedidas por Andris Figueiroa Bakuzis, da Universidade Federal de Goiás. Elas foram preparadas pelo método de co-precipitação à base de ferrita de manganês modificadas ou não por

revestimento com citrato descrito por Itri *et al.* (2001) e Branquinho *et al.* (2013), seguindo a estequiometria da reação: $1Mn^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH \rightarrow MnFe_2O_4 + 4H_2O$.

Resumidamente, uma solução contendo 90 mL de metilamina (CH_3NH_2) em 400 mL de água destilada é mantida sob agitação e aquecida até ebulição. Em seguida, é adicionado 50 mL de soluções de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de cloreto de manganês tetra hidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) e 1 mol.L^{-1} de cloreto férrico hexa hidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), mantidos em agitação e ebulição por 30 minutos seguido de separação magnética. Ainda, para proteger a superfície da nanopartícula, é feita a passivação com a adição de 50 mL de uma solução de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de nitrato de ferro ($Fe(NO_3)_3$), seguido também por agitação, ebulição e separação (Zufelato, 2018).

O recobrimento com citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$) é feito diluindo-se as partículas em água e adicionando o citrato de sódio em uma proporção de 1:10 mol de citrato de sódio para ferro da amostra. Essa solução é aquecida até $80^\circ C$ e agitada por 10 minutos para posterior separação magnética. As NPM são dispersas em água para formar o fluido magnético, uma solução coloidal estável (Zufelato, 2018).

4.4.1 Funcionalização das nanopartículas e Incorporação da quercetina

A funcionalização da NPM e incorporação da quercetina foi realizada por diferentes métodos até definir o melhor método seguido no planejamento fatorial. Para a definição do melhor método foram feitas adaptações dos trabalhos descritos por Natesan *et al.* (2017) e Algharib *et al.* (2022), Apriceno *et al.* (2021) e o método de Zufelato (2018) seguido pela técnica de incorporação do fármaco de Islam *et al.* (2017), conforme exemplificado no quadro abaixo (Quadro 1). Os valores de potencial Zeta, tamanho médio, índice de polidispersão e micrografias (*FEG-SEM*) foram utilizados para concluir a melhor funcionalização da NPM.

Quadro 1 – Métodos de funcionalização das NPMs e incorporação da quercetina.

(continua)

Referências	Detalhamento do método adaptado
Natesan <i>et al.</i> (2017) e Algharib <i>et al.</i> (2022)	Inicialmente, a NPM foi submetida à 15 min de banho de ultrassom. Foi preparada uma solução de QS em 100 mL de ácido acético 2% ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) sob agitação magnética "overnight". Após dissolução, foi adicionado 100 mL de NPMs ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) e 2 mL de solução etanólica de QC (5 mg.mL^{-1}). Sob agitação mecânica foi gotejado 100 mL de TPP ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) e mantido em agitação por mais 3 h. Após, a formulação foi centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos e o precipitado foi suspenso em 10 mL de água.

Quadro 1 – Métodos de funcionalização das NPMs e incorporação da quercetina.

(conclusão)

Apriceno <i>et al.</i> (2021)	As NPMs (40 mg ou 1,05 mL) foram diluídas em 2 mL de água por sonicação de 10 minutos (amplitude 60% 2 seg on 2 seg off) em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado 2 mL de solução aquosa de ácido acético (1% v/v) contendo 8 mg de QS e sonicado por mais 30 minutos (6 ciclos de 5 minutos). Após 30 min, a fim de precipitar a QS nas NPMs, 10 mL de NaOH 1 M foram adicionados. As nanopartículas revestidas foram recuperadas por centrifugação 10000 rpm por 5 minutos e lavadas com água. O precipitado foi suspenso em 4 mL de água por 10 minutos no sonicador (amplitude 60% 2 s on 2 s off).
Zufelato (2018)	A solução de revestimento foi preparada com 25 mg de quitosana em 25 mL de ácido acético 2% sob agitação magnética overnight. Esta solução polimérica foi mantida em agitador shaker (1500 rpm) e adicionado 0,25 mL do fluido magnético aquoso contendo 9,5 mg de NPM. Após 1 hora de agitação, a suspensão foi colocada em separação magnética lateral por 15 dias. As NPMs foram coletas e suspensas em 1 mL de água destilada sob sonicador 1 minuto (amplitude 80% 2 s on 2 s off). Em seguida, a incorporação da QC seguiu adaptações de Islam <i>et al.</i> (2017) descrita no item 4.6.2.

Fonte: A autora.

4.4.2 Incorporação da quercetina nas NPMs

A incorporação da quercetina foi feita a partir de adaptações de Islam *et al.* (2017) com a formulação sintetizada conforme adaptações de Zufelato (2018). Foi adicionado 10 mg de NPMs funcionalizadas com quitosana (NPM-QS) em 10 mL de solução etanólica de QC ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A mistura foi agitada em agitador shaker (1500 rpm) por 1 hora, incubada em repouso por 24 h e, em seguida, separada magneticamente por 15 dias. Após a separação, as NPM-QS-QC foram coletadas, suspensas em 1 mL de água destilada e sonicadas por 1 minuto (amplitude 80% 2 s on 2 s off).

4.4.3 Teor e Eficiência de Incorporação da quercetina nas NPMs

A Eficiência de Incorporação (EI) e o teor foram avaliados pela quantificação do sobrenadante por método validado em espectrofotômetro UV-Vis (M51, BEL ENGINEERING, Monza, Itália) e detalhado no Apêndice A deste trabalho. Após separação magnética lateral da suspensão de nanopartículas, a incorporação da QC foi calculada indiretamente conforme a equação 3 e o teor conforme a equação 4.

$$EI (\%) = \frac{[QC_{\text{teórico}}] - [QC_{\text{livre}}]}{[QC_{\text{teórico}}]} \times 100 \quad (3)$$

EI: eficiência de incorporação; $QC_{\text{teórico}}$: quercetina adicionada; QC_{livre} : quercetina quantificada;

$$\text{Teor (\%)} = \frac{\text{massa de QC na NPM}}{\text{massa de NPM}} \times 100 \quad (4)$$

QC: quercetina; NPM: nanopartícula magnética;

4.4.4 Planejamento fatorial 3² das NPMs

Com a definição do método de preparo das NPMs (Zufelato, 2018), foi realizado o delineamento fatorial 3² com avaliação aleatória de dois fatores em três níveis (nível inferior (-), nível intermediário (0) e nível superior (+)). A quantidade de NPM foi fixada em 9,5 mg (250 µL) e o volume da solução polimérica fixado em 25 mL. Os fatores modificáveis e os níveis escolhidos estão descritos na Tabela 1, sendo a concentração da solução de quitosana e a temperatura do agitador orbital shaker.

As variáveis de resposta ou variáveis dependentes escolhidas foram diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI) das partículas e potencial Zeta. Todas as possíveis combinações dos fatores escolhidos resultaram em nove diferentes formulações realizados em duplicata (18 experimentos).

Tabela 1 - Níveis e fatores do planejamento experimental 3².

Níveis de planejamento	Nível inferior	Nível intermediário	Nível superior
Fatores	-	0	+
Quitosana	0,5 mg.mL ⁻¹	1 mg.mL ⁻¹	2 mg.mL ⁻¹
Temperatura de agitação	20 °C	30 °C	40 °C

Fonte: A autora.

4.5 DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Assim como as NPMs, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) também foram preparadas por diferentes métodos definição do método que deu continuidade ao planejamento fatorial. Conforme exemplificado no quadro abaixo (Quadro 2), foram feitas adaptações dos trabalhos descritos por Sandri *et al.* (2017) e Vijayakumar *et al.* (2017). O melhor método foi escolhido avaliando o potencial Zeta, tamanho médio, índice de polidispersão e micrografias *FEG-SEM*. As NLSs foram funcionalizadas tanto com quitosana quanto com quitosana-folato para posterior comparação.

Quadro 2 – Métodos de preparo das NLSs.

Referências	Detalhamento do método adaptado
Vijayakumar <i>et al.</i> (2017) e Sandri <i>et al.</i> (2017)	1. A síntese da NLS foi feita após verter fase aquosa (FA) na fase oleosa (FO) sob agitação magnética. A FO é composta por ácido esteárico (200 mg), Span 80® (30 mg), quercetina (5 mg) e PEG 400 (100 mg). A FA é composta por Tween 80® (125 mg) em água destilada (10 g). Ambas as fases foram aquecidas a 70°C. Após verter a FA na FO foi feita sonicação de 6 minutos com amplitude de 60% com pulsos de 2 segundos “on” e “off”. Na sequência a dispersão foi resfriada em banho de gelo. Neste método, o revestimento polimérico foi feito após a síntese das NLS, adicionando as nanopartículas na solução de quitosana-folato 1 mg.mL ⁻¹ (1:1, v/v) e mantendo em agitação magnética por 1 hora, seguido de armazenamento em geladeira.
	2. As concentrações dos componentes da formulação, de FO foram mantidas como no método 1. O revestimento foi realizado alterando a água da fase aquosa pela solução de QSAF 1 mg.mL ⁻¹ em ácido acético 2% (revestimento <i>in situ</i>). A FA foi vertida na FO sob agitação magnética vigorosa de 30 minutos, mantendo em 70°C. Em seguida, a formulação foi sonicada por 5 minutos com amplitude de 80% com pulsos de 2 segundos “on” e “off” e resfriada em banho de gelo.
	3. Neste método, foi alterado a forma de adição da FA na FO, sendo adicionada lentamente por gotejamento (taxa de 1 mL.min ⁻¹) sob agitação magnética vigorosa de 30 minutos. Em seguida, a formulação também foi sonicada por 5 minutos (amplitude de 80% com pulsos de 2 s “on” e “off”) e resfriada em banho de gelo.

Fonte: A autora.

4.5.1 Planejamento fatorial 3² das NLSs

Após selecionar o melhor método do item anterior (variação 3), foi realizado o delineamento fatorial 3² com avaliação aleatória de dois fatores em três níveis (nível inferior (-), nível intermediário (0) e nível superior (+)). A quantidade dos componentes da fase oleosa foi fixada. Os fatores modificáveis, concentração da solução polimérica e tempo de sonicação, com os respectivos níveis escolhidos estão descritos na Tabela 2. As variáveis de resposta ou variáveis dependentes foram diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI) das partículas, potencial Zeta, eficiência de encapsulação e teor de quercetina. Todas as possíveis combinações dos fatores escolhidos resultaram em 9 diferentes formulações realizadas em duplicata (18 experimentos).

Tabela 2 - Níveis e fatores do planejamento experimental 3².

Níveis de planejamento	Nível inferior	Nível intermediário	Nível superior
Fatores	-	0	+
Quitosana	0,5 mg.mL ⁻¹	1 mg.mL ⁻¹	2 mg.mL ⁻¹
Sonicação	5 minutos	10 minutos	15 minutos

Fonte: A autora.

4.5.2 Teor e Eficiência de Encapsulação da quercetina nas NLSs

A quercetina encapsulada foi determinada conforme descrito por Oliveira *et al.* (2021). As suspensões das nanopartículas foram centrifugadas em uma ultracentrífuga (Table Top Refrigerate Centrifuge Z 326 K, HERMLE LABORTECHNIK GmbH, Alemanha), 3880.g a 4°C durante 30 min, utilizando dispositivos centrífugos (Amicon® Ultra 10.000 MW Millipore, Bedford, MA, EUA). O concentrado foi solubilizado em metanol até concentração teórica de 10 µg.mL⁻¹ para quantificação do fármaco encapsulado pelo método validado de CLUE detalhado no Apêndice A deste trabalho.

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada pela diferença entre a concentração total de fármaco adicionado à formulação e a concentração de fármaco quantificada (Eq. 5 e 6).

$$EE (\%) = \frac{[QC_{teórico}] - [QC_q]}{[QC_{teórico}]} \times 100 \quad (5)$$

EE: eficiência de encapsulação; QC_{teórico}: quercetina adicionada; QC_q: quercetina quantificada;

$$Teor (\%) = \frac{\text{massa de QC na NLS}}{\text{massa de NLS}} \times 100 \quad (6)$$

QC: quercetina; NLS: nanopartícula lipídica sólida;

4.6 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

4.6.1 Avaliação da estabilidade da quercetina

Inicialmente, foi realizado uma avaliação da estabilidade da QC em 13 diferentes meios de dissolução variando solvente, pH, antioxidante e/ou tensoativos, para garantir a correta quantificação do fármaco no meio. O teste foi realizado em triplicata, sob agitação magnética (1500 rpm), ao abrigo da luz, em temperatura ambiente durante 24 h, sendo avaliado por espectrofotômetro UV-Vis com varredura entre 200 e 400 nm e quantificação nos tempos de 1, 2, 4, 8 e 24 horas.

Assim, uma solução metanólica de 50 µg.mL⁻¹ de quercetina foi diluída para obter soluções de 10 µg.mL⁻¹ nos seguintes meios de dissolução: água:metanol 65:35 (v/v), tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,4, PBS pH 7,4:PEG 400 8:2 (v/v), PBS pH

7,4 com 0,5% de tween 80[®] (m/v), PBS pH 5,8, PBS pH 5,8:PEG 400 8:2 (v/v) e PBS pH 7,4 com 0,5% de tween 80[®] (p/v). Quando o PBS foi utilizado sozinho ou em mistura com PEG 400 ou tween 80[®] foi avaliado o efeito da adição de metabissulfito de sódio 1% (p/v) sobre a estabilidade da quercetina.

4.6.2 Avaliação da solubilidade da quercetina

A solubilidade da quercetina foi avaliada no meio de dissolução selecionado após avaliação da estabilidade para respeitar a condição *sink* do ensaio, concentração de fármaco suficientemente quantificada sem que haja saturação do meio. Em triplicata, foi adicionada uma quantidade em excesso de quercetina (até precipitação) em uma solução de 10 mL de tampão PBS pH 5,8 e tween 80[®] 0,5% (p/v). A mistura foi mantida sob agitação magnética (1500 rpm), ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, durante 24 h. Nos tempos 0 e 24 horas, a solução foi avaliada por espectrofotômetro UV-Vis com varredura entre 200 e 400 nm e quantificada pelo método previamente validado.

4.6.3 Liberação da quercetina pelas nanopartículas

O ensaio de dissolução foi realizado seguindo adaptações de Shah *et al.* (2013) em agitador orbital do tipo shaker a 100 rpm (430-RDBP, ETHIK TECHNOLOGY, Brasil), 37°C por 24 h. Eppendorfs contendo a suspensão de nanopartículas e o meio de dissolução na proporção 1:10 (v/v) foram preparados, e a velocidade de liberação do fármaco no meio foi avaliada nos tempos de 1, 2, 4, 8 e 24 horas, em triplicata. A quantificação e determinação da quercetina liberada foi quantificada pelo método espectrofotométrico previamente validado (Apêndice A) após centrifugação das amostras (10.000 rpm por 10 min a 4°C) em ultracentrífuga (Table Top Refrigerate Centrifuge Z 326 K, HERMLE LABORTECHNIK GmbH, Alemanha).

Para as NLS-QC-QS, o ensaio de dissolução foi avaliado variando os meios de dissolução com PBS pH 7,4 (corrente sanguínea), PBS pH 5,8 (microambiente tumoral) e PBS pH 5,8 com 0,5% de tween 80[®] (p/v) para fins comparativos. No ensaio das NLS-QC-QSAF, NPM-QS-QC e NPM-QSAF-QC, os parâmetros já descritos

foram mantidos, porém a análise foi feita apenas com o meio de PBS pH 5,8 com adição de tween 80[®] 0,5% (p/v).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados, com regressão linear dos mínimos quadrados ou regressão fatorial, análise de variância (ANOVA), considerando um p com nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$) e com teste *post-Hoc* de Tukey, e plotagem dos gráficos foi realizada com o auxílio dos softwares Minitab[®] 21.4.1, OriginPro[®] 9.0 e Microsoft Excel365[®].

4.8 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DESENVOLVIDOS

4.8.1 Potencial Zeta e tamanho de partícula

O potencial Zeta das NPMs e das NLSs foram avaliados em diferentes diluições (1:15 a 1:15000 v/v) em água ou cloreto de potássio 1 M no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (MALVERN INSTRUMENTS, Worcestershire, Reino Unido) por Micro-eletoforese de Laser Doppler até definir o melhor preparo de amostra. Assim, a análise foi realizada em triplicata, a 20°C, partir da amostra diluída em água destilada na proporção 1:200 e 1:15 (v/v), para NPM e NLS, respectivamente. Juntamente, foi avaliado o diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão das amostras pela técnica de espalhamento dinâmico de luz no mesmo equipamento.

4.8.2 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (*Field Emission Gun Scanning Eletron Microscopy - FEG-SEM*)

As micrografias por *FEG-SEM* (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca) foram realizadas em diferentes aumentos, após diluição da amostra em água destilada (1:500 e 1:200 v/v, NLS e NPM, respectivamente) e secagem na superfície dos stubs. As amostras também foram recobertas com ouro (metalizador IC-50 Ion Coater, SHIMADZU, Quioto, Japão) para avaliar as características morfológicas e o tamanho das partículas. Já para a análise dos compostos puros, os pós foram

dispostos em fita de carbono na superfície do stub e analisadas após revestimento com ouro.

4.8.3 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo com detector *STEM* acoplado (*STEM-in-FEG-SEM* - *Scanning transmission electron microscopy*)

A NPM-citrato também foi analisada por micrografias em *STEM* acoplado ao *FEG-SEM* (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca) para complementar a avaliação das características morfológicas. Para isto, a amostra foi diluída em água destilada para uma concentração de 2 mg.mL⁻¹ e seca na superfície do grid próprio para análise sem a necessidade de tingimento.

4.8.4 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho por transformada em Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - *FTIR*)

Os compostos foram analisados por FTIR, modelo IR Prestige-21 com acessório de refletância difusa (SHIMADZU, Quito, Japão). As pastilhas foram preparadas com 4 mg de amostra e 196 mg de KBr. As análises foram realizadas em intervalo de 400 a 4000 cm⁻¹, com 32 scan.min⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹.

4.8.5 Avaliação por difração de Raio-X (X Ray Diffraction - DRX)

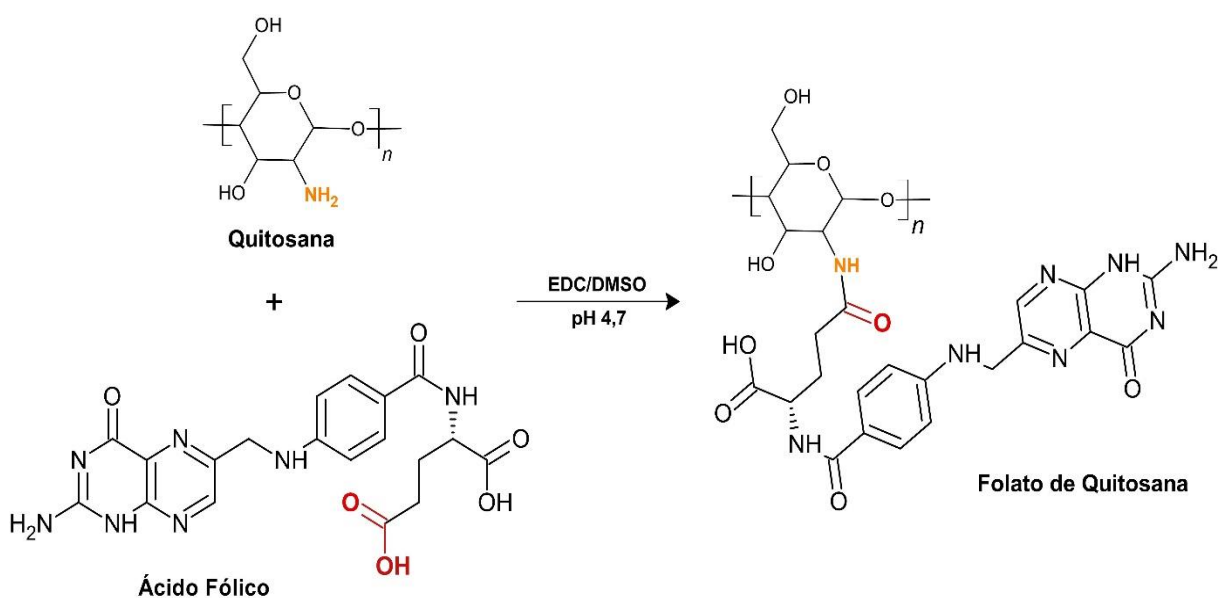
Os compostos foram analisados em difratômetro de raio X modelo Ultima IV (RIGAKU, Tóquio, Japão), operado com scan de 2°.min⁻¹, 2 θ e varredura de 5° a 50°, radiação K α de cobre ($\lambda=1.5418\text{\AA}$), corrente de 30 mA e voltagem 40 kV.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DE QUITOSANA-FOLATO

O folato de quitosana é sintetizado por conjugação do grupo carboxílico do ácido fólico (R-COOH) com a amina da quitosana (R-NH₂). Esta conjugação é promovida pela carbodiimida, EDC, um agente de acoplamento que aumenta a reatividade de grupamentos de ácidos carboxílicos frente a ataques nucleofílicos. Inicialmente, o EDC reage com R-COOH do AF formando um intermediário (O-acil-isouréia), que irá reagir com R-NH₂ da QS sintetizando o conjugado por ligação amida (Figura 11) (Li *et al.*, 2011; Profirio; Pessine, 2018).

Figura 11 - Representação esquemática da reação de conjugação QSAF.



Fonte: A autora.

5.1.1 Eficiência de conjugação e teor de ácido fólico

Para quantificar a concentração de ácido fólico livre, o sobrenadante do centrifugado foi diluído na proporção 1:200, obtendo uma absorbância de 0,6843 em 285 nm. A equação da reta do método validado, detalhado no Apêndice B deste trabalho, foi utilizada para calcular a concentração de AF livre (13,18 µg.mL⁻¹). Aplicando, o fator de correção da diluição (1:100 v/v), obtemos uma concentração de 1,318 mg.mL⁻¹ (DP ± 0,14).

Assim, o AFc e a EC foram calculados conforme as equações 1 e 2 descritas no tópico de materiais e métodos. Portanto, o conjugado QSAF sintetizado neste estudo, contém 3,55 mg de AFc (DP \pm 0,14) com EC de 72,92% (DP \pm 0,3), eficiência semelhante aos resultados relatados por Yang *et al.* (2010), um estudo semelhante de síntese de folato de quitosana com variação na faixa de 50 - 80% de eficiência (Yang *et al.*, 2010).

