



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BRUNA FERNANDA DE LIMA ARRUDA HOLANDA

**OTIMIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI (ϵ -
CAPROLACTONA) CARREGADAS COM RESVERATROL PARA
TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**

Recife

2024

BRUNA FERNANDA DE LIMA ARRUDA HOLANDA

**OTIMIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI (ϵ -
CAPROLACTONA) CARREGADAS COM RESVERATROL PARA
TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Coorientadora: Dra. Myla Lôbo de Souza

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Holanda, Bruna Fernanda de Lima Arruda.

Otimização de nanopartículas de poli (E-caprolactona)
carregadas com resveratrol para tratamento do câncer de mama /
Bruna Fernanda de Lima Arruda Holanda. - Recife, 2024.
95f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas, 2024.

Orientação: Pedro José Rolim Neto.

Coorientação: Myla Lôbo de Souza.

1. Nanocarreador; 2. Planejamento experimental; 3. Liberação
controlada; 4. Viabilidade celular; 5. Tratamento. I. Rolim
Neto, Pedro José. II. Souza, Myla Lôbo de. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

BRUNA FERNANDA DE LIMA ARRUDA HOLANDA

**OTIMIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI (ϵ -
CAPROLACTONA) CARREGADAS COM RESVERATROL PARA
TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito para obtenção do título de
mestre em Ciências Farmacêuticas.

Recife, 07 de agosto de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
(Presidente)

Dr.^a Joandra Máisa da Silva Leite
(Membro Externo)

Dr.^a Thayse Silva Medeiros
(Membro Externo)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Betânia Magaly e Fernando Holanda, que me permitiram estar aqui hoje, me ajudaram a crescer da forma mais brilhante e cuidadosa que eu poderia sonhar. Por todos os conselhos, palavras de conforto e ombro amigo nos momentos mais difíceis, não apenas durante a pós-graduação, mas durante toda a minha vida. À minha irmã Tainá, minha melhor amiga, com quem compartilho as melhores risadas e em quem sempre posso confiar, obrigada por tudo, "Nana".

Ao professor Pedro Rolim, carinhosamente chamado de Pedroca, por me acolher na grande família LTM, por toda a confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e palavras de carinho que sempre me dirigiu. À minha "co", Myla Lôbo, sem quem eu não estaria aqui. Obrigada pela paciência e disposição em me ensinar praticamente tudo que sei.

À professora Larissa Rolim, que sempre observava: "essa menina está sempre na bancada?", por ser a luz no fim do túnel quando eu já não conseguia pensar em resolver questões estatísticas. Obrigada pela oportunidade de me integrar ao GPETCAM e por me permitir crescer ainda mais profissional e academicamente. Ao grupo nano, nas pessoas de Victor Sales, Samilly Sales, Dante Silva e Beatriz Lima, pelas ajudas, debates e trocas de experiências.

Aos meus queridos amigos apocalípticos, Larissa Pereira, Lavinya Arruda, Emerson de Oliveira e Demis Melo, por serem as válvulas de escape nesta loucura que é a vida. Aprendi muito com vocês, e nossa parceria e convivência durante esse um ano e meio foram fundamentais, tanto academicamente quanto pessoalmente. Ao trio de amigas formado sob as bênçãos de Pedro Rolim, obrigada por me apoiarem em tudo.

Aos amigos que fiz no LTM, Aline Ferreira, Lucas Gonzaga, Joanellys Lima, Fernanda Nóbrega e Laysa Barros, obrigada por me ensinarem coisas que vocês nem imaginam, pelos momentos cômicos e pelas histórias incríveis. Aos amigos e familiares de Caruaru e Taquaritinga do Norte, desculpem pela ausência. Perdi muitos eventos, aniversários e comemorações importantes da vida de vocês, mas estou em busca de algo verdadeiramente importante para mim.

Ao laboratório Biofarmatox, na pessoa de George Torres, por lutar batalhas por mim e garantir que os experimentos progredissem. E ao CETENE, na pessoa de Francisco Ribeiro, por se disponibilizar a emprestar o ultrasonicador para que eu pudesse concluir o mestrado. À coordenação e secretaria do PPGCF, nas pessoas de

professor José Lamartine e Rilvan, por todos os esclarecimentos e suporte necessários, desde a seleção até o fim desse ciclo. E por fim, à minha banca, pelas considerações e valiosas contribuições que enriqueceram este trabalho. A todos vocês, meu profundo agradecimento e eterna gratidão.

RESUMO

O resveratrol é um polifenol amplamente estudado quanto ao potencial antineoplásico *in vitro*, entretanto, é classificado como classe II pelo sistema de classificação biofarmacêutica, apresentando baixa solubilidade, instabilidade e intenso metabolismo. Este trabalho objetivou obter, caracterizar e avaliar a liberação de sistemas de resveratrol em nanopartículas poliméricas. Foi validado um método de quantificação do resveratrol por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) para o doseamento dos sistemas. Os sistemas foram obtidos pelo método de nanoprecipitação para obter nanoesferas e nanocápsulas. A eficiência de encapsulamento foi realizada pelo método indireto e quantificado por UV-vis, e as caracterizações físico-químicas foram realizadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difratometria de raios-X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de varredura por transmissão (STEM) para avaliar a formação dos sistemas. Ensaios de liberação *in vitro* nas condições *sink* em diferentes pH evidenciaram o perfil de liberação do resveratrol nos nanosistemas. Nos ensaios de citotoxicidade, realizados em células L929, as células foram expostas a diferentes concentrações de resveratrol encapsulado em nanoesferas e nanocápsulas, bem como ao resveratrol livre. As nanoesferas apresentaram 73,23% e as nanocápsulas 86,57% de eficiência de encapsulamento. O DRX mostrou significativa redução na cristalinidade do fármaco, confirmada pelo STEM e pelo DSC, juntamente com as demais análises que corroboraram a formação das nanopartículas. Nos estudos de liberação, as nanoesferas liberaram em torno de 52% de resveratrol em 48 horas, enquanto as nanocápsulas liberaram cerca de 73% do fármaco incorporado nas 48 horas analisadas através do mecanismo de liberação de Peppas-Sahlin. Foram obtidas nanopartículas com boa estabilidade à temperatura ambiente, preservando suas características físico-químicas de tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta. As nanopartículas contendo resveratrol apresentaram uma redução significativa na viabilidade celular comparada ao resveratrol livre, indicando um potencial dos sistemas em incrementar a atividade do IFA nas células. Dessa forma, foi possível obter nanopartículas com estabilidade de 180 dias em armazenamento à temperatura ambiente e capazes de promover liberação prolongada, com melhores taxas de dissolução, modulação de liberação e eficácia em ensaios biológicos *in vitro*.

Palavras-chave: Nanocarreador; Planejamento experimental; Liberação controlada; Viabilidade celular; Tratamento.

ABSTRACT

Resveratrol is a polyphenol widely studied for its *in vitro* antineoplastic potential; however, it is classified as a class II compound in the Biopharmaceutics Classification System, exhibiting low solubility, instability, and extensive metabolism. This study aimed to obtain, characterize, and evaluate the release of resveratrol-loaded polymeric nanoparticle systems. A method for resveratrol quantification by ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption spectroscopy was validated for system dosing. The systems were obtained via nanoprecipitation to produce nanospheres and nanocapsules. Encapsulation efficiency was determined by the indirect method and quantified by UV-Vis, while physicochemical characterizations were performed using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC), and scanning transmission electron microscopy (STEM) to assess system formation. *In vitro* release assays under sink conditions at different pH values revealed the resveratrol release profile from the nanosystems. In cytotoxicity assays performed on L929 cells, the cells were exposed to different concentrations of resveratrol encapsulated in nanospheres and nanocapsules, as well as free resveratrol. Nanospheres exhibited 73.23% and nanocapsules 86.57% encapsulation efficiency. XRD showed a significant reduction in drug crystallinity, confirmed by STEM and DSC, along with the other analyses that corroborated nanoparticle formation. In the release studies, nanospheres released approximately 52% of resveratrol over 48 hours, while nanocapsules released around 73% of the incorporated drug within the same time frame, following the Peppas-Sahlin release mechanism. Nanoparticles exhibited good stability at room temperature, maintaining their physicochemical characteristics, including size, polydispersity index, and zeta potential. Resveratrol-loaded nanoparticles showed a significant reduction in cell viability compared to free resveratrol, indicating the potential of the systems to enhance the drug's activity in cells. Therefore, nanoparticles with 180-day stability at room temperature were obtained, capable of providing prolonged release, improved dissolution rates, controlled release modulation, and efficacy in biological assays conducted *in vitro*.

Keywords: Nanocarrier; Experimental design; Modified release; Cell viability; Treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do trans-resveratrol (A) e cis-resveratrol (B).	22
Figura 2. Curvas de DSC de substâncias isoladas, misturas físicas binárias e ternárias.	45
Figura 3. Espectro infravermelho de substâncias isoladas, misturas físicas binárias e ternárias.	46
Figura 4. Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade.....	48
Figura 5. Gráfico dos resíduos da linearidade através do cálculo de regressão linear ...	48
Figura 6. Formulação número 9 do DoE para nanoesferas.	54
Figura 7. Gráfico de Pareto para a avaliação das variáveis no delineamento experimental de nanoesferas.....	55
Figura 8. Gráfico de Pareto para a avaliação das variáveis no delineamento experimental de nanocápsulas.	56
Figura 9. Gráfico de superfície de resposta para a variável tamanho de partícula em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental das nanoesferas.	57
Figura 10. Curvas de DSC após a fabricação das nanopartículas.	62
Figura 11. Espectro infravermelho das nanopartículas obtidas.....	63
Figura 12. Gráfico de difração de raios X das nanopartículas obtidas.....	64
Figura 13. Microscopia Eletrônica de Transmissão (STEM) das nanocápsulas contendo resveratrol (A) e seu respectivo branco (B).....	65
Figura 14. Microscopia Eletrônica de Transmissão (STEM) das nanoesferas contendo resveratrol (A) e seu respectivo branco (B).....	66
Figura 15. Gráfico de estabilidade de longa duração das nanoesferas	67
Figura 16. Gráfico de estabilidade de longa duração das nanocápsulas.....	69
Figura 17. Estudo de liberação <i>in vitro</i> das nanopartículas e do resveratrol livre.....	73
Figura 18. Percentual de inibição das células nas diferentes concentrações testadas. ...	77

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Tratamentos mais utilizados para o câncer de mama.	20
Tabela 2. Planejamento do delineamento experimental de acordo com os fatores e níveis empregados na produção de nanopartículas.	39
Tabela 3. Método através da variação intencional de pH com HCl 0,1M e da marca de solvente.	49
Tabela 4. Repetibilidade do método.	50
Tabela 5. Precisão intermediária com analistas diferentes.	50
Tabela 6. Exatidão do método.	50
Tabela 7. Matriz do delineamento experimental das nanoesferas mostrando as variáveis dependentes e independentes.	52
Tabela 8. Matriz do delineamento experimental das nanocápsulas mostrando as variáveis dependentes e independentes.	53
Tabela 9. Otimização da aquisição de nanopartículas através do delineamento experimental.	59
Tabela 10. Eficiência de encapsulamento e <i>drug loading</i> do resveratrol por espectrofotometria.	61
Tabela 11. Modelos cinéticos obtidos a partir da liberação <i>in vitro</i>	74
Tabela 12. Concentrações citotóxicas das substâncias testadas para a célula L929.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNP	Nanopartículas de prata
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Reflectância Total Atenuada
AuNP	Nanopartícula de ouro
BBD	<i>Box Behnken Design</i>
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CMA	Atributos Críticos de Material
CNT	Nanotubos de carbono
CPP	Parâmetros Críticos do Processo
CQA	<i>Critical Quality Attributes</i> (Atributos Críticos de Qualidade)
CUR/MTX	Curcumina/Metotrexato
DL	<i>Drug Loading</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento de Luz Dinâmico)
DMEM	Meio de Cultura de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOE	<i>Design of Experiments</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
DRX	Difração de Raios-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EE	Eficiência de Encapsulamento
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ER-POSITIVAS	Receptor de Estrogênio-Positivas
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro Fetal Bovino)
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
HCL	Ácido Clorídrico
HER2	Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IC ₅₀	Concentração Inibitória 50%

ICH	Conferência Internacional sobre Harmonização
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KBr	Brometo de Potássio
MCF10CA1A	Linha Celular de Câncer de Mama MCF10CA1A
MCF-7	Linha Celular de Câncer de Mama MCF-7
MDAMB231	Linha Celular de Câncer de Mama MDA-MB-231
MDAMB23112	Variante da Linha Celular de Câncer de Mama MDA-MB-231
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MSC	<i>Model Selection Criterion</i> (Critério de Seleção do Modelo)
MSE	<i>Mean Squared Error</i> (Erro Médio Quadrático)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo
NC-R	Nanocápsulas de Resveratrol
NS-R	Nanoesferas de Resveratrol
O/A	Óleo em Água
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCL	Policaprolactona
PDI	Índice de Polidispersão
PEG30	Polietilenoglicol 30
PH	Potencial Hidrogeniônico
PZ	Potencial Zeta
QBD	<i>Quality by Design</i> (Desenvolvimento Baseado em Qualidade)
QTPP	<i>Quality Target Product Profile</i> (Perfil de Produto Alvo de Qualidade)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
R-NP	Nanopartículas de Resveratrol
STEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão com Varredura
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1	Câncer de mama	18
3.2	Resveratrol e seus efeitos no câncer de mama	21
3.3	Importância das nanopartículas no tratamento do câncer.....	23
3.4	Métodos de obtenção de nanopartículas.....	26
3.5	Quality by Design na produção de nanopartículas	27
3.6	Caracterização físico-química e morfológica	28
3.6.1	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	28
3.6.2	Difração de Raios-X (DRX).....	29
3.6.3	Microscopia Eletrônica.....	30
3.6.4	Tamanho médio, índice de polidispersão, e potencial Zeta.....	30
3.7	Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	31
3.8	Análise citotóxica <i>in vitro</i>	34
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	Material.....	36
4.2	Métodos	36
4.2.1	Estudo de compatibilidade.....	36
4.2.2	Validação de método analítico para quantificação do resveratrol nas nanopartículas.....	37
4.2.3	Delineamento experimental e otimização das nanopartículas.....	39
4.2.4	Desenvolvimento das nanopartículas contendo resveratrol.....	40

4.2.5 Caracterização das nanopartículas contendo resveratrol	40
4.2.6 Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	42
4.2.7 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	43
4.2.8 Análise estatística	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Estudo de compatibilidade.....	44
5.2 Validação do método analítico	47
5.3 Delineamento experimental e otimização das nanopartículas	51
5.4 Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas contendo resveratrol	59
5.4.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta.	60
5.4.2 Eficiência de encapsulação	60
5.4.3 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) nas NPs.....	61
5.4.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR)	62
5.4.5 Difratomia de Raios X (DRX).....	64
5.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura por Transmissão (STEM)	65
5.4.7 Estudo de estabilidade coloidal	66
5.5 Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	70
5.6 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	76
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
6.1 Perspectivas	81
7 ANEXOS.....	82
REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma das principais causas de morte entre mulheres em todo o mundo e é caracterizado pela proliferação descontrolada de células mamárias que podem se disseminar para outras partes do corpo (Brasil, 2023). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que o câncer de mama é responsável por cerca de 2,3 milhões de novos casos e 670 mil mortes em 2022, tornando-se o câncer mais diagnosticado globalmente (WHO, 2022). No Brasil, o câncer de mama é o segundo mais incidente entre as mulheres, ficando atrás apenas do câncer de pele não-melanoma, com taxas mais altas nas regiões Sul e Sudeste. Na região Nordeste, Pernambuco é o estado com a maior taxa de mortalidade, com 13,26 casos para cada 100.000 mulheres (Gomes et al., 2022).

As abordagens tradicionais para o tratamento do câncer de mama incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal. Embora essas técnicas tenham melhorado as taxas de sobrevivência, elas apresentam limitações consideráveis. Muitos pacientes desenvolvem resistência aos medicamentos quimioterápicos, o que reduz a eficácia do tratamento a longo prazo (Autier et al., 2024). Outro desafio crítico é a baixa seletividade dos agentes quimioterápicos, que afetam não apenas as células cancerígenas, mas também as células normais, resultando em toxicidade sistêmica (Franceschi; Bezerra; Torqueti, 2024). A quimioterapia, por exemplo, apesar de ser eficaz na redução do tumor, é frequentemente associada a efeitos colaterais graves, como náuseas, fadiga, alopecia e imunossupressão (NCI, 2020). Esse cenário impulsionou a busca por novos fármacos e novos métodos de administração de medicamentos que possam aumentar a concentração do fármaco no local do tumor, minimizando os efeitos adversos nos tecidos saudáveis (Elumalai; Srinivasan; Shanmugam, 2024).

O resveratrol é um polifenol natural encontrado em diversas plantas, incluindo uvas, amendoins e frutos vermelhos. Este composto tem sido amplamente estudado por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (Kurzava Kendall et al., 2024). Estudos pré-clínicos demonstraram que o resveratrol pode induzir apoptose, inibir a proliferação celular e suprimir a angiogênese em várias linhagens de células cancerígenas, incluindo células de câncer de mama (Jang et al., 1997; Kundu & Surh, 2004). No entanto, a aplicação clínica do resveratrol é limitada por sua baixa

solubilidade em água, rápida metabolização e baixa biodisponibilidade (Zhang et al., 2024). Para contornar essas limitações, o encapsulamento do resveratrol em sistemas nanotecnológicos podem ser uma alternativa para contornar os problemas supracitados, proporcionando uma melhor eficácia e uma liberação sustentada e direcionada do composto no local do tumor (Shadmani et al., 2023).

A nanotecnologia emergiu como uma abordagem inovadora e promissora para superar os desafios associados às terapias convencionais. Nanopartículas, incluindo as poliméricas, são sistemas de entrega de fármacos que podem ser projetados para melhorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de agentes terapêuticos (Danafar et al., 2022). Essas nanopartículas poliméricas podem ser subdivididas em nanoesferas, onde o fármaco é distribuído de forma homogênea na matriz polimérica, e nanocápsulas, onde o fármaco é encapsulado em um núcleo rodeado por uma camada polimérica. Além disso, as nanopartículas podem ser funcionalizadas com ligantes específicos que reconhecem e se ligam a receptores presentes na superfície das células tumorais, proporcionando uma entrega direcionada do medicamento (Amicis et al., 2011).

Dentre os vários tipos de nanopartículas, as de policaprolactona têm se destacado devido às suas propriedades biodegradáveis e biocompatíveis (Soppimath et al., 2001). A PCL é um polímero sintético que se degrada lentamente no corpo, permitindo a liberação controlada do fármaco encapsulado ao longo do tempo. Essa característica é particularmente vantajosa para o tratamento do câncer, pois pode manter concentrações terapêuticas do medicamento no local do tumor por períodos prolongados (Sinha et al., 2004).

A abordagem Quality by Design (QbD) tem sido amplamente adotada no desenvolvimento de nanopartículas para assegurar a qualidade e a consistência das características do produto final. Neste contexto, o Design of Experiments (DoE) é uma ferramenta da qualidade utilizada para a otimização dos processos de fabricação de nanopartículas. O DoE permite a avaliação sistemática de múltiplos fatores e suas interações, facilitando a identificação das condições ideais para a síntese das nanopartículas (Buya; Mahlangu; Witika, 2024; Li; Qiao; Wu, 2017). Sendo assim, objetivou-se produzir e otimizar a obtenção de nanopartículas biodegradáveis de poli(ϵ -caprolactona) contendo resveratrol para o tratamento do câncer de mama.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir nanopartículas biodegradáveis de poli(ϵ -caprolactona) contendo resveratrol para o tratamento do câncer de mama.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar um delineamento experimental (DoE) para otimização da obtenção das nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas);
- b) Caracterizar quanto as propriedades físico-químicas das nanopartículas, definindo suas características de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulamento e *drug loading*;
- c) Caracterizar as nanopartículas quanto as propriedades morfológicas através de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão;
- d) Desenvolver e validar a metodologia analítica de quantificação do resveratrol por espectrofotometria de absorção na região ultravioleta-visível (UV-VIS);
- e) Determinar perfil de liberação *in vitro* e a cinética de liberação do resveratrol incorporado às nanopartículas de PCL;
- f) Realizar controle de qualidade físico-químico e perfil de estabilidade preliminar da nanopartícula;
- g) Avaliar o potencial citotóxico das formulações preparadas em células de linhagem cancerígena e não cancerígena.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer de mama

O câncer é a proliferação descontrolada de células anormais por todo o corpo. Essas células anormais são frequentemente chamadas de células cancerosas, malignas ou tumorais. Essas células podem se infiltrar em tecidos saudáveis do corpo (Fatima et al., 2024). Fatores ambientais como tabaco, álcool, produtos químicos, radiação e organismos infecciosos são responsáveis pelo desenvolvimento do câncer e mutações hereditárias, hormonais, distúrbios imunológicos e alterações genéticas aleatórias são alguns fatores internos que apoiam o crescimento do câncer. Doenças como hepatite B e C, HIV, *Helicobacter pylori* e infecção pelo vírus do papiloma humano contribuem para cerca de 15% dos cânceres em todo o mundo (Al-Ajmi et al., 2018; Menezes et al., 2015; Gomes et al., 2022).

O câncer de mama é uma das neoplasias malignas mais prevalentes entre as mulheres no Brasil, representando uma significativa preocupação de saúde pública devido à sua alta incidência e mortalidade. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), para o ano de 2024, foram estimados cerca de 74.000 novos casos de câncer de mama no país, o que corresponde a uma taxa bruta de incidência de aproximadamente 68,5 casos por 100 mil mulheres. Além disso, a epidemiologia do câncer de mama no Brasil continua a revelar disparidades regionais e socioeconômicas que influenciam a detecção precoce e o acesso ao tratamento. Por exemplo, as regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas de incidência, enquanto as regiões Norte e Nordeste ainda registram menores taxas, possivelmente devido a diferenças na infraestrutura de saúde e na conscientização da população sobre a importância do rastreamento (Brasil, 2024).

A relevância do câncer de mama no Brasil também se reflete na mortalidade associada à doença. Em 2023, foram registrados cerca de 19.500 óbitos por câncer de mama, representando uma taxa de mortalidade de 15,2 por 100 mil mulheres. A mortalidade continua a ser particularmente alta entre mulheres de baixa renda e baixo grau de escolaridade, o que sublinha a importância de estratégias de saúde pública focadas na equidade e no acesso universal aos serviços de saúde. Programas de rastreamento mamográfico e campanhas de conscientização têm sido intensificados para melhorar a detecção precoce, já que o diagnóstico em estágios iniciais está associado a

melhores prognósticos e maior taxa de sobrevida. No entanto, desafios persistem na ampliação do acesso a exames de imagem de qualidade e no acompanhamento contínuo das pacientes diagnosticadas (Autier et al., 2024; Watts et al., 2024).

A mulher que possui alterações genéticas herdadas na família tem risco elevado de câncer de mama. De 5 a 10% dos casos estão relacionados a fatores hereditários e/ou genéticos. Existem diferentes subtipos de câncer de mama, classificados com base na presença de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Os principais subtipos são: luminal A, luminal B, HER2-positivo e triplo-negativo (Perou et al., 2000). Cada subtipo apresenta características biológicas e comportamentos clínicos distintos, influenciando diretamente as estratégias terapêuticas adotadas.

O subtipo luminal A é geralmente considerado menos agressivo e tem um melhor prognóstico, com altas taxas de resposta ao tratamento hormonal, devido à sua positividade para receptores de estrogênio e progesterona. O luminal B, embora também positivo para receptores hormonais, é mais agressivo que o luminal A e pode exigir quimioterapia além da terapia hormonal (Bonotto et al., 2017). O subtipo HER2-positivo, caracterizado pela superexpressão do receptor HER2, tende a ser mais agressivo, mas responde bem a terapias alvo específicas, como trastuzumabe e pertuzumabe. O câncer de mama triplo-negativo, que não expressa receptores hormonais nem HER2, é o mais agressivo e tem o pior prognóstico, sendo frequentemente tratado com quimioterapia, já que as opções de terapia alvo são limitadas (Bao et al., 2024).

O tratamento do câncer de mama enfrenta diversos desafios contemporâneos que afetam tanto a eficácia terapêutica quanto a equidade no acesso aos cuidados de saúde. Um dos maiores desafios é o diagnóstico tardio da doença. Muitas pacientes ainda são diagnosticadas em estágios avançados, quando as opções terapêuticas são mais limitadas e a taxa de sobrevivência é menor. Tratamentos padrões, como quimioterapia, radioterapia e cirurgia, embora eficazes, podem causar efeitos colaterais significativos que afetam a qualidade de vida das pacientes, como ilustrado no Quadro 1. A gestão desses efeitos colaterais e a personalização dos tratamentos para minimizar a toxicidade são áreas de preocupação contínua (Tao; Visvanathan; Wolff, 2015).

Quadro 1. Tratamentos mais utilizados para o câncer de mama.

