

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS -
PPGCF

Desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo diferentes revestimentos e também funcionalizadas na superfície como uma estratégia inovadora para vetorização ativa e passiva de fármacos

RODRIGO CÉ

Porto Alegre, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS -
PPGCF

Desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo diferentes revestimentos e também funcionalizadas na superfície como uma estratégia inovadora para vetorização ativa e passiva de fármacos

Tese apresentada por **RODRIGO CÉ**
para obtenção do **TÍTULO DE DOUTOR** em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Porto Alegre, 2020

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 24 de Agosto de 2020, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Aline Rigon Zimmer

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Profa. Dra. Elizandra Braganhol

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Universidade de São Paulo - USP

CIP - Catalogação na Publicação

Cé, Rodrigo
Desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo diferentes revestimentos e também funcionalizadas na superfície como uma estratégia inovadora para vetorização ativa e passiva de fármacos / Rodrigo Cé. -- 2020.
312 f.
Orientadora: Adriana Raffin Pohlmann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Nanocápsulas de núcleo lipídico. 2. Galleria mellonella. 3. Ácido fusídico. 4. Doxorubicina. 5. Ácido fólico. I. Raffin Pohlmann, Adriana, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O estudo que contempla esta tese de doutorado foi desenvolvido nos laboratórios:

1. Laboratório K208 e K217 do Instituto de Química - UFRGS sob orientação da Profa. Adriana Raffin Pohlmann.
2. Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia – UFRGS em colaboração com a Profa Sílvia Stanisçuaski Guterres.
3. Centro de Desenvolvimento Tecnológico - Prédio 19, Lab 8. – UFPEL em colaboração com a Profa. Fabiana K. Seixas e o Prof. Tiago V. Collares.
4. Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia – UFRGS em colaboração com o Prof. Martin Steppe.

Está tese, dedico a minha mãe

MARLENE DE FÁTIMA FERNANDES DA COSTA CÉ

*I have no special talent.
I am only passionately curious.*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo à minha mãe Marlene de Fátima Fernandes da Costa Cé, que me incentivou e me deu todo o apoio de que precisava durante meu doutorado.

Agradeço à minha família que me apoiou, me compreendeu e me iluminou para que eu pudesse completar esta etapa da minha vida.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pela oportunidade.

À minha orientadora Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann pela oportunidade, orientação e confiança que foram fundamentais para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Às agências brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). "Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001". Agradecemos seus apoios financeiros para concluir este estudo.

Agradecimentos especiais: Dr. Vladimir Lavayen, Dra. Silvia Stanisçuaski Guterres, Dr. Tiago Collares; Dra. Fabiana Seixas; Dr. Alexandre José Macedo, Dr. Martin Steppe, Dr. João Guilherme de Marchi, Barbara Zoche Pacheco e MS.c. Gabriela Couto pelas importantes colaborações que proporcionaram o desenvolvimento desta tese.

Àos colegas e amigos do Laboratório - K208 do Instituto de Química e Laboratório - 405 da Faculdade de Farmácia por todas as contribuições fundamentais que foram essenciais durante esta trajetória.

RESUMO

Está tese dedicou-se a investigar o uso de larvas de *G. mellonella* como modelo alternativo *in vivo* para avaliar a toxicidade de formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) com diferentes revestimentos de superfície (1); bem como, sintetizar formulações de LNCs contendo ácido fusídico e sua avaliação antimicrobiana *in vitro* (2); e sintetizar LNCs, cuja superfície é revestida com lecitina-quitosana-polissorbato 80, funcionalizada com ácido fólico e cloridrato de doxorrubicina através da formação de um complexo de coordenação com zinco-II, bem como, a sua avaliação biológica em modelos de células cancerígenas (3 e 4). Sendo assim (1), as larvas de *G. mellonella* são uma alternativa viável e promissora para estudos nanotoxicológicos *in vivo*. Os resultados mostraram que as nanocápsulas com núcleo lipídico com superfície neutra (revestida com polissorbato 80 – LNC-1), negativa (revestida com lecitina e polissorbato 80 - LNC-2) ou positiva (revestido com lecitina, quitosana e polissorbato 80 - LNC-3) não demonstraram efeitos de toxicidade aguda no modelo de larvas de *G. mellonella*. Assim, conclui-se que este modelo de invertebrado pode ser um modelo útil para a triagem de toxicidade de nanoformulações. Posteriormente (2), o desenvolvimento de uma nanoformulação contendo o ácido fusídico - um antibiótico esteróide com ação bacteriostática, um ácido carboxílico α , β -insaturado com um grupo acetoxil e dois grupos hidroxil que se ligam ao ribossomo para inibir a síntese proteica; demonstrou-se de que à nanoencapsulação do ácido fusídico modificou o comportamento biológico do fármaco e proporcionou melhor desempenho das formulações quando avaliada a atividade antibacteriana *in vitro* contra as cepas de *S. aureus*, *E. faecalis* e *S. epidermidis*. Além disso, os valores de potencial zeta diminuíram consideravelmente nas formulações quando comparadas às formulações sem a presença de quitosana. Por espectroscopia no infravermelho, observamos que as formulações em contato com bactérias apresentaram um modo de alongamento de C = O, amida I ou modo de alongamento (C = O) do grupo COO- (*S. aureus*); um modo de alongamento do grupo COO- e outro associado a ligações C-O-C-éster (*E. faecalis*); e um modo de alongamento C = O, amida I provavelmente relacionado a grupos carboxílicos (*S. epidermidis*). O estudo atual apoiados por evidências *in vitro* oferecem dados preliminares e um raio de