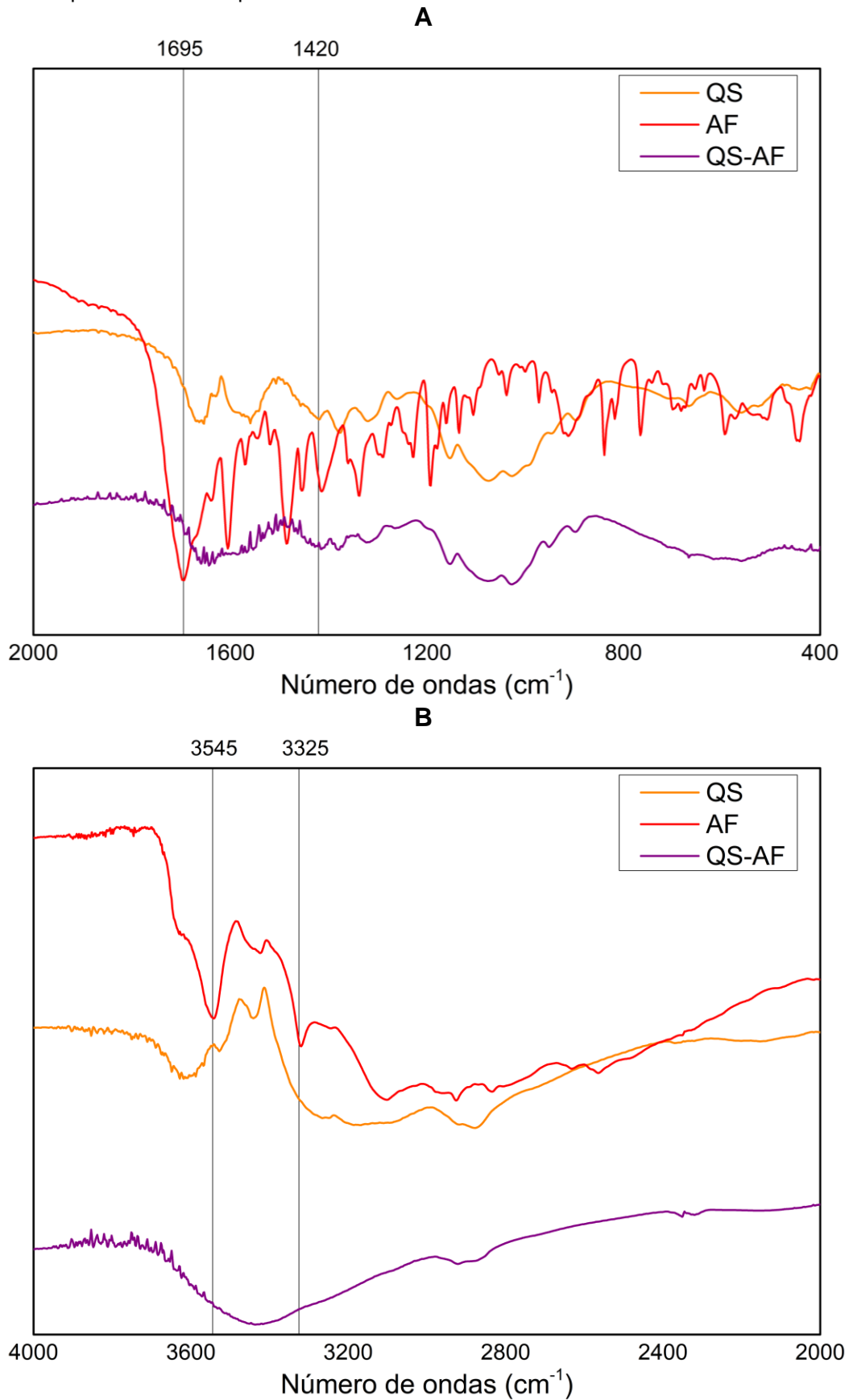
5.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada em Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR*)

Ainda para caracterização, a conjugação do ácido fólico com a quitosana foi confirmada pelos espectros de infravermelho por transformada de Fourier (Figura12). O ácido fólico puro apresentou bandas características em 1695 cm^{-1} referente à ligação C=O (Li *et al.*, 2011), em 1695 cm^{-1} referente ao grupo R-COOH, em 1420 cm^{-1} característica de ligação C=N, banda do anel pteridina em 1609 cm^{-1} e banda de vibração R-NH em 3425 cm^{-1} (Amiryaghoubi *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2011). A quitosana apresentou bandas características em 1554 cm^{-1} indicando a presença da amida secundária, em 1657 cm^{-1} referente à amida primária e banda em 3439 cm^{-1} característica do grupo R-OH (Darroudi *et al.*, 2021; Ding *et al.*, 2023).

Com o espectro do conjugado quitosana-folato foi observado o aparecimento de banda larga em 3432 cm^{-1} pela sobreposição do R-OH (3541 cm^{-1}) e NH da amida secundária (3323 cm^{-1}) e da amina primária (3425 cm^{-1}) do ácido fólico e da amina primária (3439 cm^{-1}) da quitosana. A conjugação também pode ser confirmada com o desaparecimento da banda em 1554 cm^{-1} da amina secundária da QS e com o deslocamento da amida primária de 1657 cm^{-1} para 1644 cm^{-1} , indicando a ligação COOH-NH₂ do ácido fólico com a quitosana. Além disso também houve um deslocamento da banda em 1418 cm^{-1} indica o alongamento do anel pteridina do AF (Islam *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com outros estudos já publicados, indicando que a reação de conjugação do ácido fólico com a quitosana foi bem-sucedida.

Figura 12 - Espectros de FTIR quitosana-folato.



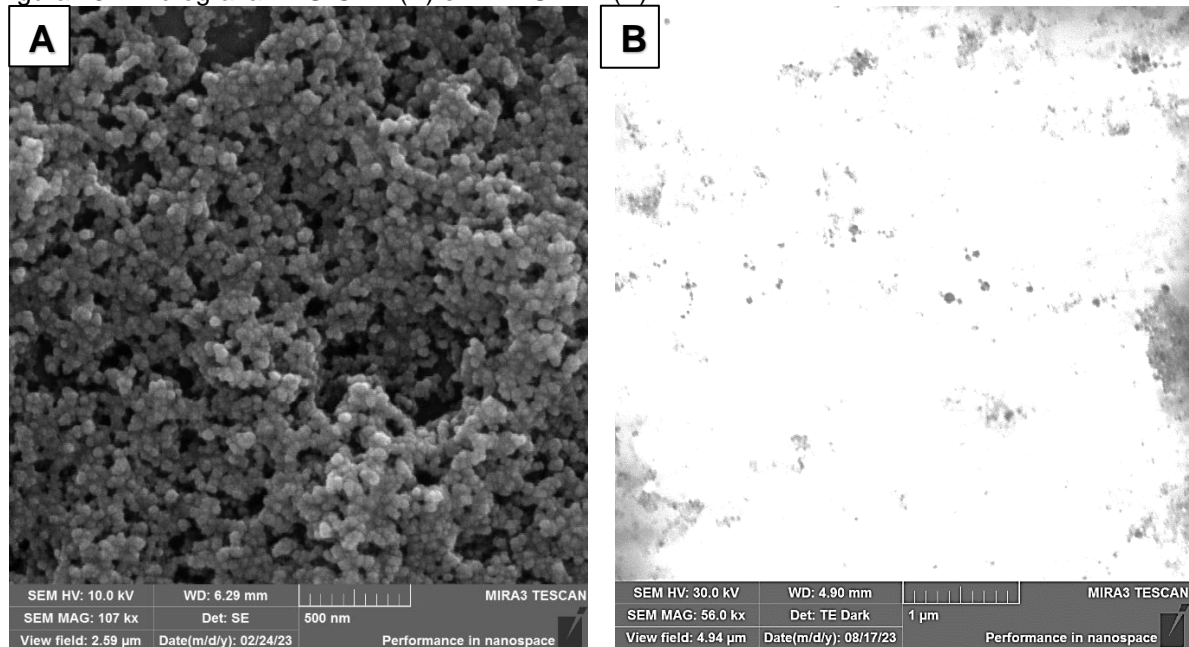
A: Espectro na faixa de 2000 a 400 cm^{-1} ; B: Espectro na faixa de 4000 a 2000 cm^{-1} ;
Fonte: A autora.

5.2 DESENVOLVIMENTO DA NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA

O desenvolvimento da formulação de nanopartículas magnéticas foi iniciado com testes de funcionalização com a NPM-citrato, seguido de análises de potencial Zeta, diâmetro médio, PDI e microscopia *FEG-SEM* para comparação.

As NPMs sintetizadas por co-precipitação e revestidas com citrato foram disponibilizadas pelo Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu em parceria com o grupo de pesquisa do professor Dr. José Ricardo de Arruda Miranda. As nanopartículas apresentaram morfologia esférica (variando de 20 a 60 nm) e tendência de aglomeração (Figura 13) com tamanho médio de 61,38 nm (DP \pm 7,01) e potencial Zeta -23,93 mV (DP \pm 1,45) conforme já demonstrado por outros autores (Branquinho *et al.*, 2013; Zufelato, 2018).

Figura 13 - Micrografia *FEG-SEM* (A) e *MEV-STEM* (B).



Fonte: A autora.

Conforme descrito na literatura, o revestimento polimérico da superfície de NPMs é necessário para aumentar a biocompatibilidade e reduzir a toxicidade para aplicação biomédica, principalmente quando se trata de sistemas *drug delivery*. Diferentes técnicas de funcionalização podem ser empregadas, tanto *in situ* quanto pós-síntese (Aisida *et al.*, 2020; Bohara; Thorat; Pawar, 2016). Neste trabalho, a funcionalização com quitosana (QS) e incorporação da quercetina (QC) foram realizadas por três diferentes métodos conforme descritos no Quadro 1 (tópico 4.4.1):

gelificação iônica (FM1), por sonicador (FM2) e por agitador shaker (FM3). A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos em cada variação.

Tabela 3 - Resultados das formulações magnéticas desenvolvidas por diferentes métodos.

Formulações	Potencial Zeta* (mV)	Diâmetro médio* (nm)	PDI*
NPM	-23,93 ± 1,45 ^C	61,38 ± 7,01 ^C	0,27 ± 0,06 ^C
FM 1	-19,57 ± 2,04 ^C	635,37 ± 81,93 ^A	0,78 ± 0,07 ^A
FM 2**	-14,30 ^B	657,80 ^A	0,50 ^B
FM 3	29,97 ± 2,33 ^A	483,57 ± 4,63 ^B	0,49 ± 0,05 ^B

Médias que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes.

*significância estatística ($p < 0,05$).

**FM2 foi avaliada não em triplicata.

Fonte: A autora.

Considerando que, quanto menor o tamanho médio da partícula melhor será a permeabilidade no sítio ativo (efeito EPR), nanopartículas na faixa de 10 a 200 nm são consideradas com tamanho ótimo para permear e ficarem retidos no interior do tumor (efeito EPR) escapando da eliminação hepática. Entretanto, diversos fatores influenciam na produção de nanopartículas magnéticas, dependendo do objetivo de aplicação, e ainda serão discutidos aqui. Neste momento, consideramos ótimo o método que apresente o menor tamanho de partículas e o menor PDI para garantir homogeneidade e as propriedades das nanoformulações. Em relação ao potencial Zeta, que representa as cargas superficiais, deseja-se valores próximos a $|30 \text{ mV}|$ (em módulo), evidenciando maior estabilidade eletrostática do sistema e menor tendência à aglomeração (Belanova *et al.*, 2018; Danaei *et al.*, 2018; Purushotham *et al.*, 2009; Wu, 2021).

Também é importante ressaltar as limitações dos métodos de medição do tamanho de partícula e PDI. O uso da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic light scattering - DLS*) avalia amostras em suspensão aquosa, medindo tanto partículas agregadas quanto a camada de solvatação ao redor de cada partícula. Por isso, essa técnica estima valores de tamanho maiores do que os observados na microscopia eletrônica de varredura, na maioria das vezes. Este parâmetro também é discutido nas seções seguintes deste estudo (Agarwal *et al.*, 2018; Bhattacharjee, 2016; Kathe; Henriksen; Chauhan, 2014).

Comparativamente, o tamanho nanométrico mais próximo do desejado foi obtido apenas na FM3, com diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com

os demais métodos, sendo considerado inadequado os valores em FM1 e FM2. O PDI de FM2 e FM3 estão bem próximos entre si, sem diferença significativa, e apesar de apresentarem valores superiores a 0,3, ainda foram aceitos neste estudo como uma amostra parcialmente homogênea, diferentemente da FM1 onde o PDI de 0,8 indicaria não homogeneidade de tamanho entre as partículas.

Em relação ao potencial Zeta, espera-se que a funcionalização com quitosana (polímero catiônico) promova a inversão da carga negativa do citrato presente na NPM para uma carga positiva na NPM-QS, indicando uma funcionalização efetiva. Entretanto, este fenômeno é difícil de ser observado na FM1, visto que a funcionalização com QS foi realizada simultaneamente com a incorporação de QC (carga negativa). O potencial Zeta referente apenas a funcionalização com QS só pode ser comparado em FM2 e FM3, sugerindo que o método de funcionalização não foi efetivo em FM2.

Ao avaliar a diferença estatística pelo teste de ANOVA e Tukey, comprovamos que não houve diferença no potencial Zeta da amostra não funcionalizada (NPM) com a FM1, e, apesar de haver diferença significativa entre NPM e FM2, não foi considerado uma funcionalização efetiva por não haver a inversão de carga negativa para positiva e por não apresentar estabilidade eletrostática ($< |30|$ mV).

Portanto, a partir dos resultados obtidos, conclui-se que o melhor método de preparo foi a FM3 com os resultados mais satisfatórios de funcionalização da NPM com QS e menor tamanho de partícula, ambos com diferença estatística significativa. Por isso, a incorporação da QC ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi testada nesta formulação e será descrita no próximo tópico.

Ainda, foi realizado o teste prévio de estabilidade de 30 dias da formulação FM3 (Tabela 4). Observa-se que o potencial Zeta se manteve quase sem alteração, porém, após 30 dias pode-se dizer que houve agregação das nanopartículas já que o PDI atingiu 0,71 e o diâmetro médio teve um aumento significativo de 30% chegando a 607,9 nm.

Ao aplicar o teste de ANOVA com post-Hoc de Tukey, nota-se que não houve diferença significativa entre as médias de potencial Zeta, diâmetro médio e PDI. Portanto, durante todo o estudo de estabilidade da FM3, pode-se dizer que a formulação não sofreu alterações significativas na estabilidade em relação a carga superficial, tamanho de partícula e homogeneidade do fluido magnético.

Tabela 4 - Estabilidade durante 30 dias da FM3 conforme Potencial Zeta, Diâmetro médio e PDI.

Dias	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro médio (nm)	PDI
0	29,97 ± 2,33 ^{ns}	483,57 ± 4,63 ^{ns}	0,49 ± 0,05 ^{ns}
7	24,80 ± 4,24 ^{ns}	478,00 ± 19,37 ^{ns}	0,43 ± 0,06 ^{ns}
15	25,10 ± 3,38 ^{ns}	459,80 ± 56,99 ^{ns}	0,62 ± 0,07 ^{ns}
30	25,00 ± 1,69 ^{ns}	607,90 ± 199,68 ^{ns}	0,71 ± 0,28 ^{ns}

ns: não significativa ($p > 0,05$).

Fonte: A autora.

5.2.1 Eficiência de incorporação da QC em NPM-QS.

A incorporação da quercetina na formulação FM3 (NPM-QS) consistiu na adição da NPM-QS em uma solução etanólica de QC ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) conforme metodologia validada e descrita no Apêndice A. Após separação magnética de 15 dias, a partir da equação 3 foi quantificado o sobrenadante com $25,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, correspondendo a $74,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de QC incorporada na NPM-QS-QC.

Esta eficiência de incorporação de 74,6% resultou em um teor de 6,94% de QC na formulação (Eq. 4). Notavelmente, a inversão de carga de positiva da NPM-QS ($29,97 \text{ mV} \pm 2,33$) para negativa ($-13,85 \text{ mV} \pm 4,6$) indica a efetiva incorporação da QC. Além disso, o aumento no tamanho das partículas de $483,57 \text{ nm}$ ($\text{DP} \pm 4,63$) para $530,85 \text{ nm}$ ($\text{DP} \pm 63,85$) sugere a presença da QC na NPM-QS.

5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL 3^2 NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA

Após selecionar a formulação FM3 como o método de funcionalização mais eficaz, foi conduzido um planejamento fatorial 3^2 para determinar a influência de fatores no processo de funcionalização das NPMs com quitosana, utilizando um número mínimo de experimentos. Com isso, a formulação otimizada de NPM-QS, com as características desejadas, será utilizada para incorporação da quercetina e continuação do estudo.

Buscando na literatura, diversos fatores podem influenciar no processo de funcionalização, como o método, a concentração, o tempo e o tipo do revestimento (Aisida *et al.*, 2020; Bohara; Thorat; Pawar, 2016). Neste trabalho, selecionamos a concentração de QS ($2, 1$ e $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) e a temperatura de agitação ($20, 30$ e $40 \text{ }^\circ\text{C}$)

como fatores que poderiam influenciar, sendo avaliado como resposta o potencial Zeta, diâmetro médio e PDI (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados do planejamento fatorial 3² de nanopartículas magnéticas.

Fatores		Variáveis Resposta			
A	B	Diâmetro médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	FEG-SEM (nm)*
-	-	161,43 ± 8,28	0,38 ± 0,03	-1,44 ± 9,75	37,54 ± 8,36
0	-	169,10 ± 4,95	0,35 ± 0,01	25,60 ± 0,26	46,29 ± 9,66
+	-	133,20 ± 2,01	0,31 ± 0,02	26,63 ± 0,74	31,45 ± 8,78
-	0	150,13 ± 2,11	0,28 ± 0,05	20,87 ± 1,08	24,46 ± 9,60
0	0	157,67 ± 1,78	0,28 ± 0,01	17,43 ± 0,51	34,21 ± 11,52
+	0	138,50 ± 2,10	0,38 ± 0,03	26,57 ± 0,55	30,09 ± 9,73
-	+	235,40 ± 6,22	0,40 ± 0,04	21,93 ± 0,06	32,57 ± 6,53
0	+	165,97 ± 3,10	0,38 ± 0,01	27,53 ± 0,76	38,75 ± 21,74
+	+	142,13 ± 1,36	0,35 ± 0,01	28,07 ± 1,27	36,15 ± 10,82
-	-	268,70 ± 91,75	0,39 ± 0,05	-22,17 ± 4,72	-
0	-	176,87 ± 4,90	0,32 ± 0,01	23,40 ± 0,62	-
+	-	129,40 ± 2,29	0,36 ± 0,01	28,97 ± 1,16	-
-	0	141,77 ± 0,46	0,26 ± 0,01	22,13 ± 0,85	-
0	0	146,33 ± 1,46	0,27 ± 0,01	21,47 ± 0,80	-
+	0	154,07 ± 1,96	0,39 ± 0,01	28,53 ± 0,23	-
-	+	265,77 ± 6,37	0,27 ± 0,05	17,43 ± 0,42	-
0	+	168,53 ± 3,65	0,39 ± 0,05	24,40 ± 1,23	-
+	+	147,23 ± 3,16	0,40 ± 0,04	28,33 ± 0,15	-

A: fator quitosana; B: fator temperatura.

*resultados FEG-SEM não foram considerados na análise fatorial.

Fonte: A autora.

Inicialmente, conclui-se que a quantidade de QS influenciou no aumento do potencial Zeta atingindo valores até 28,97 mV (DP ± 1,16) no nível alto (2 mg.mL⁻¹) quando combinado com uma temperatura de 20°C durante o processo de funcionalização, indicando uma boa estabilidade da formulação. No entanto, uma menor quantidade de QS em baixa temperatura (20°C) resultou em um potencial Zeta negativo, sugerindo que a funcionalização não foi eficaz nesta condição.

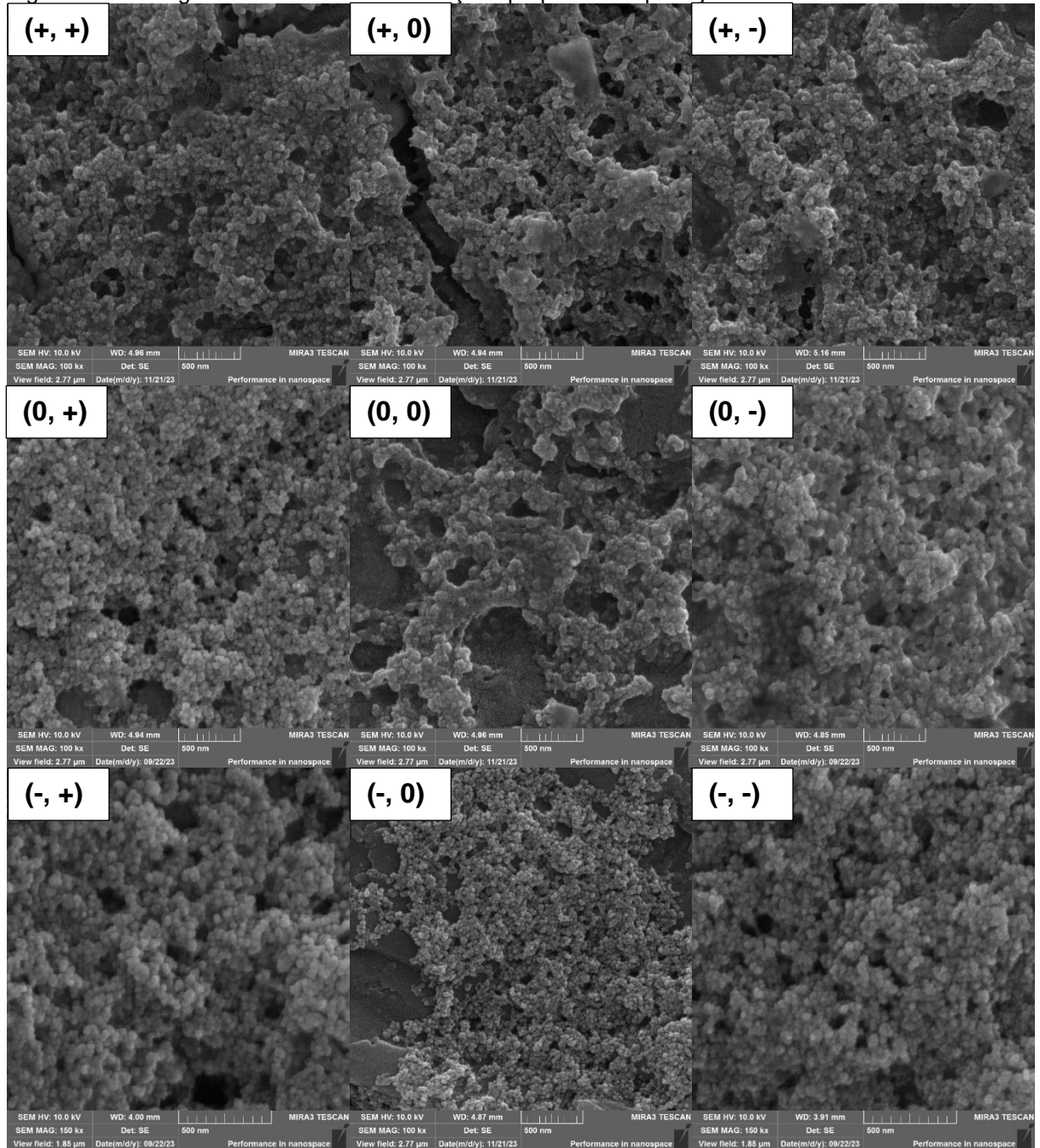
Quanto ao diâmetro médio, os resultados foram contraditórios. Com a adição de mais QS (+, +/-) espera-se obter partículas maiores, devido à formação de uma camada mais espessa ao redor delas. No entanto, na maioria dos experimentos foi observado menor tamanho no fator A em nível alto (+), e isto pode estar relacionada a maior estabilidade das partículas (justificado pelos maiores valores de potencial Zeta) pelo melhor revestimento reduzindo à tendência de aglomeração.

Considerando o princípio da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (*DLS*), onde há a possibilidade de medir aglomerados de partículas, foi feita uma avaliação complementar em *FEG-SEM*. A partir das micrografias (Figura 14), sugere-se esta outra observação podendo confirmar a hipótese anterior (Agarwal *et al.*, 2018; Bhattacharjee, 2016; Kathe; Henriksen; Chauhan, 2014).

A variação de tamanho foi muito pequena entre a adição de QS 0,5, 1 e 2 mg.mL⁻¹, em geral as partículas ficaram maiores com mais polímero e menor temperatura. Entretanto, essa diferença não foi evidenciada nos resultados de diâmetro médio por *DLS*, devido à alta tendência de aglomeração, também observada na análise de *FEG-SEM*, resultando em partículas maiores com menos QS pela técnica de *DLS*. No entanto, com o auxílio do software Image J, ao medir cerca de 100 nanopartículas em cada micrografia, encontramos tamanhos semelhantes, variando de 15 a 60 nm, com variações sutis entre as formulações (Tabela 5).

A funcionalização das NPMs com revestimento polimérico visa aumentar a estabilidade das partículas, promovendo repulsão estérica (barreira física) e/ou eletrostática (repulsão de cargas superficiais). O revestimento com QS resultou em maior estabilidade, reduzindo a tendência à aglomeração nas formulações com 1 e 2 mg.mL⁻¹ em comparação com 0,5 mg.mL⁻¹. Comparativamente, Yarjanli *et al.* (2019) também demonstraram nanopartículas de óxido de ferro com quercetina menores na análise *SEM* em comparação com a técnica de *DLS*.

Figura 14 - Micrografias *FEG-SEM* das variações propostas no planejamento fatorial.



Fonte: A autora.

A regressão múltipla linear para esta análise fatorial usa uma equação de segunda ordem para explicar a relação entre as variáveis fatoriais e a resposta desejada. Neste caso, a equação é expressa como $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_{12} + \beta_{11}x_{11}^2 + \beta_{22}x_{22}^2$, onde os coeficientes de regressão são representados por β_0 (constante), β_1 (quitosana), β_2 (temperatura), β_{12} (interação entre quitosana e temperatura), β_{11} (relação quadrática da quitosana) e β_{22} (relação quadrática da temperatura).

Os resultados experimentais estão apresentados na Tabela 5 e os coeficientes da análise de regressão na Tabela 6 conforme a significância apresentada ($p < 0,05$) para cada variável. O modelo de regressão linear quadrático foi validado apenas para o efeito potencial Zeta ($p < 0,05$), com R^2 de 0,6757 e $F_{calculado}$ (5) maior que $F_{tabelado}$ (3,84).