Tratamento	Descrição	Indicação
Cirurgia	Remoção do tumor e/ou tecidos circundantes. Inclui mastectomia e lumpectomia.	Indicada em estágios iniciais e alguns casos avançados. Pode ser conservadora ou radical, dependendo da extensão do tumor.
Radioterapia	Uso de radiação para destruir células cancerígenas remanescentes após a cirurgia.	Frequentemente usada após a cirurgia para reduzir o risco de recorrência local.
Quimioterapia	Uso de medicamentos para destruir células cancerígenas. Pode ser neoadjuvante (antes da cirurgia) ou adjuvante (após a cirurgia).	Indicada em estágios avançados, câncer triplo-negativo, HER2-positivo ou quando o tumor é grande.
Terapia Hormonal	Uso de hormônios ou inibidores hormonais para tratar cânceres sensíveis ao hormônio.	Indicada para cânceres que expressam receptores hormonais (ER+ e/ou PR+). Exemplos: tamoxifeno, inibidores de aromatase.
Terapia Alvo	Medicamentos que atacam alvos específicos das células cancerígenas, como o HER2.	Indicada para câncer HER2-positivo. Exemplos: trastuzumabe (Herceptin), pertuzumabe.
Imunoterapia	Estimula o sistema imunológico a reconhecer e atacar células cancerígenas.	Em uso experimental ou para casos específicos como câncer de mama triplo-negativo. Exemplos: inibidores de checkpoint, vacinas terapêuticas.
Terapias Combinadas	Combinação de duas ou mais abordagens terapêuticas, como quimioterapia e radioterapia.	Usada para aumentar a eficácia do tratamento e diminuir a probabilidade de resistência.

Um outro problema relevante quanto à terapêutica é a resistência ao tratamento, especialmente em casos de câncer de mama metastático, processo pelo qual células cancerígenas se disseminam do tumor primário para outras partes do corpo, formando novas lesões tumorais em locais distantes. Tumores podem desenvolver resistência a medicamentos, como terapia hormonal ou quimioterapia, exigindo estratégias terapêuticas alternativas e contínua pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos (Pernas; Tolaney, 2019). Embora haja progresso na pesquisa de novas terapias, a transição das descobertas laboratoriais para tratamentos clínicos eficazes é lenta e complexa. Por isso, torna-se evidente a necessidade de novas abordagens terapêuticas que possam melhorar a eficácia do tratamento e a qualidade de vida das pacientes com câncer de mama. Terapias inovadoras e alternativas apresentam-se como alternativas promissoras às terapias convencionais. Diversas substâncias naturais têm mostrado potencial como agentes terapêuticos para o câncer de mama, dentre elas o resveratrol. (Bhat; Pezzuto, 2002).

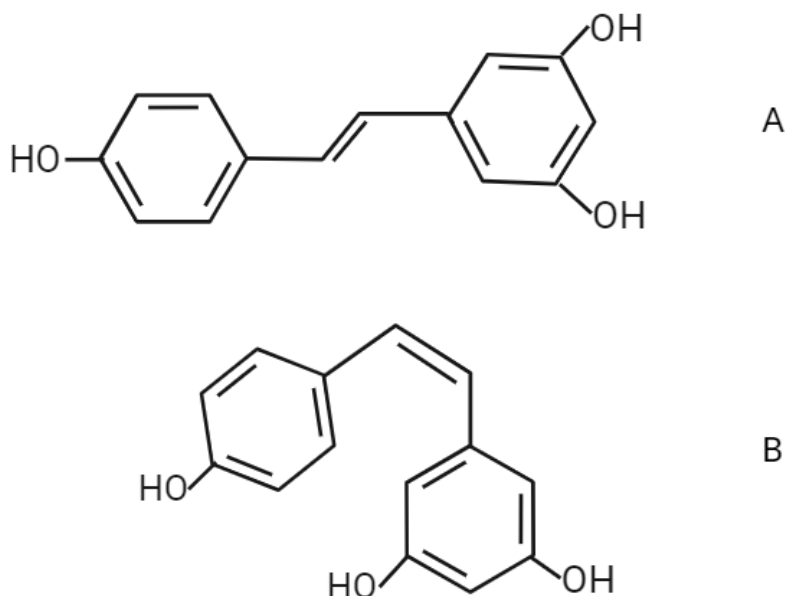
3.2 Resveratrol e seus efeitos no câncer de mama

O resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxiestilbeno) é um polifenol natural amplamente distribuído em diversas plantas, como uvas, amendoins e amoras, sendo reconhecido por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas. Pesquisas recentes têm reforçado seu potencial terapêutico, destacando sua capacidade de interferir em múltiplos processos celulares envolvidos na carcinogênese. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o resveratrol pode induzir apoptose, inibir a proliferação celular, suprimir a angiogênese e modular várias vias de sinalização celular que são cruciais para o desenvolvimento e progressão do câncer. Além disso, o resveratrol tem sido investigado por sua capacidade de melhorar a eficácia de tratamentos convencionais contra o câncer e reduzir os efeitos adversos associados (Shaito et al., 2020; Singh; George; Ahmad, 2013; Song et al., 2023).

A estrutura química do resveratrol consiste em dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de etileno, conferindo-lhe uma configuração *trans* ou *cis* (Jeandet et al., 2021). Possui a fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$ e um peso molecular de 228,24 g/mol. Sua estrutura química é mostrada na Figura 1. A presença de grupos hidroxila nos anéis aromáticos contribui para suas propriedades antioxidantes, permitindo a neutralização de radicais livres e a proteção das células contra danos oxidativos (Song et al., 2023). A forma *trans* é a mais estável e bioativa, predominando nas fontes naturais. Suas

propriedades farmacológicas são atribuídas à capacidade de interagir com várias moléculas-alvo dentro das células, modulando a atividade de enzimas, receptores e fatores de transcrição (Shaito et al., 2020; Singh; George; Ahmad, 2013).

Figura 1. Estrutura química do trans-resveratrol (A) e cis-resveratrol (B).



Fonte: Autoria própria.

Os mecanismos de ação antitumoral do resveratrol são multifacetados. Ele pode induzir apoptose em células cancerígenas através da ativação de vias de sinalização como a via das caspases e a via da p53 (Fulda; Debatin, 2006). Além disso, o resveratrol pode inibir a proliferação celular ao bloquear o ciclo celular em fases críticas, como G1 e S, através da modulação de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (Aggarwal et al., 2004). Também é capaz de inibir a angiogênese, essencial para o crescimento tumoral, através da supressão da expressão de fatores pro-angiogênicos como o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (Xiao et al., 2024).

Diversos estudos têm demonstrado a eficácia do resveratrol na inibição do crescimento de células de câncer de mama. Por exemplo, Jang et al. (1997) observaram que o resveratrol induz apoptose e inibe a proliferação de células MCF-7. Outro estudo de Kundu e Surh (2004) relatou que o resveratrol suprime a expressão de genes relacionados à invasão e metastatização tumoral em células MDA-MB-231.1.2. Estudos mais recentes destacaram que o resveratrol inibe a proliferação de células de câncer de

mama ao induzir apoptose e modular a expressão do receptor de estrogênio, especialmente em células de câncer de mama ER-positivas e HER2-positivas (Francheschi; Bezerra; Torqueti, 2024).

Além disso, uma pesquisa realizada em 2024 revelou que o resveratrol tem como alvo epigenético os oncogenes para silenciamento através da hipermetilação do DNA. Essa ação foi observada em linhas celulares de câncer de mama humano não invasivo ER-positivo MCF-7 e altamente invasivo triplo-negativo MCF10CA1a. O estudo mostrou que a exposição ao resveratrol levou ao aumento da metilação do DNA dentro de potenciadores gênicos específicos, resultando em diminuição da expressão gênica e regulação negativa das vias de sinalização oncogênicas (Kurzava Kendall et al., 2024). Adicionalmente, outro estudo relatou que o resveratrol induz a inibição do crescimento e o bloqueio da fase S em células de câncer de mama, regulando a expressão de várias proteínas relacionadas ao ciclo celular. Isso foi sustentado pela observação da redução nos marcadores de proliferação e um aumento nos marcadores indicativos de arresto do ciclo celular e apoptose (Joe et al., 2024).

O resveratrol é um composto hidrofóbico, evidenciado por seu valor de log P de 3,0. Devido à sua natureza lipofílica, o resveratrol pode atravessar facilmente as membranas celulares e é bem absorvido pelo epitélio humano. É classificado como composto da Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica por possuir baixa solubilidade em água (3 mg/100 mL) e alta permeabilidade. No entanto, um problema comum com fármacos de baixa solubilidade aquosa é a dificuldade de alcançar as células ou tecidos alvo em concentrações adequadas para exercer sua ação terapêutica. Essas limitações têm incentivado a busca por métodos alternativos para aumentar a biodisponibilidade do resveratrol e seus derivados (Jeandet et al., 2021).

3.3 Importância das nanopartículas no tratamento do câncer

As nanopartículas representam uma estratégia inovadora e eficaz para a entrega de fármacos no tratamento do câncer. Sua capacidade de melhorar a solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade e toxicidade dos fármacos, além de permitir uma liberação controlada e direcionada, torna-as altamente vantajosas em comparação às formas convencionais de administração de medicamentos (Wang et al., 2012).

A nanotecnologia é uma área interdisciplinar de ciência e engenharia dedicada à manipulação da matéria em uma escala atômica e molecular, geralmente inferior a 500

nanômetros. As nanopartículas, que são uma das principais formas de nanomateriais, possuem propriedades físicas e químicas únicas devido à sua alta razão superfície-volume e efeitos quânticos. Estas características permitem que as nanopartículas interajam de maneiras inovadoras com células biológicas, tornando-as ideais para aplicações médicas como a entrega de fármacos e a terapia dirigida (Karunakaran et al., 2023).

As nanopartículas podem ser classificadas de acordo com sua composição, estrutura e função. Nanopartículas de óxidos metálicos são comumente utilizadas em fotocatalise, proteção UV em cosméticos, e em aplicações biomédicas como agentes de contraste em imagens por ressonância magnética. As nanopartículas de ouro (AuNPs), prata (AgNPs) e nanotubos de carbono (CNTs) com utilização em biossensores, revestimentos de dispositivos médicos; Quantum Dots utilizados em bioimagem, monitores de alta resolução, e dispositivos fotovoltaicos devido às suas propriedades de fluorescência; Lipossomas para entrega de fármacos e vacinas, dendrímeros, e nanopartículas poliméricas, usadas na entrega controlada de fármacos, engenharia de tecidos, e dispositivos médicos devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (Joseph et al., 2022; Karunakaran et al., 2023; Zanbak Çotaoğlu; Köse Özkan; Özkan, 2023).

Nanopartículas poliméricas podem ser projetadas para alcançar a liberação sustentada e controlada de fármacos, reduzindo a frequência de administração e melhorando a aderência ao tratamento. Sua alta área de superfície permite a conjugação com ligantes específicos, direcionando a entrega do fármaco diretamente às células cancerígenas e minimizando os efeitos colaterais sistêmicos. Além disso, as nanopartículas podem atravessar barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica, aumentando a eficácia terapêutica em cânceres de difícil acesso (Sun et al., 2023).

As nanopartículas poliméricas desempenham diversas funções no campo da entrega de fármacos. Elas podem melhorar a eficácia terapêutica dos medicamentos ao promover a solubilidade e a permeabilidade dos compostos ativos, facilitando sua absorção celular e biodisponibilidade (Lee et al., 2022). Além disso, nanopartículas podem reduzir a toxicidade sistêmica dos fármacos ao permitir uma liberação controlada e direcionada, minimizando os efeitos colaterais e a exposição a tecidos não-alvo. Essas partículas também protegem os ativos de degradação precoce, mantendo sua estabilidade e prolongando sua ação no organismo. Por essas razões, a utilização de

nanopartículas é uma estratégia promissora para melhorar a eficiência e segurança dos tratamentos farmacológicos (Ali et al., 2024).

Desde a introdução das primeiras nanopartículas de lipossomas para a quimioterapia nos anos 1990, o campo das nanopartículas tem evoluído rapidamente (Allen & Cullis, 2004). Novas gerações de nanopartículas, incluindo polímeros biodegradáveis como a poli (ϵ -caprolactona) (PCL), têm sido desenvolvidas para melhorar ainda mais a especificidade e eficácia dos tratamentos oncológicos. Estudos clínicos e pré-clínicos continuam a expandir o conhecimento sobre a aplicação dessas tecnologias, abrindo caminho para terapias mais precisas e personalizadas (Torchilin, 2005).

A PCL é um polímero biodegradável amplamente utilizado na fabricação de nanopartículas devido às suas propriedades físicas e químicas favoráveis, como boa biocompatibilidade, biodegradabilidade lenta e capacidade de formar estruturas estáveis para a entrega controlada de fármacos. Este polímero é particularmente atraente para aplicações em nanomedicina, pois sua lenta taxa de degradação permite uma liberação prolongada de medicamentos, tornando-o ideal para terapias que requerem um perfil de liberação sustentado. Além disso, sua compatibilidade com uma ampla gama de fármacos, tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos, e a facilidade de modificação química para incorporar ligantes específicos ampliam suas aplicações em tratamentos personalizados e direcionados (BHADRAN et al., 2023; ONEY-MONTALVO et al., 2024).

Dentro da categoria de nanopartículas poliméricas, as nanoesferas e as nanocápsulas são dois tipos principais que diferem em sua estrutura e função. As nanoesferas são sistemas matriciais sólidos nos quais o fármaco é distribuído ao longo de toda a matriz polimérica, permitindo uma liberação controlada do princípio ativo ao longo do tempo. Este tipo de nanopartícula é especialmente útil para medicamentos que necessitam de uma liberação prolongada e constante. Em contraste, as nanocápsulas apresentam uma estrutura central de reservatório, onde o fármaco é encapsulado em um núcleo líquido ou sólido, envolto por uma camada polimérica. Essa estrutura oferece uma liberação mais direcionada e controlada, sendo muitas vezes utilizada para transportar fármacos que precisam ser protegidos de degradação até chegarem ao seu alvo específico no organismo (Alshawwa et al., 2022; Mora-Huertas; Fessi; Elaissari, 2010).

3.4 Métodos de obtenção de nanopartículas

A obtenção de nanopartículas poliméricas, como as de PCL, podem ser realizadas por várias técnicas, cada uma com suas vantagens e desvantagens. Entre os métodos mais comuns estão a nanoprecipitação e a emulsão-evaporação de solvente. A nanoprecipitação, também conhecida como deslocamento de solvente, é um método simples e rápido para a preparação de nanopartículas. Envolve a adição de uma solução orgânica contendo o polímero e o fármaco a uma solução aquosa contendo um surfactante. A rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa resulta na precipitação das nanopartículas. É um método simples, rápido e não requer altas temperaturas, sendo adequado para polímeros sensíveis ao calor. No entanto, a escolha dos solventes é crucial para evitar toxicidade residual (Zielinska et al., 2020). A evaporação do solvente orgânico com pressão reduzida ou agitação contínua resulta na formação de nanopartículas (Gagliardi et al., 2021).

A encapsulação do resveratrol em nanopartículas de PCL visa melhorar sua estabilidade, biodisponibilidade e eficácia terapêutica. A incorporação do resveratrol pode ser realizada durante a síntese das nanopartículas, misturando-o com o polímero na fase orgânica. Alternativamente, pode-se utilizar a técnica de adsorção pós-síntese, onde o resveratrol é adsorvido na superfície das nanopartículas preparadas (Neves et al., 2016). A eficiência de encapsulação do resveratrol depende de vários fatores, incluindo a solubilidade do fármaco no polímero, a interação entre o fármaco e o polímero, e as condições de síntese. A otimização desses fatores é essencial para maximizar a carga do fármaco nas nanopartículas e garantir uma liberação controlada e eficiente (Kumar et al., 2018).

A otimização dos parâmetros de síntese é crucial para obter nanopartículas com características desejadas. Parâmetros como a concentração de polímero, razão polímero/fármaco, tipo e concentração de surfactante, e condições de agitação podem influenciar significativamente o tamanho das partículas, eficiência de encapsulamento e estabilidade das nanopartículas (Costa et al., 2016). O uso de ferramentas da qualidade como o Design of Experiments (DoE) permite a avaliação sistemática desses fatores, facilitando a identificação das condições ótimas de síntese (Montgomery, 2017).

3.5 Quality by Design na produção de nanopartículas

O Quality by Design (QbD) é uma abordagem sistemática para o desenvolvimento de produtos que enfatiza o entendimento profundo do processo de fabricação e o controle de variabilidades para garantir a qualidade do produto final. O QbD ajuda a identificar e controlar os fatores críticos que influenciam as características das nanopartículas, como o tamanho e sua distribuição, eficiência de encapsulação e estabilidade. A primeira etapa na aplicação do QbD é definir claramente os objetivos de qualidade do produto final, conhecidos como Quality Target Product Profile (QTPP). Para nanopartículas, isso pode incluir especificações de tamanho, PDI, eficiência de encapsulação, taxa de liberação do fármaco, biocompatibilidade e estabilidade (ICH Q8(R2), 2009).

A identificação dos Atributos Críticos de Qualidade (CQAs) devem ser controladas para garantir que o produto final atenda ao QTPP. Para as nanopartículas, os CQAs mais utilizados incluem, o tamanho das partículas e o índice de polidispersão, a eficiência de encapsulação do fármaco, o potencial zeta e a estabilidade física e química da formulação. Concomitantemente deve-se determinar os Parâmetros Críticos do Processo (CPPs), ou seja, variáveis do processo de fabricação que têm impacto significativo nos CQAs. Na produção de nanopartículas, os CPPs podem incluir a concentração do polímero e do fármaco, a taxa de agitação e temperatura durante a produção, e o tempo e condições de evaporação do solvente (Camacho Vieira et al., 2024).

Os Atributos Críticos de Material (CMAs) são propriedades físicas, químicas, biológicas ou microbiológicas de matérias-primas e outros insumos que podem impactar a qualidade do produto final. Os CMAs são determinados com base no impacto que têm sobre os Atributos Críticos de Qualidade (CQAs) do produto final. Os CMAs comuns para a produção de nanopartículas incluem por exemplo, o tipo e a qualidade do polímero utilizado, as propriedades físico-químicas do fármaco (como solubilidade, estabilidade e estrutura molecular) e o tipo e concentração de surfactante (Buya; Mahlangu; Witika, 2024).

A gestão eficaz dos CPPs e CMAs na produção de nanopartículas traz vários benefícios relacionados à consistência na qualidade do produto, com a garantia de que cada lote de nanopartículas atenda aos requisitos de qualidade, e redução da

variabilidade no processo de fabricação, resultando em um produto final mais consistente. Estudos recentes têm demonstrado a importância de uma gestão eficaz dos CMAs na produção de nanopartículas. Por exemplo, a escolha correta do surfactante e sua concentração foram cruciais para a formação de nanopartículas de tamanho uniforme com alta eficiência de encapsulação do fármaco, conforme relatado por Saha et al. (2021). Essa gestão pode ser otimizada através do uso do DoE (Design of Experiments), que permite planejar e otimizar as formulações de maneira sistemática e eficiente, identificando as melhores condições para a produção de nanopartículas.

3.6 Caracterização físico-química e morfológica

3.6.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica utilizada para a caracterização de materiais, amplamente utilizada em diversas áreas, incluindo a química, ciência dos materiais e nanotecnologia. A FTIR baseia-se na absorção de radiação infravermelha pelas moléculas, resultando em transições vibracionais que são específicas para diferentes grupos funcionais presentes na amostra. Os princípios fundamentais da FTIR envolvem a interação de radiação infravermelha com a amostra, onde a energia é absorvida em frequências específicas correspondentes às vibrações moleculares (Melo et al., 2023).

Cada tipo de ligação química em uma molécula absorve a radiação infravermelha em uma frequência característica, criando um espectro que pode ser visto como uma "impressão digital" única da amostra. A FTIR possui diversas aplicações na caracterização de nanopartículas, sendo utilizada para confirmar a presença do polímero e do fármaco encapsulado, bem como para verificar a integridade química das nanopartículas. Por exemplo, as bandas características de absorção do PCL, tais como as bandas de estiramento do C=O e do C-O-C, podem ser monitoradas para assegurar que o polímero está presente e não sofreu degradação durante o processo de síntese (Smith, 2011).

O processo de obtenção de um espectro FTIR envolve a preparação da amostra, que pode ser analisada na forma de pastilha de KBr, filme fino ou suspensão líquida. A amostra é então exposta a um feixe de luz infravermelha, e a intensidade da luz transmitida é medida em função do comprimento de onda, resultando no espectro de absorção infravermelha. A análise do espectro permite identificar os picos de absorção

correspondentes a diferentes modos vibracionais das moléculas na amostra. No caso das nanopartículas de PCL carregadas com resveratrol, a FTIR pode ser empregado para confirmar a incorporação do resveratrol e avaliar possíveis interações químicas entre o resveratrol e a matriz polimérica (Gurler et al., 2019).

3.6.2 Difração de Raios-X (DRX)

A Difração de Raios-X (DRX) é uma técnica analítica utilizada para a caracterização estrutural de materiais cristalinos. Esta técnica baseia-se na difração de raios-X por átomos em uma estrutura cristalina, fornecendo informações detalhadas sobre a organização atômica do material. Quando um feixe de raios-X incide sobre um cristal, resulta em um padrão de difração que é específico para a estrutura cristalina do material analisado. A técnica de DRX é particularmente importante para a caracterização de nanopartículas, pois permite determinar a fase cristalina, o tamanho dos cristais, a tensão e a desordem cristalina (Melo et al., 2023).

Em materiais nanoestruturados, onde as propriedades dependem fortemente da estrutura atômica e da morfologia, a DRX fornece informações críticas que ajudam a entender e controlar as propriedades do material. A análise de padrões de difração pode revelar a presença de diferentes fases cristalinas e quantificar suas proporções, o que é essencial para o desenvolvimento de nanopartículas com propriedades otimizadas (Gond et al., 2022). Além disso, a DRX pode ser usada para monitorar a estabilidade das nanopartículas ao longo do tempo, detectando possíveis mudanças na estrutura cristalina que possam indicar degradação ou interação com o ambiente (Shokrieh; Ghanei Mohammadi, 2021).

Em sistemas de entrega de fármacos, como nanopartículas de PCL carregadas com resveratrol, a DRX é usada para confirmar a cristalinidade do polímero e do fármaco encapsulado. Esta informação é crucial para garantir que o processo de encapsulamento não alterou a estrutura cristalina do fármaco, o que poderia afetar sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica. O padrão de difração pode revelar mudanças na estrutura cristalina do resveratrol após a encapsulação, indicando se o fármaco está presente em forma cristalina ou amorfa dentro das nanopartículas. A presença do resveratrol em uma forma amorfa geralmente está associada a uma melhor solubilidade e biodisponibilidade (Wang; Komine; Gotoh, 2022).

3.6.3 Microscopia Eletrônica

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) é uma técnica utilizada para visualizar a estrutura interna de materiais a nível nanométrico. No MET, um feixe de elétrons é transmitido através de uma amostra extremamente fina, à medida que os elétrons interagem com a amostra, eles são dispersos e a imagem resultante é formada a partir dos elétrons que passam pela amostra e são capturados em um detector abaixo dela (Stachowiak et al., 2004).

A MET permite a visualização de detalhes estruturais com resolução atômica, o que é crucial para a análise de materiais nanométricos, incluindo nanopartículas, biomateriais e complexos de proteínas. Um dos principais usos do MET é na determinação da morfologia e estrutura interna de nanopartículas. Essa técnica pode revelar informações sobre o tamanho, forma, distribuição de tamanho, estrutura de núcleo-casca e a presença de defeitos ou inclusões dentro das nanopartículas (Egerton, 2005).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET) são técnicas poderosas para avaliar a morfologia e o tamanho das nanopartículas. A MEV fornece imagens detalhadas da superfície das nanopartículas, enquanto a MET oferece imagens de alta resolução que permitem observar a estrutura interna das partículas. Essas técnicas são essenciais para garantir que as nanopartículas tenham um tamanho uniforme e uma morfologia adequada para a liberação controlada do fármaco (Hong et al., 2020).

3.6.4 Tamanho médio, índice de polidispersão, e potencial Zeta

O tamanho médio das nanopartículas é uma característica fundamental que influencia suas propriedades físico-químicas, biológicas e farmacocinéticas. Em sistemas de entrega de fármacos, como as nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) carregadas com resveratrol, o tamanho das partículas pode afetar a taxa de liberação do fármaco, a biodistribuição, a internalização celular e a eficácia terapêutica (Danaei et al., 2018). A técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS) é comumente usada para determinar o tamanho médio das nanopartículas. No DLS, um feixe de laser é passado através de uma suspensão de nanopartículas, e a flutuação na intensidade da luz dispersada causada pelo movimento Browniano das partículas é analisada. Esta técnica

fornece não apenas o tamanho médio, mas também a distribuição de tamanho das partículas na amostra (Bhattacharjee, 2016).

O índice de polidispersão (PDI) é uma medida da distribuição de tamanho das nanopartículas em uma suspensão. Um PDI baixo ($<0,3$) indica uma distribuição de tamanho estreita e homogênea, enquanto um PDI alto (próximo de um) indica uma distribuição de tamanho ampla e heterogênea. A homogeneidade do tamanho das partículas é crucial para garantir a consistência na liberação do fármaco e na resposta biológica (Alonso-González et al., 2022). A análise de PDI também é realizada usando DLS. O PDI é derivado da análise de autocorrelação dos dados de DLS e fornece uma visão sobre a uniformidade das partículas. Para aplicações biomédicas, um PDI inferior a 0,3 é geralmente desejável, pois indica uma distribuição de tamanho uniforme e controlada (Jiang et al., 2008).