esperança para o desenvolvimento de uma nanoformulação candidata para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas. Adicionalmente (3), desenvolvemos uma nova estratégia para decorar a superfície das nanocápsulas poliméricas usando reações interfaciais em água. No presente estudo, investigamos o papel da lecitina nas formulações para sintetizar uma nova formulação e avaliar a atividade antitumoral contra culturas celulares de câncer de ovário (OVCAR-3) e bexiga (T24) - os resultados indicaram que a lecitina nas formulações é necessária para executar a funcionalização de superfície apropriada das nanocápsulas de núcleo lipídico. Neste contexto, os ensaios de inibição do crescimento celular revelaram que a formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico dupla-funcionalizada com ácido fólico-doxorrubicina apresentou maior taxa da indução de morte celular nas linhagens de câncer de ovário (OVACAR-3) e bexiga (T24) quando comparada à solução de doxorrubicina. No geral, nossos resultados sugerem que essa nanoformulação inovadora com dupla funcionalização pode ter aplicações promissoras em nanomedicina, considerando a superexpressão de receptores de folato por tumores. E por fim (4), demonstramos também que a coordenação da doxorrubicina, um medicamento amplamente utilizado na quimioterapia do câncer, e o ácido fólico, um ligante direcionado à terapia do câncer, às nanocápsulas de núcleo lipídico para avaliar a eficácia da formulação contra células cancerígenas triplas negativas (MDA-MB-231) que superexpressam os receptores de folato parecem promissoras para o tratamento do câncer de mama. Mais importante, nossos dados demonstraram-se altamente eficazes na inibição do crescimento de tumores de câncer de mama quando comparados à uma solução de doxorrubicina. No entanto, mais estudos são necessários para demonstrar sua eficácia.

Palavras-chave: Nanocápsulas de núcleo lipídico, *Galleria mellonella*, ácido fusídico, doxorrubicina, ácido fólico.

ABSTRACT

This thesis is dedicated to investigating the use of *G. mellonella* larvae as an *in vivo* alternative model to evaluate the toxicity of lipid-core nanocapsule (LNC) formulations with different surface coatings (1); as well as synthesize LNCs formulations containing fusidic acid and its *in vitro* antimicrobial evaluation (2); and synthesize LNCs coated with lecithin-chitosan-polysorbate 80 and functionalized with folic acid and doxorubicin hydrochloride through the formation of a coordination complex with zinc-II, as well as its biological evaluation in cancer cell models (3 and 4). Thus (1), *G. mellonella* larvae are a viable and promising alternative for *in vivo* nanotoxicological studies. The results showed that the nanocapsules with neutral surface (coated with polysorbate 80 - LNC-1), negative (coated with lecithin and polysorbate 80 - LNC-2) or positive (coated with lecithin, chitosan and polysorbate 80 - LNC-3) did not demonstrate effects of acute toxicity in the *G. mellonella* larvae model. In this way, concluded that this invertebrate model can be a useful model for the screening of toxicity of nanoformulations. Subsequently (2), the development of a nanoformulation containing fusidic acid - a steroid antibiotic with bacteriostatic action, an α , β -unsaturated carboxylic acid with an acetoxy group and two hydroxyl groups that bind to the ribosome to inhibit protein synthesis; it was demonstrated that nanoencapsulation of fusidic acid modified the biological behavior of the drug and provided better performance of the formulations when the antibacterial activity was evaluated *in vitro* against the strains of *S. aureus*, *E. faecalis* and *S. epidermidis*. In addition, zeta potential values decreased considerably in formulations when compared to formulations without the presence of chitosan. By infrared spectroscopy, it was observed that the formulations in contact with bacteria showed to the stretching mode of C = O, amide I or stretching mode (C = O) of the COO⁻ group (*S. aureus*); a stretching mode of COO⁻ group and another stretching to C-O-C-ester bonds (*E. faecalis*); and a stretching mode C = O, amide I likely to carboxylic groups (*S. epidermidis*). The present study backed by *in-vitro* evidences offers preliminary data and a ray of hope for the development of a candidate nanoformulation for the treatment of infections caused by Gram-positive bacteria. Additionally (3), we developed a new strategy to decorate the surface of polymeric nanocapsules using interfacial reactions in water. In the present study, we investigated the role of lecithin in