Tabela 6 - Coeficientes da regressão fatorial para as variáveis resposta.

Coeficientes	Diâmetro médio	PDI	Potencial Zeta
β_1	-121,0000 ^{ns}	-0,0450 ^{ns}	76,4000*
β_2	-18,0000 ^{ns}	-0,0274 ^{ns}	3,8700 ^{ns}
β_{12}	-0,5000 ^{ns}	0,0018 ^{ns}	-0,8960*
β_{11}	37,5000 ^{ns}	0,0081 ^{ns}	-0,0377 ^{ns}
β_{22}	0,3220 ^{ns}	0,0004 ^{ns}	-14,9800 ^{ns}
β_0	492,0000*	0,7120*	-109,6000*
R^2	0,5560 ^{ns}	0,3858 ^{ns}	0,6757*

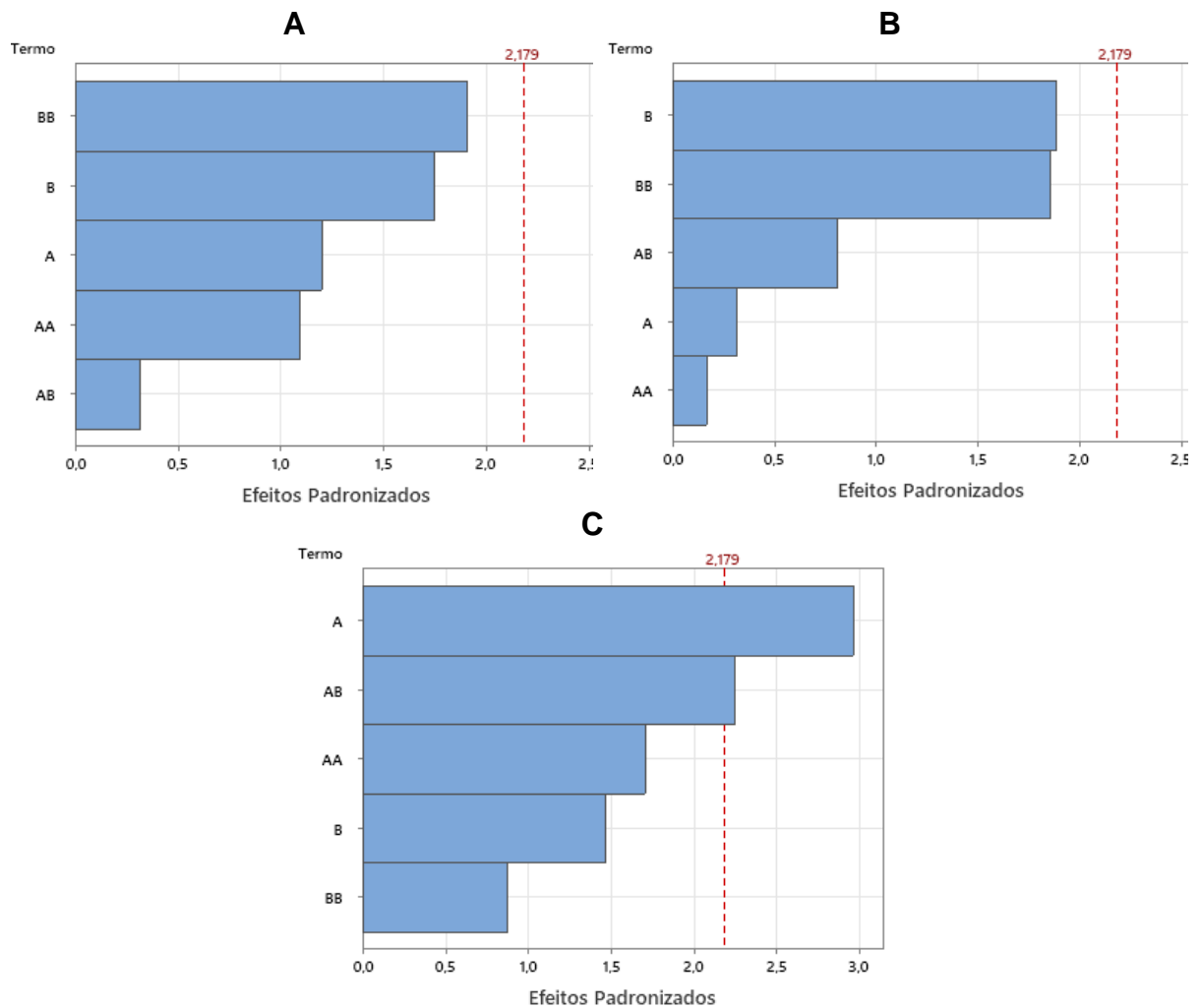
β_0 : constante; β_1 : quitosana; β_2 : temperatura; β_{12} : interação entre quitosana e temperatura; β_{11} : interação quadrática da quitosana; β_{22} interação quadrática da temperatura;

*influência significativa ($p < 0,05$); ns: influência não significativa; R^2 : linearidade do modelo;

Fonte: A autora.

Com os resultados experimentais, observa-se que houve influência significativa apenas da quitosana e interação entre temperatura e quitosana quanto ao potencial Zeta das NPM-QS. Os gráficos de Pareto das respectivas variáveis (Figura 15) ilustra a magnitude da influência dos fatores, determinando os parâmetros que mais contribuem no efeito. Nota-se que, a temperatura tem maior influência no PDI (Figura 15B), com efeito negativo (Tabela 6), e a relação quadrática da temperatura teve maior influência no tamanho (Figura 15A), com efeito positivo (Tabela 6), mesmo ambos não apresentaram significância pelo teste de ANOVA. No potencial Zeta (Figura 15C), a QS apresentou efeito positivo (Tabela 6), diretamente proporcional, com significância estatística.

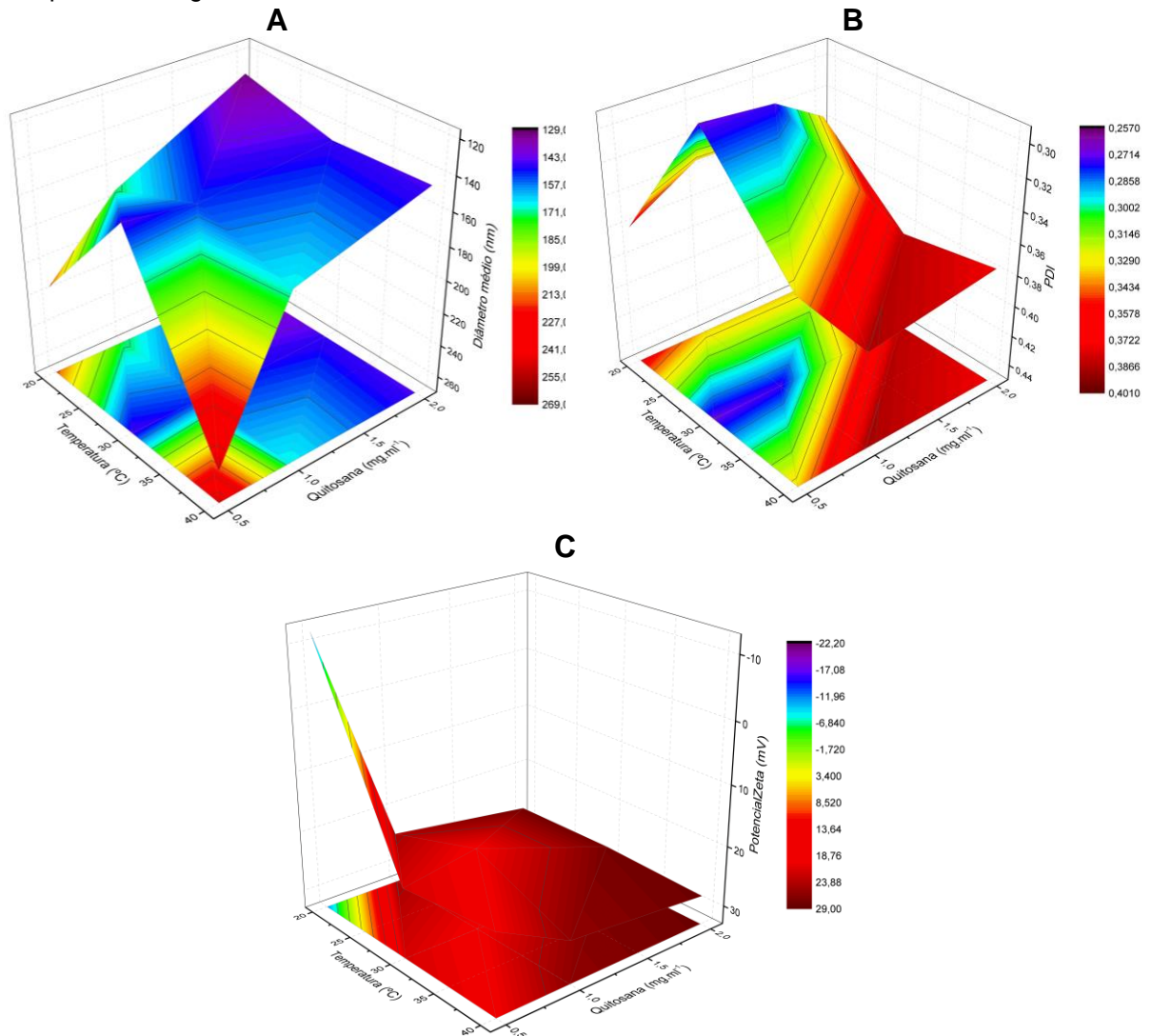
Figura 15 - Gráfico de Pareto do Planejamento Fatorial 3² Nanopartícula Magnética.



A: Diâmetro médio; B: PDI; C: Potencial Zeta;
 Fonte: A autora.

As análises de Superfície de Resposta (Figura 16) permite melhor visualização do efeito para cada variável (PDI, Diâmetro médio e potencial Zeta), auxiliando na escolha da formulação para os próximos ensaios deste estudo. Uma formulação ideal de NPM é aquela que resulte no menor diâmetro médio (preferencialmente < 300 nm), homogeneidade de partículas (PDI < 0,3) e maior carga superficial (> |30| mV).

Figura 16 - Gráfico de Superfície de Resposta das variáveis resposta do planejamento fatorial 3² Nanopartícula Magnética.



A: Diâmetro médio; B: PDI; C: Potencial Zeta;
Fonte: A autora.

O planejamento fatorial de experimentos é um guia para concluir qual o melhor nível de variação entre os fatores escolhidos (quitosana e temperatura). A partir da ferramenta de otimização de resposta é possível escolher a importância de cada variável resposta e o objetivo desejado: maximizar, minimizar ou não otimizar a resposta. O *desirability* composto (d), um índice global que é calculado a partir da combinação de cada variável e deve ser considerado para garantir o melhor resultado, sendo que valores próximos a 1 são mais recomendados. (Asif *et al.*, 2022; Dhoranwala; Shah P.; Shah S., 2016).

A primeira solução de otimização da formulação, minimizando diâmetro médio e PDI e maximizando potencial Zeta, gerou um *d* de 0,8629 tendo como solução 1,25 mg.mL⁻¹ de quitosana a 28,69 °C. Este resultado estimado (Tabela 7) poderia ser

considerado como a solução deste trabalho, porém era preferível manter a concentração e temperatura conforme optado no planejamento. O potencial Zeta foi considerado um parâmetro crucial por sugerir funcionalização, garantir a estabilidade da formulação e por ter sido o único parâmetro com significância estatística. Além disso o diâmetro reduzido da partícula é importante para garantir o transporte passivo para o interior do tumor (efeito EPR).

Tabela 7 - Otimização de resposta do planejamento fatorial da NPM.

<i>d</i>	Quitosana	Temperatura	Potencial Zeta	Diâmetro médio	PDI
0,8629	1,25 mg.mL ⁻¹	28,69 °C	29,97 mV	129,39 nm	0,31
1	1,71 mg.mL ⁻¹	29,29 °C	32,07 mV	118,14 nm	-

Fonte: A autora.

Por esta razão, foi gerado uma segunda otimização de resposta, minimizando o diâmetro médio e maximizando o potencial Zeta, sem otimizar o PDI, onde a variação foi muito sutil (Tabela 5). Assim, foi obtido um *d* de 1 com quitosana de 1,71 mg.mL⁻¹ e temperatura de 29,29 °C com valores estimados de potencial Zeta e diâmetro médio mais adequados que na primeira otimização. Assim, a formulação otimizada escolhida para incorporação de QC (400 µg.mL⁻¹) e continuação do estudo foi com 2 mg.mL⁻¹ de quitosana e temperatura de 30 °C, valores mais próximos da segunda otimização de resposta.

5.4 DESENVOLVIMENTO DA NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA

O desenvolvimento da formulação de nanopartículas lipídicas sólidas foi iniciado com testes de funcionalização por três adaptações do método descrito por Vijayakumar (2017) e Sandri (2017) detalhadas no Quadro 2. As modificações consistiram em funcionalização posterior (FL1), funcionalização *in situ* (FL2) e funcionalização *in situ* por gotejamento (FL3), utilizando o conjugado QSAF como solução polimérica de funcionalização. Ainda, foi preparada uma formulação sem polímero (NLS-QC) e com quitosana não conjugada (FL4). A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos por análises de potencial Zeta, diâmetro médio e PDI para comparação.

A formulação de síntese das NLS-QC (sem polímero) foi considerada adequada visto que apresentou potencial Zeta de -25,8 mV (DP \pm 2,13), indicando boa estabilidade coloidal por repulsão de cargas, com diâmetro médio próximo a 300 nm (DP \pm 23,7) e PDI de 0,31 (DP \pm 0,05) garantindo homogeneidade da formulação.

Tabela 8 - Resultado dos diferentes métodos de desenvolvimento de NLS funcionalizada.

Formulações	Potencial Zeta (mV)*	Diâmetro médio*(nm)	PDI*
NLS-QC	-25,80 \pm 2,13 ^D	382,67 \pm 23,70 ^C	0,31 \pm 0,05 ^B
FL1	24,60 \pm 0,57 ^B	1001,95 \pm 141,49 ^A	0,58 \pm 0,13 ^B
FL2	37,87 \pm 2,55 ^A	806,53 \pm 46,08 ^B	0,51 \pm 0,07 ^B
FL3	9,51 \pm 3,40 ^C	508,45 \pm 98,36 ^C	0,53 \pm 0,45 ^B
FL4	18,20 \pm 8,20 ^{BC}	882,55 \pm 23,12 ^{AB}	1,00 \pm 0,00 ^A

Médias que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes.

NLS-QC: nanopartícula lipídica sólida sem polímero; FL1: NLS-QSAF-QC funcionalização posterior; FL2: NLS-QSAF-QC funcionalização *in situ*; FL3: NLS-QSAF-QC *in situ* por gotejamento; FL4: NLS-QS-QC *in situ* por gotejamento;

*p < 0,05.

Fonte: A autora.

Comparativamente, pode-se supor que houve funcionalização da NLS-QC com quitosana (polímero catiônico) em todas as formulações testada, pois observa-se uma inversão de carga negativa (NLS-QC) para positiva (FL1, FL2, FL3 e FL4). No entanto, foram observadas diferenças significativas em relação a cada método de funcionalização. A FL1, apesar de apresentar um potencial Zeta próximo ao ideal (+24,6 mV), exibiu um tamanho micrométrico com pouca homogeneidade de partículas e por isso não foi considerada como melhor método de funcionalização neste estudo.

Existem diferentes trabalhos que produziram NLS funcionalizadas com polímeros e aqui, vale ressaltar os trabalhos de Vijayakumar *et al.* (2017), Khatamian *et al.* (2023), Ramalingam e Ko (2015), Fengzhen *et al.* (2018) e Talarico *et al.* (2021). Apesar das diferenças entre os compostos da formulação, todos desenvolveram NLS com funcionalização polimérica posterior, semelhante ao método da FL1 que apresentou tamanho micrométrico. Comparativamente, todos mostraram um aumento no diâmetro médio após a funcionalização, como também observamos neste estudo. Porém os resultados desses trabalhos não ultrapassaram 500 nm. Os autores citados obtiveram NLS funcionalizadas com tamanhos variando de 200, 310, 100 a 500, 200

a 500 e 480 nm, respectivamente (Fengzhen *et al.*, 2018; Khatamian *et al.*, 2023; Ramalingam; Ko, 2015; Talarico *et al.*, 2021; Vijayakumar *et al.*, 2017).

O tamanho das nanopartículas lipídicas sólidas pode ser influenciado pelo método, tipo e quantidade de lipídeo e surfactante utilizado (Scioli-Montoto; Muraca; Ruiz, 2020). Por isso, vale lembrar que as formulações e metodologias apresentam particularidades distintas dificultando a comparação entre os estudos relatados. Entretanto, o trabalho de Sandri *et al.* (2017) traz uma outra abordagem de funcionalização, a funcionalização *in situ*. Sandri *et al.* comparou NLS funcionalizadas posteriormente e *in situ* com quitosana, mostrando que houve um aumento de 40% do tamanho quando o polímero é adicionado, atingindo cerca de 200 nm *in situ* ou não. Uma característica que difere entre os métodos de funcionalização é o potencial Zeta, demonstrando maior estabilidade pela funcionalização *in situ* com maior carga superficial (Sandri *et al.*, 2017).

Com isso, a funcionalização *in situ* foi a próxima estratégia utilizada neste estudo para a síntese de NLS-QC funcionalizada para tentar obter um tamanho nanométrico. Neste caso, a adição de polímero ocorre na fase aquosa (FA) da formulação e mostrou-se como uma estratégia interessante, visto que o diâmetro das partículas foi reduzido em 20% para 806,53 nm (FL2). Buscando um diâmetro médio das partículas ainda menor foi feita a adição da FA lentamente por gotejamento (FL3) atingindo um resultado mais satisfatório com tamanho de 508,45 nm. Apesar disso, houve uma diminuição significativa do potencial Zeta de +37,87 mV (FL2) para +9,51 mV (FL3) sem muita alteração no PDI.

Considerando as limitações dos métodos de análise e os resultados desejados, o objetivo é desenvolver uma nanopartícula de tamanho reduzido (< 300 nm) e homogênea (PDI 0,3), garantindo a estabilidade eletrostática da formulação (potencial Zeta > |30 mV|) (Danaei *et al.*, 2018; Scioli-Montoto; Muraca; Ruiz, 2020). A FL3 foi selecionada como o método de preparo mais próximo do ideal para dar continuação no estudo, apesar do valor de potencial Zeta não desejado.

Adicionalmente, também foi desenvolvida a FL4 com o mesmo método da FL3 (funcionalização *in situ* por gotejamento), porém com a QS não conjugada. Esta alteração resultou em um potencial Zeta maior (+18,2 mV), visto que a QS (catiônica) perde um pouco da carga positiva quando conjugada com AF (interação entre ácido carboxílico do folato com o grupo amino da quitosana). O aumento no diâmetro médio também pode ser explicado pela maior quantidade de quitosana na FL4 quando

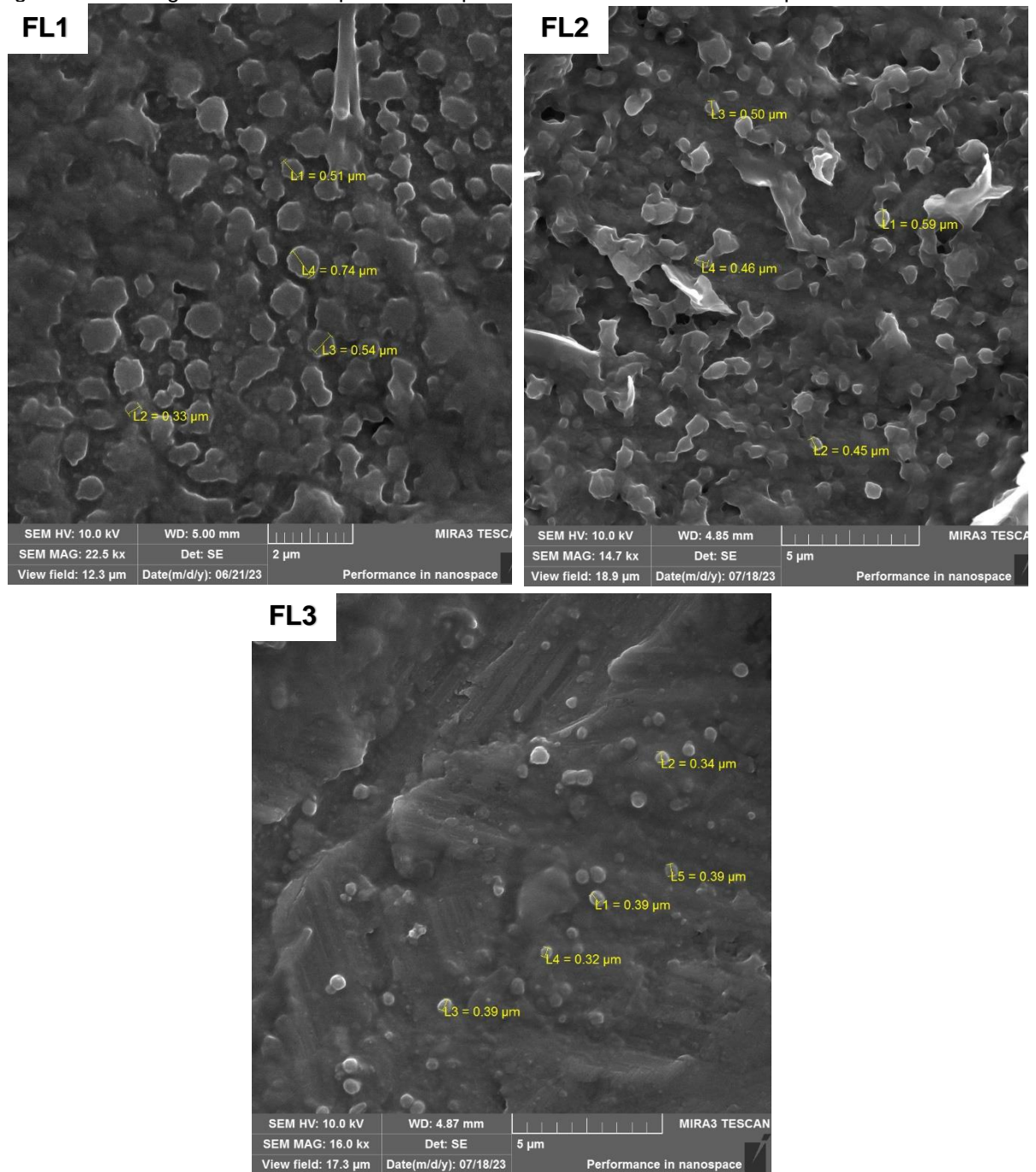
comparada com as demais formulações preparadas com quitosana-folato, já que a concentração final de polímero na formulação foi mantida, independentemente de ser quitosana conjugada ou não.

As diferenças entre os resultados dos métodos testados também foram avaliadas estatisticamente com o teste de ANOVA e post-Hoc de Tukey. Observando o potencial Zeta, houve diferença significativa entre os métodos de síntese avaliados, e a FL4 (método FL3 com quitosana não conjugada) não apresentou diferença estatística com a FL1 (melhor valor obtido de potencial zeta, porém diâmetro e PDI considerados insatisfatórios). Em relação ao tamanho e homogeneidade da nanodispersão, não houve diferença de PDI entre FL1, FL2 e FL3, porém houve diferença significativa entre os diâmetros médio das formulações. A FL3 não difere, em tamanho, da formulação sem polímero, confirmando como melhor escolha entre os métodos variados.

Ainda, as formulações desenvolvidas também foram caracterizadas por *FEG-SEM* (Figura 17), apresentando morfologia esférica e uniforme, com bordas bem definidas na funcionalização *in situ* por gotejamento, porém não tão definidas nas formulações FL1 e FL2. Nota-se ainda que o tamanho das partículas também foi reduzindo conforme a sequência de alterações (FL1 > FL2 > FL3). Com o auxílio do software Image J foram avaliadas cerca de 100 nanopartículas, com média de 658 nm (DP \pm 138), 564 nm (DP \pm 102) e 364 nm (DP \pm 0,75) para FL1, FL2 e FL3 respectivamente.