O potencial zeta é uma medida da carga superficial das nanopartículas e é crucial para entender a estabilidade coloidal das suspensões de nanopartículas. Ele representa o potencial elétrico na interface de deslizamento ao redor da partícula e influencia a repulsão eletrostática entre partículas, afetando assim a estabilidade da suspensão. Um potencial zeta alto (positivo ou negativo, $\pm|30|$ mV) indica uma suspensão estável devido à forte repulsão entre partículas carregadas, prevenindo a agregação (Souza; Saez; Mansur, 2023). A medição do potencial zeta é realizada usando técnicas como a eletroforese de partículas, onde a mobilidade das partículas em um campo elétrico é medida e convertida no potencial zeta. O potencial zeta também pode influenciar a interação das nanopartículas com células e biomoléculas, afetando a eficiência de entrega do fármaco e a biodistribuição (Alonso-González et al., 2022).

3.7 Ensaio de liberação *in vitro*

Após a realização de todas as caracterizações e avaliação da qualidade das nanopartículas, se faz necessário avaliar o desempenho *in vitro* do sistema de entrega. O ensaio de liberação *in vitro* é um método utilizado para avaliar a taxa e a quantidade de fármaco liberado de um sistema de entrega ao longo do tempo. Esse ensaio simula as condições fisiológicas para prever o comportamento de liberação do fármaco *in vivo* (Yu et al., 2019). Algumas técnicas podem ser utilizadas para determinar o padrão de liberação *in vitro* de fármacos encapsulados em nanopartículas, como a agitação realizada por centrifugação/ultracentrifugação, através de células de difusão

compartimentadas com membranas artificiais ou biológicas, método de ultrafiltração ou difusão através de bolsa de diálise, este último sendo o mais utilizado para ensaios de liberação (Jain; Thareja, 2019).

No método de difusão através da bolsa de diálise, as nanopartículas carregadas com o fármaco são colocadas dentro de uma bolsa feita de uma membrana semipermeável, com poro previamente definido, que permite a passagem do fármaco, mas não das nanopartículas. A bolsa de diálise é imersa em um meio de liberação e mantida sob agitação constante. Em intervalos de tempo predeterminados, amostras do meio de liberação são coletadas e substituídas por volumes iguais de meio fresco para manter as condições *sink* e em seguida as alíquotas são analisadas para quantificar a quantidade de fármaco liberado. As alíquotas coletadas são analisadas por técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou espectrofotometria UV-Vis para quantificar a quantidade de fármaco liberado. A análise dos dados permite a determinação de parâmetros cinéticos de liberação, como a quantidade total liberada, a taxa de liberação e os mecanismos de liberação (Adepu; Ramakrishna, 2021).

Cada mecanismo influencia a cinética de liberação e a eficiência terapêutica do fármaco. Dentre os mecanismos físicos e químicos que governam a liberação de fármacos estão a erosão, difusão e degradação. A difusão é um dos mecanismos mais comuns de liberação de fármacos a partir de matrizes poliméricas e sistemas de entrega. Neste processo, o fármaco se move de uma área de alta concentração dentro do sistema de entrega para uma área de baixa concentração no meio de liberação, seguindo a lei de Fick. A difusão é governada por fatores como a solubilidade do fármaco, o tamanho das partículas, a porosidade da matriz e a interação entre o fármaco e o polímero (Guimarães; Cavaco-Paulo; Nogueira, 2021; Lagreca et al., 2020).

A erosão é um mecanismo de liberação que envolve a degradação e a dissolução do material polimérico que compõe o sistema de entrega. A erosão é influenciada pela natureza do polímero, a presença de enzimas degradativas, a velocidade de difusão de água no polímero e a estabilidade do fármaco no ambiente de liberação (Mirciou et al., 2019). A difusão através da matriz ocorre quando um polímero hidrofílico absorve água e expande, aumentando a difusão do fármaco. Este mecanismo é particularmente relevante para sistemas de entrega baseados em hidrogéis. O processo de inchamento aumenta a mobilidade do fármaco e facilita sua difusão para fora da matriz (Korsmeyer; Lustig; Peppas, 1986; Talevi; Ruiz, 2022).

A degradação enzimática é um processo em que enzimas presentes no ambiente de liberação atacam o material polimérico, degradando-o e liberando o fármaco. Este mecanismo é frequentemente observado em sistemas de entrega de fármacos baseados em polímeros naturais, como a quitosana e o colágeno. A taxa de degradação e a liberação do fármaco dependem da concentração e atividade das enzimas, bem como da estrutura do polímero (Dwivedi et al., 2020). Também existe a possibilidade de ocorrer mecanismos combinados, sendo assim, os modelos matemáticos de liberação *in vitro* podem ser utilizados tanto para determinar o mecanismo específico de liberação, como também para classificar o tipo de transporte envolvido no processo.

Os modelos ajudam a prever a cinética de liberação, permitindo a otimização dos sistemas para atingir uma liberação controlada e eficaz. O modelo de ordem zero descreve uma liberação de fármaco onde a quantidade de fármaco liberado por unidade de tempo é constante, independentemente da concentração remanescente no sistema. Este modelo é aplicável a sistemas de liberação onde o fármaco é liberado a uma taxa constante, como em implantes de liberação controlada (Mircioiu et al., 2019). O modelo de primeira ordem assume que a taxa de liberação do fármaco é proporcional à quantidade de fármaco remanescente no sistema. Este modelo é frequentemente usado para descrever a liberação de fármacos de matrizes porosas e sistemas de difusão (Adepu; Ramakrishna, 2021; Yu et al., 2019).

O modelo de Higuchi é utilizado para descrever a liberação de fármacos de sistemas matriciais, especialmente aqueles baseados em difusão. Este modelo é aplicável a sistemas onde a liberação de fármaco é controlada pela difusão através de uma matriz homogênea (Paul, 2011). O modelo de Hixson-Crowell é utilizado para descrever a liberação de fármacos em situações em que a taxa de liberação é influenciada pela mudança na área de superfície do sistema de entrega. Esse modelo é particularmente relevante para formas farmacêuticas sólidas, como comprimidos, onde a dissolução e a erosão alteram a superfície disponível para a liberação do fármaco ao longo do tempo (Rehman et al., 2020). O modelo de Korsmeyer-Peppas é uma equação empírica utilizada para descrever a liberação de fármacos de sistemas poliméricos quando os mecanismos de liberação não são bem conhecidos ou são complexos (Korsmeyer; Lustig; Peppas, 1986; Talevi; Ruiz, 2022). A cinética de liberação de fármacos é influenciada por diversos fatores, principalmente o tipo de nanopartícula, sua composição, a estrutura da matriz polimérica, a quantidade de fármaco encapsulado

e a forma como o fármaco está disperso no sistema. Essas características físico-químicas das nanopartículas também determinam seu desempenho em outros ensaios, incluindo estabilidade, biodisponibilidade e eficácia terapêutica.

3.8 Análise citotóxica *in vitro*

A análise citotóxica *in vitro* é uma técnica crucial para avaliar a eficácia e a segurança de novas terapias anticancerígenas, como nanopartículas carregadas com fármacos. Este ensaio mede a capacidade de um composto ou formulação de induzir morte celular ou inibir o crescimento celular em culturas de células de câncer. Para realizar a análise citotóxica *in vitro*, são utilizadas linhagens celulares representativas, como L929 (fibroblastos de camundongo) e RAW 264.7 (macrófagos de camundongo). Essas linhagens são escolhidas por suas características específicas e pela facilidade de manutenção em cultura. A L929 é frequentemente usada em normas internacionais para testes de citotoxicidade de materiais médicos, enquanto a RAW 264.7 é valiosa para investigar interações imunológicas devido à sua origem de macrófagos. As células são cultivadas em placas de cultura e tratadas com diferentes concentrações do fármaco ou sistema a ser estudado (Panneerselvam et al., 2024).

A viabilidade celular após o tratamento é avaliada usando ensaios de viabilidade celular, como o ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo), que mede a atividade mitocondrial como um indicador da viabilidade celular. No ensaio MTT, o corante tetrazólio é reduzido pelas células viáveis a um produto formazan insolúvel, que pode ser dissolvido e quantificado espectrofotometricamente (Kari et al., 2022; Mosmann, 1983). A análise dos dados de viabilidade celular permite a determinação da concentração inibitória média (IC₅₀), que é a concentração do fármaco necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%. Este parâmetro é fundamental para comparar a eficácia citotóxica das nanopartículas carregadas com o fármaco, o fármaco sua forma livre e outros tratamentos já estabelecidos (Nair; Sujith, 2023).

Além dos ensaios de viabilidade, técnicas como citometria de fluxo podem ser usadas para avaliar a apoptose e a necrose celular. A citometria de fluxo permite a quantificação de células apoptóticas e necróticas com base em marcadores específicos, como a anexina V e o iodeto de propídio. Esses estudos fornecem uma compreensão abrangente da eficácia terapêutica e do perfil de segurança das nanopartículas, informando o desenvolvimento e a otimização de novas terapias para o tratamento do

câncer de mama (Kari et al., 2022). Dessa maneira, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* permitem a seleção de materiais mais adequados para aplicações *in vivo*, reduzindo a necessidade de testes experimentais em animais e promovem uma abordagem mais ética e eficiente no desenvolvimento de novos tratamentos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Resveratrol foi gentilmente doado pela Pharmapele (Recife, Brasil). O polímero poli ϵ -caprolactona (PCL) e o surfactante SpanTM80 (monooleato de sorbitano) foram adquiridos na Merck (Darmstadt, Alemanha). O Alckest[®] CSO 300 (óleo de rícino etoxilado EO30) foi doado pela MCassab (São Paulo, Brasil). O óleo de semente de gergelim foi doado pela Croda Pharma (East Yorkshire, Inglaterra). Água ultrapura foi obtida pelo equipamento MilliQ water Ultrapure Simplicity[®] (Merck, Darmstadt, Alemanha). Outros produtos químicos, como acetona e solventes de grau analítico, foram adquiridos da Química Moderna (São Paulo, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Estudo de compatibilidade

O ensaio de compatibilidade fármaco-excipiente foi conduzido para selecionar os componentes a serem utilizados no desenvolvimento das nanopartículas poliméricas. Foram realizadas análises envolvendo polímeros, surfactantes e o insumo farmacêutico ativo (IFA), tanto individualmente quanto em misturas binárias e misturas de formulação completa, utilizando as técnicas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para avaliar potenciais incompatibilidades entre os componentes. Alterações drásticas, como deslocamentos, aparecimento ou desaparecimento de eventos térmicos, bem como o surgimento/desaparecimento de bandas no espectro infravermelho em comparação com o perfil original dos compostos isolados, foram avaliadas para indicações de incompatibilidades. Os componentes que demonstraram compatibilidade foram utilizados para obter as nanopartículas poliméricas.

4.2.1.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi realizada utilizando um DSC-60 Shimadzu[®] (Shimadzu, Japão). Amostras com uma massa de aproximadamente $2,5 \pm 0,5$ mg das misturas físicas foram adicionadas ao cadinho de alumínio hermeticamente selado e submetido à análise sob temperatura de 25 °C à 300 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min. Os eventos térmicos e a entalpia foram determinados pelo software TA-60 Shimadzu[®].

4.2.1.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise espectroscópica foi realizada em espectrômetro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier, modelo 400, marca Perkin Elmer® FTIR-MIR. As amostras foram caracterizadas empregando-se a técnica de reflexão total atenuada (ATR), no modo transmitância, com resolução espectral de 8 cm⁻¹ e média de 45 varreduras (scans) por espectro. A região espectral avaliada foi de 4000 a 550 cm⁻¹. Os espectros obtidos foram comparados aos disponibilizados na literatura.

4.2.2 Validação de método analítico para quantificação do resveratrol nas nanopartículas

A validação de métodos analíticos é um processo essencial para garantir a linearidade, precisão (repetibilidade), exatidão, seletividade e robustez do método utilizado na quantificação do resveratrol encapsulado em nanopartículas. A validação foi procedida de acordo com a RDC 166 de 24 de julho de 2017 utilizando o Espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu® UVMini 1240 PC) e Balança analítica (Bioprecisa®- FA2104N) (BRASIL, 2017).

4.2.2.1 Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (BRASIL, 2017). Esse parâmetro foi analisado, a partir de uma leitura comparativa por varredura no espectrofotômetro UV-Vis (190 nm – 1000 nm) entre soluções padrões feitas com o resveratrol e solução sem a adição de resveratrol. Os ensaios foram realizados, em triplicata, na concentração de 3,0 µg/mL.

4.2.2.2 Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (BRASIL, 2017). Foi preparado 25mL de uma solução mãe de 100 µg/mL, e a partir desta solução os ensaios foram realizados, em triplicata, obtidas em cinco níveis de concentrações diferentes: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 µg/mL.

4.2.2.3 Precisão

A precisão é um parâmetro que avalia a proximidade dos resultados obtidos, através de ensaios com amostras preparadas, de acordo com o método analítico a ser

validado. O teste de precisão pode ser expresso através da avaliação dos critérios de repetibilidade. A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade com as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica e da precisão intermediária com variação do analista, visando avaliar a concordância entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos (BRASIL, 2017). Os ensaios foram realizados, em triplicata, obtidas em três níveis de concentrações diferentes: 1,0; 3,0; 5,0 µg/mL.

4.2.2.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. Devendo ser verificada a partir de, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível (BRASIL, 2017). Os ensaios foram realizados, em triplicata, obtidas em três níveis de concentrações diferentes: 1,0; 3,0; 5,0 µg/mL.

4.2.2.5 Robustez

Robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. Na espectrofotometria, o parâmetro robustez pode ser averiguado pela variação de pH da solução, diferentes lotes ou fabricantes (BRASIL, 2017). A robustez do método proposto foi verificada através da variação do pH com adição de HCl 0,1M e dos fabricantes de solventes Química Moderna e Santa Cruz. Para a variação de pH foram preparadas 3 soluções em concentrações de 1, 3 e 5 µg/mL representando um ponto baixo, médio e alto da curva, com adição do tampão HCl 0,1M na proporção 1:3.

4.2.2.6 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é demonstrado pela capacidade de identificar a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Para métodos visuais, o LD é determinado pela menor concentração que permita observar o efeito visual esperado, com uma relação sinal-ruído de pelo menos 2:1.

$$LD = \frac{Dpa.3}{IC}$$

Já o limite de quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas mesmas condições experimentais, sendo necessário que a razão sinal-ruído seja de no mínimo 10:1.

$$LQ = \frac{DPa.10}{IC}$$

4.2.3 Delineamento experimental e otimização das nanopartículas

Um design de experimentos (DoE) foi realizado através do software Minitab® para ajustar todos os parâmetros necessários para a síntese das nanopartículas poliméricas do tipo nanoesfera e nanocápsula, objetivando os melhores parâmetros de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta, ou seja, menor tamanho e PDI, e maior potencial zeta. As formulações testadas foram compostas por diferentes concentrações de polímero, e volumes de fase orgânica e aquosa baseadas em experimentos prévios como ilustrado na Tabela 1. A otimização foi realizada com o design Box-Behnken (BBD) usando três parâmetros em três níveis. Os parâmetros de otimização selecionados foram a concentração de PCL (X_1), o volume da fase orgânica (X_2) e o volume da fase aquosa (X_3), considerados como parâmetros independentes. Os três fatores dependentes considerados foram o tamanho de partícula (Tamanho) (Y_1), o PDI (Y_2) e o potencial zeta (PZ) (Y_3). Para evitar viés, os ensaios foram conduzidos de forma aleatória.

Tabela 2. Planejamento do delineamento experimental de acordo com os fatores e níveis empregados na produção de nanopartículas.

Parâmetros		Nanoesfera			Nanocápsula		
		Níveis			Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)	(-1)	(0)	(+1)
X_1	Concentração de PCL (% p/p)	0,1	0,15	0,2	0,1	0,15	0,2
X_2	Volume de fase orgânica (mL)	20	40	60	10	20	30

X ₃	Volume de fase aquosa (mL)	40	80	120	25	82.5	140
----------------	----------------------------	----	----	-----	----	------	-----

4.2.4 Desenvolvimento das nanopartículas contendo resveratrol

O método de nanoprecipitação foi utilizado para preparar as nanoesferas (NS-R) e nanocápsulas (NC-R). Para obter as nanoesferas com resveratrol, a fase orgânica foi produzida solubilizando PCL (0,15%) e resveratrol (10 mg) em acetona (40 mL). O tensoativo óleo de rícino etoxilado EO30 (1%) foi solubilizado em água (40 mL) para fazer uma fase aquosa. Em seguida, a fase orgânica foi submetida a aquecimento (50°C) para dissolução completa e resfriada por 10–15 minutos. Depois disso, a fase orgânica foi vertida gradualmente na fase aquosa com o auxílio de uma agulha e seringa, a mistura foi submetida ao ultrasonicador por 1 minuto a uma frequência de 70% 850W. O solvente orgânico foi então removido durante 15 minutos por rotaevaporação a 30 rpm, a 40 °C por 15 minutos. Para a produção de nanocápsulas com resveratrol (NC-R), além do polímero e do resveratrol na fase orgânica, óleo de semente de gergelim (25mg) e SpanTM80 (77mg) também foram utilizados para obter a nanocápsula. Diferentemente da nanoesfera, as nanocápsulas seguem para remoção do solvente orgânico sob os mesmos parâmetros sem a necessidade de ser submetida ao ultrasonicador.

4.2.5 Caracterização das nanopartículas contendo resveratrol

4.2.5.1. Tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial Zeta

O tamanho das nanopartículas foi calculado utilizando a tecnologia de dispersão dinâmica de luz no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). A dispersão de nanopartículas (1 mL) foi preparada em água purificada (800 µL) misturando com 200 µL das R-NP. A análise do tamanho das partículas foi conduzida a um ângulo de dispersão de 90° a 25°C. Em seguida, essa dispersão foi analisada para potencial zeta por mobilidade eletroforética no mesmo equipamento.

4.2.5.2. Eficiência de Encapsulamento (EE%) e *Drug Loading* (DL%)

A quantidade de resveratrol encapsulada na nanopartícula foi determinada utilizando espectroscopia UV-Vis e método indireto. A dispersão de nanopartículas foi

centrifugada a 13.000 rpm por 20 minutos. Após isso, o sobrenadante foi coletado e diluído com etanol. Em seguida, foi quantificado o resveratrol utilizando um espectrofotômetro UV-Vis a λ_{max} 307 nm. A EE e DL foram determinadas em triplicata e calculadas pela Equação 1 e 2, respectivamente:

Equação 1.

$$EE\% = \frac{\text{quantidade de fármaco inicial} - \text{fármaco recuperado}}{\text{quantidade total de fármaco}} \times 100$$

Equação 2.

$$DL\% = \frac{\text{quantidade de fármaco inicial} - \text{fármaco recuperado}}{\text{quantidade total de fármaco} + \text{quantidade inicial de polímero}} \times 100$$

4.2.5.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia FTIR foi realizada para confirmar a incorporação do fármaco nas nanopartículas dispersas e as possíveis interações entre os componentes. A varredura FTIR do resveratrol, PCL e excipientes foi feita usando um espectrômetro IRTracer-100 (Shimadzu®). Todas as amostras estavam em forma de pó, e uma pequena quantidade de cada amostra foi analisada conforme previamente citado no tópico 4.2.1.2.

4.2.5.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O resveratrol, PCL e as nanopartículas foram analisados por DSC, onde os eventos térmicos e a entalpia foram determinados usando o software TA-60 (Shimadzu®) como previamente citado no tópico 4.2.1.1.

4.2.5.5. Difração de Raios-X (DRX)

O estudo de difração de raios X das nanopartículas foram determinadas pela análise de difração de raios-X (DRX), obtido usando um difratômetro Smartlab® (Rigaku, Japão), equipado com anodo de cobre, comprimento de onda 1,5443 Å. As amostras foram analisadas no ângulo de difração 2 θ na faixa de 5 à 60°, com velocidade

de varredura de 5 °/min e passo de 0,03 °/s (Aminu et al., 2021). A análise foi realizada no Central multiusuário do Departamento de Física da UFPE.

4.2.5.6. Microscopia Eletrônica de Varredura por Transmissão (STEM)

A análise de STEM foi realizada para confirmar a estrutura esférica das nanopartículas. As amostras foram depositadas em um grid recoberto de Formar e deixados por 3 min. O excesso é retirado com papel filtro, seguido da adição de ácido fosfotungico (PTA) como contraste, sob repouso de 1min. Após, o excesso é retirado e os grids são guardados para secagem em temperatura ambiente. As amostras foram então visualizadas por STEM, no equipamento ZEISS SUPRA 55VP, sob aceleração de 30Kv. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuários do Departamento de Física. A forma e o tamanho das nanopartículas poliméricas foram registrados.

4.2.5.7. Estudo de estabilidade coloidal

A estabilidade das nanopartículas foi verificada através do armazenamento durante seis meses ($30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$). As alíquotas foram retiradas e avaliadas quanto ao tamanho das partículas, PDI, potencial zeta e aparência física em 7, 15, 30, 60, 90 e 180 dias.

4.2.6 Ensaio de liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* das nanopartículas foram realizados usando a técnica de bolsa de diálise, conforme descrito por Luan et al. (2015). As membranas de diálise de acetato de celulose, com porosidade de 12-14 kDa (SERVAPOR®, Alemanha), foram previamente hidratadas em água ultrapura por 12 horas. Cada bolsa de diálise foi preenchida com 1 mL de solução contendo resveratrol livre e nanopartículas dispersas e posteriormente selada. Em seguida, as bolsas foram imersas em béqueres contendo 60 mL de meio de liberação, mantidos a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ com agitação a 100 rpm em banho-maria. O ensaio foi conduzido sequencialmente em diferentes meios simulando condições gastrointestinais, com 2 horas em HCl 1,2 M (meio gástrico), 4 horas em tampão fosfato pH 6,8 (meio intestinal) e tampão fosfato pH 7,4 (meio circulatório), até o término do experimento. A cada intervalo de tempo (de 15 minutos a 48 horas), foram retirados 2 mL do meio de liberação, e repostos mais 2mL para manutenção da condição *sink*, para análise da concentração de resveratrol por

espectroscopia UV-Vis, seguindo o método descrito na seção 4.2.4.2, utilizando uma curva analítica previamente preparada para concentrações entre 1 e 5 µg/mL. A solução de etanol foi usada como referência zero, enquanto as soluções tampão de cada etapa serviram como branco. Os resultados foram expressos como a porcentagem cumulativa de fármaco liberado ao longo do tempo, calculada com base na quantidade total inicialmente adicionada ao ensaio. A cinética de liberação do fármaco foi estimada usando o DDSolver, a fim de encontrar o modelo cinético mais adequado. Foram testados os modelos ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin e Hixon-Crowell. O coeficiente de determinação (R²) e o coeficiente de determinação ajustado (R²-ajustado) foram calculados para determinar o modelo de melhor ajuste.

4.2.7 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

A linhagem celular utilizada para avaliação da citotoxicidade nesta pesquisa é a L929, que é uma linha de células do tipo fibroblastos. A cultura celular foi realizada em frascos contendo meio de cultura DMEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e 1% (v/v) de antibiótico penicilina-estreptomicina X1 (Pen-Strep). Após a contagem do número de células com um hemacitômetro, essas células foram plaqueadas com uma densidade de 1×10^5 células/mL e 100 µl por poço de meio em placas de 96 poços e cultivadas por 18-24 horas. Os meios foram descartados e substituídos por meio de cultura contendo diferentes concentrações das nanopartículas e do fármaco, (1,56 a 25 µg/mL) incubando a 37 °C por 72 horas. 25 µl de solução de MTT com concentração de 0,5 mg/ml foi adicionada a cada poço e incubada por 3 horas. A solução de MTT foi removida dos poços e 100 µl de DMSO foi adicionado a cada poço para dissolver os cristais de formazan. A absorbância óptica da solução roxa de formazan a 540 nm foi medida por um leitor de ELISA. Os resultados foram calculados como porcentagem de redução de viabilidade celular em relação ao controle feito com células cultivadas apenas com meio DMEM.

4.2.8 Análise estatística

A média e o desvio padrão foram calculados para todo o conjunto de dados. A ANOVA unidirecional dos dados foi realizada utilizando o software Statistica, EUA, onde $p < 0,05$ indica uma diferença estatisticamente significativa.