Como já elencado anteriormente no tópico de desenvolvimento das NPMs, estes resultados também corroboram com outros autores, onde a diferença de diâmetro médio pode ser justificada pela diferença entre os princípios das técnicas de espalhamento de luz dinâmico (*DLS*) e visualização microscópica (*FEG-SEM*). No desenvolvimento das NLS também foi encontrado tamanho menores de partículas visualizadas na microscopia quando comparado com os valores obtidos pela técnica de *DLS* (Agarwal *et al.*, 2018; Bhattacharjee, 2016; Kathe; Henriksen; Chauhan, 2014).

Figura 17 - Micrografias das Nanopartículas Lipídicas Sólidas funcionalizadas por diferentes métodos.



A: NLS-QS funcionalização posterior (FL1); B: NLS-QS funcionalização *in situ* (FL2); C: NLS-QS *in situ* por gotejamento (FL3);

Fonte: A autora.

5.5 PLANEJAMENTO FATORIAL 3² NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA

Após a seleção da FL3 como o método de funcionalização mais eficaz (*in situ* por gotejamento), foi conduzido um planejamento fatorial 3². Baseado em estudos de nanoformulações descritos na literatura, foram definidos o tempo de sonicação

como parâmetro crítico de processo e a quantidade de polímero de revestimento como parâmetro crítico da formulação, sendo estes os fatores do *Design of Experiments* (DoE) variados em três níveis. Como atributos críticos de qualidade das nanopartículas foram consideradas variáveis respostas o diâmetro médio, PDI, potencial Zeta, eficiência de encapsulamento (EE) e teor de fármaco.

Portanto, o planejamento fatorial foi realizado variando a concentração de QS (2, 1 e 0,5 mg.mL⁻¹) e o tempo de sonicação de 5 minutos (1 ciclo), 10 minutos (2 ciclos) e 15 minutos (3 ciclos), e analisado partir dos resultados de potencial Zeta, diâmetro médio, PDI, EE e teor de quercetina (Tabela 9). As formulações apresentaram-se como suspensões líquidas de nanopartículas lipídicas sólidas e possuíam aspecto leitoso, condizente com os tamanhos encontrados, e coloração amarelada, referente à quercetina.

Observações iniciais dos resultados após a variação dos fatores podem trazer algumas conclusões importantes. Em geral, o diâmetro médio reduziu em resposta a um aumento no tempo de sonicação, conforme era esperado. Similarmente, o PDI demonstrou maior homogeneidade em formulações com um tempo de sonicação prolongado (PDI < 0,3). De forma geral, para a produção de nanopartículas lipídica há a necessidade de alto fornecimento de energia para a quebra e formação de partículas nanométricas, e o uso de sonicação por sonda é bastante relatado para redução de tamanho e homogeneização das dispersões lipídicas (Gordillo-Galeano; Mora-Huertas, 2018; Scioli-Montoto; Muraca; Ruiz, 2020).

Entretanto, nota-se que apesar da importância da sonicação na redução do tamanho e homogeneização da amostra, o tempo é um fator limitante que influencia principalmente o PDI, visto que os valores foram menores no tempo 10 minutos (5 > 15 > 10 min). Este ponto limite de tempo de sonicação corrobora com descrições da literatura que, quando avaliado valores superiores de tempo, há um limite de exposição que, se superior, não confere benefício adicional e até causam aumento de PDI. Isto pode ser explicado pelo elevado tempo de choque entre as partículas favorecendo a aglomeração, e, conseqüente aumento do diâmetro e PDI (Becker *et al.*, 2016; Behbahani *et al.*, 2017; De Souza, 2022; Pucek-Kaczmarek, 2021; Scioli-Montoto; Muraca; Ruiz, 2020).

Tabela 9 - Resultados do planejamento fatorial 3² de Nanopartículas Lipídicas Sólidas.

Fator		Variáveis Resposta				
A	B	Diâmetro médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	EE (%)	Teor (%)
-	-	443,10 ± 34,63	0,36 ± 0,90	14,23 ± 0,91	56,68 ± 1,39	1,03 ± 0,04
0	-	257,43 ± 8,50	0,49 ± 0,02	11,57 ± 1,33	56,64 ± 1,65	1,03 ± 0,04
+	-	532,37 ± 15,77	0,32 ± 0,14	13,93 ± 1,79	59,88 ± 0,56	0,89 ± 0,02
-	0	133,00 ± 7,49	0,27 ± 0,08	6,75 ± 0,14	61,56 ± 0,63	0,93 ± 0,01
0	0	308,47 ± 16,05	0,25 ± 0,23	19,50 ± 0,50	69,74 ± 1,87	0,72 ± 0,05
+	0	618,67 ± 16,24	0,17 ± 0,07	11,03 ± 0,21	50,63 ± 0,75	1,10 ± 0,01
-	+	214,20 ± 17,12	0,29 ± 0,17	3,62 ± 0,36	65,52 ± 0,78	0,82 ± 0,02
0	+	864,27 ± 142,99	0,29 ± 0,18	12,10 ± 0,87	53,68 ± 2,99	1,27 ± 0,01
+	+	576,17 ± 23,64	0,20 ± 0,07	13,70 ± 2,20	70,08 ± 0,97	0,67 ± 0,02
-	-	378,10 ± 35,19	0,44 ± 0,12	9,00 ± 1,54	63,03 ± 0,23	0,89 ± 0,01
0	-	498,23 ± 79,85	0,29 ± 0,27	11,33 ± 0,92	57,94 ± 3,29	1,00 ± 0,08
+	-	588,33 ± 144,88	0,48 ± 0,46	11,47 ± 0,64	40,47 ± 0,76	1,32 ± 0,02
-	0	362,03 ± 33,30	0,26 ± 0,24	5,46 ± 0,43	61,12 ± 2,35	0,94 ± 0,05
0	0	397,20 ± 60,83	0,22 ± 0,13	8,88 ± 1,41	69,71 ± 0,31	0,72 ± 0,01
+	0	821,10 ± 133,09	0,40 ± 0,33	11,13 ± 0,65	54,35 ± 0,18	1,02 ± 0,01
-	+	264,37 ± 13,63	0,32 ± 0,24	9,77 ± 0,67	41,43 ± 0,82	1,39 ± 0,02
0	+	616,87 ± 71,02	0,41 ± 0,11	7,03 ± 0,56	55,04 ± 0,5	1,08 ± 0,07
+	+	506,03 ± 69,65	0,32 ± 0,16	10,20 ± 0,10	40,22 ± 0,87	1,33 ± 0,02

A: fator quitosana; B: fator tempo de sonicator;

Fonte: A autora.

Em relação ao potencial Zeta, espera-se que a adição de concentração maior de QS resulte em um aumento da carga. Apesar dos resultados não terem sido satisfatórios, com variações sutis, sugere-se que a QS contribuiu para o aumento da carga superficial das partículas. Aqui vale ressaltar que o ácido esteárico, lipídio utilizado, possui carga negativa, portanto, a proporção QS:AE pode influenciar na carga superficial final (Gordillo-Galeano; Mora-Huertas, 2018; Scioli-Montoto; Muraca; Ruiz, 2020).

Ainda, a proporção lipídio:surfactante tem papel importante no tamanho, na estabilidade da dispersão coloidal e da carga superficial. Na formulação produzida foram utilizados tensoativos não iônicos que podem auxiliar na estabilidade estérica,

se utilizados na proporção adequada, porém são neutros e não influenciariam diretamente na carga superficial e estabilidade eletrostática (Gordillo-Galeano; Mora-Huertas, 2018; Scioli-Montoto; Muraca; Ruiz, 2020).

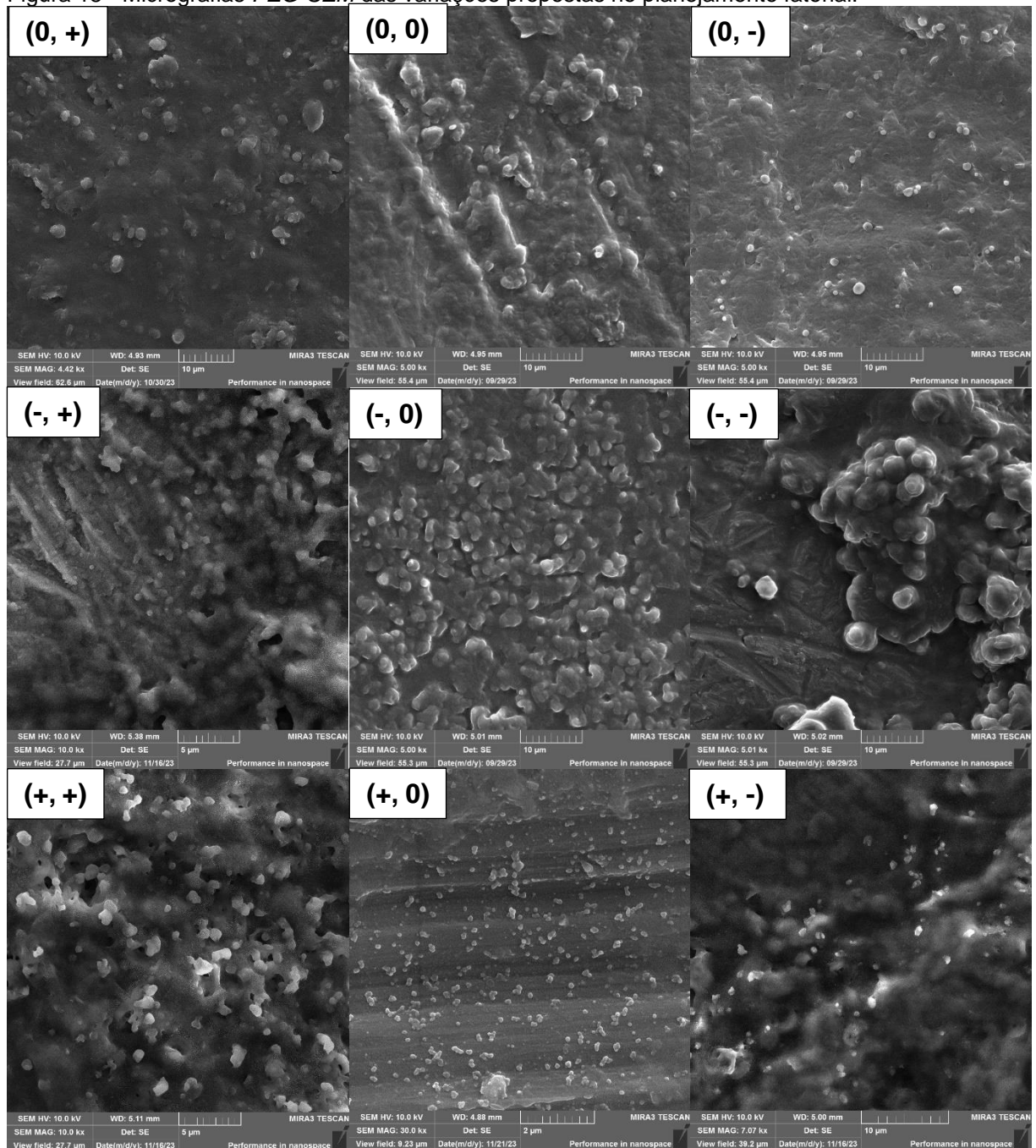
Quanto à EE, o revestimento polimérico promoveu uma maior encapsulação da quercetina possivelmente pela maior proteção do núcleo lipídico. O maior valor (69,7%) foi obtido na média das duplicatas com concentração intermediária de quitosana (1 mg.mL^{-1}) e tempo de sonicação (10 min). No entanto, o teor de quercetina na formulação apresentou um valor reduzido nestas condições. Em geral, outros estudos variam bastante em relação a EE, sendo este um fator bastante influenciado pela composição e método de síntese das NLS, considerando os estudos já citados com NLS revestidas, os valores variam de 40 a 99% (Fengzhen *et al.*, 2018; Khatamian *et al.*, 2023; Ramalingam; Ko, 2015; Vijayakumar *et al.*, 2017).

Adicionalmente, o revestimento polimérico auxilia no maior controle da liberação do fármaco do que em nanopartículas não revestidas, por promover a proteção do fármaco (Fengzhen *et al.*, 2018; Khatamian *et al.*, 2023; Ramalingam; Ko, 2015; Vijayakumar *et al.*, 2017). Este ponto é bem discutido no tópico de ensaio de liberação também descrito neste trabalho.

Para complementar a avaliação das nanopartículas lipídicas, foi realizado a análise por *FEG-SEM* de cada variação (Figura 18). Observa-se uma morfologia esférica e uniforme das nanopartículas, entretanto algumas nanopartículas se aglomeraram apresentando diversas partículas com tamanhos superiores, de até 700 nm em todas as formulações.

Um ponto importante que deve ser ressaltado é em relação a estabilidade da amostra, a análise microscópica foi realizada em tempos variados, com intervalo de 7 a 45 dias e não logo após o preparo como na análise de *DLS*. Neste caso, consideramos o diâmetro obtido pelo *DLS* como o mais fidedigno, para avaliar o tamanho no *FEG-SEM* seria necessário análises microscópicas logo após a síntese das NLS, evitando a falta de estabilidade não investigada, ou uma avaliação criteriosa da estabilidade das formulações produzidas.

Figura 18 - Micrografias FEG-SEM das variações propostas no planejamento fatorial.



Fonte: A autora.

A análise fatorial deste estudo foi feita a partir de uma regressão múltipla linear usando uma equação de segunda ordem para explicar a relação entre as variáveis quanto à resposta desejada. Assim, a equação $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_{12} + \beta_{11}x_{11}^2 + \beta_{22}x_{22}^2$ é descrita pelos coeficientes da regressão representados por β_0 (constante), β_1 (quitosana), β_2 (tempo), β_{12} (interação entre quitosana e tempo), β_{11} (relação quadrática da quitosana) e β_{22} (relação quadrática do tempo). Esta análise foi feita para

cada variável resposta a partir dos valores expressos na Tabela 9 e os coeficientes estão apresentados na Tabela 10 ($p < 0,05$).

Tabela 10 - Coeficientes da regressão fatorial para as variáveis resposta.

Coeficientes	Diâmetro médio	PDI	Potencial Zeta	EE	Teor
β_1	616 ^{ns}	0,1020 ^{ns}	11,6700 ^{ns}	9,2000 ^{ns}	-0,6710 ^{ns}
β_2	-28,6000 ^{ns}	-0,0738 ^{ns}	-0,7100 ^{ns}	3,8700 ^{ns}	-0,0170 ^{ns}
β_{12}	3,2000 ^{ns}	-0,0006 ^{ns}	0,2540 ^{ns}	0,7620 ^{ns}	-0,0251 ^{ns}
β_{11}	1,5300 ^{ns}	-0,0356 ^{ns}	0,0082 ^{ns}	-0,2450 ^{ns}	0,0034 ^{ns}
β_{22}	-177 ^{ns}	-0,0032 ^{ns}	-4,6800 ^{ns}	-8,2200 ^{ns}	0,3850 ^{ns}
β_0	127 ^{ns}	0,6330*	8,3700 ^{ns}	41,8000 ^{ns}	1,1310 ^{ns}
R^2	0,4569 ^{ns}	0,3836 ^{ns}	0,3572 ^{ns}	0,2786 ^{ns}	0,2663 ^{ns}

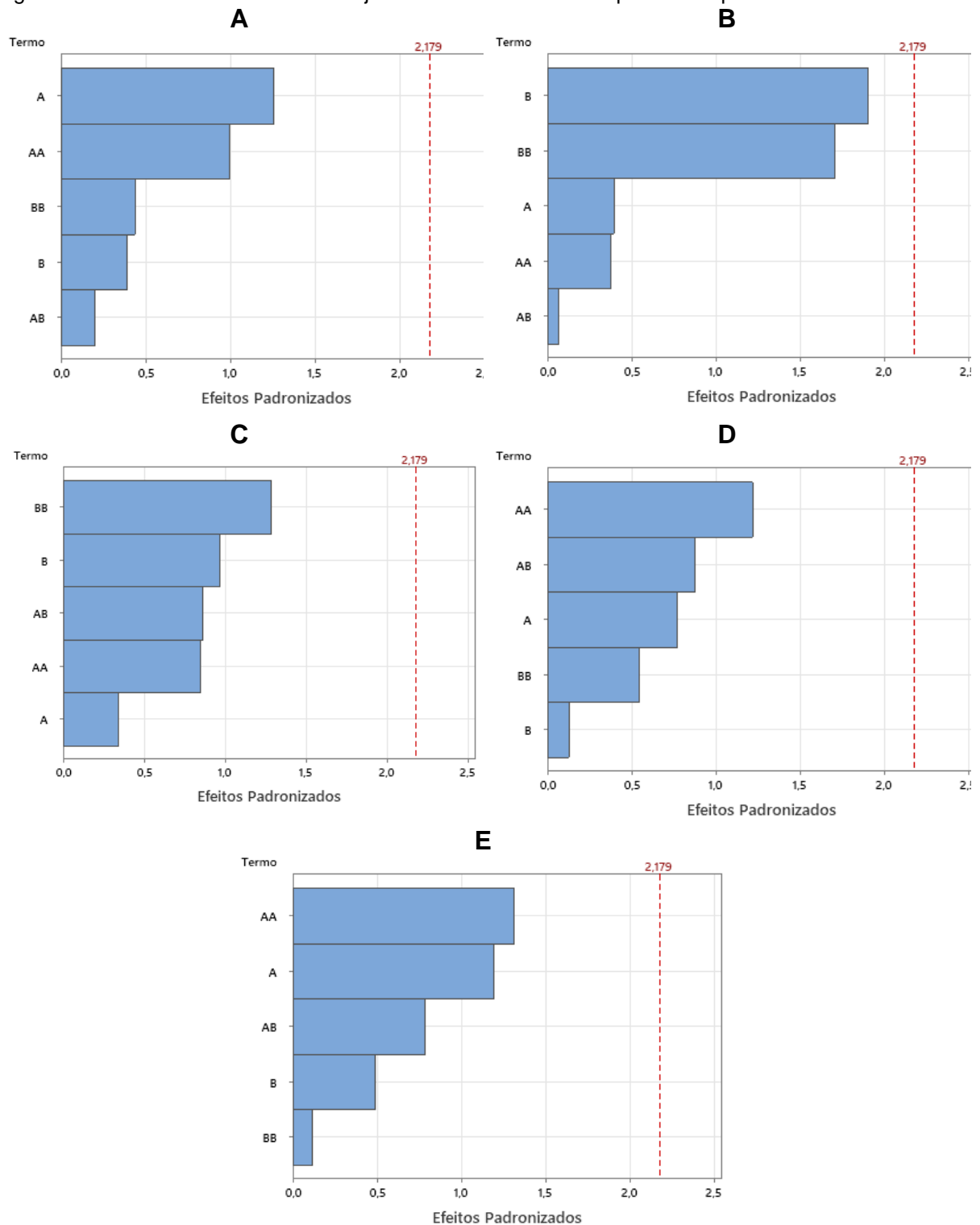
β_0 : constante; β_1 : quitosana; β_2 : tempo; β_{12} : interação entre quitosana e tempo; β_{11} : interação quadrática da quitosana; β_{22} : interação quadrática do tempo; R^2 : linearidade do modelo;

*influência significativa ($p < 0,05$); ns: influência não significativa;

Fonte: A autora.

A partir dos dados de resposta, observa-se que, dentro da região experimental planejada, não houve influência significativa dos fatores para as respostas. Os gráficos de Pareto (Figura 19) das variáveis resposta ilustram a magnitude da influência dos fatores, permitindo uma visão mais ampla dos parâmetros que mais contribuem no efeito, entretanto não houve influência significativa conforme as variações deste estudo.

Figura 19 - Gráfico de Pareto do Planejamento Fatorial 3^2 Nanopartícula Lipídica Sólida.

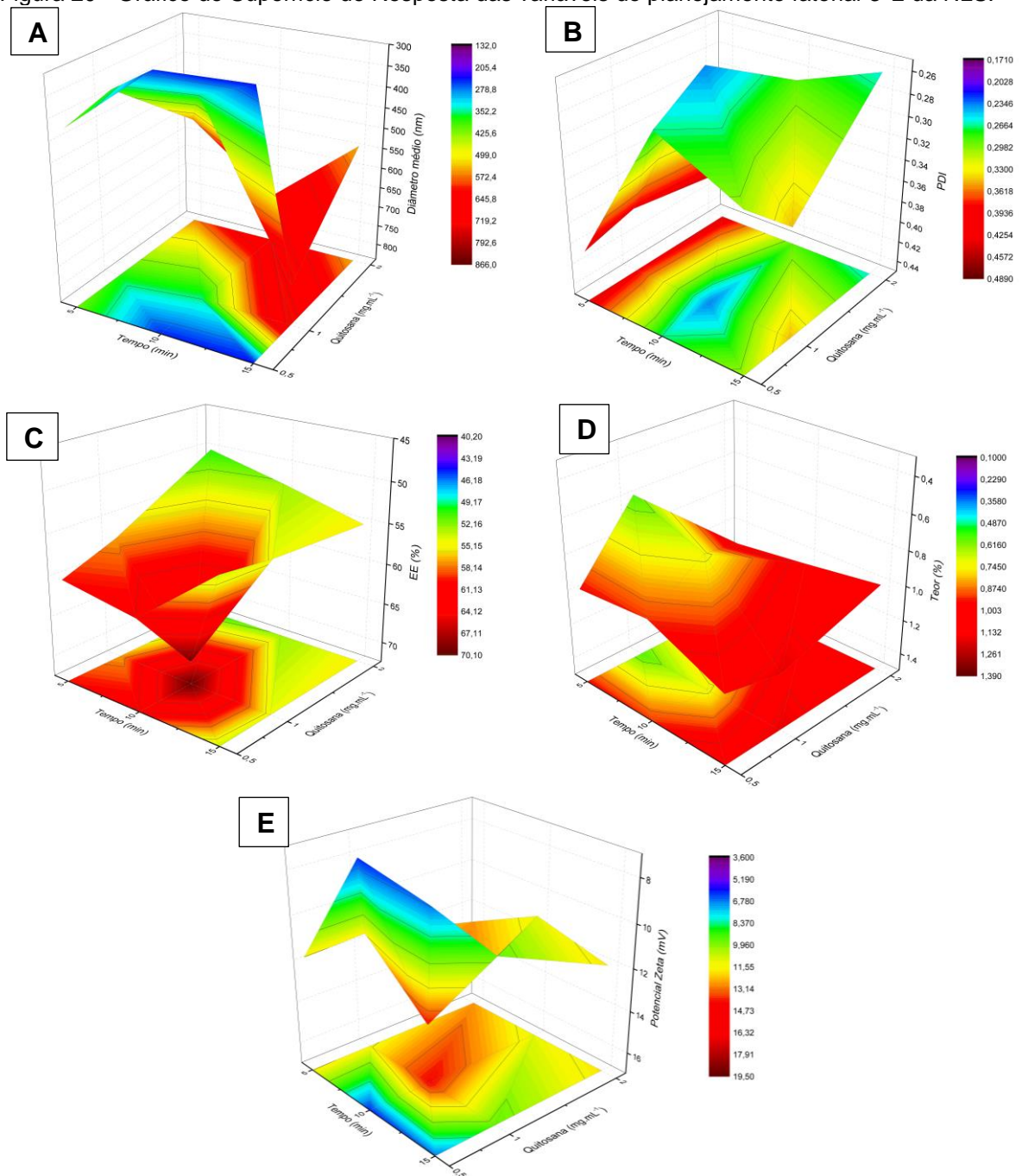


A: Diâmetro médio; B: PDI; C: EE; D: Teor; E: Potencial Zeta;
 Fonte: A autora.

Adicionalmente, a Figura 20 representa as análises de superfície de resposta com melhor visualização para cada variável resposta (PDI, Diâmetro médio, potencial Zeta, EE e teor), auxiliando na escolha da formulação que seguirá para as próximas

etapas deste estudo. Nenhum fator teve influência estatisticamente significativa, entretanto os gráficos de superfície de resposta permitem melhor visualização dos resultados com algumas conclusões. Uma formulação ideal de NLS, neste estudo, foi definida como aquela que resulte no menor diâmetro médio (preferencialmente < 300 nm), homogeneidade de tamanho de partículas (PDI < 0,3), maior carga superficial (potencial Zeta > |30| mV) e com alta eficiência de encapsulação e teor de fármaco.

Figura 20 - Gráfico de Superfície de Resposta das variáveis do planejamento fatorial 3² da NLS.



A: Diâmetro médio; B: PDI; C: EE; D: teor; E: potencial Zeta;
Fonte: A autora.