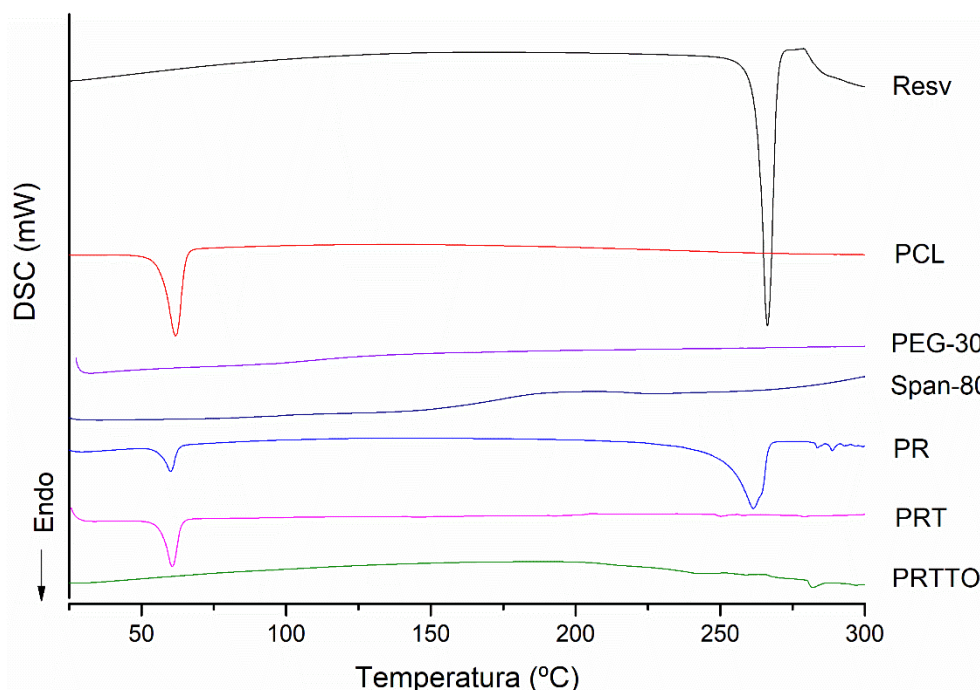
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo de compatibilidade

As incompatibilidades entre o resveratrol e os excipientes podem ser detectadas por diversas alterações, como mudanças na coloração ou na aparência, propriedades mecânicas (como a dureza de medicamentos em formas farmacêuticas sólidas), perfil de dissolução, transformações na forma física, variações no ponto de fusão e perda por sublimação, entre outros. Essas incompatibilidades podem ocorrer nas interações fármaco-excipiente, excipiente-excipiente e fármaco-fármaco no caso de formas farmacêuticas que contêm combinações de fármacos. Portanto, a eficácia e a segurança de um medicamento dependem principalmente de suas propriedades físicas, químicas e biológicas, além dos processos de fabricação, que são altamente influenciados pelas interações entre o fármaco e os excipientes (Ebrahimi et al., 2024; Jain; Shah, 2023).

Os estudos de compatibilidade entre os componentes das formulações foram conduzidos através da avaliação dos espectros de FTIR e curvas de DSC. Nas curvas de DSC, ilustradas na Figura 2, podem ser identificados na curva do PCL (vermelho) um pico característico da sua fusão em 61,83 °C. Na curva do resveratrol (preto), foi possível identificar um pico característico da sua fusão em 266,2°C. Em seguida, estão representadas as curvas de eventos dos tensoativos 1, óleo de rícino etoxilado EO30 e tensoativo 2, o monooleato de sorbitano (Span80). Para o PEG-30, Span80 e o óleo utilizado para a produção das nanocápsulas não foram visualizados eventos na faixa estudada, visto que são substâncias líquidas amorfas com eventos de decomposição acima de 290 °C.

Figura 2. Curvas de DSC de substâncias isoladas, misturas físicas binárias e ternárias.



Fonte: Autoria própria.

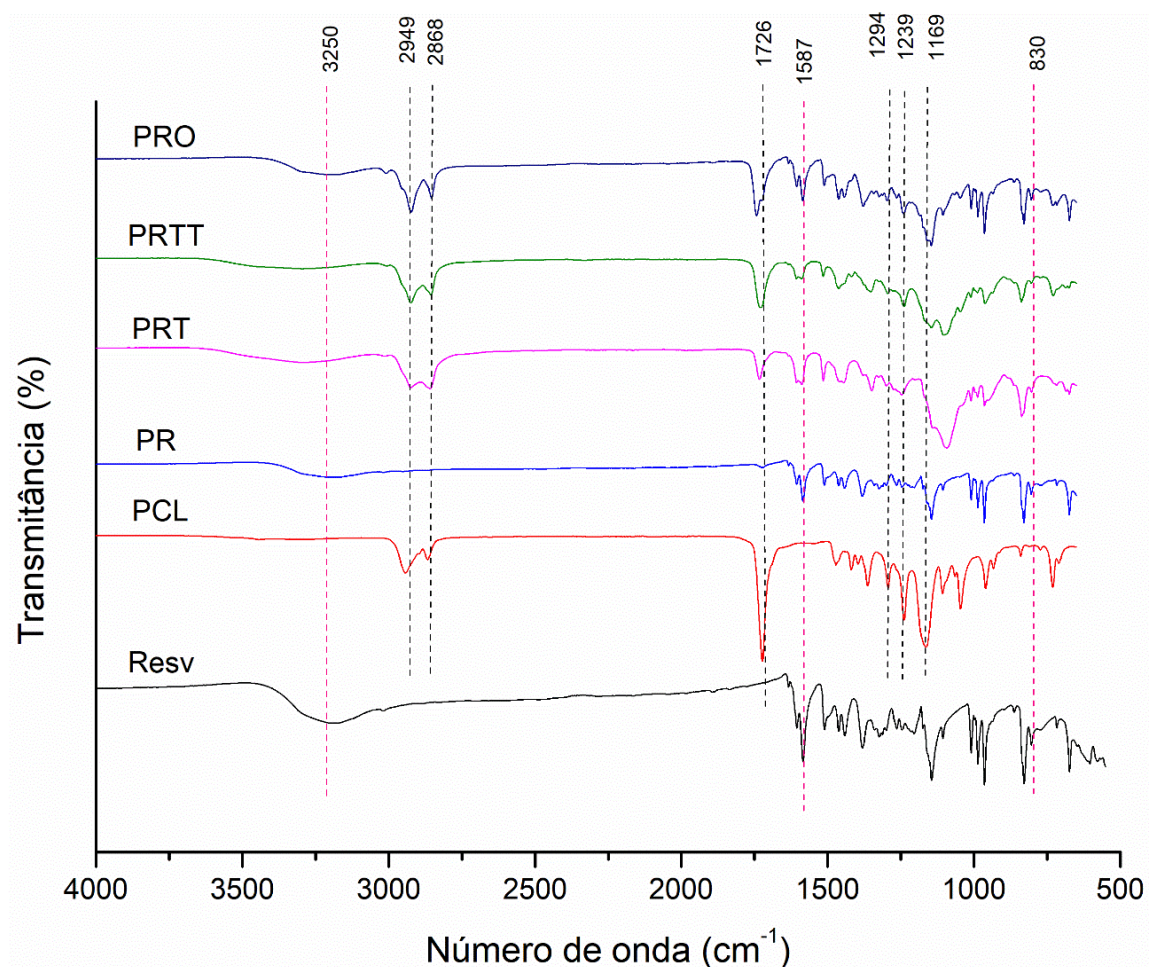
Legenda: Resv: Resveratrol, PCL: Policaprolactona, PR: Polímero/Resveratrol, PRT: Polímero/Resveratrol/Tensoativo1, PRTTO: Polímero/Resveratrol/Tensoativo1/Tensoativo2/Óleo

Na curva da mistura binária (PR) é possível observar os picos endotérmicos característicos do resveratrol e do polímero PCL, entretanto ao adicionar os tensoativos e o óleo nas misturas ternárias e totais (PRT e PRTTO), o pico endotérmico do fármaco e do polímero são mimetizados em razão da solubilização nestes compostos líquidos. Em misturas complexas, como as testadas neste trabalho, são esperados alargamentos e diminuição dos picos de fusão devido à menor proporção de cada componente na mistura e às possíveis interações físicas ou solubilização dos componentes sólidos nos líquidos. Essas interações promovem uma redução na entalpia dos eventos (Ebrahimi et al., 2024; Lamch, 2023). Essa redução na entalpia, observada como uma diminuição dos picos endotérmicos, sugere que o resveratrol está efetivamente solubilizado nos tensoativos, indicando uma boa miscibilidade e compatibilidade entre os componentes e a potencial formação de sistemas de liberação controlada mais estáveis e eficientes.

O espectro de FTIR obtido para resveratrol isolado, PCL e suas respectivas misturas físicas são ilustrados na Figura 3. O espectro do trans-resveratrol puro (Resv) mostrou picos característicos em 3250 cm^{-1} (banda de absorção do grupo hidroxila -OH), 1587 cm^{-1} (alongamento olefínico C-C) e 830 cm^{-1} (banda olefínica trans típica).

O espectro do polímero PCL é representado por uma banda em 1726 cm^{-1} (alongamento do éster $\text{C}=\text{O}$), vibrações de alongamento assimétricas e simétricas ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) em 1294 cm^{-1} a 1169 cm^{-1} e duas bandas em 2949 cm^{-1} e 2868 cm^{-1} (alongamentos simétricos e assimétricos do $\text{C}-\text{H}_2$), respectivamente, demonstrando características de um poliéster alifático. O óleo de semente de gergelim em conjunto com o polímero e o resveratrol (PRO) exibe uma banda característica dos ésteres de triglicerídeos em 1169 cm^{-1} (flexão no plano do $\text{C}-\text{H}$ aromático) e uma suavização da banda 3250 cm^{-1} característica do resveratrol em virtude da sua solubilização no óleo. Bandas das unidades de óxido de etileno (PRT e PRTTO) também podem ser observadas em uma banda de absorção em torno de $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ (alongamento do $\text{C}-\text{O}-\text{C}$), caracterizando a estrutura do surfactante óleo de rícino etoxilado EO30. Também houve suavização das bandas características do resveratrol em virtude de sua solubilização nos tensoativos presentes nas misturas.

Figura 3. Espectro infravermelho de substâncias isoladas, misturas físicas binárias e ternárias.



Legenda: Resv: Resveratrol, PCL: Policaprolactona, PR: Polímero/Resveratrol, PRT: Polímero/Resveratrol/Tensoativo1, PRTTO: Polímero/Resveratrol/Tensoativo1/Tensoativo2/Óleo

Fonte: Autoria própria.

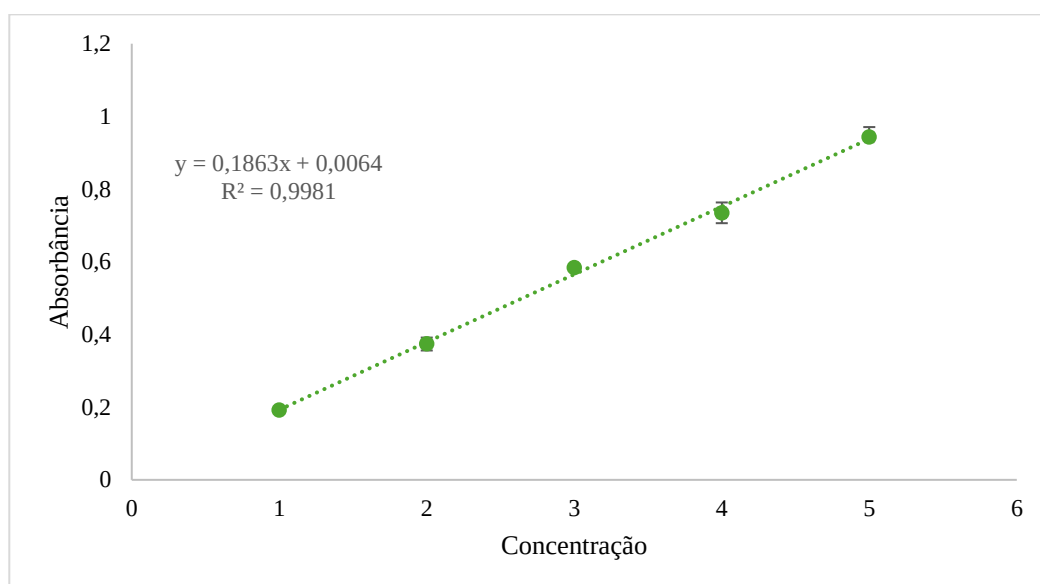
Estudos de compatibilidade entre os materiais necessários para a produção, conduzidos por meio de análises térmicas, não mostraram mudanças significativas, como deslocamentos, surgimento ou desaparecimento de eventos, nem o aparecimento/desaparecimento de bandas no espectro infravermelho em comparação com o perfil original dos compostos isolados, ocorreram apenas alteração nos parâmetros físico-químicos dos compostos, com indícios de solubilização entre os componentes da formulação (Ebrahimi et al., 2024; Kaur; Sinha, 2018; Rojek; Wesolowski, 2019).

Após a conclusão dos ensaios de compatibilidade, foi possível evidenciar e esclarecer comportamentos característicos das substâncias que serão utilizadas para a produção das nanopartículas. Os resultados demonstraram a estabilidade e a compatibilidade entre o resveratrol, o polímero PCL e os tensoativos. As análises de calorimetria exploratória diferencial mostraram que as misturas ternárias e totais apresentam perfis de fusão compatíveis com uma boa miscibilidade dos componentes, indicando que os tensoativos e o óleo atuam efetivamente na solubilização do resveratrol.

5.2 Validação do método analítico

O método espectrofotométrico apresentou linearidade a 307 nm para as concentrações estudadas (1-5 µg/mL). A equação da regressão linear média obtida a partir da média das três absorvâncias de cada concentração, construída com um padrão de resveratrol, foi $y = 0,1863x + 0,0064$, em que y é a absorvância (nm) e x a concentração (µg/mL). O coeficiente de determinação obtido foi $r^2=0,9981$ e coeficiente de correlação $r=0,9990$, comprovando a adequação do método à RDC N° 166/2017, possuindo o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação linear que deve ser maior ou igual a 0,99, como mostra a Figura 4.

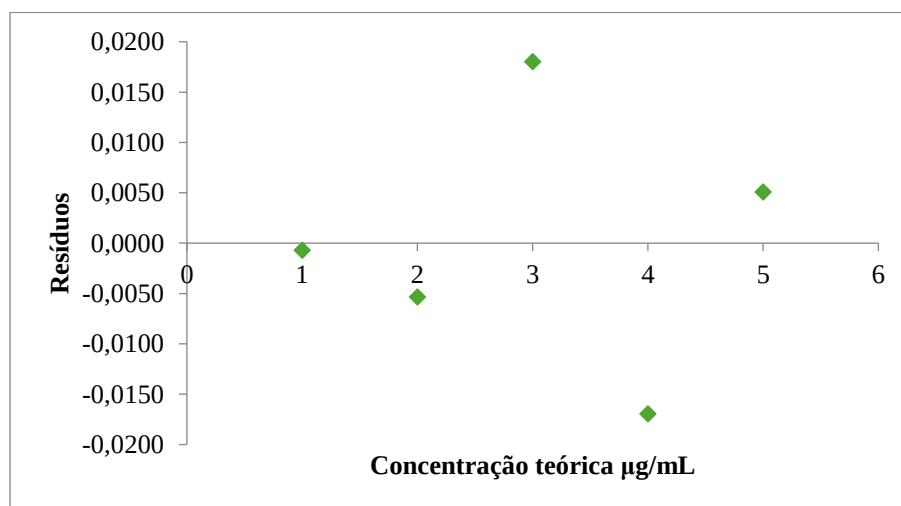
Figura 4. Gráfico de regressão linear do parâmetro linearidade.



Fonte: Autoria própria.

O cálculo dos resíduos da linearidade do método foi obtido por meio de regressão linear, onde demonstra os valores estimados e os dados observados. Os resíduos distribuíram-se em torno do zero, mostrando que a dispersão é aleatória e sem tendência, indicativo de um bom resultado como o exposto na Figura 5.

Figura 5. Gráfico dos resíduos da linearidade através do cálculo de regressão linear



Fonte: Autoria própria.

A robustez foi dada através de análise em diferentes concentrações do fármaco (concentração baixa, média e alta da curva) com adição de HCl e com variação da marca de solvente. Os resultados podem ser verificados na Tabela 2.

Tabela 3. Método através da variação intencional de pH com HCl 0,1M e da marca de solvente.

ROBUSTEZ (pH)				ROBUSTEZ (Marca de solvente)			
Concentrações (µg/mL)				Concentrações (µg/mL)			
	1 µg/mL	3 µg/mL	5 µg/mL		1 µg/mL	3 µg/mL	5 µg/mL
Média	0,735	2,132	3,506	Média	1,193	3,485	5,800
Desvio padrão	0,003	0,006	0,023	Desvio padrão	0,001	0,008	0,010
Desvio padrão relativo	2,16%	1,49%	3,50%	Desvio padrão relativo	0,41%	1,18%	0,96%
Recuperação	73,50152	71,0801	70,13061	Recuperação	119,3058	116,1687	116,0064

De acordo com o artigo 61 da RDC 166 de 2017 da ANVISA o parâmetro de robustez observa a capacidade do método analítico resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. O método avaliado se mostrou robusto, o DPR das amostras contendo HCl e com diferentes marcas de solvente, foram baixos, ou seja, todas possuem baixa variabilidade intrínseca. Os dados também foram avaliados estatisticamente pelo ANOVA fator único e os valores do $F_{\text{calculado}}$ (0,004) foram inferiores ao F_{tabelado} (5,14) não existindo variação estatisticamente significativa, excluindo a teoria da hipótese nula.

O percentual de recuperação após a variação do pH demonstrou uma variação nas concentrações das amostras, porque em ambientes de pH extremo (muito ácido ou muito básico), o resveratrol pode sofrer degradação ou alterar a sua ionização, levando a resultados analíticos imprecisos e mudando seu espectro de absorção (Khaimov et al., 2019; Zupančič; Lavrič; Kristl, 2015).

A repetibilidade (precisão) foi realizada em triplicatas de três concentrações (baixa, média e alta), e de acordo com os resultados ilustrados na tabela 3, pode-se concluir que o método apresenta boa repetibilidade já que produz resultados com baixo DPR. Os dados foram avaliados estatisticamente pela ANOVA fator único e os valores do $F_{\text{calculado}}$ (0,005) foram inferiores ao F_{tabelado} (5,14) não existindo variação estatisticamente significativa.

Tabela 4. Repetibilidade do método.

REPETIBILIDADE			
	Concentrações (µg/mL)		
	1 µg/mL	3 µg/mL	5 µg/mL
Média	1,101	3,170	5,116
Desvio padrão	0,004	0,006	0,036
Desvio padrão relativo	1,90%	0,96%	3,71%

A precisão intermediária refere-se à repetibilidade dos resultados analíticos quando o método é aplicado por diferentes operadores, em diferentes dias, utilizando diferentes equipamentos, mas dentro do mesmo laboratório. Os resultados da precisão intermediária demonstram que o método possui baixa variabilidade entre diferentes condições experimentais como pode ser observado na tabela 4, e a partir dos resultados da ANOVA fator único, onde os valores do $F_{\text{calculado}}$ (0,005) foram inferiores ao F_{tabelado} (5,14), excluindo a hipótese nula.

Tabela 5. Precisão intermediária com analistas diferentes.

PRECISÃO INTERMEDIÁRIA			
	Concentrações (µg/mL)		
	1 µg/mL	3 µg/mL	5 µg/mL
Média	1,132	3,536	5,891
Desvio padrão	0,001	0,012	0,006
Desvio padrão relativo	0,57%	1,84%	0,58%

O parâmetro de exatidão foi realizado a partir da análise que contemplou o intervalo linear do método analítico utilizando diferentes concentrações do fármaco (concentração baixa, média e alta da curva). Os resultados podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 6. Exatidão do método.

EXATIDÃO			
	Concentrações (µg/mL)		
	1 µg/mL	3 µg/mL	5 µg/mL
Média	1,119	3,188	5,141
Desvio padrão	0,004	0,004	0,039
Desvio padrão relativo	2,01%	0,75%	4,08%
Recuperação	111,9699	106,2683	102,8377

O método demonstrou exatidão, conforme evidenciado pela comparação entre os resultados obtidos e a concentração teórica conhecida. Os valores obtidos ficaram muito próximos da concentração esperada, em conformidade com os requisitos estabelecidos pela RDC 166 de 2017 da ANVISA. Os desvios padrão relativos (DPR) foram baixos, indicando alta precisão do método. Análises estatísticas realizadas pelo ANOVA de fator único mostraram que os valores de $F_{\text{calculado}}$ (0,005) eram inferiores aos valores de F_{tabelado} (5,14), indicando que não houve variação estatisticamente significativa entre as medições.

O percentual de recuperação foi ligeiramente superior nas amostras com concentrações mais baixas (1 µg/mL), possivelmente devido à maior sensibilidade do método nessas condições, o que torna essas amostras mais suscetíveis a pequenas variações. No entanto, de modo geral, o método apresentou um percentual de recuperação em torno de 100% e valores de DPR até 5%, o que é considerado adequado. A RDC 166 de 2017 não especifica valores absolutos para os resultados, mas exige que uma justificativa seja fornecida para os valores obtidos, o que foi devidamente cumprido pelo método utilizado.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) podem ser estabelecidos pela análise de soluções com concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até se atingir o nível detectável e quantificável. Existem diferentes abordagens para determinar esses limites, incluindo o método visual, a relação sinal-ruído e a avaliação com base em parâmetros da curva analítica. Na presente análise espectrofotométrica, utilizou-se a curva analítica da solução de resveratrol, considerando a equação da reta obtida na linearidade ($y = 0,1863x + 0,0064$) para a determinação do LD e LQ. A partir da equação da reta, obteve-se o desvio padrão do intercepto y (DPa) = 0,0034 e a inclinação da reta (IC) = 0,1863. Com esses parâmetros, os valores de LD e LQ foram calculados, resultando em 0,017 e 0,045 µg/mL, respectivamente.

5.3 Delineamento experimental e otimização das nanopartículas

Um ensaio de pré-formulação pode ser otimizado empregando planejamento estatístico de experimentos, também conhecido como Design of Experiments (DoE). O objetivo de utilizar um DoE nesse estudo foi investigar a influência de alguns parâmetros da formulação nas características físico-químicas das NPs, para obter as

condições ideais de obtenção das nanopartículas com as melhores características. Assim, baseado em relatos da literatura e avaliações preliminares, foram definidos como Atributos Críticos de Qualidade (CQA) das nanopartículas o diâmetro médio, PDI e potencial zeta, enquanto a concentração de polímero e proporção entre fase aquosa e orgânica foram definidos como Atributo Crítico de Material (CMA), visto que são fatores importantes que afetam a qualidade da formulação final.

Sendo assim, a otimização foi realizada com o design Box-Behnken (BBD) usando três parâmetros em três níveis, com 3 repetições do ponto central, totalizando 15 experimentos. Os parâmetros de otimização selecionados foram a concentração de PCL (X_1), o volume da fase orgânica (X_2) e o volume da fase aquosa (X_3), considerados como variáveis independentes. As três variáveis dependentes consideradas foram o tamanho de partícula (Y_1), o índice de polidispersão (PDI) (Y_2) e o potencial zeta (PZ) (Y_3). Os níveis máximos e mínimos de cada fator foram estabelecidos baseados em uma triagem da literatura e testes prévios para avaliação do comportamento do polímero para com o método de obtenção das nanopartículas. O desenho experimental referente ao ensaio realizado para nanoesferas estão dispostos na Tabela 6 abaixo e para as nanocápsulas na Tabela 7.

Tabela 7. Matriz do delineamento experimental das nanoesferas mostrando as variáveis dependentes e independentes.

ORDEM DOS ENSAIOS	VARIÁVEIS INDEPENDENTES			VARIÁVEIS DEPENDENTES		
	% Polímero	Fase orgânica (mL)	Fase aquosa (mL)	Diâmetro (nm)	PDI	Zeta (mV)
1	0,10	20	80	264,3	0,153	-4,06
2	0,20	20	80	359,4	0,267	-11,30
3	0,10	60	80	219,0	0,100	-15,10
4	0,20	60	80	278,2	0,063	4,54
5	0,10	40	40	204,8	0,076	-4,91
6	0,20	40	40	237,7	0,038	-7,59
7	0,10	40	120	252,2	0,095	-8,46
8	0,20	40	120	341,8	0,035	-2,79
9	0,15	20	40	156,1	0,018	-8,34
10	0,15	60	40	285,1	0,037	-10,40

11	0,15	20	120	294,0	0,099	-7,09
12	0,15	60	120	230,0	0,072	-12,90
13	0,15	40	80	242,8	0,062	-6,31
14	0,15	40	80	242,4	0,121	-17,60
15	0,15	40	80	225,6	0,089	-12,30

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8. Matriz do delineamento experimental das nanocápsulas mostrando as variáveis dependentes e independentes.

ORDEM DOS ENSAIOS	VARIÁVEIS INDEPENDENTES			VARIÁVEIS DEPENDENTES		
	% Polímero	Fase orgânica (mL)	Fase aquosa (mL)	Diâmetro (nm)	PDI	Zeta (mV)
1	0,20	10	82,5	345,3	0,140	-29,4
2	0,15	30	140,0	281,7	0,135	-38,2
3	0,15	20	82,5	280,4	0,155	-40,5
4	0,15	10	25,0	295,9	0,255	-21,7
5	0,20	30	82,5	216,7	0,168	-33,6
6	0,10	10	82,5	483,4	0,259	-37,9
7	0,10	20	140,0	333,9	0,184	-31,1
8	0,15	10	140,0	101,0	0,165	-29,5
9	0,15	30	25,0	158,4	0,162	-29,5
10	0,15	20	82,5	200,5	0,228	-34,3
11	0,20	20	140,0	250,6	0,218	-35,6
12	0,20	20	25,0	185,4	0,174	-30,0
13	0,15	20	82,5	288,9	0,237	-32,7
14	0,10	20	25,0	143,2	0,187	-28,6
15	0,10	30	82,5	120,3	0,306	-30,4

Fonte: Autoria própria.

Avaliando os resultados mostrados pelas variáveis dependentes, foi possível obter NPs com diâmetro médio variando de 156,1 nm à 359,4 nm para as nanoesferas e 101 nm à 483,4 nm para as nanocápsulas, valores de PDI entre 0,018 e 0,267 para as

nanoesferas e 0,135 à 0,306 para as nanocápsulas, e potencial zeta entre -2,79 e -17,6 para as nanoesferas e -21,7 mV à -40,5 mV para as nanocápsulas. As formulações apresentaram-se líquidas, com aspecto translúcido, além de reflexo azulado característico de nanopartículas, como ilustrado na Figura 6.

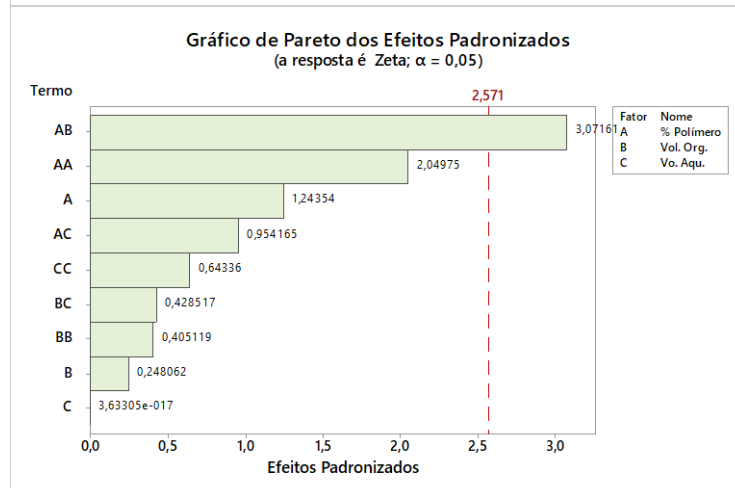
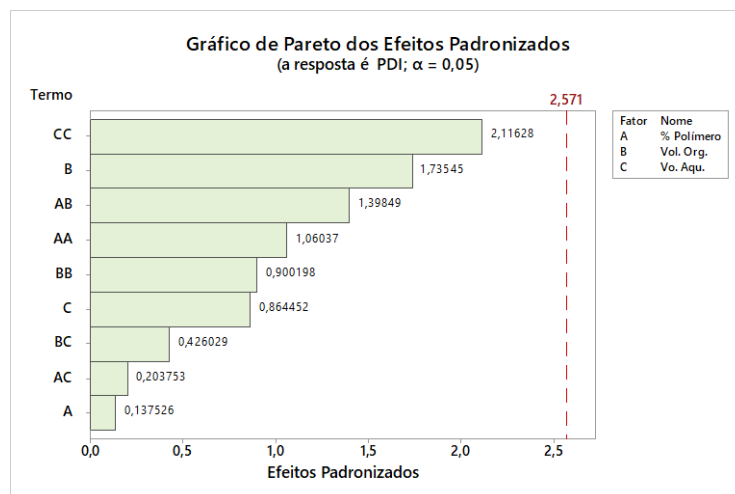
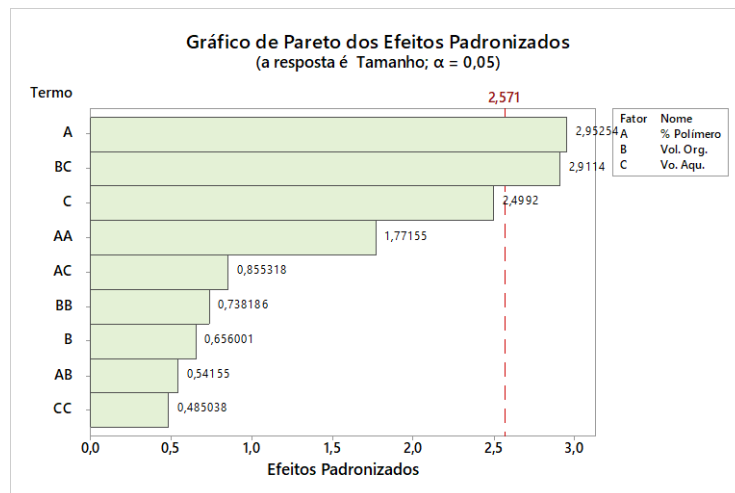
Figura 6. Formulação número 9 do DoE para nanoesferas.



Fonte: autoria própria.

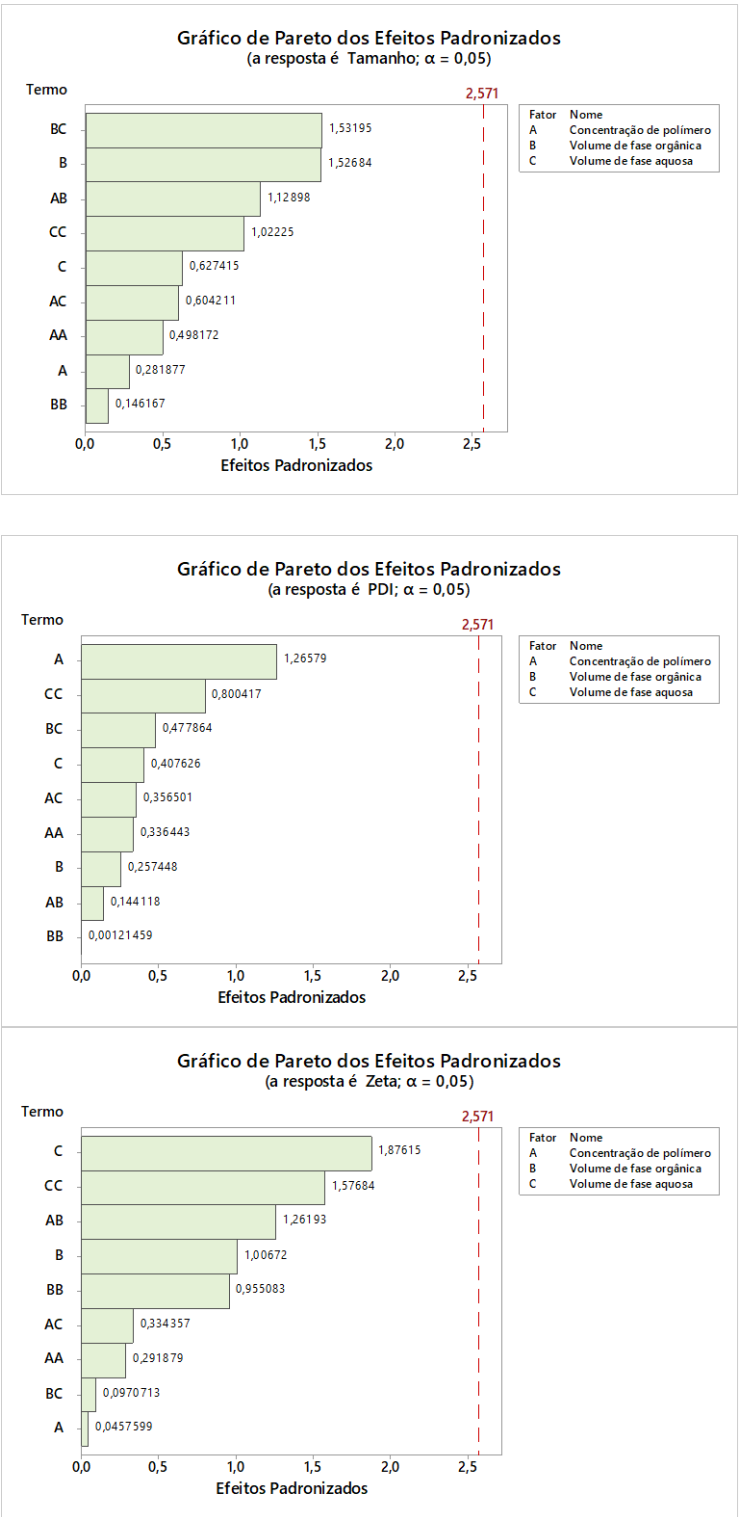
Através do processamento estatístico do planejamento experimental através de ANOVA, foi revelado um valor de $p > 0,05$ para falta de ajuste, o que significa a adequação do modelo para as variáveis estudadas. Os gráficos de Pareto (Figura 7 e 8) foram elaborados para ilustração dos efeitos significativos e comparar a intensidade destes, determinando os parâmetros que mais contribuem nas variáveis tamanho, PDI e PZ.

Figura 7. Gráfico de Pareto para a avaliação das variáveis no delineamento experimental de nanoesferas.



Fonte: autoria própria.

Figura 8. Gráfico de Pareto para a avaliação das variáveis no delineamento experimental de nanocápsulas.

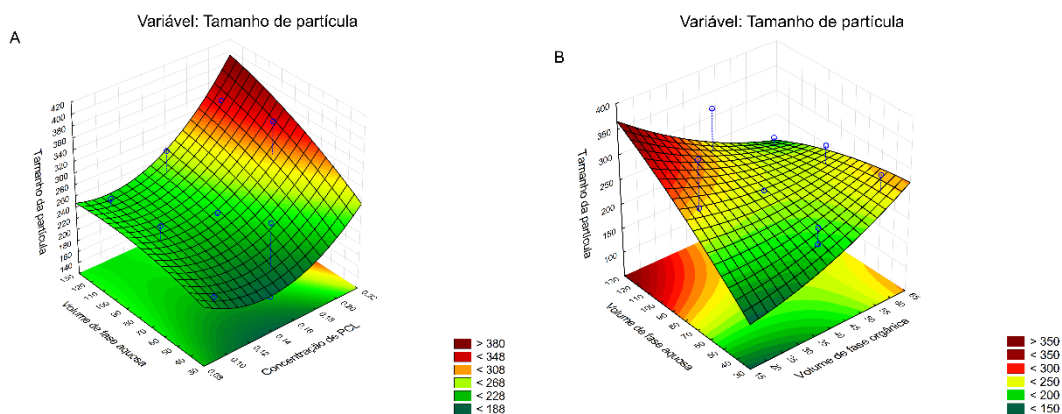


Fonte: autoria própria.

O gráfico de Pareto mostra que nenhuma variável do DoE para as nanocápsulas apresentou-se significativa para as respostas avaliadas, então foi escolhida a formulação

12 como a ideal para prosseguir com os estudos, por conter características essenciais para administração por via oral (50-300nm, PDI<0,3 e ± 30 mV de potencial zeta). O gráfico de Pareto exhibe que, para o diâmetro das nanoesferas, as variáveis que tiveram efeito significativo ($p < 0,05$), com influência positiva nos níveis analisados foram a concentração de polímero (A) e a interação entre o volume de fase orgânica e aquosa (BC), números positivos (+) no gráfico. O sinal negativo de um efeito para uma variável indica que em níveis mais baixos, a resposta da variável diminui. Assim como, o valor positivo da concentração de polímero mostra que altos níveis desse fator aumentam o diâmetro das nanopartículas. Para o PDI, os parâmetros analisados não tiveram efeitos significativos sob seus valores. O gráfico de Pareto para o potencial Zeta revelou que a interação entre o polímero e o volume de fase orgânica foi estatisticamente significativa, sendo assim, variações nesses parâmetros têm impacto direto nos valores de potencial Zeta das nanoesferas. Para uma melhor visualização desses efeitos significativos, foram gerados gráficos de superfície resposta, mostrados na Figura 9.

Figura 9. Gráfico de superfície de resposta para a variável tamanho de partícula em relação aos efeitos significativos do planejamento experimental das nanoesferas.



Fonte: autoria própria.

É possível observar no gráfico da Figura 9 (A) que as regiões em vermelho, que correspondem aos maiores diâmetros, são regiões onde a concentração de PCL ($> 0,2\%$) e o volume de fase aquosa estão maiores ($> 90\text{mL}$). Pela inclinação, percebe-se o grau de significância do efeito, confirmando os resultados do Pareto que em altas concentrações de polímero e um grande volume de fase aquosa aumentam o diâmetro médio das nanopartículas. Todos esses resultados estão de acordo com as amostras que apresentaram os melhores resultados de tamanho, índice de polidispersão e potencial

zeta já mostradas nas tabelas 6 e 7. Assim, nesse planejamento experimental foi possível obter NPs com características adequadas ao objetivo do trabalho.

Os resultados do planejamento demonstram que o tamanho da nanopartícula é uma das propriedades mais críticas destes sistemas, e também um dos fatores que mais sofre variação com a mudança nos parâmetros independentes, tanto de processo quanto de produto. Ou seja, variações na formulação e no método de obtenção influenciará diretamente no tamanho das nanopartículas desenvolvidas. Como exemplo, a concentração das matrizes utilizadas na síntese das nanopartículas deve ter seu efeito avaliado, onde geralmente, um aumento na concentração desse componente leva a um aumento no tamanho das nanopartículas, pois mais matéria-prima está disponível para a formação das partículas. A proporção também pode afetar o tamanho, por exemplo, em algumas sínteses de nanopartículas, a adição de um reagente em excesso pode resultar em partículas maiores pois reduz a capacidade de emulsificação dos surfactantes e diminuem o efeito das forças de cisalhamento na redução de tamanho das nanopartículas, o que resulta na agregação de partículas, enquanto uma proporção menor de polímeros pode levar à formação de partículas menores (Cristina; Pinto, 2022; Roy et al., 2023).

O DoE gerou modelos polinomiais com funções matemáticas que melhor descrevem a relação entre os fatores e as respostas como o tamanho da partícula das nanoesferas, representados pela seguinte equação:

$$\text{Tamanho da partícula (Y1)} = 220,62 - 3183X_1 + 12.223,33X_1^2 - 0,06X_2X_3$$

Na equação acima, Y representa a resposta devido à interação de todos os fatores em combinação. O intercepto é b_0 (220,62), e os fatores independentes são X_1 , X_2 e X_3 . Essas equações ilustram a influência de cada fator independente na resposta por meio de efeitos principais de primeira ordem, termos de interação e efeitos de ordem superior. Um sinal negativo indica um efeito antagonista, enquanto um sinal positivo denota um efeito sinérgico. Os dados estatísticos da regressão linear, bem como os gráficos de resposta de superfície 3D, foram analisados usando o Statistica® Versão 12.

O software foi capaz de gerar uma otimização a partir da análise de significância estatística entre as variáveis dependentes e independentes e estabeleceu a formulação ótima da nanoesfera para dar sequência aos experimentos. O valor de desejabilidade da

formulação otimizada, conforme mostrado na Tabela 8, foi de 0,83, o que é próximo do valor ideal de 1. O nível de significância (5%) das equações quadráticas foi avaliado utilizando ANOVA.

Tabela 9. Otimização da aquisição de nanopartículas através do delineamento experimental.

Otimização	(X ₁) Polímero (%)	(X ₂) Volume de fase orgânica (mL)	(X ₃) Volume de fase aquosa (mL)	Potencial zeta (mV)	PDI	Tamanho de partícula (nm)	Desejabilidade composta
Nanoesfera	0,148971	32,5253	40	-10,6261	0,0259863	185,422	0,827876

Para dar seguimento ao estudo, foram utilizadas as formulações 12 para as nanocápsulas, uma vez que nenhuma variável do DoE para nanocápsulas apresentou-se significativa para as respostas avaliadas, e utilizou-se a formulação otimizada para as nanoesferas. Essas formulações foram consideradas adequadas devido às suas características ideais de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. O planejamento experimental foi bem-sucedido, levando ao desenvolvimento de nanopartículas poliméricas com características físico-químicas adequadas e com potencial para serem utilizados como nanocarreadores para administração oral. A faixa de tamanho entre 50 a 300 nm é ideal para absorção intestinal e transposição das barreiras biológicas, facilitando a absorção e aproveitamento do resveratrol. Um PDI menor que 0,3 indica uma distribuição de tamanho homogênea, essencial para a consistência na dosagem e desempenho terapêutico, e potencial zeta superior a ± 30 mV garante a estabilidade coloidal das nanopartículas, prevenindo a agregação e garantindo uma administração eficaz (Ghaemi et al., 2024; Schreiner et al., 2023).

5.4 Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas contendo resveratrol

A partir dos parâmetros das amostras eleitas na otimização com o planejamento experimental foram desenvolvidas NPs com e sem o resveratrol, a seguir denominadas NS-R e NC-R respectivamente. As nanopartículas foram obtidas através do método de nanoprecipitação e em seguida submetidas à rotaevaporação como previamente descrito no item 4.2.4.

5.4.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta.

Os nanocarreadores obtidos passaram por caracterização pós-preparo para avaliação de diâmetro médio, PDI e potencial zeta (PZ) os quais foram também monitorados continuamente ao longo da pesquisa para avaliação de estabilidade. A nanoesfera apresentou diâmetro médio de partícula de $167,5 \pm 2,052$ nm, PDI $0,040 \pm 0,026$ e potencial zeta de $-25,9 \pm 1,50$ mV. A nanocápsula escolhida contou com um tamanho médio de partícula de $204,4 \pm 2,488$ nm, PDI de $0,100 \pm 0,007$, potencial zeta de $-26,6 \pm 1,68$ mV. A nanoesfera apresentou valores de diâmetro, PDI e PZ semelhantes aos valores obtidos através da otimização no planejamento experimental, demonstrando sua reprodutibilidade. A formulação 12 escolhida para a nanocápsula apresentou pequenas alterações que podem estar relacionadas à incorporação do fármaco, influenciando em alguns parâmetros, como aumento de tamanho e variação de PZ das nanopartículas.

A estabilidade das nanopartículas é um fator crucial que determina sua eficácia, segurança e aplicabilidade, portanto o tamanho e a homogeneidade da dispersão das nanopartículas são parâmetros cruciais para garantir um comportamento ideal da formulação. Por isso, é importante obter carreadores com características físico-químicas ótimas, que confirmem estabilidade, e que essas características se mantenham com o encapsulamento do fármaco. Os valores de diâmetro, PDI, PZ, EE apresentados pelas nanopartículas estão dentro dos padrões de qualidade recomendados na literatura para conferir melhor estabilidade para as nanopartículas e dentro dos critérios estabelecidos dessa pesquisa (diâmetro ≤ 300 nm, $PDI \leq 0,300$ e $PZ \geq |20|$ mV, $EE \geq 60\%$) (Souza et al., 2021; Kaur et al., 2022; Soni et al., 2020). As avaliações iniciais confirmaram a qualidade das nanopartículas obtidas, permitindo que elas fossem encaminhadas para outros ensaios de caracterizações físico-químicas.

5.4.2 Eficiência de encapsulação

A partir dos dados de concentrações obtidos por meio da curva analítica proposta, foi possível dosear o percentual de resveratrol que foi encapsulado através do método de quantificação indireto descrito no item 4.2.5.2. Para isso, os valores das absorbâncias foram substituídos na equação da reta obtida através do processo de validação do método onde foi possível determinar a concentração de fármaco quantificada. Após a correção dos fatores de diluição e do cálculo através da equação da eficiência de encapsulamento foi possível determinar a quantidade exata de resveratrol

presente nas nanopartículas. Os resultados apresentados na tabela 9, demonstraram que a eficiência de encapsulamento e o *drug loading* foram altas, indicando que o método de preparação utilizado foi eficaz para a incorporação do resveratrol nas nanopartículas.

Tabela 10. Eficiência de encapsulamento e *drug loading* do resveratrol por espectrofotometria.

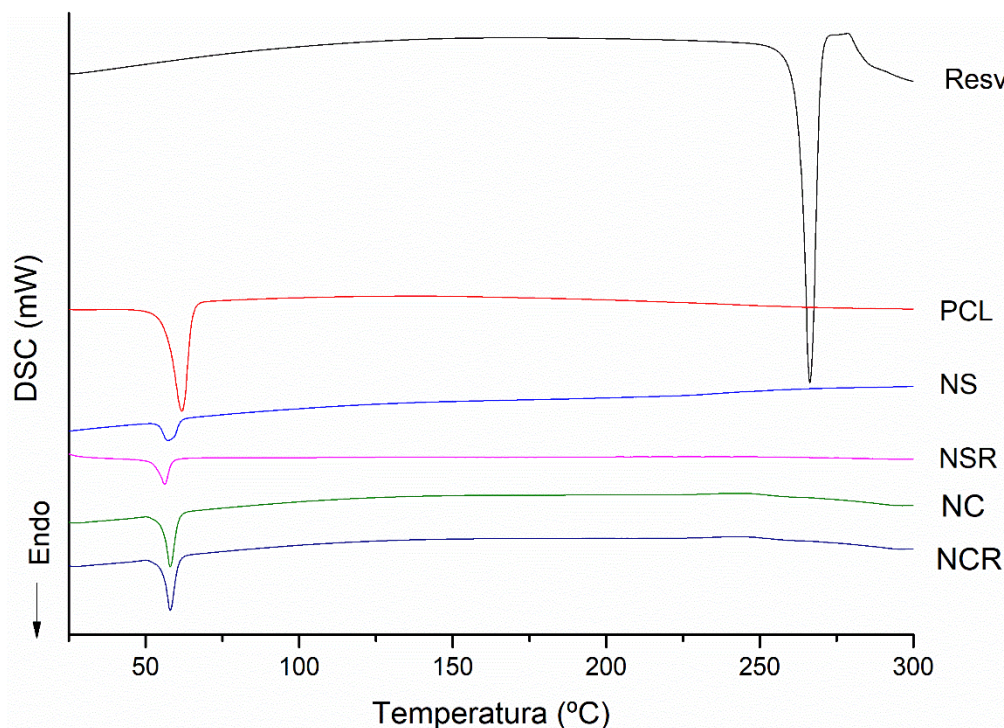
Amostra	Eficiência de encapsulamento		<i>Drug loading</i>	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
NS-R	73,235 %	2,3368	10,45 %	0,3338
NC-R	86,577 %	1,0316	9,61 %	0,1146

Os valores de EE% e DL% obtidos estão de acordo com outros estudos disponíveis na literatura (Khaimov et al., 2019; Khan et al., 2019; Korkut; Özdemir, 2024), que também obtiveram médias de encapsulamento por volta de 50-70% em nanopartículas poliméricas contendo resveratrol, enfatizando assim a eficiência do método de encapsulamento. As avaliações iniciais realizadas confirmaram a qualidade dos nanocarreadores obtidos, sendo direcionados para demais ensaios de caracterizações físico-químicas.

5.4.3 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) nas NPs

Foram feitas avaliações de DSC dos compostos isolados e das nanopartículas desenvolvidas visando avaliação do comportamento térmico dessas amostras e da cristalinidade da matriz desenvolvida, visto que são fatores importantes para prever a estabilidade física a longo prazo das nanopartículas e sua capacidade de manter o fármaco encapsulado. O gráfico apresentado na Figura 10, comparam as curvas das nanopartículas (NS-R e NC-R) com o fármaco e o polímero PCL isolados. Nota-se o desaparecimento do evento de fusão do fármaco por volta de 260°C nas amostras das nanopartículas, sendo um indicativo de incorporação na matriz polimérica e encapsulação bem-sucedida como relatado na literatura (Chaudari; Bose, 2023; Lamch, 2023; Metawea et al., 2023; Pereira Santos Carvalho et al., 2024).

Figura 10. Curvas de DSC após a fabricação das nanopartículas.

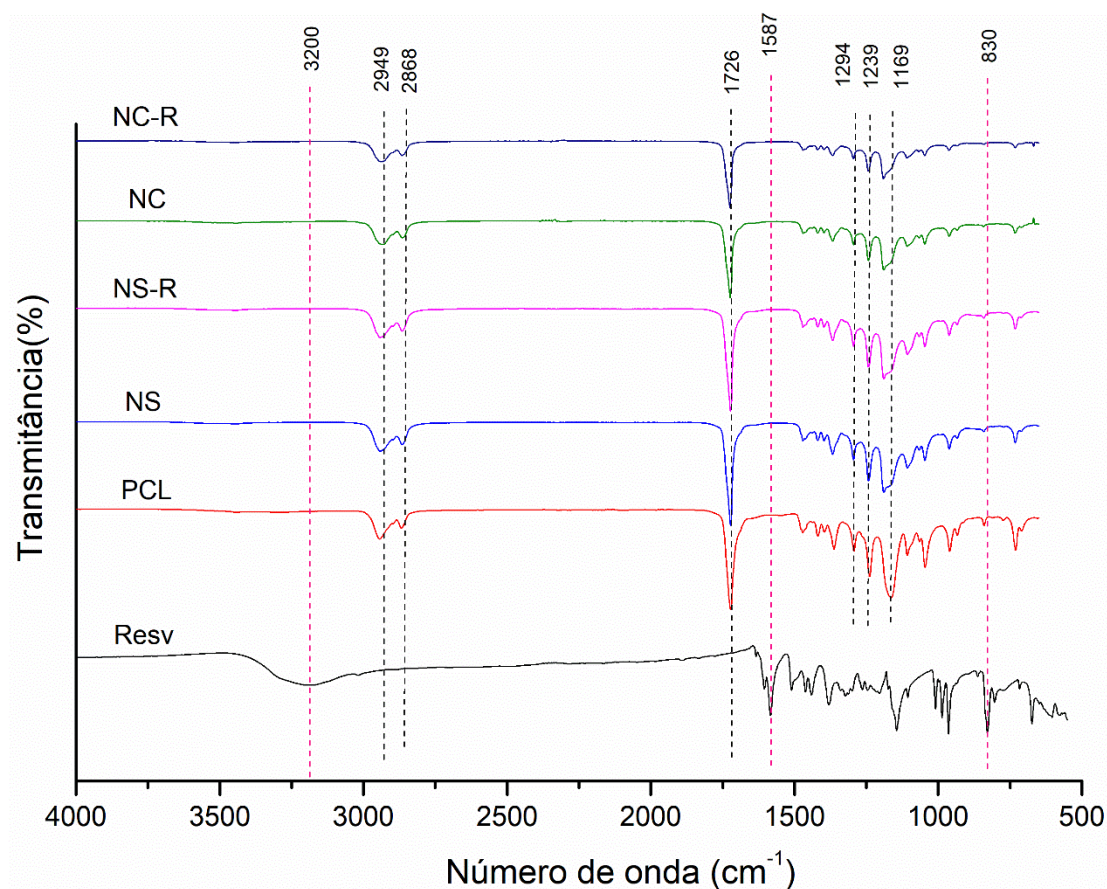


Legenda: Resv: Resveratrol, PCL: Policaprolactona, NS: Nanoesfera branca, NS-R: Nanoesfera com resveratrol, NC: Nanocápsula branca, NC-R: Nanocápsula com resveratrol.