Nos gráficos de superfície os tons mais azulados representam os menores valores e os tons avermelhados maiores valores obtidos no experimento. No gráfico A e B, observa-se a região azulada entre o tempo de sonicator 10 e 15 minutos sendo um parâmetro importante na redução das partículas, entretanto, em relação ao PDI, a região azul é mais restrita ao tempo 10 minutos, realçando um possível limite de sonicação da amostra para garantir uma maior homogeneidade da formulação. Visualizando a variável QS, observa-se uma relação diretamente proporcional de aumento de polímero para aumento de tamanho e pouca relação com o PDI.

Como já definido, valores maiores de EE, teor e potencial Zeta, são desejados. Ao analisar os gráficos C, D e E nota-se que o aumento do fator QS é diretamente proporcional ao aumento da EE e teor, e o ponto de 10 minutos de sonicator e 1 mg.mL⁻¹ de QS é aquele que apresentou maior intensidade da tonalidade avermelhada para as variáveis EE e potencial Zeta.

A otimização de resposta é uma ferramenta estatística possível após a realização do planejamento fatorial de experimentos que permite concluir qual o melhor nível de variação entre os fatores escolhidos (quitosana e tempo de sonicator) que otimiza a variável resposta conforme o objetivo desejado. A fim de garantir o resultado, deve ser considerado o *desirability* composto (d), um índice global que varia de 0 a 1 e é calculado a partir da combinação de cada uma das variáveis resposta do planejamento fatorial (Asif *et al.*, 2022; Dhoranwala; Shah P.; Shah S., 2016).

Neste contexto, com otimização máxima de potencial Zeta, EE e teor, e mínima de diâmetro médio e PDI, a melhor solução dada foi pelo valor de *desirability* composta de 0,6121 para uma formulação composta de 0,68 mg.mL⁻¹ de quitosana e 9,95 minutos de sonicator. Esta resposta estimou valores de diâmetro médio de 353,26 nm, valor de PDI de 0,26, potencial Zeta de 9,6 mV, eficiência de encapsulação com 63,62% e teor de 0,851%. Mesmo com a falta de influência significativa e com baixo *desirability*, esta análise auxiliou na escolha da formulação do estudo.

Portanto, ao analisar a Tabela 9, considerar as informações da análise fatorial e com o auxílio da otimização de resposta, apesar da falta de influência significativa dos fatores quitosana e tempo, em todas as variáveis respostas, optou-se por seleccionar a formulação (Tabela 11) que apresenta quantidade intermediária de QS e tempo de sonicator (0, 0) na tentativa de manter melhores valores de potencial Zeta, diâmetro médio e PDI, principalmente.

Tabela 11 - Formulação otimizada de nanopartículas lipídicas sólidas funcionalizadas.

	Composição	Quantidade
Fase aquosa (10mL)	Ácido acético 2% (v/v)	0,2 mL
	Quitosana ou Quitosana-folato	10 mg
	Tween 80®	130 mg
Fase oleosa	Ácido esteárico	200 mg
	Span 80®	40 mg
	Polietileglicol 400	100 mg
	Quercetina	5 mg

Fonte: A autora.

5.6 NANOPARTÍCULAS OTIMIZADAS

Com o auxílio da ferramenta de *Design of experiments* (DoE), as formulações de nanopartículas magnéticas e lipídicas foram otimizadas, produzidas e caracterizadas conforme descrito na Tabela 12.

Nesta etapa do estudo, as NPMs utilizadas para a funcionalização polimérica e incorporação do fármaco não possuem um revestimento prévio de citrato, ao contrário das NPMs utilizadas no tópico de desenvolvimento e planejamento fatorial (p. 32). Por esta razão, a NPM sem citrato também foi caracterizada com potencial Zeta, diâmetro e PDI para garantir a efetividade da funcionalização e incorporação.

Tabela 12 - Resultado das nanopartículas otimizadas.

(continua)

Formulação	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro médio (nm)	PDI	EE/EI (%)	Teor (%)
NPM	21,10 ± 0,56 C	68,91 ± 2,50 C	0,33 ± 0,02 CD	-	-
NPM-QS	30,78 ± 0,80 B	122,32 ± 8,56 B	0,46 ± 0,05 B	-	-
NPM-QS-QC	-11,45 ± 1,10 D	388,45 ± 14,50 A	0,69 ± 0,04 A	80,45 ± 4,10 ^A	24,30 ± 0,93 ^A
NPM-QSAF	48,38 ± 4,10 A	93,50 ± 3,98 C	0,23 ± 0,04 D	-	-
NPM-QSAF-QC	-25,20 ± 1,90 E	365,10 ± 29,01 A	0,38 ± 0,05 BC	54,40 ± 5,13 ^B	17,85 ± 1,40 ^B

Tabela 12 - Resultado das nanopartículas otimizadas.

Formulação	Potencial	Diâmetro	PDI	EE/EI	Teor
	Zeta (mV)	médio (nm)		(%)	(%)
NLS-QC	-25,80 ± 2,10 c	382,67 ± 23,70 a	0,31 ± 0,05 a	-	-
NLS-QC-QS	14,20 ± 5,90 a	352,83 ± 62,80 a	0,23 ± 0,17 a	69,73 ± 1,20 ^a	0,72 ± 0,03 ^a
NLS-QC-QSAF	1,64 ± 0,33 b	432,30 ± 65,05 a	0,26 ± 0,01 a	83,82 ± 6,70 ^a	1,95 ± 0,16 ^b

Médias que compartilham a mesma letra não significativamente diferentes.

NPM: nanopartícula magnética; NPM-QS: revestida com quitosana; NPM-QS-QC: revestida com quitosana e com quercetina incorporada; NPM-QSAF: revestida com quitosana-folato; NPM-QSAF-QC: revestida com quitosana-folato e com quercetina incorporada; NLS-QC: nanopartícula lipídica com quercetina; NLS-QC-QS: revestida com quitosana; NLS-QC-QSAF: revestida com quitosana-folato
Fonte: A autora.

No entanto, é possível supor que houve a funcionalização com quitosana (NPM-QS) pelo aumento da carga superficial positiva, de 21,1 mV para 30,78, e do diâmetro médio de 68,91 para 122,32 nm, com diferença significativa pela análise de ANOVA e post-Hoc de Tukey. O mesmo pode ser observado quando há a incorporação da quercetina, alterando a carga superficial para negativa com aumento no diâmetro (-11,45 mV e 388,45 nm). Portanto, apesar de apresentar uma menor alteração de potencial Zeta entre as etapas de síntese, sugerindo menor estabilidade eletrostática quando comparado NPM sem citrato e NPM-citrato, é possível dizer que os métodos de preparo foram eficientes para ambas. Estas alterações de carga e aumento de diâmetro corroboram com resultados já descritos na literatura, apesar de serem nanopartículas magnéticas com outros revestimentos e/ou outro fármaco (Al-Musawi *et al.*, 2020; Al-Obaidy *et al.*, 2023; Bano *et al.*, 2016; Islam *et al.*, 2017; Shanavas *et al.*, 2017; Yarjanli *et al.*, 2019).

Em relação ao revestimento polimérico, nota-se diferenças tanto de potencial Zeta quanto de encapsulação da quercetina. Nas NPMs, a adição de quitosana-folato apresentou mais carga superficial que a adição de quitosana não conjugada, isto pode ter ocorrido por melhor interação entre o folato (carga negativa) com a molécula de ferro (carga positiva) presente na nanopartícula de ferrita de manganês (MnFe₂O₄). Desta forma, a porção de quitosana exposta poderia ser responsável pela carga superficial positiva da partícula. Outra forma, de melhor avaliar esse parâmetro seria

funcionalizando a NPM-citrato com QSAF, visto que a NPM-citrato possui carga superficial negativa referente ao citrato, porém isto não foi avaliado neste estudo.

O revestimento polimérico das NLSs apresentou um resultado contrário, onde a NLS-QC-QSAF obteve carga superficial próxima do neutro e a NLS-QC-QS maior carga superficial positiva, de 14,2 mV. Em ambas, supõem-se que houve revestimento polimérico, visto que a carga superficial inicial era negativa (NLS-QC), e, esta inversão de carga indicaria o revestimento com quitosana (carga positiva). A QSAF interage de forma diferente com a nanopartícula lipídica de ácido esteárico (carga negativa) que na NPM, para maiores conclusões seria necessário outros testes e análises, entretanto, podemos supor que houve uma proporção equivalente de cargas da QS, presente no QSAF, e do AE promovendo a carga superficial neutra (Scioli-Montoto; Muraca; Ruiz, 2020).

Em relação a EE ou EI também tiveram resultados contrários comparando NPM e NLS, sendo melhor a NPM-QS-QC (80,45%) e a NLS-QC-QSAF (83,82%). A incorporação/encapsulação do fármaco está relacionada com as interações entre polímero-fármaco-nanopartícula, como foram produzidas nanopartículas de diferentes materiais, as interações com a quitosana ou quitosana-folato foram distintas, sendo necessário investigações mais aprofundadas para justificar este resultado. Vale ressaltar, que, apesar do valor da EE na NLS-QC-QSAF ter sido maior, não houve diferença significativa entre os polímeros no caso da NLS. Entretanto, o teor foi diferente entre os polímeros tanto para a formulação lipídica e quanto para a magnética. Estes resultados também corroboraram com a literatura, onde encontram-se EE variando de 40 a 99 % para ambos os tipos de nanopartículas (Al-Obaidy *et al.*, 2023; Rajesh *et al.*, 2014; Ramalingam; Ko, 2015; Vijayakumar *et al.*, 2017).

O diâmetro médio manteve as características descritas anteriormente, com o aumento do tamanho em cada etapa de produção, tanto ao adicionar o polímero (NLS-QC-QS, NLS-QC-QSAF, NPM-QS e NPM-QSAF) quanto ao adicionar o fármaco no caso das nanopartículas magnéticas (NPM-QS-QC e NPM-QSAF-QC). Apesar da formulação NPM-QSAF-QC não ter apresentado diferença significativa estatisticamente em relação a NPM não revestida, mesmo com diâmetro médio maior, foi considerado efetiva a funcionalização pelo aumento da carga superficial. Para melhor caracterizar a morfologia e tamanho, as formulações foram analisadas por *FEG-SEM* (Figura 21).

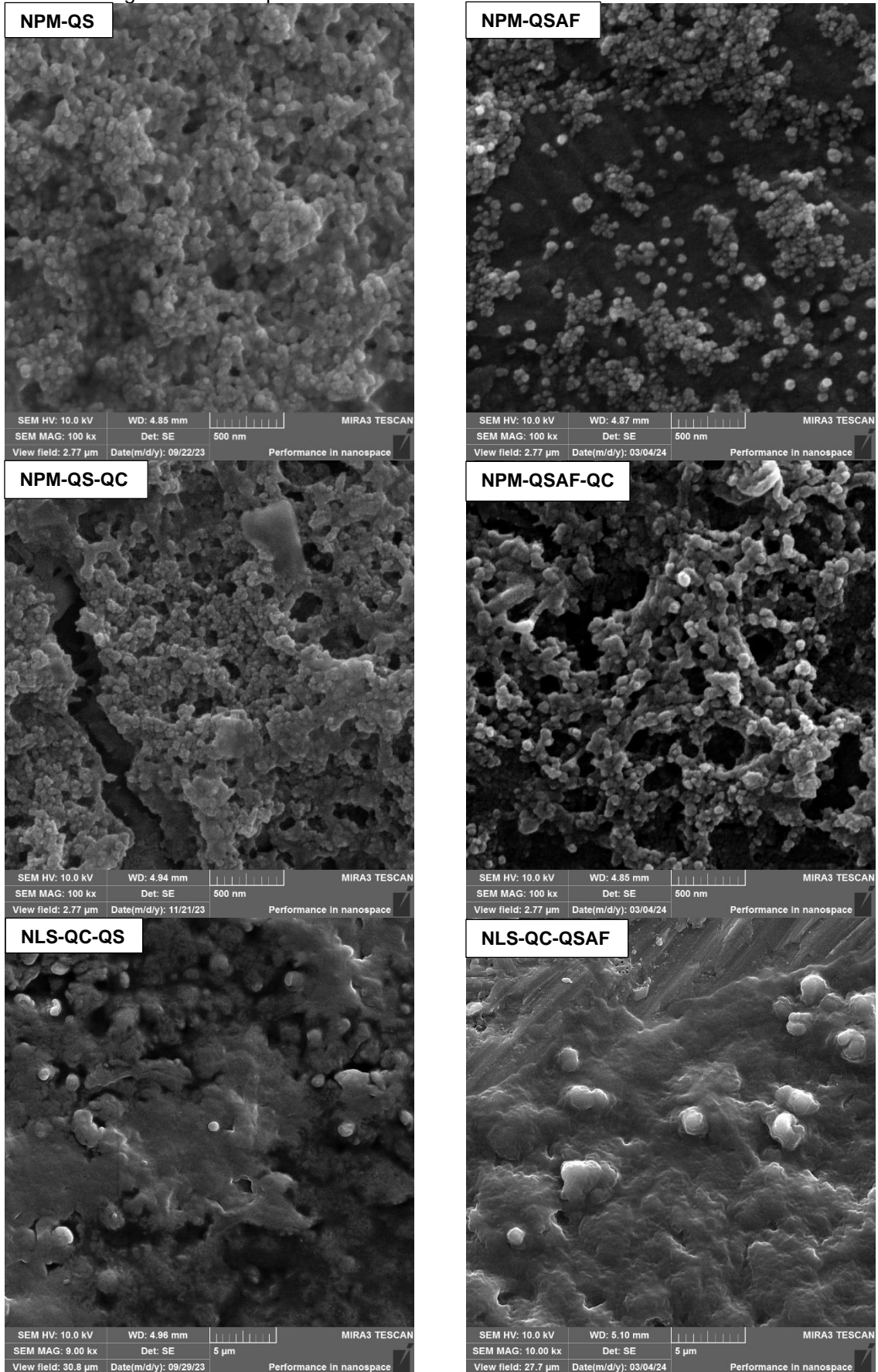
Comparando as técnicas de *DLS* e *FEG-SEM*, é possível perceber resultados diferentes, principalmente ao avaliar as formulações com NPM, como já discutido neste trabalho (Yarjanli *et al.*, 2019). Em todas as micrografias as NPM apresentam tamanho menores que os valores encontrados na análise de *DLS* e, durante as etapas de produção (adição de polímero e fármaco) não é possível notar diferenças de tamanho ao visualizar as amostras por microscopia eletrônica de varredura, entretanto nota-se uma ligeira diferença em relação a formação de aglomerados das partículas após incorporação do fármaco.

Resumidamente, a técnica de *DLS* mede o raio hidrodinâmico da partícula em suspensão, enquanto, na *FEG-SEM* obtemos uma estimativa de diâmetro da partícula projetada sobre a superfície do stub. Possivelmente, os aglomerados de partículas são medidos pela técnica de *DLS*, e ainda, partículas com superfícies poliméricas têm capacidade de inchaço por intumescimento em meio aquoso, justificando estas diferenças de tamanho entre as análises (Agarwal *et al.*, 2018; Bhattacharjee, 2016; Kathe; Henriksen; Chauhan, 2014).

Entretanto, observa-se comportamentos distintos entre NPM e NLS que pode ser justificado pelas particularidades dos componentes de síntese e as características nanoestruturais da formulação final, como fluido magnético e dispersão lipídica, respectivamente. No preparo da amostra de *FEG-SEM*, as formulações precisam ser diluídas em água e secas em estufa, este processo pode estimular a instabilidade da formulação lipídica tendendo à maior aglomeração e difícil visualização da morfologia durante a análise, o que não ocorre com a NPM, pelas características de núcleo magnético rígido em suspensão aquosa. Sandri *et al.* (2017) também relatou em seu trabalho a presença de aglomerados (> 500 nm) ao analisar as NLS-QS (200 nm) por microscopia de força atômica e propôs como resultado da quitosana residual na formulação final (Sandri *et al.*, 2017).

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados é a estabilidade da formulação lipídica. As NLSs não foram avaliadas conforme alteração de tamanho e tendência de aglomeração com o tempo. As análises de *DLS* foram avaliadas no mesmo dia que as formulações são produzidas, entretanto, a análise microscópica foi avaliada após cerca de 15 a 30 dias, dependendo da formulação.

Figura 21 - Micrografia das nanopartículas otimizadas.



Fonte: A autora.

5.7 AVALIAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA QUERCETINA

Para a realização dos ensaios de dissolução é necessária uma avaliação prévia da estabilidade e da solubilidade do fármaco no meio de dissolução a fim de garantir a confiabilidade do método de liberação, respeitando a condição *sink*, e do método de quantificação, respeitando a estabilidade do fármaco (Silva *et al.*, 2013).

Flavonoides, incluindo a quercetina, são facilmente degradados pelo oxigênio do ar sob condições neutras e alcalinas (pH > 7). Esta oxidação já foi investigada por diversos autores que relataram diferentes possíveis mecanismos de degradação oxidativa em soluções aquosas, dependente do pH e do tempo de exposição. Estes produtos de oxidação refletem com alterações no espectro de absorção UV-Vis da quercetina com redução de absorbâncias e deslocamentos batocrômicos mais evidentes (pH alcalino) e hipsocrômico mais sutis (pH ácido) quando comparado com solução padrão de quercetina (Jurasekova *et al.*, 2014; Krishnamachari *et al.*, 2004; Tungjai *et al.*, 2008; Zenkevich *et al.*, 2007).

Além da oxidação, a quercetina é lipofílica (Log P 1,47) e possui baixa solubilidade em sistemas aquosos, com solubilidade de 9 µg.mL⁻¹ em água, o que pode causar alterações no espectro UV-Vis. Alguns estudos vêm relatando uma maior solubilidade da quercetina quando associada a tensoativos, a partir de micelas, inclusive relacionando isto à biodisponibilidade *in vivo* após solubilização pelos sais biliares (Buchweitz *et al.*, 2016; Parmar *et al.*, 2013; Pathan *et al.*, 2019; Tungjai *et al.*, 2008).

5.7.1 Estabilidade e solubilidade da quercetina

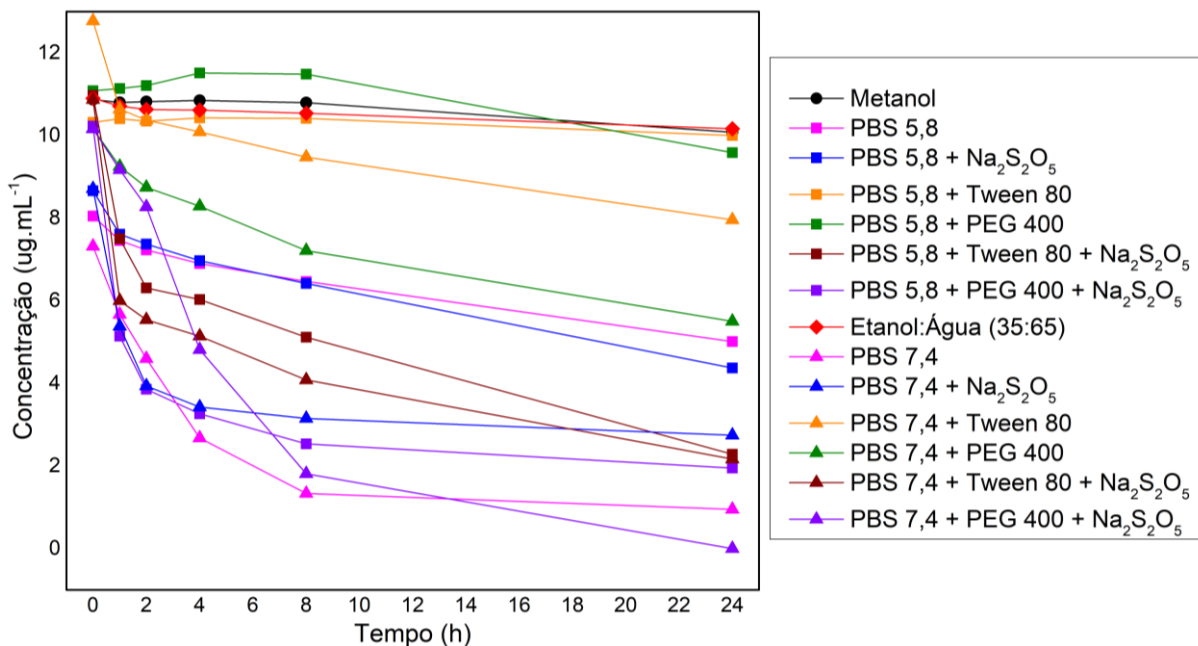
Para garantir os resultados do ensaio de dissolução com maior fidedignidade da velocidade de liberação da quercetina dos sistemas de liberação desenvolvidos, foi necessário avaliar o comportamento da quercetina em diferentes meios. O meio tampão fosfato de sódio (PBS) é comumente empregado em ensaios de dissolução *in vitro* para mitigar as características *in vivo*, porém também foi avaliado a adição de etanol em água (35:65), visto que a QC tem alta solubilidade em etanol. Em relação ao PBS, foi variado o pH da solução tampão, com e sem a presença de tensoativos (PEG400 e Tween80®) e antioxidante (metabissulfito de sódio – Na₂S₂O₅) para tentar driblar os desafios de oxidação e solubilização do fármaco.

A concentração de quercetina foi avaliada por 24 horas e comparada com uma solução padrão de quercetina em metanol de mesma concentração. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 22, onde foi verificado a menor variação de concentração em 24 horas no meio etanol:água, muito semelhante à solução padrão, seguido dos meios com adição de tensoativo (etanol:água > Tween80® > PEG 400).

Outro ponto interessante está relacionado ao pH do meio, nota-se que o PBS pH 7,4 apresentou as maiores variações na concentração de quercetina quando comparado com o PBS pH 5,8 nas mesmas condições, o que corrobora com a literatura sobre a maior estabilidade e solubilidade da quercetina em meio ácido e maior oxidação em meio básico.

Também vale ressaltar características do aspecto das soluções ao final do ensaio de 24 horas. Todas as soluções apresentaram coloração amarelada no início do ensaio, característico da presença de quercetina. Entretanto, os meios que apresentaram maior queda da concentração tinham uma coloração marrom avermelhada e até o surgimento de precipitados, indicativo para os produtos de oxidação da quercetina (PBS pH 7,4 em todas as variações, exceto com tensoativos).

Figura 22 - Estabilidade da quercetina em diferentes meios.

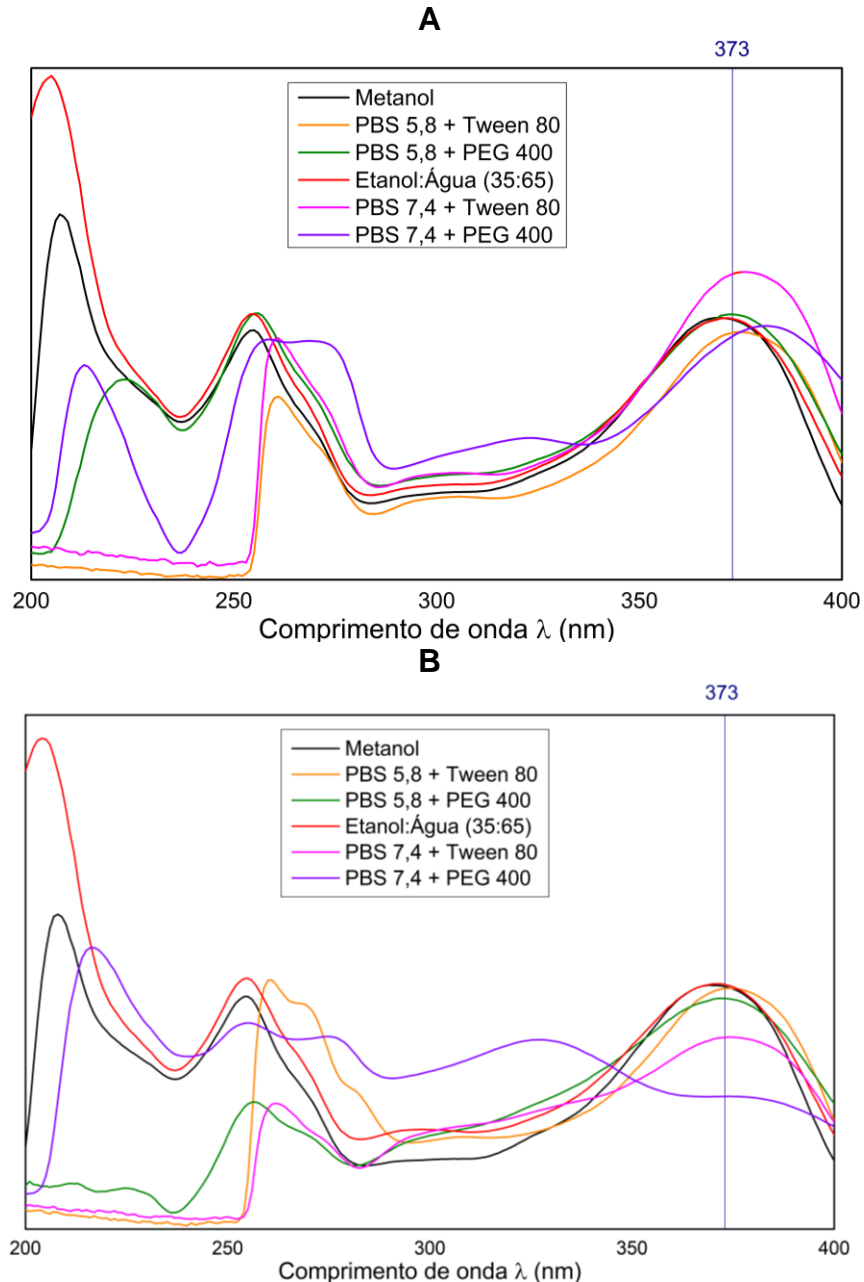


Fonte: A autora.