5.4.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR)

Para confirmação da incorporação do fármaco na matriz das NPs, bem como avaliação da estabilidade físico-química, foi realizado ensaio de espectroscopia no infravermelho, cujos gráficos estão apresentados na Figura 11. Estão destacados os picos característicos do polímero em linhas tracejadas pretas, e os picos do resveratrol em linhas tracejadas rosa.

Figura 11. Espectro infravermelho das nanopartículas obtidas.



Legenda: Resv: Resveratrol, PCL: Policaprolactona, NS: Nanoesfera branca, NS-R: Nanoesfera com resveratrol, NC: Nanocápsula branca, NC-R: Nanocápsula com resveratrol.

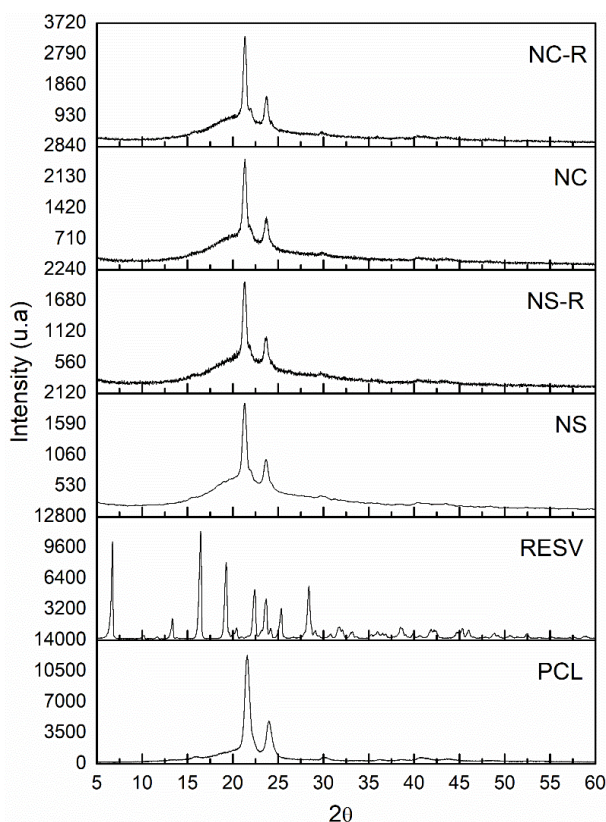
Os espectros dos nanocarreadores possuem muita semelhança com espectro do polímero isolado, o pico específico de PCL na região de 1726 cm^{-1} está relacionado à vibração de tração do grupo carbonila no éster, que também foi visível em todas as amostras de nanopartículas contendo o fármaco, isto pode ser atribuído ao processo de esterificação (Danafar et al., 2022; Harini Sri et al., 2023). Além disso, o desaparecimento dos picos em 3301 cm^{-1} (grupo O-H) e 1587 cm^{-1} (grupo C-C) característicos do resveratrol nos espectros das NPs deve-se ao fato da encapsulação do fármaco e a complexação dos polifenóis no polímero (KHAN et al., 2019). Similar aos resultados de DSC, as análises de FTIR das NPs obtidas revelam uma relação positiva destes com o fármaco. A redução e/ou desaparecimento dos picos característicos do resveratrol no espectro da NS-R e NC-R indica que o fármaco está bem disperso nos componentes da nanopartícula e incorporado em sua matriz. Além disso, a manutenção do perfil espectral dos compostos, sem

deslocamentos ou surgimento de novos picos, confirma a estabilidade físico-química dos sistemas obtidos.

5.4.5 Difratometria de Raios X (DRX)

A análise do difratograma de raios X das NPs e do resveratrol é essencial para entender a estrutura cristalina e a dispersão do fármaco nas nanopartículas. O difratograma do resveratrol isolado apresenta picos característicos e bem definidos que indicam sua natureza cristalina (Khan et al., 2019). No entanto, quando o resveratrol é incorporado nas nanopartículas, observa-se uma diminuição significativa na intensidade desses picos ou até mesmo o desaparecimento de alguns deles. Os padrões de DRX das nanopartículas exibiram claramente as reflexões semicristalinas típicas do PCL, combinando bem com o plano (110) e o plano (200) em torno de $2\theta = 21,04^\circ$ e $23,44^\circ$ aproximadamente (Chaudari; Bose, 2023; Harini Sri et al., 2023).

Figura 12. Gráfico de difração de raios X das nanopartículas obtidas.



Portanto, a análise do difratograma confirma através da redução de intensidade dos picos do PCL, redução da sua cristalinidade quando na forma de NPs, mostrando que a nanoestruturação foi capaz de amorfizar sua estrutura, sendo importante para a melhoria de solubilidade do resveratrol e consequente melhor eficácia. A ausência dos

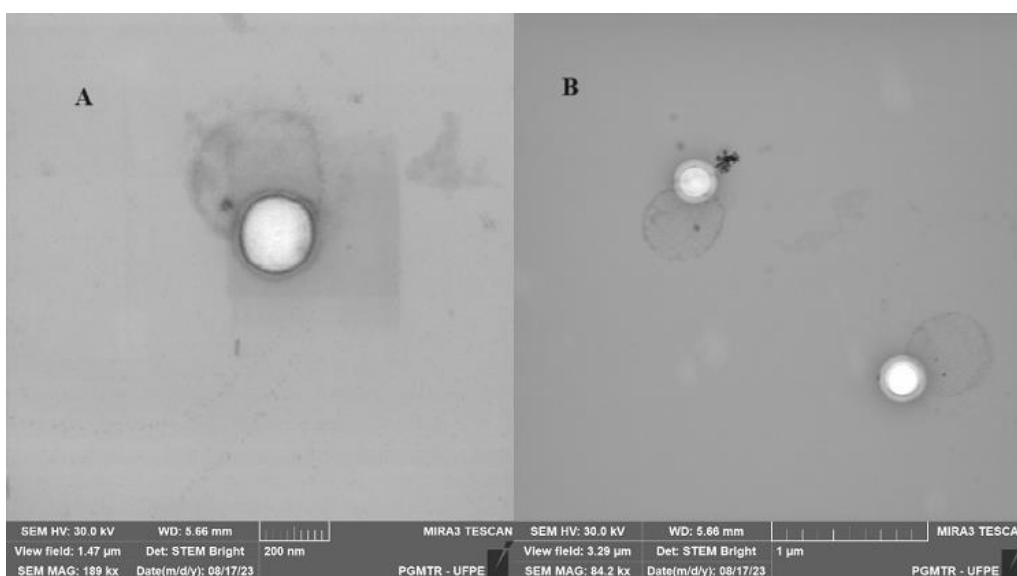
picos de cristalinidade do fármaco sugere a incorporação eficaz do resveratrol nas nanopartículas, além de demonstrar a estabilidade físico-química do sistema obtido. Além disso, esses resultados corroboram os dados obtidos no DSC, que indicaram uma redução da cristalinidade das NPs devido à diminuição do pico de fusão, das temperaturas e das entalpias. Essa observação, juntamente com o desaparecimento dos picos no DRX, confirma uma maior amorfização das nanopartículas.

5.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura por Transmissão (STEM)

A análise por microscopia eletrônica de transmissão (STEM) das nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NS), vazias e carregadas com resveratrol, proporciona mais detalhes sobre a morfologia, estrutura das nanopartículas, diâmetro médio e índice de polidispersão. Os tamanhos médios de partícula concordam com os valores derivados do DLS ($\pm 10\%$) (Wilson; Prud'Homme, 2021).

As imagens STEM das nanocápsulas são capazes de detectar a forma da cápsula uma vez que a microscopia de transmissão permite analisar um corte horizontal através do feixe de elétrons que é incidido sob a amostra. As nanocápsulas contendo resveratrol mostram uma estrutura bem definida e esférica com invólucro polimérico e centro oleoso, característico de um sistema reservatório (cápsula), que confirma o seu tamanho anteriormente definido pela técnica de DLS. As nanocápsulas sem resveratrol também exibem uma morfologia esférica e uniforme (Martins et al., 2024).

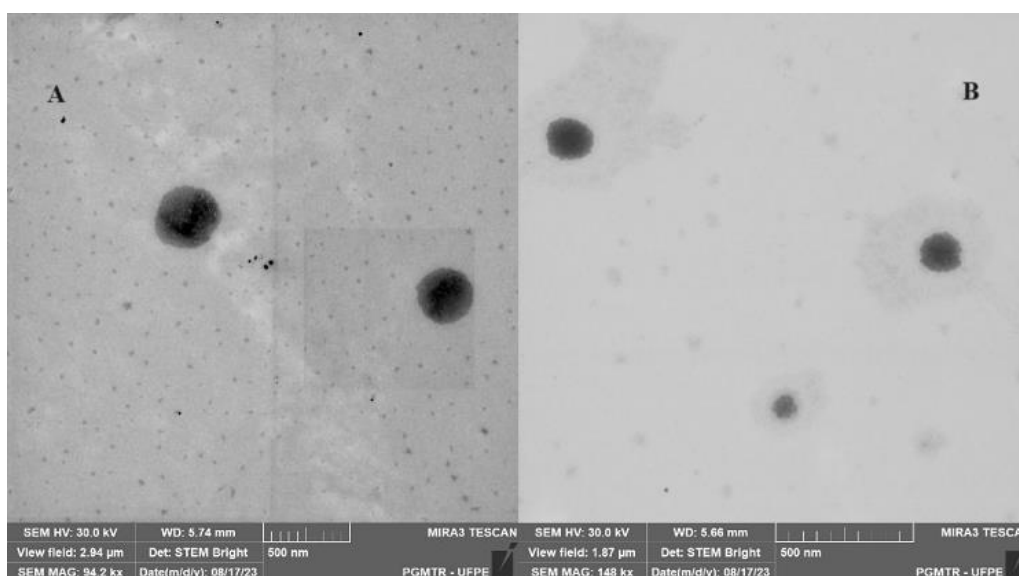
Figura 13. Microscopia Eletrônica de Transmissão (STEM) das nanocápsulas contendo resveratrol (A) e seu respectivo branco (B).



Fonte: autoria própria.

As imagens STEM das nanoesferas contendo resveratrol mostram partículas esféricas e homogêneas com estrutura maciça típica de um sistema matricial, também confirmando a leitura de tamanho médio feita previamente através da DLS. As nanoesferas sem resveratrol apresentam uma morfologia esférica semelhante às com resveratrol. Isso confirma que a estrutura das nanoesferas é mantida matricial independentemente da presença do fármaco (He et al., 2021; Pereira Santos Carvalho et al., 2024).

Figura 14. Microscopia Eletrônica de Transmissão (STEM) das nanoesferas contendo resveratrol (A) e seu respectivo branco (B).



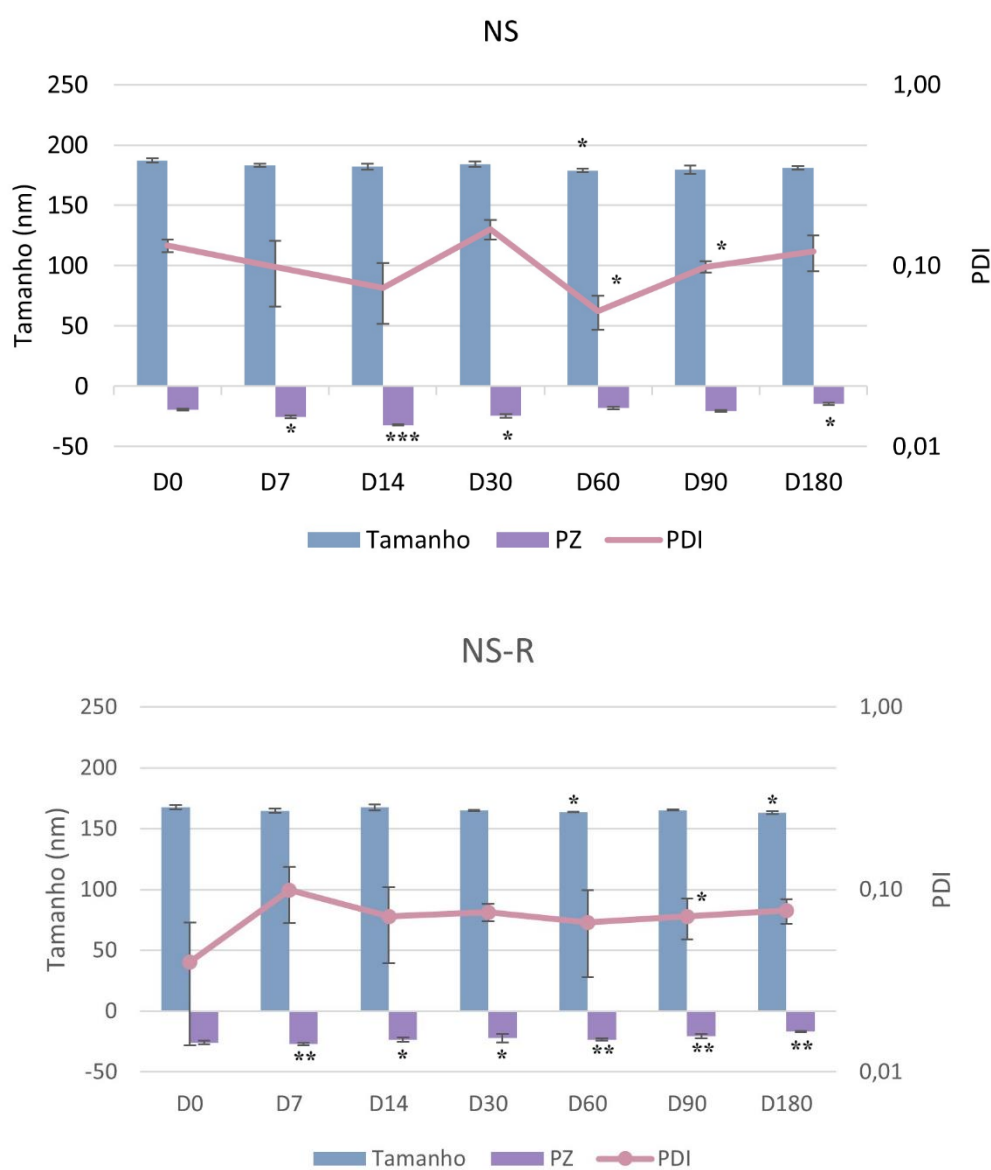
As análises por STEM confirmam que tanto as nanocápsulas quanto as nanoesferas possuem sua integridade estrutural e morfologia esférica, independentemente da presença de resveratrol, sugerindo uma incorporação eficiente do fármaco nas matrizes poliméricas. Essas observações corroboram os resultados de outras análises físico-químicas, como DSC, DRX e FTIR, confirmando a qualidade e a estabilidade dos nanocarreadores desenvolvidos.

5.4.7 Estudo de estabilidade coloidal

A estabilidade durante o armazenamento é um aspecto crucial na avaliação de nanopartículas e outros sistemas de liberação de fármacos. Ela se refere à capacidade do produto de manter suas propriedades físicas, químicas, biológicas e terapêuticas ao longo do tempo, sob condições específicas de armazenamento como temperatura,

umidade e exposição a luz. As nanopartículas foram armazenadas por seis meses à temperatura ambiente ($30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$). As alíquotas retiradas foram avaliadas quanto ao tamanho das partículas, PDI, potencial zeta e aparência física em 7, 15, 30, 60, 90 e 180 dias. As variações ocorridas nas nanoesferas durante o período de armazenamento podem ser observadas na figura 15 a seguir:

Figura 15. Gráfico de estabilidade de longa duração das nanoesferas.



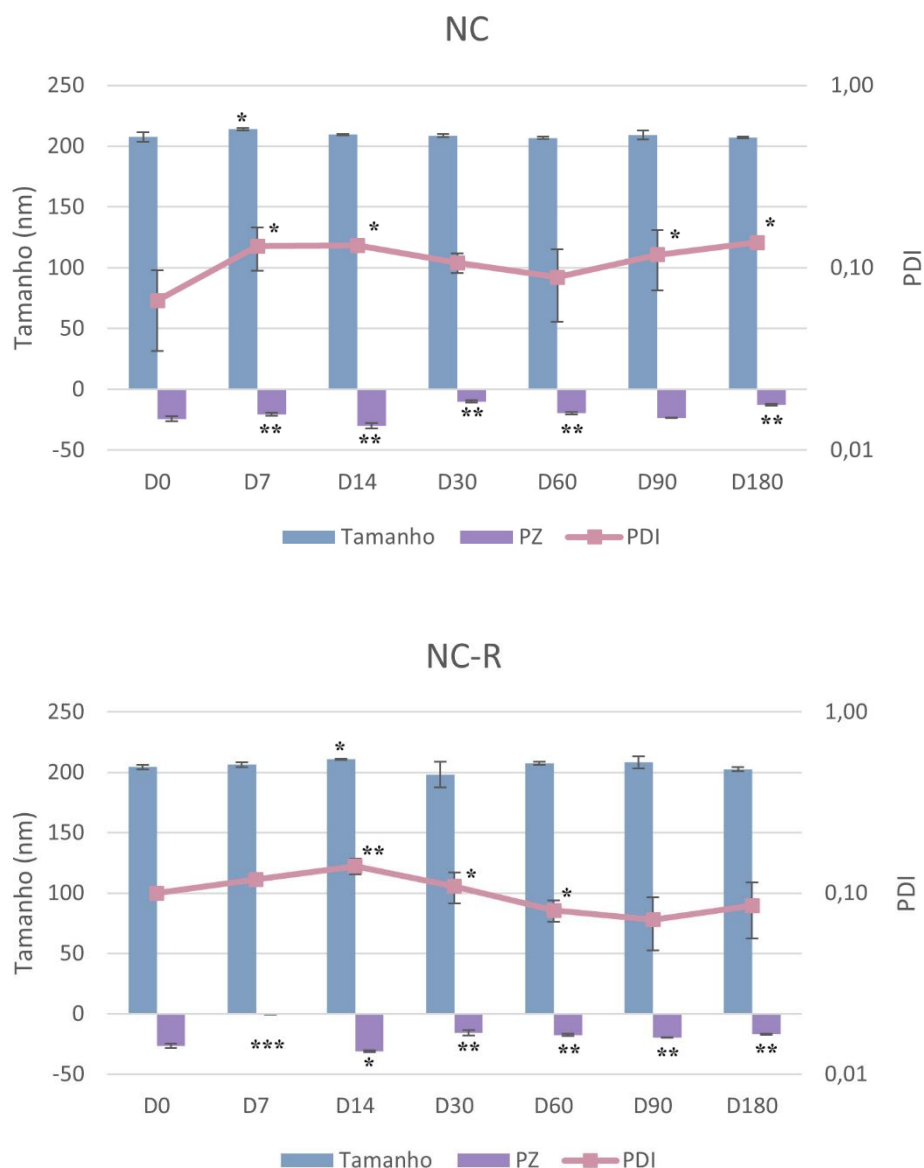
Legenda: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ quando comparado com o D0.

As variações de tamanho da nanoesfera partiram de $167,5 \pm 1,7$ nm no pós-preparo para $165,3 \pm 1,6$ nm no D180, essas variações foram consideradas estatisticamente significativas moderadas de acordo com a escala de significância de FISHER, uma vez que o valor de $p < 0,05$ após análise de variância apenas a partir do D60 e sem variações bruscas de instabilidade. Para os valores de PDI, onde os valores partiram de $0,04 \pm 0,021$ no pós-preparo e permaneceram por volta de $0,077 \pm 0,01$ no D180 a análise de variância realizada para os valores de PDI demonstraram que não houve variação estatisticamente significativa entre as medições, onde $p > 0,05$ (Trafimow; Trafimow, 2017).

Entretanto, os valores de potencial zeta para as nanoesferas carregadas com resveratrol apresentaram mudanças significativas, partindo de $-19,43 \pm 0,94$ mV no pós-preparo, para $-14,63 \pm 1,00$ mV no D180. Essa variação apresentou-se estatisticamente significativa após a análise de variância, onde os valores $p < 0,01$ apontam uma evidência forte na escala de Fisher nos D7, D60, D90 e D180. Embora as variações tenham sido significativas, não foram acentuadas o suficiente para causar instabilidade no sistema.

Os variação de estabilidade das nanocápsula seguiram a mesma linha das nanoesferas. O tamanho das nanocápsulas partiu de $204,4 \pm 2,03$ nm no pós-preparo, para $202,6 \pm 1,55$ nm no D180 como ilustrado na Figura 16. As análises estatísticas do tamanho de partícula realizadas mostraram que os valores de $p < 0,05$ apresentando uma variação significativamente moderada de acordo com a escala de significância de FISHER entre as medições a partir do D14 e sem mostrar instabilidade no sistema. Os valores de PDI partiram de $0,1 \pm 0,007$ no pós-preparo para $0,08 \pm 0,029$ no D180, corroborando com as análises estatísticas de variância, onde $p < 0,01$ no D14 sendo estatisticamente significativo a variação entre os valores do pós-preparo. Porém ao longo dos dias, o valor de PDI mostrou-se estável apresentando pouca $p < 0,05$ (D30 e D60) ou nenhuma variação $p > 0,05$ (D90 e D180). Os valores de potencial zeta apresentaram variação significativa no pós-preparo, $-26,6 \pm 1,68$ mV até o D180, $-16,8 \pm 0,45$ mV. A ANOVA do potencial zeta apresentou variação estatística significativa alta entre os valores, onde o valor de $p < 0,001$ no D7. A variação nos valores pode ter se dado devido à oxidação dos eletrodos da cubeta potenciométrica, o que impede a passagem da corrente elétrica e a geração do campo elétrico necessário para a eletroforese das partículas (Roy et al., 2023; Selvamani, 2019).

Figura 16. Gráfico de estabilidade de longa duração das nanocápsulas.



Legenda: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Os resultados indicam que tanto o tamanho das nanopartículas quanto o PDI mantiveram-se estáveis ao longo dos 180 dias de armazenamento. Essa estabilidade é crucial para a eficácia das nanopartículas, uma vez que variações significativas no

tamanho das partículas podem impactar a distribuição, liberação e eficácia terapêutica das nanopartículas. Estudos recentes corroboram a importância da estabilidade no tamanho das nanopartículas. Por exemplo, Rossetti et al. (2024) destaca que a manutenção do tamanho das nanopartículas é fundamental para garantir a sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica. Além disso, a ausência de variação estatisticamente significativa nos valores de PDI sugere que as dispersões das nanocápsulas mantiveram uma distribuição de tamanho homogênea ao longo do tempo. Um PDI baixo indica uma distribuição estreita de tamanhos de partículas, o que é desejável para aplicações terapêuticas, pois minimiza a possibilidade de agregação e sedimentação das partículas (Sakhi et al., 2023).

A variação observada nos valores de potencial zeta da NC-R no D7 pode ser atribuída à oxidação dos eletrodos da cubeta potenciométrica, que pode ter interferido na medida da carga superficial das nanopartículas. A redução do potencial zeta de $-26,6 \pm 1,68$ mV para $-16,8 \pm 0,45$ mV ao longo dos 180 dias indica uma diminuição da estabilidade eletrostática das nanocápsulas, o que pode aumentar a tendência à agregação. No entanto, é importante considerar que a estabilização das nanopartículas não depende exclusivamente do potencial zeta e mesmo com essas variações, nenhuma formulação apresentou sinais de instabilidade ao final do estudo. Estudos sugerem que a estabilização estérica, fornecida por surfactantes não iônicos, pode compensar uma redução no potencial zeta (Nascimento et al., 2016; Lima et al., 2019). Estudos como o de Navarrete et al., (2019) enfatizam que a estabilização estérica pode ser uma estratégia eficaz para manter a estabilidade das nanopartículas, mesmo quando o potencial zeta diminui. A existência de uma camada de íons ao redor de cada partícula pode ser útil para fins de estabilidade, pois há forças de repulsão entre os íons nas camadas externas de diferentes partículas. Essa abordagem pode ser especialmente relevante para formulações que utilizam surfactantes ou polímeros com propriedades estéricas.

5.5 Ensaio de liberação *in vitro*

A liberação *in vitro* é uma técnica empregada para avaliar e investigar a taxa de liberação de substâncias de maneira controlada, replicando condições laboratoriais que simulam o ambiente biológico ao longo do tempo. Esse método oferece dados valiosos sobre a cinética de liberação de substâncias a partir de uma formulação ou material específico. O método de diálise para determinar o perfil de liberação de fármacos tem

sido amplamente utilizado em sistemas poliméricos, para orientar o desenvolvimento da formulação, facilitando o controle de qualidade e no melhor dos casos, estabelecer a correlação *in vitro-in vivo* da formulação. O perfil de liberação *in vitro* do resveratrol livre foi analisado como controle comparativo para os sistemas de nanoesferas e nanocápsulas (Heredia et al., 2022; Zhang et al., 2023).