Adicionalmente, a Figura 23 traz os espectros de varredura na região UV-VIS do teste de estabilidade no início do ensaio (tempo zero) e após as 24 horas, para

melhor demonstrar a possível oxidação e falta de solubilidade do composto. Aqui, foram retirados os espectros do meio PBS sem e com adição de metabissulfito de sódio, visto que foram os piores resultados apresentados na Figura 22.

Figura 23 - Espectro de varredura UV-Vis da quercetina em diferentes meios.



A: Espectro no tempo zero; B: Espectro no tempo 24 horas;
Fonte: A autora.

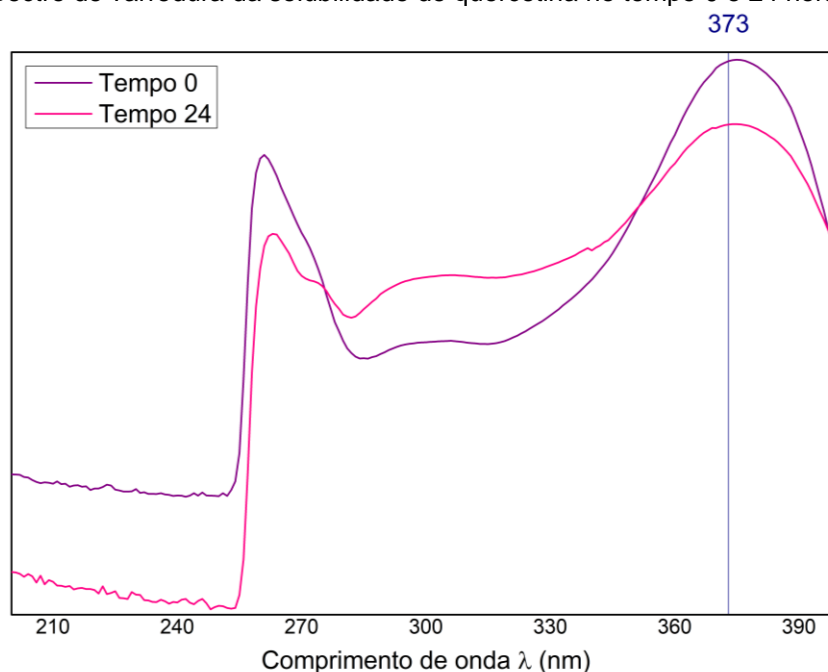
Em geral, cada solvente promoveu uma alteração específica na região de 200 a 400 nm, sendo que o meio de etanol:água foi o que se manteve mais próximo das características da solução padrão em metanol. Entretanto, a quantificação da quercetina foi realizada no comprimento de onda de 373 nm, conforme evidenciado

na Figura 23, e por isso a discussão irá ser feita a partir desta região do espectro. Nota-se que no tempo 0 (Figura 23A) alguns meios já apresentam concentrações diferentes da solução padrão, porém o maior impacto aparece após 24 horas (Figura 23B), principalmente em relação ao PBS pH 7,4, pior na adição de PEG 400.

Quando buscamos estudos na literatura sobre nanocarreadores de quercetina, vemos que os ensaios de dissolução são realizados, em sua grande maioria, no meio etanol:água (35:65) ou com a adição de Tween80® em tampão PBS, independentemente do pH (Aditya *et al.*, 2014; Talarico *et al.*, 2021; Vijayakumar *et al.*, 2017). Com esses pontos levantados, foi selecionado o meio PBS pH 5,8 com Tween80® 0,5% (p/v) como o meio de dissolução mais adequado para realizar o ensaio de liberação da quercetina nos sistemas desenvolvidos.

O ensaio de solubilidade foi realizado a fim de conhecer o limite de saturação da quercetina no meio selecionado. A análise de varredura (200 a 400 nm) no tempo 0 e 24 horas está representado na Figura 24, a amostra foi diluída 1:20 (v/v) no meio para garantir absorvância < 1. Ao aplicar os resultados na equação da reta obteve-se uma solubilidade máxima, em PBS 5,8 e tween80® 0,5%, de 0,183 mg.mL⁻¹ e 0,157 mg.mL⁻¹ nos tempos 0 e 24 horas, respectivamente. Neste ensaio também é possível verificar uma pequena degradação da quercetina, visto que a solubilidade máxima de 24 h é 14% menor que a solubilidade máxima inicial.

Figura 24 - Espectro de varredura da solubilidade de quercetina no tempo 0 e 24 horas.



Fonte: A autora.

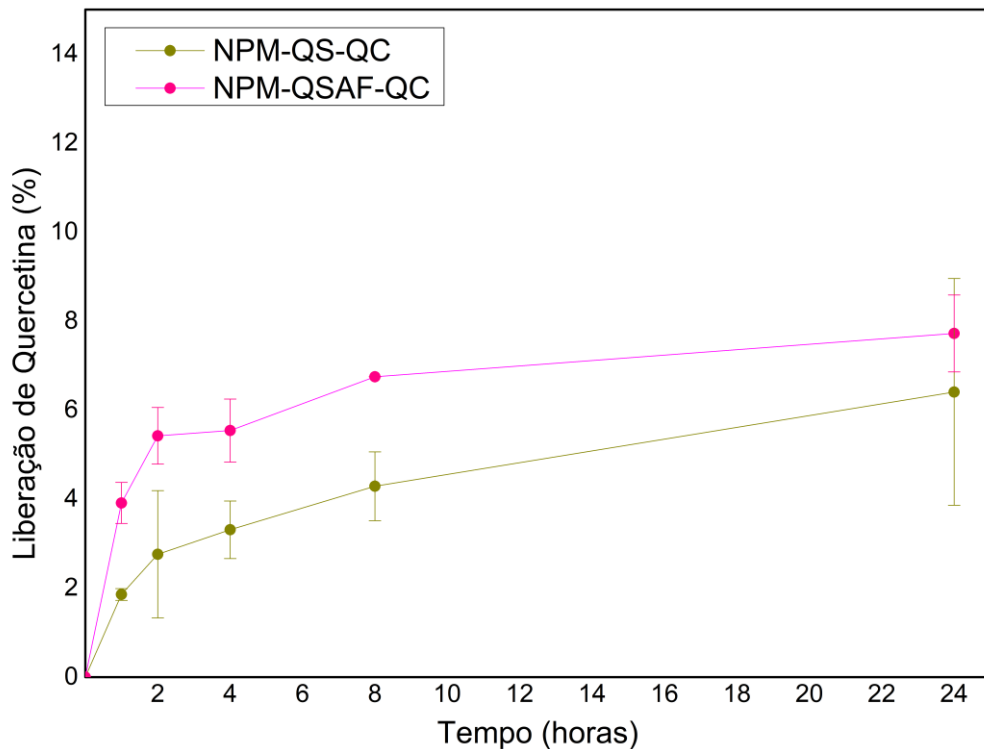
5.8 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DA QUERCETINA

5.8.1 Nanopartículas magnéticas

Conforme mencionado anteriormente, a solução de PBS pH 5,8 com tween80® 0,5% foi escolhida como meio de dissolução mais adequado para realizar o ensaio de liberação das nanopartículas, na tentativa de garantir a quantificação da quercetina liberada. Os perfis de liberação das NPMs revestidas estão representados na Figura 25. Especificamente para a NPM-QSAF-QC, houve uma liberação inicial de 3,9% (DP \pm 0,46) na primeira hora, quase dobrando em 8 h (6,8% \pm 0,01) e seguindo de forma sustentada até as 24 h, atingindo um máximo de 7,7% (DP \pm 0,86) de quercetina liberada.

Comparativamente, o perfil de liberação para a formulação com revestimento de QS (NPM-QS-QC) também apresentou liberação sustentada, porém com maior controle. A primeira hora liberou apenas 1,8% (DP \pm 0,13) e, de forma controlada, em 24 h atingiu uma liberação de 6,4% (DP \pm 2,54). Essa diferença pode estar relacionada a maior quantidade de quitosana quando adicionada de forma livre ao invés de conjugada.

Figura 25 - Ensaio de liberação das nanopartículas magnéticas



Fonte: A autora.

Estes resultados corroboraram com o encontrado no estudo de Barreto *et al.* (2011), onde obtiveram uma liberação sustentada de 96 h com liberação de apenas 14,5% de quercetina a partir de nanopartículas magnéticas com revestimento polimérico (Barreto *et al.*, 2011). Assim, é possível concluir que houve uma interação forte entre o núcleo magnético com o polímero de revestimento e a quercetina resultando em uma liberação lenta do fármaco, sendo um potencial sistema carreador deste ativo para liberação retardada.

Ainda, nanopartículas superparamagnéticas são sistemas interessantes para controle da liberação de fármacos a partir da propriedade de hipertermia magnética como terapia combinada. Neste caso, a liberação do fármaco seria ativada pelo campo magnético externo com a hipertermia da partícula. Este parâmetro não foi avaliado neste estudo, porém poderia demonstrar outro perfil de liberação de quercetina após hipertermia da nanopartícula magnética quando se deseja uma terapia combinada.

5.8.2 Nanopartículas lipídicas sólidas

Neste estudo, inicialmente optamos por avaliar a velocidade de liberação da quercetina em meio ácido (pH 5,8), simulando o microambiente tumoral, e em pH 7,4 simulando a corrente sanguínea. O primeiro ensaio de dissolução (Figura 26) foi realizado com a NLS-QC-QS nos meios de PBS pH 5,8 e 7,4, sem adição de tensoativo, e PBS pH 5,8 com Tween80® 0,5% (p/v). Dessa forma, foi possível relacionar os resultados com o estudo de estabilidade descrito anteriormente, e ainda comparar a liberação em diferentes pHs e com a adição de tensoativo.

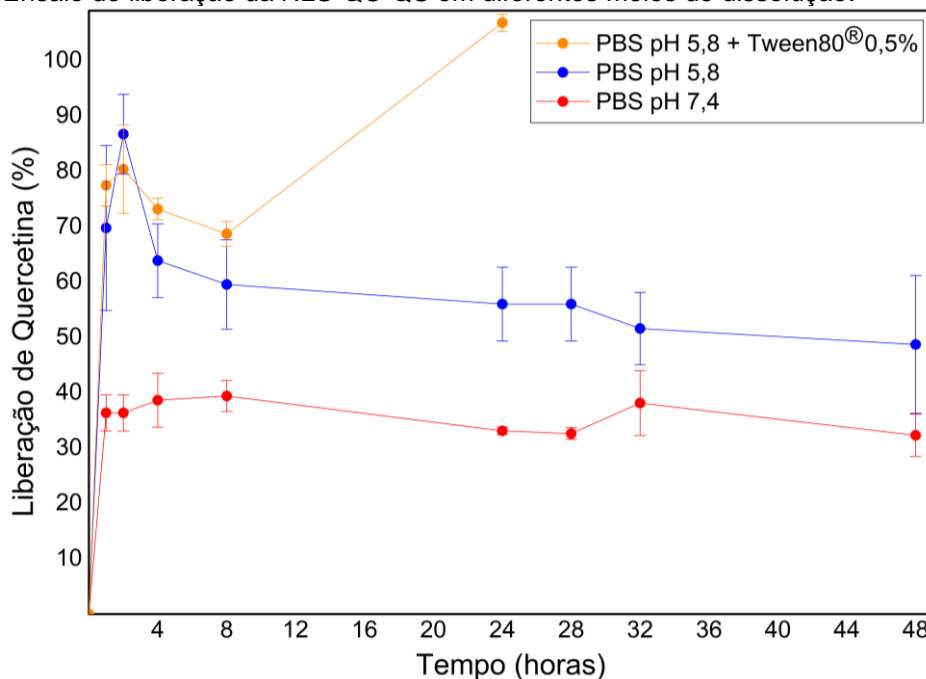
A primeira observação é a liberação inicial de quercetina do tipo *burst* em todos os meios avaliados, liberando cerca de 80% do fármaco na primeira hora. Em seguida, a baixa solubilidade e alta degradabilidade da quercetina é mais evidente em pH 7,4 com porcentagem de liberação menor quando comparado com o meio ácido, corroborando com o ensaio de estabilidade do fármaco.

Entretanto, no meio pH 7,4 também pode estar havendo um maior controle da liberação pela quitosana de revestimento, visto que este polímero é degradado em meio ácido. Para confirmar esta hipótese seria necessário um ensaio de dissolução em PBS pH 7,4 com Tween80®, verificando se a quantidade de quercetina medida é realmente a quantidade liberada.

Nota-se ainda que há uma redução na quantidade de quercetina liberada a partir das 4 horas de ensaio, independentemente do meio de dissolução empregado. Com isso, supõe-se que a liberação de 1 e 2 h ainda não sofreu com os processos de oxidação da quercetina e poderia ser um resultado considerado. Para a liberação no meio sem tensoativo, a porcentagem é mantida com pequena alteração e/ou diminuição da quantidade de fármaco liberado no decorrer do ensaio (48 h).

Na avaliação da estabilidade, foi feito um teste de 24 h e por isso os valores de quercetina após este tempo não podem ser considerados neste estudo. Ao observar o perfil de liberação da quercetina no meio PBS pH 5,8 com Tween80®, confirmamos a hipótese de que a quercetina foi liberada 100% em 24 h, e sem a presença do tensoativo não foi possível quantificar o fármaco no tempo determinado.

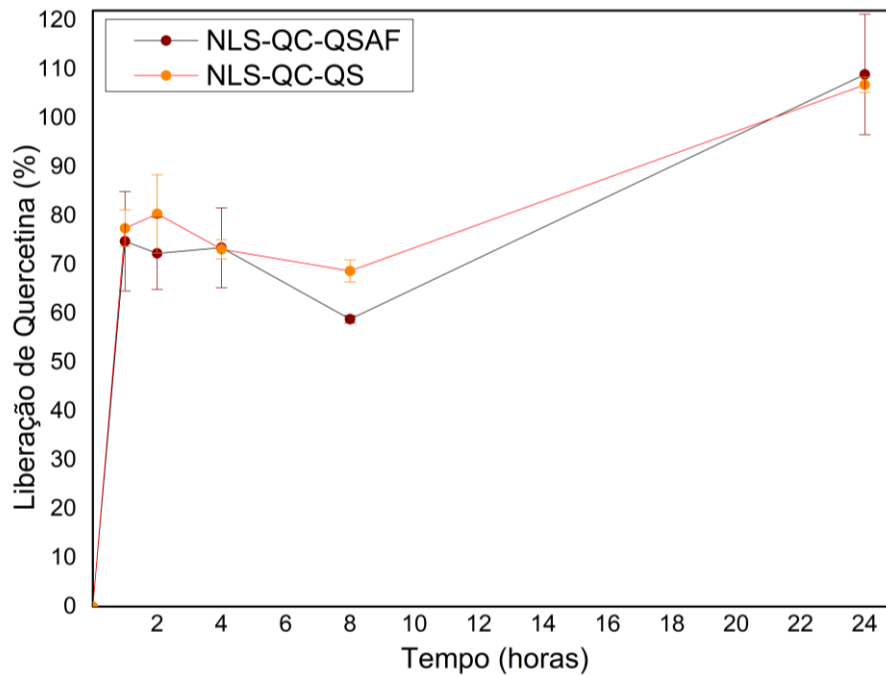
Figura 26 - Ensaio de liberação da NLS-QC-QS em diferentes meios de dissolução.



Fonte: A autora.

A Figura 27 traz a o perfil de liberação da quercetina na NLS com revestimento de quitosana e de quitosana-folato. Ambas as formulações apresentaram a liberação inicial do tipo *burst* liberando 77,2% (DP \pm 3,7) e 74,8% (DP \pm 10,2) em 1 h, com a NLS-QC-QS e NLS-QC-QSAF, respectivamente. Em seguida, houve uma liberação sustentada de até 100 % pelas 24 h finais do ensaio. Neste estudo, não foi verificado diferenças entre os perfis de liberação das NLS revestidas com quitosana ou quitosana-folato.

Figura 27 - Ensaio de liberação das nanopartículas lipídicas sólidas em PBS pH 5,8 com tween80® 0,5% (p/v).



Fonte: A autora.

Vijayakumar *et al.* (2017) fizeram um ensaio comparativo de liberação de quercetina por NLS com e sem revestimento de QS em meio PBS pH 3 e 7 com tween80®. A liberação máxima também foi maior em pH ácido (até 80%) que o pH neutro (até 60%), com o maior controle da liberação a partir do revestimento (Vijayakumar *et al.*, 2017). Já Talarico *et al.* demonstraram o efeito *burst* das NLS com liberação de 20% em 5 minutos, porém seguido de liberação sustentada (Talarico *et al.*, 2021).

5.9 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

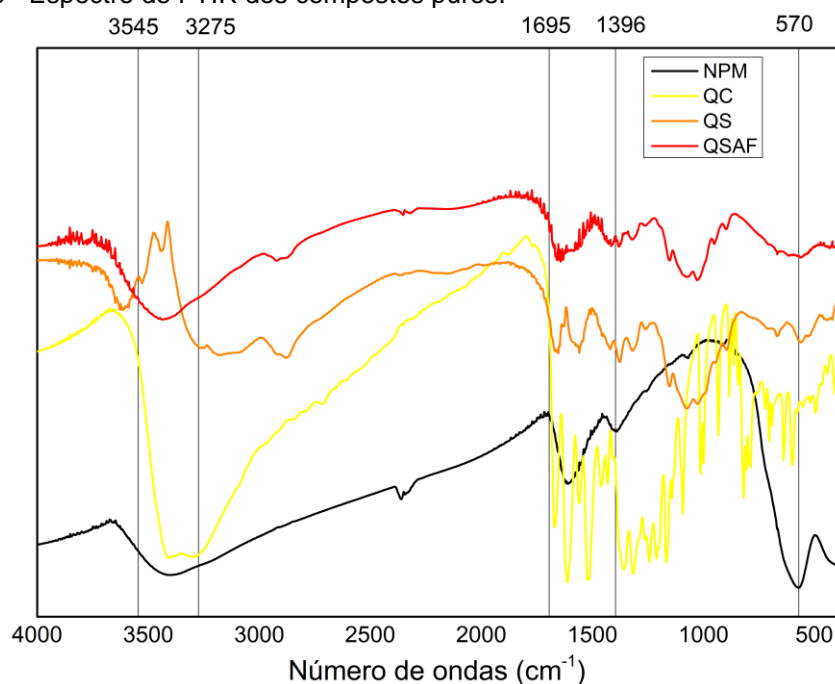
Para a caracterização dos sistemas que serão desenvolvidos nas próximas etapas deste estudo, os compostos puros foram analisados individualmente. A Espectroscopia na região do infravermelho permite caracterizar as estruturas moleculares e ligações químicas de interação entre os compostos dentro do sistema de liberação. Já o Difractômetro de Raio X determina a estrutura cristalina ou amorfa de cada material.

5.9.1 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada em Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR*)

O espectro de infravermelho dos compostos puros (NPM, QC, QS e QSAF) estão apresentados na Figura 28 e serão imprescindíveis para a caracterização das formulações. A NPM composta por ferrita de manganês tem uma banda característica da sua composição em 570 cm^{-1} associada às vibrações de Mn-O e Fe-O e uma ampla banda em 3425 cm^{-1} associada à vibração de estiramento O-H (Gorgizadeh *et al.*, 2020; Islam *et al.*, 2017; Naik; Shivashankar; Bindu, 2022).

A quitosana apresentou bandas características em 1554 cm^{-1} indicando a presença da amida secundária, em 1657 cm^{-1} referente à amida primária e banda em 3439 cm^{-1} característica do grupo R-OH (Darroudi *et al.*, 2021; Ding *et al.*, 2023). Já no conjugado (QSAF) tem alargamento da banda em 3432 cm^{-1} pela sobreposição do R-OH (3541 cm^{-1}) e NH da amida secundária (3323 cm^{-1}) e da amina primária (3425 cm^{-1}) do ácido fólico e da amina primária (3439 cm^{-1}) da quitosana. Além disso, há um deslocamento da banda em 1418 cm^{-1} referente ao alongamento do anel pteridina do AF e da amida primária de 1657 cm^{-1} para 1644 cm^{-1} , indicando a ligação COOH-NH₂ do ácido fólico com a quitosana (Islam *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2011).

Figura 28 - Espectro de FTIR dos compostos puros.



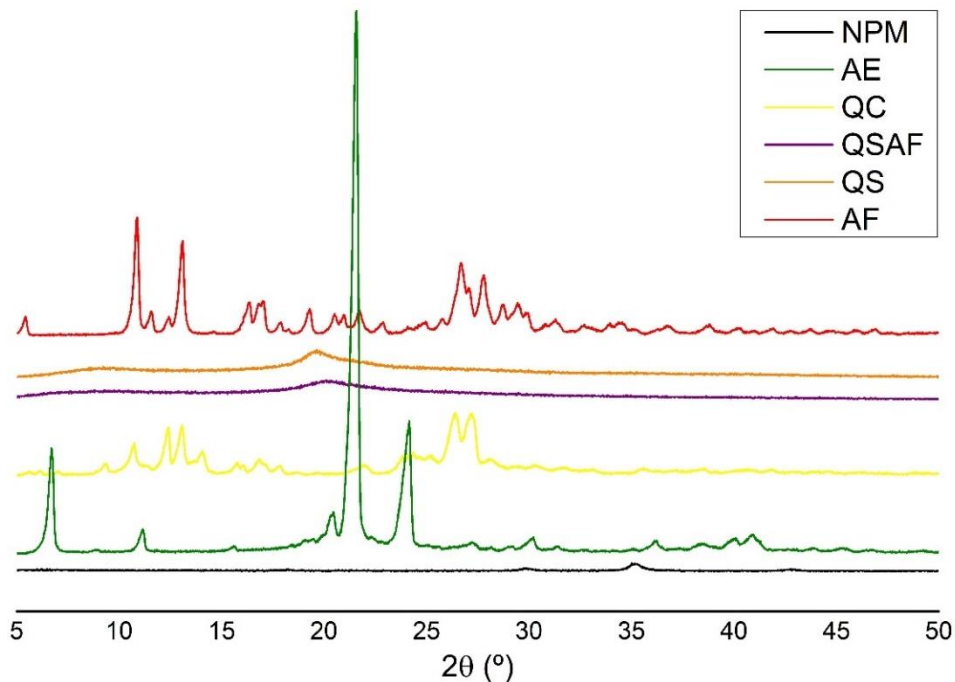
Fonte: A autora.

Em relação ao espectro da quercetina, as bandas em 3400 cm^{-1} e 3275 cm^{-1} representam o estiramento OH e as ligações aromáticas $\text{C} = \text{C}$ são indicadas pelas bandas entre 1670 cm^{-1} a 1516 cm^{-1} , com porção fenólica típica em 1360 cm^{-1} e 1317 cm^{-1} (Talarico *et al.*, 2021; Vijayakumar *et al.*, 2017).

5.9.2 Avaliação por difração de Raio-X (X Ray Diffraction - DRX)

Os difratogramas de raio X dos compostos puros (NPM, AE, QC, QS, QSAF, AF) estão representados na Figura 29 e podem indicar a cristalinidade das amostras. Muitos estudos indicam que os compostos convertem para a forma amorfa quando encapsulados em partículas coloidais (Zhou *et al.*, 2021). Os picos de difração característicos da ferrita de manganês localizados em cerca de 22° , 35° , 44° , 51° , 64° e 75° correspondem aos planos cristalinos, porém o difratograma da NPM (MnFe_2O_4 -Citrato) apresentou apenas picos pouco evidentes em 35° e em 30° (Gorgizadeh *et al.*, 2020; Islam *et al.*, 2017).