Estudos recentes sobre a degradação do poli(ϵ -caprolactona) (PCL) em ambientes aquosos revelaram várias características importantes sobre o comportamento desse polímero. A PCL é um polímero hidrofóbico e biodegradável, sua degradação começa com a absorção de água (intumescimento), seguida pela hidrólise das ligações éster (erosão), resultando na formação de oligômeros ácidos que são posteriormente decompostos em ácido capróico e ácido 6-hidroxi-hexanóico que podem ser metabolizados e eliminados pelo organismo. Este processo pode ser monitorado através da mudança no pH do meio, refletindo a formação de subprodutos ácidos. Comparativamente, sistemas de liberação de fármacos baseados em PCL apresentam um perfil de liberação bifásico. Inicialmente, ocorre uma liberação rápida do fármaco devido à difusão através da matriz polimérica e a liberação de moléculas superficiais. Posteriormente, a taxa de liberação diminui e é controlada principalmente pela degradação do polímero, o que proporciona uma liberação sustentada do fármaco ao longo do tempo (Kim et al., 2023; Shin et al., 2024).

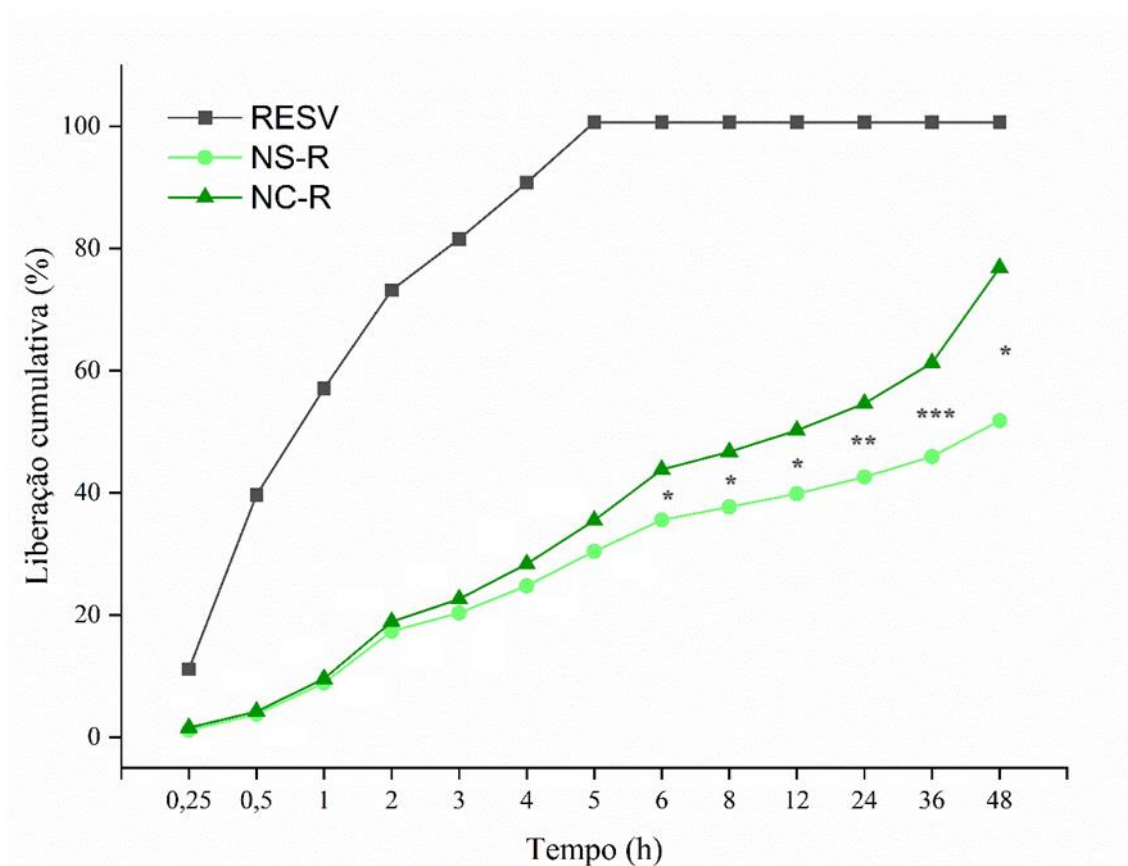
Desta forma, o perfil de liberação das nanopartículas contendo o resveratrol foi avaliada em meio ácido (pH 1,2) por 2h e adicionado em meio básico (pH 6,8) até o tempo final do estudo (48h), simulando o pH estomacal e intestinal respectivamente a uma temperatura de 37°C mimetizando uma administração oral. Observa-se através da Figura 17, que o resveratrol livre apresentou uma liberação de 100% disperso nas primeiras 5 horas. Essa liberação pode ser atribuída à intensa dispersão do resveratrol livre no meio de dissolução, seguido por uma fase de platô, indicando uma saturação do meio. Esses resultados corroboram com estudos anteriores que também observaram a rápida liberação do resveratrol livre devido à sua baixa estabilidade e intensa dispersão em meio aquoso (Katila et al., 2022; Zhang et al., 2023, Zhang et al., 2024).

Os perfis de liberação *in vitro* revelaram que as nanopartículas desenvolvidas não exibiram liberação de explosão (efeito *burst*), indicando que o fármaco foi integrado ao polímero na matriz e não apenas adsorvido na superfície da partícula. Por fim, os resultados revelaram que após 5h, a porcentagem cumulativa do resveratrol liberado foi

significativamente menor ($p < 0,01$) das formulações selecionadas do que no fármaco livre. Com 12h de experimento, 100% da solução de resveratrol já havia sido liberado, enquanto as nanoesferas liberaram apenas 40% do fármaco total incorporado na nanopartícula, atingindo 52% de liberação em 48h. As nanocápsulas por sua vez também mantiveram a liberação em 46% em 12h, finalizando o ensaio com 77% do fármaco liberado em 48h.

A partir das 6h de liberação foi comparado as liberações entre as nanopartículas para avaliar a diferença de intensidade de fármaco liberado. A partir das 24h a quantidade de resveratrol liberado pelas nanocápsulas foi significativamente maior ($p < 0,01$), atingindo seu ponto máximo às 36h ($p < 0,001$), que as nanoesferas. Nanocápsulas são caracterizadas por um núcleo central que contém óleo e/ou água, rodeado por uma membrana polimérica, este arranjo pode facilitar uma liberação inicial rápida se o fármaco estiver localizado próximo à superfície ou dentro do núcleo, especialmente se a membrana for permeável ou se houver rápida degradação do polímero. Em estudos *in vitro*, as nanocápsulas podem mostrar uma liberação mais rápida comparada às nanoesferas, devido à presença de fármaco livre ou fracamente ligado na superfície da cápsula, facilitando uma rápida disponibilidade. Nanoesferas possuem uma distribuição homogênea do fármaco na matriz polimérica. A liberação do fármaco ocorre principalmente por difusão e pela degradação do polímero, tendendo a ter uma liberação mais controlada e menos abrupta, dado que o fármaco deve difundir através da matriz polimérica. Esse processo pode ser mais lento comparado à liberação de fármaco encapsulado em nanocápsulas (Deng et al., 2020; Gomes et al., 2019; Rață et al., 2019).

Figura 17. Estudo de liberação *in vitro* das nanopartículas e do resveratrol livre.



Legenda: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, quando comparada a liberação entre as nanopartículas.

Então, para avaliar o perfil de liberação do resveratrol a partir das nanopartículas poliméricas, detectar qual mecanismo de liberação, foram testados vários modelos cinéticos para determinar qual corresponde ao perfil apresentado pelas nanopartículas e pela solução de fármaco livre como ilustrado na tabela 10. Entre todos os modelos testados pelo software (ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlim, Hixson-Crowell). O coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajust}), o desvio padrão dos resíduos (MSE) e o erro quadrático médio entre as curvas ajustadas pelo modelo e as curvas correspondentes aos dados experimentais (MSC), foram utilizados para determinar o modelo que melhor se ajusta aos dados. O R^2_{ajust} foi empregado para comparar o ajuste dos modelos teóricos com os dados experimentais, sendo que valores mais próximos de 1 indicam um melhor ajuste do modelo aos dados. O MSE, por sua vez, é uma medida estatística que avalia o erro médio quadrático entre os valores observados e os valores previstos pelo modelo. Um valor baixo de MSE indica um bom ajuste do modelo às curvas dos dados experimentais. (Heredia et al., 2022; Moroney; Vynnycky, 2021).

Tabela 11. Modelos cinéticos obtidos a partir da liberação *in vitro*.

Formulação	Modelo cinético	Equação	R ² _{ajust}	MSE	MSC	Constantes
Resveratrol	Ordem zero	$F=k_0*t$	-3,688	62,60	-1,699	$k_0 = 0,055$
	Primeira ordem	$F=100*[1-\text{Exp}(k_i*t)]$	0,9616	5,66	3,105	$k_i = 0,010$
	Higuchi	$F= k_{Hi}*t^{0,5}$	-0,813	38,93	-0,748	$k_{Hi}= 2,946$
	Korsmeyer-Peppas	$F=kKP*t^n$	-8,37	88,52	-2,45	$k_{KP}= 4,856$ $n = -2,22$
	Hixson-Crowell	$F=100*[1-(1-kHC*t)^3]$	-1,06	41,544	-0,878	$k_{HC}= 0,00$
	Peppas-Sahlin	$F=k_1*t^m+k_2*t^{(2*m)}$	0,874	10,259	1,792	$k_1= 9,467$ $k_2 = -0,194$ $m = 0,450$
Nanoesfera	Ordem zero	$F=k_0*t$	-0,151	17,67	-0,294	$k_0 = 0,024$
	Primeira ordem	$F=100*[1-\text{Exp}(k_i*t)]$	0,2187	14,56	0,0929	$k_i= 0,00$
	Higuchi	$F= k_{Hi}*t^{0,5}$	0,7550	8,15	1,25	$k_{Hi}= 1,176$
	Korsmeyer-Peppas	$F=kKP*t^n$	0,0114	16,37	-0,209	$k_{KP}= 0,503$ $n = 0,651$
	Hixson-Crowell	$F=100*[1-(1-kHC*t)^3]$	0,0468	16,08	-0,106	$k_{HC}= 0,00$
	Peppas-Sahlin	$F=k_1*t^m+k_2*t^{(2*m)}$	0,9115	4,900	2,145	$k_1= 2,522$ $k_2 = -0,03$ $m = 0,450$
Nanocápsula	Ordem zero	$F=k_0*t$	0,2553	19,99	0,14	$k_0 = 0,03$
	Primeira ordem	$F=100*[1-\text{Exp}(k_i*t)]$	0,761	11,556	1,278	$k_i= 0,00$
	Higuchi	$F= k_{Hi}*t^{0,5}$	0,881	7,97	1,979	$k_{Hi}= 1,55$
	Korsmeyer-Peppas	$F=kKP*t^n$	0,3405	18,81	0,195	$k_{KP}= 0,515$ $n = 0,682$
	Hixson-Crowell	$F=100*[1-(1-kHC*t)^3]$	0,5697	15,20	0,689	$k_{HC}= 0,00$
	Peppas-Sahlin	$F=k_1*t^m+k_2*t^{(2*m)}$	0,9203	6,54	2,25	$k_1= 2,76$ $k_2 = -0,020$ $m = 0,450$

Legenda: R²_{ajust} = coeficiente de correlação ajustado; MSE = desvio padrão dos resíduos; MSC = erro quadrático médio entre as curvas ajustadas pelo modelo e as curvas correspondentes aos dados experimentais; K = constantes de difusão características do modelo; t = tempo; n = expoente de liberação ou parâmetro de difusão; m = direcionalidade do tipo de difusão; F₀ = fração inicial do fármaco na solução resultante de uma liberação rápida.

De acordo com os critérios estabelecidos para a seleção do modelo matemático, o modelo de Primeira Ordem (R²_{ajust} = 0,96; MSE = 5,66; MSC = 3,105) apresentou a melhor adequação ao perfil de liberação observado para a solução de resveratrol livre. A cinética de primeira ordem descreve a taxa de liberação de uma substância a partir do sistema ao longo do tempo, onde essa taxa diminui exponencialmente. Isso significa que

a quantidade de substância liberada por unidade de tempo reduz à medida que o tempo passa, indicando a ocorrência de um mecanismo de transporte por difusão Fickiana. Esse tipo de difusão ocorre devido a um gradiente de concentração entre o meio doador e o receptor, tendendo a atingir um equilíbrio, característica típica de uma difusão normal (Liu et al., 2024).

Já as nanoesferas ($R^2_{\text{ajust}} = 0,911$; $\text{MSE} = 4,90$; $\text{MSC} = 2,145$) e nanocápsulas ($R^2_{\text{ajust}} = 0,920$; $\text{MSE} = 6,54$; $\text{MSC} = 2,25$) apresentaram melhor adequação ao modelo Peppas-Sahlin, o que difere do modelo encontrado para a solução de resveratrol, indicando que o sistema foi capaz de modificar a cinética de liberação do fármaco livre. O modelo Peppas-Sahlin é usado para descrever a liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos e combina os efeitos de difusão Fickiana e relaxamento das cadeias poliméricas. Este modelo é caracterizado por dois parâmetros: o expoente de liberação (m) e a constante de taxa de relaxamento (k). Valores de m inferiores a 0,43 indicam que o mecanismo de liberação é dominado pela difusão Fickiana, enquanto valores entre 0,43 e 0,85 indicam uma combinação de difusão e relaxamento da matriz (transporte anômalo). A constante k_2 corresponde ao mecanismo de relaxamento do polímero e k_1 com o mecanismo de difusão Fickiana. Para ambas as nanopartículas, $0,43 < m < 0,85$, revelando que o mecanismo de liberação do fármaco é governado por transporte anômalo, ou seja, uma combinação de difusão e relaxamento da matriz. Além disso, como k_1 foi maior que k_2 , ficou demonstrado que a difusão é o mecanismo predominante. O ajuste dos dados ao modelo Peppas-Sahlin sugere que o modelo de liberação do resveratrol encapsulado ocorre através de uma interação complexa entre difusão e relaxamento polimérico, com predomínio da difusão, onde o fármaco é liberado através da malha polimérica após seu intumescimento, proporcionando uma compreensão mais detalhada do comportamento de liberação controlada dos nanosistemas (Liu et al., 2024; Sahu et al., 2024; Vaid; Jindal, 2023; Zhao et al., 2023).

No estudo de Kharaziha et al. (2015) sobre a liberação controlada de dexametasona a partir de membranas de PCL, foi constatado que as nanocápsulas proporcionaram uma liberação mais rápida do fármaco devido à sua estrutura que facilita a difusão inicial do composto ativo. Esses achados corroboram com a hipótese de que as nanocápsulas apresentam uma liberação mais rápida do resveratrol em comparação com as nanoesferas. A estrutura das nanocápsulas permite uma maior solubilização do fármaco

em sua cavidade líquida, facilita a liberação mais rápida do composto ativo, enquanto as nanoesferas, com sua matriz mais densa e uniforme, promove uma liberação mais lenta e controlada (Fernando et al., 2022; Rață et al., 2019; Sharma et al., 2023).

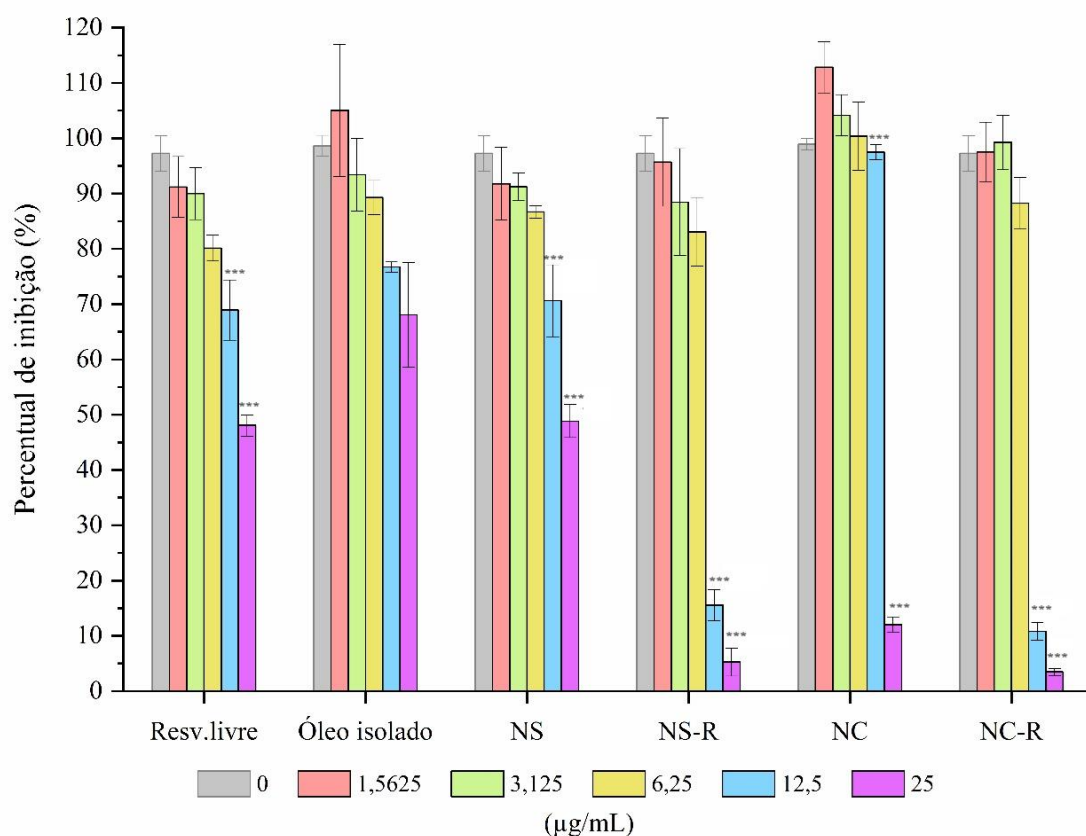
Sendo assim, observa-se que as diferenças estruturais entre nanocápsulas e nanoesferas de PCL influenciam significativamente os mecanismos de liberação de fármacos, portanto, a escolha entre nanocápsulas e nanoesferas deve considerar as características desejadas para a liberação do fármaco, com as nanocápsulas sendo mais adequadas para aplicações que requerem uma liberação mais rápida e controlada do agente terapêutico.

5.6 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

O ensaio de citotoxicidade por meio de cultura celular foi realizado, visto que conseguem avaliar a viabilidade celular de diversos compostos com sucesso, devido a sua reprodutibilidade, rapidez, sensibilidade e custo acessível (Panneerselvam et al., 2024). O teste foi realizado para avaliar a segurança dos nanossistemas frente aos fibroblastos L929, bem como comparar com as nanopartículas contendo o fármaco (NS-R e NC-R), nanopartículas sem IFA (NS e NC) e o óleo de gergelim utilizado para a produção das nanocápsulas, para avaliação de um possível sinergismo que possa haver com o fármaco, com concentrações avaliadas entre 25 µg/mL e 1,0 mg/mL. Os resultados apresentados na Figura 18 demonstram que as nanopartículas sem fármaco não apresentaram citotoxicidade até a concentração de 12,5 µg/mL, visto que não reduziu a viabilidade em até 70%, ao contrário das nanopartículas com resveratrol, que foram citotóxicas a partir dessa mesma concentração ($p < 0,001$).

A nanocápsula com fármaco foi mais citotóxica que a nanoesfera visto que, na concentração de 12,5 µg/mL o percentual de inibição da NC-R atingiu 15%, enquanto a NS-R permaneceu por volta de 10%, porém estes valores não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Nota-se que as nanopartículas intensificaram a atividade do resveratrol, visto que ele começou a apresentar citotoxicidade apenas na maior concentração (25 µg/mL), enquanto as nanopartículas foram bastante citotóxicas desde 12,5 µg/mL ($p < 0,001$). Tais resultados podem ser corroborados com os valores das concentrações citotóxicas (CC_{50}) para cada amostra testada apresentados na Tabela 11.

Figura 18. Percentual de inibição das células nas diferentes concentrações testadas.



Legenda: 0: Controle negativo apenas com o meio de cultivo. NS: Nanoesfera NS-R: Nanoesfera com resveratrol NC: Nanocápsula NC-R: Nanocápsula com resveratrol. *** $p < 0,001$, quando comparado Resv. livre com NC-R e NS-R, quando comparado NS com NS-R e NC com NC-R.

Fonte: autoria própria.

Tabela 12. Concentrações citotóxicas das substâncias testadas para a célula L929.

Substâncias	CC ₅₀ (µg/mL)	
	L929	
	Média	Desvio padrão
Resveratrol livre	24,04	3,56
Óleo de gergelim	40,74	6,38
NS	24,98	3,18
NS-R	8,74	0,61
NC	19,58	2,45
NC-R	8,77	0,32

Legenda: NS: Nanoesfera NS-R: Nanoesfera com resveratrol NC: Nanocápsula NC-R: Nanocápsula com resveratrol.

Os dados indicam que o resveratrol livre apresenta uma CC₅₀ de 24,04 µg/mL, situando-se na faixa do intervalo de confiança de 20,58 a 29,26 µg/mL, o que confirma a eficácia do fármaco livre na inibição do crescimento dos fibroblastos L929 e sua toxicidade. Comparativamente, o óleo utilizado para a produção das nanocápsulas mostrou uma CC₅₀ significativamente mais alta (40,74 µg/mL), sugerindo uma menor citotoxicidade quando utilizado isoladamente, necessitando de doses mais elevadas para causar a morte das células. Os controles em branco (NS e NC) apresentaram CC₅₀ de 24,98 µg/mL e 19,58 µg/mL, respectivamente.

Esses resultados indicam que, na ausência do fármaco ativo, a citotoxicidade é reduzida, exigindo concentrações mais elevadas para inibir o crescimento dos fibroblastos. No entanto, a citotoxicidade ainda está presente devido aos componentes da formulação das nanopartículas. As nanopartículas contendo o resveratrol (NS-R e NC-R) apresentaram CC₅₀ de 8,74 µg/mL e 8,77 µg/mL, respectivamente. Estes valores são consideravelmente menores do que os observados para o fármaco livre, indicando um aumento na eficácia citotóxica quando o resveratrol é encapsulado. Este efeito pode ser atribuído a potencialização a ação do resveratrol devido a nanoestruturação.

Os resultados deste estudo são consistentes com outros estudos que avaliaram a citotoxicidade do resveratrol encapsulado em nanopartículas poliméricas. Por exemplo, um estudo publicado por Lian et al. (2019) relatou uma CC_{50} menor para nanopartículas de resveratrol (110,8 $\mu\text{g/mL}$) em comparação ao resveratrol livre (157,2 $\mu\text{g/mL}$), sugerindo um efeito sinérgico similar ao observado no presente estudo. Esses resultados, alinhados com os encontrados na literatura, destacam a vantagem das nanopartículas poliméricas em potencializar a ação do resveratrol, provavelmente devido à melhor internalização celular e liberação controlada do fármaco. A diferença observada na citotoxicidade entre o fármaco livre e as nanopartículas pode ser atribuída a fatores como a estabilização do resveratrol, a proteção contra degradação e a entrega direcionada, que juntos contribuem para uma maior eficácia terapêutica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As considerações finais deste trabalho indicam que o planejamento experimental para otimização da obtenção foi eficaz, resultando no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas com características físico-químicas apropriadas. As análises de DLS, STEM e o estudo de estabilidade durante 180 dias demonstraram que essas nanopartículas possuem tamanho uniforme, distribuição homogênea, potencial zeta e estabilidade durante o armazenamento adequados para utilização como nanocarreadores para administração oral.

As técnicas de caracterização confirmaram a eficiente incorporação do fármaco na estrutura das nanopartículas, garantindo bom encapsulamento e minimizando perdas durante o armazenamento. Os ensaios de liberação *in vitro* demonstraram que as nanopartículas proporcionam uma liberação prolongada do resveratrol por pelo menos 48 horas, contrastando com as 5 horas de liberação do fármaco livre. Essa liberação prolongada é promissora, pois pode melhorar a absorção e aproveitamento do resveratrol pelo organismo, trazendo benefícios para o regime posológico e melhoria na toxicidade. Os resultados da liberação corroboram com as respostas de citotoxicidades obtidas no ensaio com as nanopartículas, onde elas puderam aumentar a atividade citotóxica do fármaco.

Portanto, pode-se concluir que as nanopartículas desenvolvidas têm potencial para serem utilizadas como um sistema de liberação oral de fármacos de ação prolongada, com destaque para as nanocápsulas, que obtiveram uma ação citotóxica melhor e um sistema de liberação mais eficiente. Ainda que as nanoesferas também apresentem ação citotóxica e uma liberação prolongada eficaz, sua metodologia de produção é financeiramente mais onerosa que a produção de nanocápsulas.

Sendo assim, ainda são necessários estudos de toxicidade celular em modelos de câncer de mama e a farmacocinética *in vivo* para confirmar a melhora na absorção oral e biodisponibilidade, quando administradas em animais ou humanos. Somente após esses estudos adicionais será possível avaliar plenamente o potencial terapêutico e a segurança dessas nanopartículas como sistema de entrega oral eficaz para o tratamento do câncer de mama. Em última análise, essas descobertas podem abrir novas perspectivas para o tratamento de doenças, melhorando a eficácia do resveratrol como princípio ativo farmacêutico.