Figura 29 - Difratograma de Raio X dos compostos puros.



Fonte: A autora.

A quercetina apresentou diversos picos que indicam a sua cristalinidade entre 9° e 27° ($9^\circ, 10^\circ, 12^\circ, 13^\circ, 14^\circ, 16^\circ, 17^\circ, 22^\circ, 24^\circ, 25^\circ, 26^\circ$ e 27°) (Wang Z. *et al.*, 2022; Zhou *et al.*,

2021). Da mesma forma, o ácido esteárico e o ácido fólico também indicam compostos cristalinos com picos intensos próximos a 6, 21 e 24°, e 11, 13 e 26°, respectivamente.

Em relação aos polímeros, os difratogramas sugerem uma característica mais amorfa, com um pico alargado e pouco evidente em 19° (QS) e 20° (QSAF). A redução da intensidade do pico em QSAF também sugere a conjugação do ácido fólico na quitosana, não apresentando picos de cristalinidade do AF (Das *et al.*, 2023).

6 CONCLUSÕES

Neste estudo foram desenvolvidos dois diferentes tipos de sistemas nanoestruturados para o carreamento de quercetina visando o tratamento de câncer no intestino grosso. Cada sistema foi delineado buscando estratégias distintas de ação e ambos se mostraram promissores representando um avanço para futuros estudos de liberação de compostos bioativos. A capacidade de direcionamento magnético e hipertermia das nanopartículas magnéticas (NPMs) oferecem a possibilidade de terapias combinadas com maior direcionamento do ativo. E, o encapsulamento da QC em nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) permite maior estabilidade e biodistribuição otimizada para administração oral deste fitoquímico.

Os resultados apresentados fornecem contribuições para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de sistemas de liberação direcionada de quercetina (QC) por meio da funcionalização de NPMs e NLSs. Apesar de não ter sido avaliado o parâmetro de direcionamento, este estudo mostrou eficiente encapsulação da quercetina com o uso de quitosana-folato conjugado, sendo uma boa opção para sistemas de liberação direcionada sem prejudicar a encapsulação do ativo.

A etapa de otimização dos processos de preparação e o planejamento fatorial revelaram formulações que apresentaram propriedades aprimoradas com tamanho reduzido, homogeneidade e maior estabilidade, indicando a formulação mais adequada para o desenvolvimento dos sistemas conforme a resposta desejada. Discutimos também, a importância de alguns fatores no desenvolvimento destas formulações, como o limite de tempo de sonicação na homogeneidade e tamanho das NLSs e a influência da quitosana no potencial Zeta de NPMs mostrando a importância de um revestimento polimérico.

Concluimos ainda, que as NPMs apresentaram maior estabilidade estérica e eletrostática na maior concentração de quitosana testada (2 mg.mL^{-1}), garantindo menor tendência de aglomeração, boa eficiência de encapsulação e um controle de liberação de 14% de quercetina em 24 h. Esta formulação demonstrou potencial para aplicação na terapia do câncer de cólon pelo tamanho reduzido. A via de administração pode ser melhor investigada, aplicando essas NPMs de forma intratumoral e intravenosa, ou ainda, uma formulação oral com outros revestimentos para proteção gatroentérica como uma estratégia *Nano-in-Micro*.

Em relação as NLSs, a formulação otimizada com 1 mg.mL^{-1} e 10 minutos de sonificador apresentou resultados potenciais para uma aplicação de quimioterapia oral com nanopartículas de 350 a 430 nm e boa homogeneidade com $\text{PDI} < 0,26$. Neste caso, ainda precisaria ser avaliada a estabilidade do ativo e a proteção gastroentérica do sistema. Pensando em uma liberação colônica, a estratégia *Nano-in-Micro* também poderia ser uma boa alternativa de revestimento com polímeros gastroresistentes para proteção do sistema até a região colônica já que a liberação da quercetina a partir das NLSs foram do tipo *burst*.

Em suma, este estudo espera ter contribuído com os avanços significativos na interface entre nanotecnologia e saúde, demonstrando o potencial das formulações de NPMs e NLSs funcionalizadas com quitosana e ácido fólico para o tratamento do câncer, cada um com suas particularidades. Outros fatores e parâmetros podem ser avaliados buscando resultados ainda melhores, assim como, caracterizações e análises *in vitro* e *in vivo* para avaliar o potencial citotóxico destes sistemas de liberação, além da avaliação da via de administração mais adequada para cada sistema desenvolvido.

REFERÊNCIAS

- ADITYA, N. P. *et al.* Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 115–121, nov. 2014.
- AGARWAL, M. *et al.* Preparation of Chitosan Nanoparticles and their In-vitro Characterization. **International Journal of Life-Sciences Scientific Research**, v. 4, n. 2, p. 1713–1720, mar. 2018.
- AGHAJANZADEH, M. *et al.* In vivo and In vitro Biocompatibility Study of MnFe₂O₄ and Cr₂Fe₆O₁₂ as Photosensitizer for Photodynamic Therapy and Drug Delivery of AntiCancer Drugs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 46, n. 5, p. 846–851, mai. 2020.
- AISIDA, S. O. *et al.* Bio-inspired encapsulation and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **European Polymer Journal**, v. 122, p. 109371, jan. 2020.
- ALGHARIB, S. A. *et al.* Preparation of chitosan nanoparticles by ionotropic gelation technique: Effects of formulation parameters and in vitro characterization. **Journal of Molecular Structure**, v. 1252, p. 132129, mar. 2022.
- ALMATROODI, S. A. *et al.* Potential Therapeutic Targets of Quercetin, a Plant Flavonol, and Its Role in the Therapy of Various Types of Cancer through the Modulation of Various Cell Signaling Pathways. **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1315, mar. 2021.
- AL-MUSAWI, S. *et al.* Design and Synthesis of Multi-Functional Superparamagnetic Core-Gold Shell Nanoparticles Coated with Chitosan and Folate for Targeted Antitumor Therapy. **Nanomaterials**, v. 11, n. 1, p. 32, dez. 2020.
- AL-OBAIDY, R. *et al.* Targeted delivery of paclitaxel drug using polymer-coated magnetic nanoparticles for fibrosarcoma therapy: in vitro and in vivo studies. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 3180, fev. 2023.
- AMIRYAGHOUBI, N. *et al.* Smart chitosan–folate hybrid magnetic nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin to osteosarcoma cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 220, p. 112911, dez. 2022.
- ANSARI, S. R. *et al.* Hyperthermia-Induced In Situ Drug Amorphization by Superparamagnetic Nanoparticles in Oral Dosage Forms. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, n. 19, p. 21978–21988, maio 2022.
- APRICENO, A. *et al.* Preparation and Characterization of Chitosan-Coated Manganese-Ferrite Nanoparticles Conjugated with Laccase for Environmental Bioremediation. **Polymers**, v. 13, n. 9, p. 1453, abr. 2021.

ASIF, A. *et al.* Development, Statistical Optimization and Characterization of Fluvastatin Loaded Solid Lipid Nanoparticles: A 32 Factorial Design Approach. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 584, mar. 2022.

BANO, S. *et al.* Paclitaxel loaded magnetic nanocomposites with folate modified chitosan/carboxymethyl surface; a vehicle for imaging and targeted drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1–2, p. 554–563, nov. 2016.

BARRETO, A. C. H. *et al.* Magnetic nanoparticles for a new drug delivery system to control quercetin releasing for cancer chemotherapy. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 12, p. 6545–6553, dez. 2011.

BAYÓN-CORDERO, L.; ALKORTA, I.; ARANA, L. Application of Solid Lipid Nanoparticles to Improve the Efficiency of Anticancer Drugs. **Nanomaterials**, v. 9, n. 3, p. 474, mar. 2019.

BECKER, L. P. *et al.* Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 317–323, abr. 2016.

BEH, C. Y. *et al.* Advances in Biomimetic Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy and Diagnosis. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 5052, ago. 2021.

BEHBAHANI, E. S. *et al.* Optimization and characterization of ultrasound assisted preparation of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles: Application of central composite design, thermal analysis and X-ray diffraction techniques. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 271–280, set. 2017.

BELANOVA, A. A. *et al.* Physicochemical Properties of Magnetic Nanoparticles: Implications for Biomedical Applications In Vitro and In Vivo. **Oncology Research and Treatment**, v. 41, n. 3, p. 139–143, 2018.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, ago. 2016.

BOHARA, R. A.; THORAT, N. D.; PAWAR, S. H. Role of functionalization: strategies to explore potential nano-bio applications of magnetic nanoparticles. **RSC Advances**, v. 6, n. 50, p. 43989–44012, 2016.

BRANQUINHO, L. C. *et al.* Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 2887, out. 2013.

BUCHWEITZ, M. *et al.* Quercetin solubilisation in bile salts: A comparison with sodium dodecyl sulphate. **Food Chemistry**, v. 211, p. 356–364, nov. 2016.

CINTRA, E. R. *et al.* Folate-Targeted PEGylated Magnetoliposomes for Hyperthermia-Mediated Controlled Release of Doxorubicin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, mar. 2022.

DABAGHI, M.; QUAAS, R.; HILGER, I. The Treatment of Heterotopic Human Colon Xenograft Tumors in Mice with 5-Fluorouracil Attached to Magnetic Nanoparticles in Combination with Magnetic Hyperthermia Is More Efficient than Either Therapy Alone. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 2562, set. 2020.

DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, maio 2018.

DARROUDI, M. *et al.* An overview and bibliometric analysis on the colorectal cancer therapy by magnetic functionalized nanoparticles for the responsive and targeted drug delivery. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 399, dez. 2021.

DAS, P. *et al.* Augmentation of anti-proliferative efficacy of quercetin encapsulated chitosan nanoparticles by induction of cell death via mitochondrial membrane permeabilization in oral cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 250, p. 126151, out. 2023.

DE OLIVEIRA, R. N. *et al.* The promising antischistosomal activity of oleic acid-loaded polymeric nanocapsules for oral administration. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, p. 102429, jun. 2021.

DE SOUZA, M. L. **Carreador lipídico nanoestruturado contendo antimoniato de meglumina como alternativa terapêutica de uso oral contra a leishmaniose**. 2022. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

DHORANWALA, K. A.; SHAH, P.; SHAH, S. Formulation Optimization of Rosuvastatin Calcium-Loaded Solid Lipid Nanoparticles by 32 Full-Factorial Design. **NanoWorld Journal**, v. 1, n. 4, 2016.

DING, Z. *et al.* Synthesis, characterization and in vitro digestion of folate conjugated chitosan-loaded proanthocyanidins nanoparticles. **Food Research International**, v. 163, p. 112141, jan. 2023.

EBRAHIMNEJAD, P. *et al.* An updated review of folate-functionalized nanocarriers: A promising ligand in cancer. **Drug Discovery Today** Elsevier Ltd, fev. 2022.

ETEMADI, H.; PLIEGER, P. G. Magnetic Fluid Hyperthermia Based on Magnetic Nanoparticles: Physical Characteristics, Historical Perspective, Clinical Trials, Technological Challenges, and Recent Advances. **Advanced Therapeutics**, v. 3, n. 11, p. 2000061, nov. 2020.

FARINHA, P. *et al.* Nanomedicines in the treatment of colon cancer: a focus on metallodrugs. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 12, n. 1, p. 49–66, jan. 2022.

FENGZHEN, W. *et al.* Preparation, optimization, and characterization of chitosancoated solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. **The Journal of Biomedical Research**, v. 32, n. 6, p. 411, 2018.

GHANBARI-MOVAHED, M. *et al.* Quercetin- and rutin-based nano-formulations for cancer treatment: A systematic review of improved efficacy and molecular mechanisms. **Phytomedicine**, v. 97, p. 153909, mar. 2022.

GHASEMIYEH, P.; MOHAMMADI-SAMANI, S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 4, p. 288, 2018.

GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 133, p. 285–308, dez. 2018.

GORGIZADEH, M. *et al.* A MnFe₂O₄/C nanocomposite as a novel theranostic agent in MRI, sonodynamic therapy and photothermal therapy of a melanoma cancer model. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 816, p. 152597, mar. 2020.

HOANG, H. T. *et al.* Dual pH-/thermo-responsive chitosan-based hydrogels prepared using “click” chemistry for colon-targeted drug delivery applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 260, maio 2021.

HU, Q.; LUO, Y. Chitosan-based nanocarriers for encapsulation and delivery of curcumin: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 125-135, mai. 2021.

HUSSAIN, Y. *et al.* Quercetin and Its Nano-Scale Delivery Systems in Prostate Cancer Therapy: Paving the Way for Cancer Elimination and Reversing Chemoresistance. **Cancers**, v. 13, n. 7, p. 1602, mar. 2021.

ISLAM, MD. S. *et al.* Core–shell drug carrier from folate conjugated chitosan obtained from prawn shell for targeted doxorubicin delivery. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 4, p. 55, abr. 2017.

ITRI, R. *et al.* Nanoparticle chain-like formation in electrical double-layered magnetic fluids evidenced by small-angle X-ray scattering. **The European Physical Journal E**, v. 4, n. 2, p. 201-208, jan. 2001.

JAIN, K. K. An Overview of Drug Delivery Systems. *In*: WALKER J. M. **Methods in Molecular Biology**. New York: Humana, 2019. cap. 1, v. 2059, p. 1-54.

JURASEKOVA, Z. *et al.* Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 16, n. 25, p. 12802–12811, 2014.

KATHE, N.; HENRIKSEN, B.; CHAUHAN, H. Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 12, p. 1565–1575, dez. 2014.

KHAN, F. A.; ALBALAWI, R.; POTTOO, F. H. Trends in targeted delivery of nanomaterials in colon cancer diagnosis and treatment. **Medicinal Research Reviews**, v. 42, n. 1, p. 227–258, jan. 2022.

KHATAMIAN, N. *et al.* Preparation and characterization of the myricetin-loaded solid lipid nanoparticles decorated with folic acid-bound chitosan and evaluation of its antitumor and anti-angiogenic activities in vitro and in vivo in mice bearing tumor models. **Cancer Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 9, dez. 2023.

KRASTEVA, N.; GEORGIEVA, M. Promising Therapeutic Strategies for Colorectal Cancer Treatment Based on Nanomaterials. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 6, p. 1213, jun. 2022.

KRISHNAMACHARI, V. *et al.* In Vitro Flavon-3-ol Oxidation Mediated by a B Ring Hydroxylation Pattern. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, n. 6, p. 795–804, jun. 2004.

LI, P. *et al.* Synthesis and characterization of folate conjugated chitosan and cellular uptake of its nanoparticles in HT-29 cells. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 6, p. 801–806, maio 2011.

LUENGO, Y. *et al.* Fine Control of In Vivo Magnetic Hyperthermia Using Iron Oxide Nanoparticles with Different Coatings and Degree of Aggregation. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, p. 1526, jul. 2022.

NAEEM, M. *et al.* Advances in colon-targeted nano-drug delivery systems: challenges and solutions. **Archives of Pharmacal Research**, v. 43, p. 153–169, jan. 2020.

NAIK, T. R. R.; SHIVASHANKAR, S. A.; BINDU, P. J. In-vitro antioxidant and anticancer activities of MnFe₂O₄ nanoparticles synthesized using spinach leaves extract. **Applied Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 330–337, 2022.

NATESAN, S. *et al.* Artemisinin loaded chitosan magnetic nanoparticles for the efficient targeting to the breast cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1853–1859, nov. 2017.

NEJADSHAFIEE, V. *et al.* Magnetic bio-metal–organic framework nanocomposites decorated with folic acid conjugated chitosan as a promising biocompatible targeted theranostic system for cancer treatment. **Materials Science and Engineering: C**, v. 99, p. 805–815, jun. 2019.

PANDEY, S. *et al.* A Recent Update: Solid Lipid Nanoparticles for Effective Drug Delivery. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 12, n. 1, p. 17–33, mai. 2021.

PARMAR, A. V. *et al.* PEO–PPO based star-block copolymer T904 as pH responsive nanocarriers for quercetin: Solubilization and release study. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 1, p. 12–21, jan. 2013.

PATHAN, H. *et al.* Structural changes in non-ionic surfactant micelles induced by ionic liquids and application thereof for improved solubilization of quercetin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 290, p. 111235, set. 2019.

PINHEIRO, R. G. R.; PINHEIRO, M.; NEVES, A. R. Nanotechnology Innovations to Enhance the Therapeutic Efficacy of Quercetin. **Nanomaterials**, v. 11, n. 10, p. 2658, out. 2021.

PRIEGO, S. *et al.* Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: a Bcl-2- and superoxide dismutase 2-dependent mechanism. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 10, p. 3330–3342, out. 2008.

PROFIRIO, D. M.; PESSINE, F. B. T. Formulation of functionalized PLGA nanoparticles with folic acid-conjugated chitosan for carboplatin encapsulation. **European Polymer Journal**, v. 108, p. 311–321, nov. 2018.

PUCEK-KACZMAREK, A. Influence of Process Design on the Preparation of Solid Lipid Nanoparticles by an Ultrasonic-Nanoemulsification Method. **Processes**, v. 9, n. 8, p. 1265, jul. 2021.

PURUSHOTHAM, S. *et al.* Thermoresponsive core–shell magnetic nanoparticles for combined modalities of cancer therapy. **Nanotechnology**, v. 20, n. 30, p. 305101, jul. 2009.

QUADIR, S. S. *et al.* Nano-strategies as Oral Drug Delivery Platforms for Treatment of Cancer: Challenges and Future Perspectives. **AAPS PharmSciTech**, v. 23, n. 5, p. 1–21, jul. 2022.

RAJESH KUMAR, S. *et al.* Quercetin conjugated superparamagnetic magnetite nanoparticles for in-vitro analysis of breast cancer cell lines for chemotherapy applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 436, p. 234–242, dez. 2014.

RAMALINGAM, P.; KO, Y. T. Enhanced Oral Delivery of Curcumin from N-trimethyl Chitosan Surface-Modified Solid Lipid Nanoparticles: Pharmacokinetic and Brain Distribution Evaluations. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 2, p. 389–402, fev. 2015.

RIZEQ, B. R. *et al.* Synthesis, bioapplications, and toxicity evaluation of chitosan-based nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1–24, nov. 2019.

SANDRI, G. *et al.* Chitosan-coupled solid lipid nanoparticles: Tuning nanostructure and mucoadhesion. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 110, p. 13–18, jan. 2017.

SCIOLI MONTOTO, S.; MURACA, G.; RUIZ, M. E. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, p. 1–24, out. 2020.

SEIDU, T. A. *et al.* Functionalization of Nanoparticulate Drug Delivery Systems and Its Influence in Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 1113, mai. 2022.

SHAH, S. A. *et al.* PEG-coated folic acid-modified superparamagnetic MnFe₂O₄ nanoparticles for hyperthermia therapy and drug delivery. **Materials Chemistry and Physics**, v. 138, n. 2–3, p. 703–708, mar. 2013.

SHANAVAS, A. *et al.* Magnetic core-shell hybrid nanoparticles for receptor targeted anti-cancer therapy and magnetic resonance imaging. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 486, p. 112–120, jan. 2017.

SILVA, L. F. C. *et al.* Preparation and characterization of quercetin-loaded solid lipid microparticles for pulmonary delivery. **Powder Technology**, v. 239, p. 183–192, mai. 2013.

SOARES, G. A. *et al.* Long-Term Clearance and Biodistribution of Magnetic Nanoparticles Assessed by AC Biosusceptometry. **Materials**, v. 15, n. 6, p. 2121, mar. 2022.

SRIVASTAVA, S. *et al.* Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24049, jul. 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, mai. 2021.

TALARICO, L. *et al.* Solid lipid nanoparticles produced via a coacervation method as promising carriers for controlled release of quercetin. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 1-14, mai. 2021.

TUNGJAI, M. *et al.* Spectrophotometric Characterization of Behavior and the Predominant Species of Flavonoids in Physiological Buffer: Determination of Solubility, Lipophilicity and Anticancer Efficacy. **The Open Drug Delivery Journal**, v. 2, n. 1, p. 10–19, out. 2008.

VESELOV, V. V. *et al.* Targeted Delivery Methods for Anticancer Drugs. **Cancers**, v. 14, n. 3, p. 622, jan. 2022.

VIJAYAKUMAR, A. *et al.* Quercetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticle Dispersion with Improved Physicochemical Properties and Cellular Uptake. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 3, p. 875–883, abr. 2017.

WAHAB, S. *et al.* Current trends and future perspectives of nanomedicine for the management of colon cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 910, p. 1-27, nov. 2021.

WANG, C. *et al.* Recent advances in anti-multidrug resistance for nano-drug delivery system. **Drug Delivery**, v. 29, n. 1, p. 1684–1697, dez. 2022.

WANG, J.; WANG, Y.; MENG, X. Chitosan Nanolayered Cisplatin-Loaded Lipid Nanoparticles for Enhanced Anticancer Efficacy in Cervical Cancer. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, p. 524, dez. 2016.

WANG, Z. *et al.* Fabrication and In Vitro/Vivo Evaluation of Drug Nanocrystals Self-Stabilized Pickering Emulsion for Oral Delivery of Quercetin. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 897, abr. 2022.

WU, J. The enhanced permeability and retention (Epr) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 8, p. 771, ago. 2021.

WU, K. *et al.* Magnetic nanoparticles in nanomedicine: A review of recent advances. **Nanotechnology**, v. 30, n. 50, p. 1-48, set. 2019.

YANG, D. *et al.* Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–13, dez. 2020.

YANG, S. C. *et al.* Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. **Journal of Controlled Release**, v. 59, n. 3, p. 299–307, jun. 1999.

YANG, S-J. *et al.* Folic Acid-Conjugated Chitosan Nanoparticles Enhanced Protoporphyrin IX Accumulation in Colorectal Cancer Cells. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 679–689, abr. 2010.

YARJANLI, Z. *et al.* The antitoxic effects of quercetin and quercetin-conjugated iron oxide nanoparticles (QNPs) against induced toxicity in PC12 cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 6813–6830, ago. 2019.

ZENKEVICH, I. *et al.* Identification of the Products of Oxidation of Quercetin by Air Oxygen at Ambient Temperature. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 654–672, mar. 2007.

ZHOU, J.-F. *et al.* Physicochemical properties and bioavailability comparison of two quercetin loading zein nanoparticles with outer shell of caseinate and chitosan. **Food Hydrocolloids**, v. 120, p. 106959, nov. 2021.

ZUFELATO, N. **Construção, caracterização e otimização da magnetohipertermia de nanocarreadores multifuncionais fluorescentes: A importância da relaxação coletiva na geração de calor.** 2018. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2018.

APÊNDICE A – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DA QUERCETINA

O método de quantificação da quercetina foi realizado por Espectrofotômetro UV-Vis (M51, BEL ENGINEERING, Monza, Itália), para as formulações de nanopartículas magnéticas (NPM), e por Cromatografia Líquida de Ultra Eficácia (CLUE) acoplado ao espectrofotômetro de UV-Vis (Nexera/Shimadzu, Quito, Japão), para as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).

Conforme determinação da ANVISA na resolução nº 166, de 24 de julho de 2017 e recomendação da ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) foi realizado as exigências analíticas de validação para assegurar a confiabilidade dos resultados. Para tanto, os métodos analíticos foram validados avaliando seletividade, linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e recuperação, além da robustez que foi avaliada apenas para o método por CLUE.

A linearidade e a equação da reta foram definidas pela relação entre a concentração de QC (x) e a absorbância (y) em 373 nm. Com a definição dos coeficientes angular e linear, foram calculados o LD e LQ pelas equações descritas na RE nº166/2017:

$$LD = 3,3 X \left(\frac{\sigma}{a} \right) \quad (7)$$

O: desvio padrão da intersecção entre a reta e o eixo y (coeficiente linear, b); a: intersecção entre a reta e o eixo x (coeficiente angular).

$$LQ = 10 X \left(\frac{\sigma}{a} \right) \quad (8)$$

O: desvio padrão da intersecção entre a reta e o eixo y (coeficiente linear, b); a: intersecção entre a reta e o eixo x (coeficiente angular).

Para garantir a seletividade do método, foram analisadas amostras do sobrenadante da separação magnética de NPM-QS-QC e NPM-QSAF-QC por Espectrofotômetro UV-Vis, além de amostras de NLS-QS sem quercetina para o método de CLUE. A precisão do método determina a proximidade dos resultados de uma mesma amostra expressa pela repetibilidade e precisão intermediária, e demonstrada pela dispersão dos resultados e desvio padrão relativo (Eq. 9).

Enquanto a exatidão é um grau de concordância entre os resultados experimentais em relação ao valor verdadeiro, sendo expressa pela recuperação (Eq. 10), e a robustez busca avaliar a proximidade dos resultados quando exposto à pequenas alterações nos parâmetros analíticos para mais e para menos.

$$DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) X 100 \quad (9)$$

DPR: desvio padrão relativo. DP: desvio padrão; CMD: concentração média determinada;

$$Recuperação (\%) = \left(\frac{CMD}{CT} \right) X 100 \quad (10)$$

CMD: concentração média determinada; CT: concentração teórica;

Em relação ao método de Espectrofotômetro UV-Vis, inicialmente, uma solução padrão de quercetina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi analisada no espectrofotômetro por varredura de 190 a 500 nm. O espectro obtido apresentou três picos de absorção característicos da QC em 210 nm, 255 nm e 373 nm (Figura 30A). O comprimento de onda escolhido para a curva de calibração e quantificação do analito foi o pico mais isolado, em 373 nm.

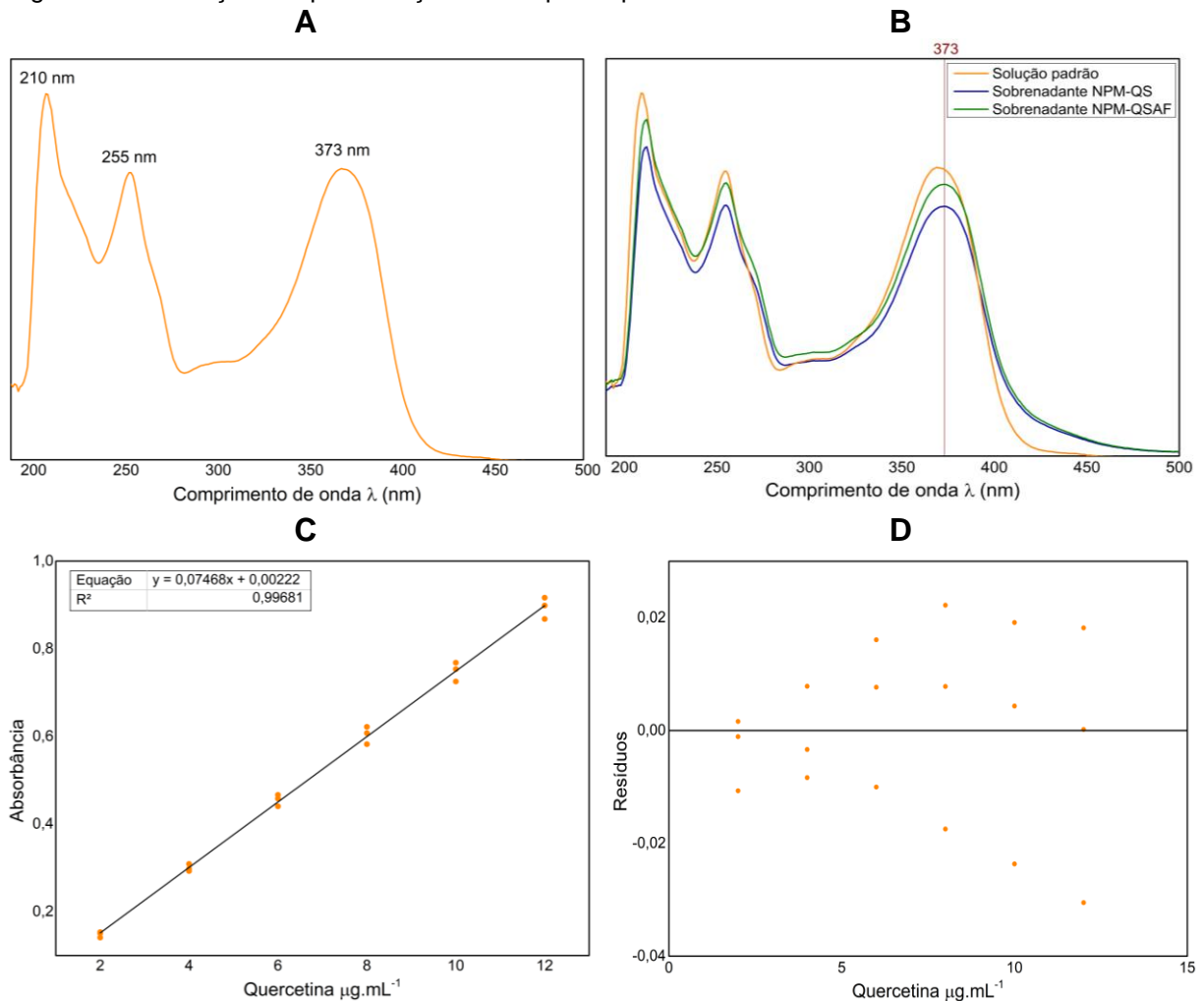
No teste de seletividade do método, realizou-se uma leitura em varredura (190 a 500 nm) da solução de quantificação (sobrenadante após incorporação de QC $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nas NPM-QS e NPM-QSAF) que não detectou interferentes da matriz (NPM ou polímeros), demonstrando que o método proposto é seletivo para detecção e quantificação do analito (Figura 30B).

Em triplicata, a linearidade do método foi determinada pela curva analítica da solução metanólica de QC ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em seis níveis de concentração (12, 10, 8, 6, 4, $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Após o processamento dos resultados por regressão linear dos mínimos quadrados foi obtido como coeficiente angular (a) 0,07468 e linear (b) 0,00222, sendo o modelo representado pela equação da reta: $y = 0,07468x + 0,00222$ (Figura 30C).

A correlação direta entre a absorbância e a concentração da amostra foi confirmada com coeficiente de correlação de Pearson (r) próximo a 1 (0,9984) com significância estatística ($p < 0,05$). O método de quantificação foi validado pelo coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,99681, seguindo recomendação da RE nº 166/2017, ANVISA ($r \geq 0,99$), com relação linear observada em uma faixa linear de 2 a $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ainda, o gráfico de dispersão de resíduos (Figura 30D) demonstra que

o modelo foi adequado com valores dispersos aleatoriamente e próximos a reta, sem padrão tendencioso, confirmando a homoscedasticidade. E, para maior confiabilidade e validade do modelo, foi feito o teste da falta de ajuste verificando a variação dos resíduos e o teste de ANOVA verificando a significância estatística (Tabela 13).

Figura 30 - Validação da quantificação de QC por Espectrofotômetro UV-Vis.



A: Espectro de varredura 190 a 500 nm; B: Seletividade; C: Linearidade; D: Gráfico de resíduos;
Fonte: A autora.

Tabela 13 - Resultados de ANOVA para validar a significância do modelo.

	SS	DF	MS	F	F_{tab}
Regressão	1,1713	1	1,1713	5003,1	4,49
Resíduo	$3,7458 \times 10^3$	16	$2,3411 \times 10^4$	Linear	
Falta de Ajuste	$2,0402 \times 10^4$	4	$5,1005 \times 10^5$	0,17281	3,26
Erro puro	$3,5418 \times 10^3$	12	$2,9515 \times 10^4$	Não há falta de ajuste	

SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados; F: valor do F teste; F_{tab}: valor do F tabelado;

Fonte: A autora.

O teste de ANOVA garantiu a significância estatística ($\geq 95\%$ de confiança), visto que o valor de F para o modelo de regressão é superior ao valor de F_{tab} e, está em concordância com a significância da falta de ajuste, onde o F foi menor que o F_{tab} indicando que não houve falta de ajuste na linearidade do método.

Com o coeficiente angular (a) e o desvio padrão do coeficiente linear (O) obtidos na linearidade do método foi possível calcular os limites de detecção e quantificação. A menor concentração de quercetina que pode ser detectada (LD) e quantificada (LQ) de forma precisa e exata foi de 0,2672 e 0,8098 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

A precisão (Tabela 14) e exatidão (Tabela 15) do método foram validados com desvio padrão relativo (DPR) inferior a 5%, sem diferença significativa entre a concentração teórica e experimental pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$) e com os percentuais de recuperação próximos ao 100%.

Tabela 14 - Resultados da precisão do método de quantificação de QC em espectrofotômetro UV-vis.

	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Desvio Padrão Relativo (%)
Repetibilidade n = 3	5	4,9692	3,3491
	7	6,9643	0,9444
	9	8,9549	1,1252
Intradia n = 3	5	4,8709	3,5743
	7	7,0045	0,7693
	9	8,9817	0,5357
Interdia n = 3	5	4,8709	3,6758
	7	7,1205	0,8582
	9	8,9995	0,8434

Fonte: A autora.

Tabela 15 - Resultados da exatidão do método de quantificação de QC em espectrofotômetro UV-vis.

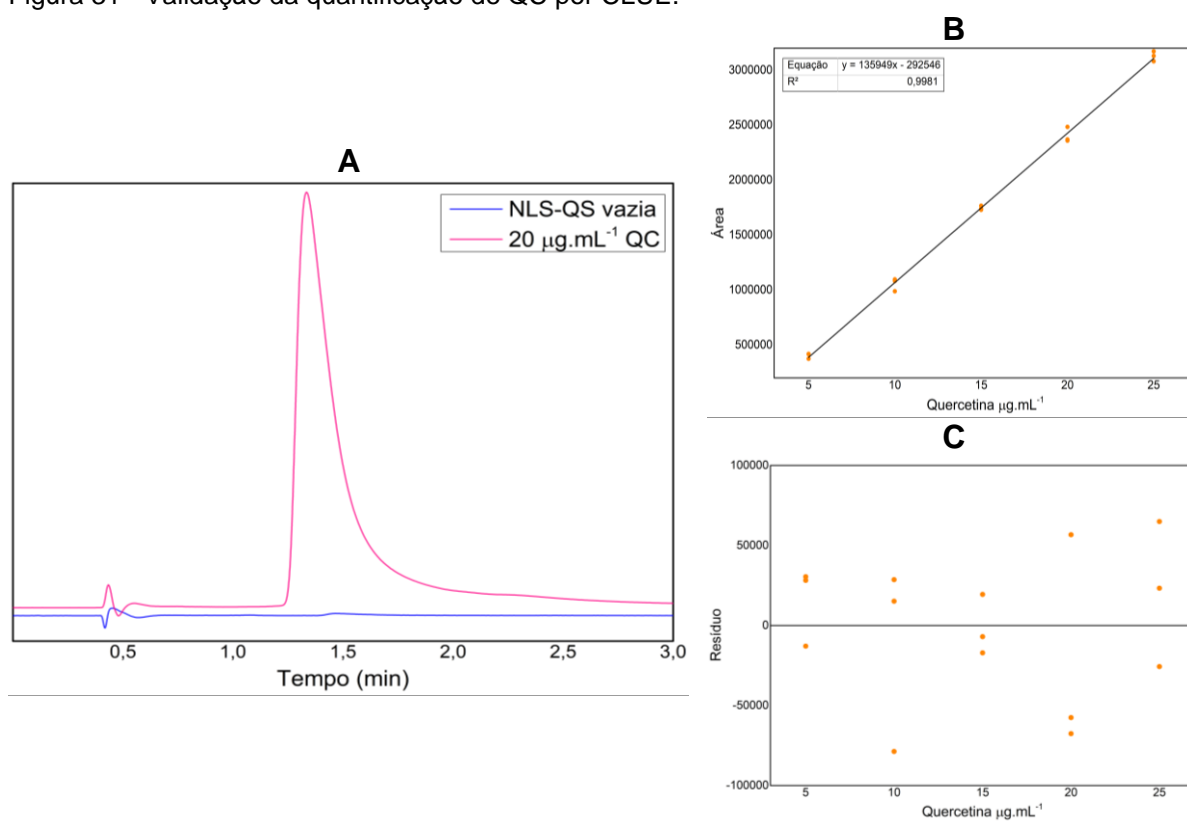
Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Desvio Padrão Relativo (%)
5	4,9037	98,07	3,6758
7	7,0297	100,42	0,8582
9	8,9787	99,76	0,8434

Fonte: A autora.

Em relação ao método de quantificação por CLUE, os parâmetros analíticos no modo isocrático de fase reversa foram fase móvel de metanol:água (60:40 v/v) a 25°C, fluxo 0,3 mL.min⁻¹, corrida de 3 minutos, leitura em 373 nm com coluna HSS T3 (ACQUITY UHPLC, WATERS), tamanho de partícula de 1,8 µm e volume de injeção de 10 µL.

A seletividade do método, foi determinada a partir de NLS branca (revestida com quitosana sem incorporação da quercetina). O cromatograma (Figura 31A) não detectou interferentes da matriz no comprimento de onda de absorção (373 nm), garantindo a seletividade da análise.

Figura 31 - Validação da quantificação de QC por CLUE.



A: Seletividade; B: Linearidade; C: Gráfico de resíduos;
Fonte: A autora.

Em triplicata, a linearidade do método foi determinada pela curva analítica da solução metanólica de QC (100 µg.mL⁻¹) diluída com fase móvel (metanol:água, 60:40) em cinco níveis de concentração (25, 20, 15, 10, 5 µg.mL⁻¹), resultando na equação da reta: $y = 135949x - 292546$ (Figura 31B).

A correlação direta foi confirmada com valor de r de 0,9990 com significância estatística ($p < 0,05$) e o modelo validado pelo R² igual a 0,9981, seguindo

recomendação da RE nº 166/2017, ANVISA ($r \geq 0,99$), com relação linear em uma faixa de 5 a 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ainda, o gráfico de dispersão de resíduos (Figura 31C), o teste de ANOVA e o teste da falta de ajuste também demonstram adequabilidade do modelo linear com significância estatística (Tabela 16), não havendo falta de ajuste.

Tabela 16 - Resultados de ANOVA para validar a significância do modelo.

	SS	DF	MS	F	Ftab
Regressão	$1,3862 \times 10^{13}$	1	$1,3862 \times 10^{13}$	6831,1000	4,67
Resíduo	$2,6379 \times 10^{10}$	13	$2,6379 \times 10^9$	Linear	
Falta de Ajuste	$3,9758 \times 10^9$	3	$1,3253 \times 10^9$	0,5915	3,71
Erro puro	$2,2403 \times 10^{10}$	10	$2,2403 \times 10^9$	Não há falta de ajuste	

SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados; F: valor do F teste; Ftab: valor do F tabelado;

Fonte: A autora.

Da mesma forma que o método do espectrofotômetro, a partir dos coeficientes da equação obteve-se um LD e LQ de 0,6211 e 1,882 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A precisão do método foi validada pela proximidade de amostras independentes analisadas, e a exatidão do método pelo cálculo da recuperação, indicando o grau de concordância entre os resultados. As concentrações baixa, média e alta com os respectivos resultados estão apresentados na Tabela 17 e Tabela 18. O método desenvolvido apresentou precisão e exatidão, sem diferença significativa entre as medidas (ANOVA $p < 0,05$), com DPR inferior a 5%, com exceção da análise intradia concentração de 17 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (5,19%), e com os percentuais de recuperação próximos a 100%.

E, para garantir que o método de quantificação se mantenha inalterado mesmo com pequenas variações nos parâmetros analíticos foi feito o teste de robustez na concentração teórica de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 19). O DPR não apresentou valores acima de 5% para nenhuma das variações que o analito foi submetido e o teste de ANOVA ($p < 0,05$) mostrou que não houve diferença significativa na área do pico da quercetina, comprovando a robustez da análise cromatográfica desenvolvida.

Tabela 17 - Resultados da precisão do método de quantificação de QC por CLUE.

	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Desvio Padrão Relativo (%)
Repetibilidade n = 3	13	13,2370	4,85
	17	17,5742	2,37
	23	22,9824	2,48
Intradia n = 3	13	13,2403	4,38
	17	17,5811	5,19
	23	23,0307	2,45
Interdia n = 3	13	13,7566	1,20
	17	18,1358	4,62
	23	23,1847	1,68

Fonte: A autora.

Tabela 18 - Resultados da exatidão do método de quantificação de QC por CLUE.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Desvio Padrão Relativo (%)
13	13,4113	103,16	3,42
17	17,7637	104,49	4,06
23	23,0659	100,29	0,92

Fonte: A autora.

Tabela 19 - Resultados da robustez do método de quantificação de QC por CLUE.

20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Varição	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Desvio Padrão Relativo (%)
Fase Móvel	59:41	19,7056	0,34
(v/v)	61:39	20,1021	5,67
Fluxo	0,29	20,5741	0,34
(mL.min^{-1})	0,31	19,6077	1,8
Temperatura	24	19,9520	0,36
($^{\circ}\text{C}$)	26	20,9594	5,77

Fonte: A autora.

APÊNDICE B – VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO POR ESPECTROFOTÔMETRO UV-Vis.

A validação do método de quantificação de AF também seguiu as determinações da ANVISA descritas no Apêndice A, e foi realizada para garantir a caracterização do polímero conjugado de quitosana-folato.

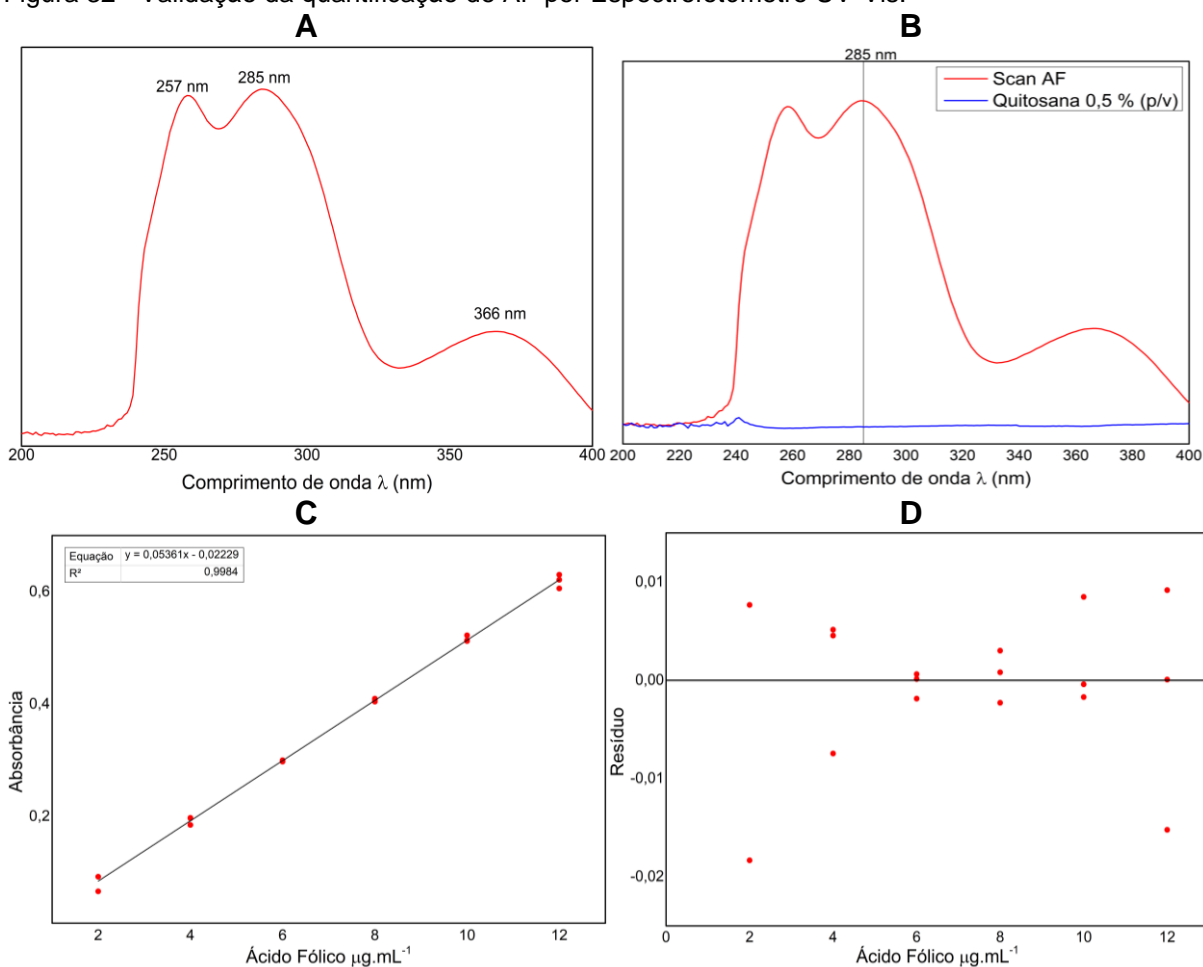
Inicialmente, foi realizada uma varredura na faixa de 200 nm a 400 nm para determinar o comprimento de onda de maior absorção do AF em Espectrofotômetro UV-Vis (M51, BEL ENGINEERING, Monza, Itália). O espectro obtido da solução padrão $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou três picos de absorção em 257 nm, 285 nm e 366 nm, característicos (Figura 32A). A onda de absorção máxima foi observada em 285 nm que é referente ao anel de pterina da molécula de ácido fólico. Este grupamento não é modificado durante a conjugação, sendo este o comprimento de onda escolhido para seguir com a validação da curva de calibração (PROFIRIO; PESSINE, 2018).

Para avaliar a seletividade do método, realizou-se uma leitura em varredura (200 a 400 nm) de solução de QS (0,5% p/v) em DMSO:ácido acético 0,1 M em pH 9 (NaOH), ou seja, uma solução de possíveis interferentes sem a presença do AF. O espectro (Figura 32B) não detectou interferentes indicando seletividade do método proposto em 285 nm.

A curva de calibração do AF padrão foi desenvolvida em triplicata com 6 pontos de concentrações conhecidas (2, 4, 6, 8, 10, 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em 285 nm, e obtidas a partir da diluição de uma solução mãe de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizando o mesmo solvente da reação de conjugação (DMSO:0,1M ácido acético na proporção 1:2 v/v com correção de pH 9 pela adição de NaOH 1M). Com a regressão linear dos mínimos quadrados (Figura 32C) foi obtido como coeficiente angular (a) 0,05361 e coeficiente linear (b) -0,02229, sendo o modelo representado pela equação: $y = 0,05361x - 0,02229$. O modelo foi validado pelo r de 0,9992 e R^2 de 0,9984, seguindo recomendação ($r \geq 0,99$) da RE nº 166/2017, ANVISA.

Ainda, o gráfico de dispersão de resíduos (Figura 32D) demonstra que os valores se apresentam de forma aleatória próximos a reta, confirmando a homoscedasticidade da regressão linear. E, para maior confiabilidade e validade do modelo, o teste de ANOVA e da falta de ajuste foi feito confirmando a significância estatística e estão apresentados na Tabela 20.

Figura 32 - Validação da quantificação de AF por Espectrofotômetro UV-Vis.



A: Espectro de varredura do AF 200 a 400 nm; B: Seletividade; C: Linearidade; D: Gráfico de resíduos;
Fonte: A autora.

Tabela 20 - Resultados de ANOVA para validar a significância do modelo.

	SS	DF	MS	F	F _{tab}
Regressão	0,60355	1	0,60355	9991,80000	4,49
Resíduo	$9,6646 \times 10^4$	16	$6,0404 \times 10^5$	Linear	
Falta de Ajuste	$3,1344 \times 10^5$	4	$7,836 \times 10^6$	0,10056	3,26
Erro puro	$9,3512 \times 10^4$	12	$7,7927 \times 10^5$	Não há falta de ajuste	

SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados; F: valor do F teste; F_{tab}: valor do F tabelado;

Fonte: A autora.

Com o coeficiente angular (a) e o desvio padrão do coeficiente linear (O) obtidos na linearidade do método foi possível calcular os limites de detecção e quantificação de 1,076 e 3,2608 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A precisão (Tabela 21) e exatidão (Tabela 22) do método foram validadas com DPR < 5%, sem diferença

significativa entre as medidas (ANOVA, $p < 0,05$) e com percentuais de recuperação próximos do 100%.

Tabela 21 - Resultados da precisão do método de quantificação de AF.

	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Desvio Padrão Relativo (%)
Repetibilidade n = 3	5	4,9067	0,94
	7	7,0466	1,42
	9	8,9434	1,24
Intradia n = 3	5	4,995	1,51
	7	7,0877	1,04
	9	9,0305	2,15
Interdia n = 3	5	5,092	1,42
	7	7,1144	1,81
	9	9,1424	0,68

Fonte: A autora.

Tabela 22 - Resultados da exatidão do método de quantificação de AF.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Desvio Padrão Relativo (%)
5	4,9979	99,95	0,3437
7	7,0829	101,18	1,2447
9	9,0388	100,43	1,1866

Fonte: A autora.