6.1 Perspectivas

- Obtenção e caracterização das nanopartículas liofilizadas;
- Ensaio de estabilidade das nanopartículas liofilizadas;
- Realização de ensaios de citotoxicidade *in vitro* em modelos celulares de câncer de mama;
- Realização de ensaios de toxicidade aguda *in vivo* em camundongos;
- Obter formas farmacêuticas sólidas orais a partir das nanopartículas desenvolvidas;

7 ANEXOS

A. Apresentação de trabalho no Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica.



B. Artigo de revisão a ser submetido no Journal of Biomedical Nanotechnology (Qualis A1).

Influência do Design Experimental na otimização do desenvolvimento de nanopartículas lipídicas e poliméricas

Bruna Fernanda de Lima Arruda Holanda¹

Maria Lavinya Arruda da Rocha²

Larissa Pereira Alves³

Emerson de Oliveira Silva⁴

Demis Ferreira de Melo⁵

Myla Lôbo de Souza⁶

Pedro José Rolim Neto⁷

Palavras-chave: Quality by Design; Otimização Box-Behnken; Nanopartículas.

Keywords: Quality by Design; Box-Behnken optimization; nanoparticles.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento farmacêutico tem como objetivo projetar um produto de qualidade junto ao seu processo de fabricação para fornecer o desempenho pretendido do produto. As informações e o conhecimento adquiridos a partir de estudos de desenvolvimento farmacêutico

- C. Artigo experimental, fruto dos resultados obtidos neste trabalho de mestrado, a ser submetido no International Journal of Nanomedicine (Qualis A1).

Title: Development of Resveratrol Polymeric Nanoparticles as a Carrier for breast cancer treatment: Statistical Design, Optimization, characterization, and in vitro activity

Bruna Fernanda de Lima Arruda Holanda¹

Myla Lôbo de Souza²

Pedro José Rolim Neto³

Abstract

Breast cancer, characterized by a complex tumor microenvironment and aggressive behavior, is one of the most prevalent malignancies among women in Brazil, with an estimated 74,000 new cases annually until 2025. Conventional treatments face significant challenges, such as low specificity, systemic toxicity, and drug resistance. Resveratrol (RES), a polyphenolic phytoalexin derived from plants, has shown therapeutic potential against breast cancer by inhibiting cell proliferation, invasion, metastasis, and inducing apoptosis. Furthermore, RES can enhance the efficacy of chemotherapy and radiotherapy. However, its hydrophobicity, lack of selectivity, renal toxicity, and photolytic and chemical instability limit its clinical application. The use of nano-delivery agents offers a promising alternative to overcome these limitations by improving stability, providing active and passive targeting, allowing controlled release, and increasing bioavailability and accumulation in breast carcinoma cells. Therefore, the aim of this work is... Compatibility studies between the formulation components were conducted through the evaluation of FTIR spectra, DSC curves, and XRD graphs.

REFERÊNCIAS

- ADEPU, S.; RAMAKRISHNA, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules*, v. 26, n. 19, 1 out. 2021.
- AGGARWAL, B. B. et al. Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. [s.d.].
- AL-AJMI, K. et al. Risk of breast cancer in the UK biobank female cohort and its relationship to anthropometric and reproductive factors. *PLOS ONE*, v. 13, n. 7, p. e0201097, 1 jul. 2018.
- ALI, M. et al. Recent Developments in Nanoparticle Formulations for Resveratrol Encapsulation as an Anticancer Agent. *Pharmaceutics* 2024, Vol. 17, Page 126, v. 17, n. 1, p. 126, 18 jan. 2024.
- ALONSO-GONZÁLEZ, M. et al. DoE-based development of celecoxib loaded PLGA nanoparticles: In ovo assessment of its antiangiogenic effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 180, p. 149–160, 1 nov. 2022.
- ALSHAWWA, S. Z. et al. Nanocarrier Drug Delivery Systems: Characterization, Limitations, Future Perspectives and Implementation of Artificial Intelligence. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 4, 1 abr. 2022.
- AMICIS, F. DE et al. Resveratrol, through NF- κ B/p53/Sin3/HDAC1 complex phosphorylation, inhibits estrogen receptor α gene expression via p38MAPK/CK2 signaling in human breast cancer cells. *The FASEB Journal*, v. 25, n. 10, p. 3695, out. 2011.
- AUTIER, P. et al. Effect of screening mammography on the risk of breast cancer deaths and of all-cause deaths: a systematic review with meta-analysis of cohort studies. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 172, p. 111426, 1 ago. 2024.
- BAO, Y. F. et al. Real-world clinical study of trastuzumab biosimilar (Zercepac) and pertuzumab (Perjeta) in combination with chemotherapy for neoadjuvant treatment of HER-2-positive breast cancer. *Asian Journal of Surgery*, v. 47, n. 7, p. 3225–3228, 1 jul. 2024.
- BHADLAN, A. et al. Recent Advances in Polycaprolactones for Anticancer Drug Delivery. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 7, 1 jul. 2023.

BHAT, K. P. L.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 957, p. 210–229, 2002.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, v. 235, p. 337–351, 10 ago. 2016.

BONOTTO, M. et al. Chemotherapy versus endocrine therapy as first-line treatment in patients with luminal-like HER2-negative metastatic breast cancer: A propensity score analysis. *The Breast*, v. 31, p. 114–120, 1 fev. 2017.

BUYA, A. B.; MAHLANGU, P.; WITIKA, B. A. From lab to industrial development of lipid nanocarriers using quality by design approach. *International Journal of Pharmaceutics: X*, v. 8, p. 100266, 1 dez. 2024.

CAMACHO VIEIRA, C. et al. Is it advantageous to use quality by design (QbD) to develop nanoparticle-based dosage forms for parenteral drug administration? *International Journal of Pharmaceutics*, v. 657, p. 124163, 25 maio 2024.

CHAUDHARI, V. S.; BOSE, S. Curcumin and resveratrol delivery from multi-functionalized calcium phosphate scaffold enhances biological properties. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 90, p. 105169, 1 dez. 2023.

CRISTINA, B.; PINTO, S. Polimeric nanoparticles for application in Photodynamic Therapy View project Polyelectrolyte coated polymeric nanoparticles View project. [s.d.].

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 2, 18 maio 2018.

DANAFAR, H. et al. Co-delivery of methotrexate and curcumin with mPEG-PCL polymeric nanoparticles and evaluation of toxicity effect on MCF7 breast cancer cell line. *Inorganic Chemistry Communications*, v. 142, p. 109715, 1 ago. 2022.

DE MELO, D. F. et al. Physicochemical Characterization of Silver Sulfadiazine in Polymeric Wound Dressings. *Current pharmaceutical design*, v. 29, n. 11, p. 865–882, 27 mar. 2023.

DE MENEZES, R. F. et al. Alcohol consumption and the risk of cancer in Brazil: A study involving 203,506 cancer patients. *Alcohol*, v. 49, n. 7, p. 747–751, 1 nov. 2015.

DE SOUZA, M. L. et al. A Systematic Review of Functionalized Polymeric Nanoparticles to Improve Intestinal Permeability of Drugs and Biological Products. *Current Pharmaceutical Design*, v. 28, n. 5, p. 410–426, 5 ago. 2021.

DENG, S. et al. Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status, Challenges and Opportunities. *Nanomaterials* 2020, Vol. 10, Page 847, v. 10, n. 5, p. 847, 28 abr. 2020.

DO NASCIMENTO, T. G. et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. *Nanoscale Research Letters*, v. 11, n. 1, p. 1–16, 1 dez. 2016.

DWIVEDI, R. et al. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, v. 10, n. 1, p. 381–388, 1 jan. 2020.

EBRAHIMI, F. et al. Material compatibility and processing challenges in droplet deposition modelling additive manufacturing: A study on pharmaceutical excipients Polyvinylpyrrolidone/vinyl acetate (PVP/VA) and Polycaprolactone (PCL). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 200, p. 106850, 1 set. 2024.

EGERTON, R. F. Physical principles of electron microscopy: An introduction to TEM, SEM, and AEM. *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*, p. 1–202, 2005.

ELUMALAI, K.; SRINIVASAN, S.; SHANMUGAM, A. Review of the efficacy of nanoparticle-based drug delivery systems for cancer treatment. *Biomedical Technology*, v. 5, p. 109–122, 1 mar. 2024.

FATIMA, A. et al. A comprehensive review on nanocarriers as a targeted delivery system for the treatment of breast cancer. *Intelligent Pharmacy*, 5 abr. 2024.

FERNANDO, I. P. S. et al. Alginate nanocapsules by water-in-oil emulsification and external gelation for drug delivery to fine dust stimulated keratinocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 218, p. 102–114, 1 out. 2022.

FRANCESCHI, B. T.; BEZERRA, P. H. A.; TORQUETI, M. R. Antitumor effects of co-treatment of resveratrol with antitumor drugs in ER- and HER2-positive breast

cancer cells are due to induction of apoptosis and modulation of estrogen receptor expression. *Breast Cancer*, p. 1–15, 23 maio 2024.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, v. 25, n. 34, p. 4798–4811, 7 ago. 2006.

GAGLIARDI, A. et al. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, 3 fev. 2021.

GHAEMI, A. et al. Targeted Nano-Delivery of Flutamide with polymeric and lipid nanoparticles. *European Polymer Journal*, v. 213, p. 113124, 10 jun. 2024.

GOMES, K. A. L. et al. Risk factors for breast cancer and their association with molecular subtypes in a population of Northeast Brazil. *Cancer Epidemiology*, v. 78, p. 102166, 1 jun. 2022.

GOMES, M. L. S. et al. Long-lasting anti-platelet activity of cilostazol from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) blend nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C*, v. 94, p. 694–702, 1 jan. 2019.

GOND, R. K. et al. Extraction and properties of cellulose for polymer composites. *Biodegradable Polymers, Blends and Composites*, p. 59–86, 1 jan. 2022.

GUIMARÃES, D.; CAVACO-PAULO, A.; NOGUEIRA, E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 601, p. 120571, 15 maio 2021.

GURLER, E. B. et al. Encapsulated melatonin in polycaprolactone (PCL) microparticles as a promising graft material. *Materials Science and Engineering: C*, v. 100, p. 798–808, 1 jul. 2019.

HARINI SRI, K. et al. Sustained release of resveratrol from fused deposition modelling guided 3D porous scaffold for bone tissue engineering. *Process Biochemistry*, v. 131, p. 188–198, 1 ago. 2023.

HE, Z. et al. Encapsulation of heteropolyacids within hollow microporous polymer nanospheres for sustainable esterification reaction. *Reactive and Functional Polymers*, v. 169, p. 105063, 1 dez. 2021.

HEREDIA, N. S. et al. Comparative statistical analysis of the release kinetics models for nanoprecipitated drug delivery systems based on poly(lactic-co-glycolic acid). *PLoS ONE*, v. 17, n. 3, 1 mar. 2022.

HONG, S. et al. Protein-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* 2020, Vol. 12, Page 604, v. 12, n. 7, p. 604, 29 jun. 2020.

JAIN, A. K.; THAREJA, S. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 47, n. 1, p. 524–539, 4 dez. 2019.

JAIN, S.; SHAH, R. P. Drug-Excipient Compatibility Study Through a Novel Vial-in-Vial Experimental Setup: A Benchmark Study. *AAPS PharmSciTech*, v. 24, n. 5, p. 117, 1 jun. 2023.

JEANDET, P. et al. Resveratrol and cyclodextrins, an easy alliance: Applications in nanomedicine, green chemistry and biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 53, p. 107844, 1 dez. 2021.

JIANG, W. et al. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature nanotechnology*, v. 3, n. 3, p. 145–150, 2008.

JOE, A. K. et al. Resveratrol Induces Growth Inhibition, S-phase Arrest, Apoptosis, and Changes in Biomarker Expression in Several Human Cancer Cell Lines 1. [s.d.].

JOSEPH, X. et al. Nanobiomaterials in support of drug delivery related issues. *Materials Science and Engineering: B*, v. 279, p. 115680, 1 maio 2022.

KARI, S. et al. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis* 2022 27:7, v. 27, n. 7, p. 482–508, 17 jun. 2022.

KARUNAKARAN, G. et al. Biosynthesis of Nanoparticles from Various Biological Sources and Its Biomedical Applications. *Molecules* 2023, Vol. 28, Page 4527, v. 28, n. 11, p. 4527, 2 jun. 2023.

KATILA, N. et al. Enhancement of blood–brain barrier penetration and the neuroprotective effect of resveratrol. *Journal of Controlled Release*, v. 346, p. 1–19, 1 jun. 2022.

KAUR, J. et al. Polymeric micelles loaded with glyburide and vanillic acid: I. Formulation development, in-vitro characterization and bioavailability studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 624, p. 121987, 25 ago. 2022.

KAUR, R.; SINHA, V. R. Use of thermal and non thermal techniques for assessing compatibility between mirtazapine and solid lipids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 161, p. 144–158, 30 nov. 2018.

KHAIMOV, V. et al. Safety evaluation of resveratrol as an active compound for drug-eluting cardiovascular implants. *Current Directions in Biomedical Engineering*, v. 5, n. 1, p. 331–333, 1 set. 2019.

KHAN, M. A. et al. Encapsulation and protection of resveratrol in kafirin and milk protein nanoparticles. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 54, n. 11, p. 2998–3007, 1 nov. 2019.

KHARAZIHA, M. et al. PCL-forsterite nanocomposite fibrous membranes for controlled release of dexamethasone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 26, n. 1, p. 1–11, 18 nov. 2015.

KIM, B. S. et al. Degradation of Poly(ϵ -caprolactone) Resorbable Multifilament Yarn under Physiological Conditions. *Polymers* 2023, Vol. 15, Page 3819, v. 15, n. 18, p. 3819, 19 set. 2023.

KORKUT, O. Ç.; ÖZDEMİR, G. Encapsulation of resveratrol in rhamnolipid-zein nanoparticles using a pH-driven method: kinetic modeling on controlled release from nanoparticles. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 45, n. 6, p. 1096–1106, 2024.

KORSMEYER, R. W.; LUSTIG, S. R.; PEPPAS, N. A. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. I. Mathematical modeling. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, v. 24, n. 2, p. 395–408, 1 fev. 1986.

KURZAVA KENDALL, L. et al. Epigenetic Effects of Resveratrol on Oncogenic Signaling in Breast Cancer. *Nutrients*, v. 16, n. 5, p. 699, 1 mar. 2024.

LAGRECA, E. et al. Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for controlled drug delivery. *Progress in Biomaterials* 2020 9:4, v. 9, n. 4, p. 153–174, 15 out. 2020.

LAMCH, Ł. Resveratrol loaded core-shell nanoparticles – The use of membrane emulsifier for nanocarriers' control and upscaling. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 86, p. 104647, 1 set. 2023.

LEE, D. G. et al. Resveratrol-loaded gold nanoparticles enhance caspase-mediated apoptosis in PANC-1 pancreatic cells via mitochondrial intrinsic apoptotic pathway. *Cancer Nanotechnology*, v. 13, n. 1, p. 1–19, 1 dez. 2022.

LI, J.; QIAO, Y.; WU, Z. Nanosystem trends in drug delivery using quality-by-design concept. *Journal of Controlled Release*, v. 256, p. 9–18, 28 jun. 2017.

LIAN, B. et al. Folate-conjugated human serum albumin-encapsulated resveratrol nanoparticles: preparation, characterization, bioavailability and targeting of liver tumors. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 47, n. 1, p. 154–165, 4 dez. 2019.

LIMA, F. V. et al. Carbamide peroxide nanoparticles for dental whitening application: Characterization, stability and in vivo/in situ evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 179, p. 326–333, 1 jul. 2019.

LIU, Z. et al. Research on the loading and release kinetics of the vincristine sulfate liposomes and its anti-breast cancer activity. *International Journal of Pharmaceutics: X*, v. 7, p. 100258, 1 jun. 2024.

MARTINS, M. G. et al. Development of polymeric nanoparticles associated with SPION and curcumin: a versatile magnetic and fluorescent platform for Life Science applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 693, p. 133966, 20 jul. 2024.

METAWEA, O. R. M. et al. Folic acid-poly(N-isopropylacrylamide-maltodextrin) nanohydrogels as novel thermo-/pH-responsive polymer for resveratrol breast cancer targeted therapy. *European Polymer Journal*, v. 182, p. 111721, 3 jan. 2023.

MIRCIOIU, C. et al. Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* 2019, Vol. 11, Page 140, v. 11, n. 3, p. 140, 21 mar. 2019.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 29 jan. 2010.

MORONEY, K. M.; VYNNYCKY, M. Mathematical modelling of drug release from a porous granule. *Applied Mathematical Modelling*, v. 100, p. 432–452, 1 dez. 2021.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

NAIR, D. B.; SUJITH, S. Evaluation of cytotoxic effect of methanolic extract of *Saraca asoca* bark in MCF-7 cell line. *Materials Today: Proceedings*, 17 nov. 2023.

NAVARRETE, N. et al. Colloidal stability of molten salt –based nanofluids: Dynamic Light Scattering tests at high temperature conditions. *Powder Technology*, v. 352, p. 1–10, 15 jun. 2019.

ONEY-MONTALVO, J. E. et al. Applications of polycaprolactone in the food industry: A review. <https://cjfs.agriculturejournals.cz/doi/10.17221/200/2023-CJFS.html>, v. 42, n. 2, p. 77–84, 2024.

PANNEERSELVAM, H. M. et al. In vitro cytotoxicity assessment of biosynthesized nanoceria against MCF-7 breast cancer cell lines. *Applied Surface Science Advances*, v. 21, p. 100603, 1 jun. 2024.

PAUL, D. R. Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 418, n. 1, p. 13–17, 10 out. 2011.

PEREIRA SANTOS CARVALHO, I. et al. Evaluation of in vivo and in vitro efficacy of solasonine/solamargine-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles against bladder cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 661, p. 124411, 15 ago. 2024.

PERNAS, S.; TOLANEY, S. M. HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance. <https://doi.org/10.1177/1758835919833519>, v. 11, 19 mar. 2019.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000 406:6797, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 17 ago. 2000.

RAȚĂ, D. M. et al. “In vitro” behaviour of aptamer-functionalized polymeric nanocapsules loaded with 5-fluorouracil for targeted therapy. *Materials Science and Engineering: C*, v. 103, p. 109828, 1 out. 2019.

REHMAN, Q. et al. Role of Kinetic Models in Drug Stability. *Drug Stability and Chemical Kinetics*, p. 155–165, 1 jan. 2020.

ROJEK, B.; WESOŁOWSKI, M. FTIR and TG analyses coupled with factor analysis in a compatibility study of acetazolamide with excipients. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 208, p. 285–293, 5 fev. 2019.

ROSSETTI, A. et al. Significant progress in improving Atorvastatin dissolution rate: Physicochemical characterization and stability assessment of self-dispersible Atorvastatin/Tween 80® nanocrystals formulated through wet milling and freeze-drying. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 650, p. 123720, 25 jan. 2024.

ROY, H. et al. N-trimethyl chitosan and tripalmitin loaded solid lipid nanoparticles of tofacitinib citrate: Characterization and in-vivo anti-inflammatory assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 87, 1 set. 2023a.

ROY, H. et al. N-trimethyl chitosan and tripalmitin loaded solid lipid nanoparticles of tofacitinib citrate: Characterization and in-vivo anti-inflammatory assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 87, p. 104789, 1 set. 2023b.

SAHA, M. et al. QbD based development of resveratrol-loaded mucoadhesive lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 63, p. 102480, 1 jun. 2021.

SAHU, K. M. et al. Synthesis and drug release kinetics of ciprofloxacin from polyacrylamide/dextran/carbon quantum dots (PAM/Dex/CQD) hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 269, p. 132132, 1 jun. 2024.

SAKHI, M. et al. Effect of polymeric stabilizers on the size and stability of PLGA paclitaxel nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 31, n. 9, p. 101697, 1 set. 2023.

SCHREINER, J. et al. Influence of drug molecular weight on self-assembly and intestinal permeation of polymer-based nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 646, p. 123483, 5 nov. 2023.

SELVAMANI, V. Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery, p. 425–444, 1 jan. 2019.

SHADMANI, N. et al. The synthesis and development of poly(ϵ -caprolactone) conjugated polyoxyethylene sorbitan oleate-based micelles for curcumin drug release: an in vitro study on breast cancer cells. RSC Advances, v. 13, n. 34, p. 23449–23460, 1 jan. 2023.

SHAITO, A. et al. Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. International journal of molecular sciences, v. 21, n. 6, 2 mar. 2020.

SHARMA, V. et al. Poly(2-n-propyl-2-oxazoline)/tannic acid nanocapsules with in-situ synthesized gold nanorods for cancer theranostics. European Polymer Journal, v. 198, p. 112409, 17 out. 2023.

SHIN, N. et al. Fast Degradation of Polycaprolactone/Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Blends by Novel Bacillus Strain NR4 with Broad Degrading Activity. Journal of Polymers and the Environment, v. 32, n. 2, p. 898–912, 1 fev. 2024.

SHOKRIEH, M. M.; GHANEI MOHAMMADI, A. R. Nondestructive testing (NDT) techniques in the measurement of residual stresses in composite materials: An overview. Residual Stresses in Composite Materials, p. 71–109, 1 jan. 2021.

SINGH, C. K.; GEORGE, J.; AHMAD, N. Resveratrol-based combinatorial strategies for cancer management. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1290, n. 1, p. 113–121, 2013.

SMITH, B. C. Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy. 9 mar. 2011.

SONG, B. et al. Inhibitory Potential of Resveratrol in Cancer Metastasis: From Biology to Therapy. Cancers, v. 15, n. 10, p. 2758, 1 maio 2023.

SONI, G. et al. Quality by design (QbD) approach in processing polymeric nanoparticles loading anticancer drugs by high pressure homogenizer. HeliyonElsevier Ltd, , 1 abr. 2020.

SOUZA, I. D. L.; SAEZ, V.; MANSUR, C. R. E. Lipid nanoparticles containing coenzyme Q10 for topical applications: An overview of their characterization. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 230, p. 113491, 1 out. 2023.

STACHOWIAK, G. W.; BATCHELOR, A. W.; STACHOWIAK. Surface Micrography and Analysis. [s.l.] Elsevier, 2004. v. 44

SUN, L. et al. Smart nanoparticles for cancer therapy. Signal Transduction and Targeted Therapy 2023 8:1, v. 8, n. 1, p. 1–28, 3 nov. 2023.

TALEVI, A.; RUIZ, M. E. Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin, and Brazel-Peppas: Models of Drug Release. The ADME Encyclopedia, p. 613–621, 2022.

TAO, J. J.; VISVANATHAN, K.; WOLFF, A. C. Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. The Breast, v. 24, p. S149–S153, 1 nov. 2015.

TRAFIMOW, D.; TRAFIMOW, D. Why It Is Problematic to Calculate Probabilities of Findings Given Range Null Hypotheses. Open Journal of Statistics, v. 7, n. 3, p. 483–499, 11 maio 2017.

VAID, V.; JINDAL, R. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin mediated nanocomposite for sustained release of phenothiazine: Microwave synthesis and optimization through experimental design. Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 88, p. 104925, 1 out. 2023.

WANG, H.; KOMINE, H.; GOTOH, T. A swelling pressure cell for X-ray diffraction test. Geotechnique, v. 72, n. 8, p. 675–686, 1 ago. 2022.

WATTS, J. P. et al. The Association Between Food Security and Mammography Screening: Cross-Sectional Survey Results From the National Health Interview Survey. Journal of the American College of Radiology, 3 jun. 2024.

WILSON, B. K.; PRUD'HOMME, R. K. Nanoparticle size distribution quantification from transmission electron microscopy (TEM) of ruthenium tetroxide stained polymeric nanoparticles. Journal of Colloid and Interface Science, v. 604, p. 208–220, 15 dez. 2021.

XIAO, K. et al. Resveratrol promotes diabetic wound healing by inhibiting ferroptosis in vascular endothelial cells. Burns, 11 jul. 2024.

YU, M. et al. Predicting drug release kinetics from nanocarriers inside dialysis bags. Journal of Controlled Release, v. 315, p. 23–30, 10 dez. 2019.

ZANBAK ÇOTAOĞLU, E. M.; KÖSE ÖZKAN, C.; ÖZKAN, Y. Nanobiomaterials: Applications in Nanomedicine and Drug Delivery. Handbook of Nanobioelectrochemistry, p. 519–539, 2023.

ZHANG, J. et al. Changes of physicochemical properties and bioactivities of resveratrol-loaded core–shell biopolymer nanoparticles during in vitro gastrointestinal digestion. Food Chemistry, v. 424, p. 136444, 30 out. 2023.

ZHANG, J. et al. Natural products and derivatives for breast cancer treatment: From drug discovery to molecular mechanism. Phytomedicine, v. 129, p. 155600, 1 jul. 2024a.

ZHANG, Z. et al. Resveratrol-loaded sulfated Hericium erinaceus β -glucan-chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and synergistic anti-inflammatory effects. Carbohydrate Polymers, v. 332, p. 121916, 15 maio 2024b.

ZHAO, Y. et al. Preparation, characterization and release kinetics of a multilayer encapsulated Perilla frutescens L. essential oil hydrogel bead. International Journal of Biological Macromolecules, v. 249, p. 124776, 30 set. 2023.

ZIELINSKA, A. et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. Molecules, v. 25, n. 16, 1 ago. 2020.

ZUPANČIČ, Š.; LAVRIČ, Z.; KRISTL, J. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 93, p. 196–204, 1 jun. 2015.