formulations to synthesize a new formulation and evaluate the antitumor activity against cell cultures of ovarian (OVCAR-3) and bladder (T24) cancer - the results indicated that lecithin in the formulations is necessary for perform the proper surface functionalization of the lipid-core nanocapsules. In this context, cell growth inhibition assays revealed that the formulation of double-functionalized lipid-core nanocapsules with folic acid and doxorubicin showed a higher rate of cell death induction in ovarian (OVCAR-3) and bladder (T24) when compared to doxorubicin in solution. In general, our results suggest that this innovative nanoformulation with dual functionalization may have promising applications in nanomedicine considering the overexpression of folate receptors in tumors. And finally (4), we also demonstrated that the coordination of doxorubicin, a drug widely used in cancer chemotherapy, and folic acid, a ligand used to cancer therapy, to polymeric nanocapsules to evaluate the effectiveness of the formulation against cells triple negative carcinogens (MDA-MB-231) that overexpress folate receptors appear promising for the treatment of breast cancer. Most importantly, our data demonstrated that nanoformulation proved to be highly effective in inhibiting the growth of breast cancer tumor when compared to doxorubicin in solution. However, further studies are needed to demonstrate its effectiveness.

Keywords: Lipid core nanocapsules, galleria mellonella, fusidic acid, doxorubicin, folic acid.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura da tese: Capítulo I) Avaliação de toxicidade *in vivo* em modelo de larvas de *Galleria mellonella*; Capítulo II) Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *E. faecalis* e *S. epidermidis*); Capítulo III) Síntese e avaliação da atividade antitumoral *in vitro* contra culturas de câncer de ovário e bexiga e; Capítulo IV) Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* contra cultura celular de câncer de mama com superexpressão de receptores de folato.....33
- Figura 2. Illustrative model of the polysorbate 80-coated lipid-core nanocapsules (A), lecithin-polysorbate 80-coated lipid-core nanocapsules (B) and chitosan-lecithin-polysorbate 80-coated lipid-core nanocapsules (C).....63
- Figura 3. Size distribution curve of the LNC-1, LNC-2 and LNC-3 formulations by NTA technique: Size profile by concentration (particles per mL) (A, C and D) and B) distribution of size by intensity of scattered light (B, E and F).....64
- Figura 4. Transmission electron microscopy analysis: A) photomicrograph of LNC-1 sample (polysorbate 80 coating) (bar = 0.2 μm) and B) a view in 3D of the nanocapsule surface (LNC-1) (bar x= 100 nm); C) photomicrograph of LNC-2 sample (lecithin-polysorbate 80 coating) (bar = 0.5 μm) and D) a view in 3D of the nanocapsule surface (LNC-2) (bar x= 120 nm); and D) photomicrograph of LNC-3 sample (chitosan-lecithin-polysorbate 80 coating) (bar = 0.2 μm) and E) a view in 3D of the nanocapsule surface (LNC-3) (bar x= 70 nm).....65
- Figure 5. Representative graphs of survival percentages of *G. mellonella* larvae in lipid-core nanocapsule formulations: LNC-1 (polysorbate 80 coating); LNC-2 (lecithin-polysorbate 80 coating) and LNC-3 (chitosan-lecithin-polysorbate 80 coating). Note: The concentrations varied from 3.75×10^{-14} to 3.75×10^{-10} mols of LNC per kg of larvae. Values of * P < 0.0001 mean statistical differences.....67
- Figura 6. Graphical Abstract – LNCs and toxicity in *Galleria mellonella* larvae.....68
- Figura 7. Distribution of diameter by volume of the lipid-core nanocapsules formulations (Laser Diffraction technique). Note: LNC-1 (polysorbate 80 coating); LNC-2 (lecithin-polysorbate 80 coating) and LNC-3 (lecithin-chitosan-polysorbate 80 coating).....77
- Figura 8. Distribution of diameter by intensity of the lipid-core nanocapsules formulations (Dynamic light scattering technique). Note: LNC-1 (polysorbate 80 coating); LNC-2 (lecithin-polysorbate 80 coating) and LNC-3 (lecithin-chitosan-polysorbate 80 coating).....77
- Figura 9. Distribution of the ζ -potential of lipid-core nanocapsule formulations. Note: LNC-1 (polysorbate 80 coating); LNC-2 (lecithin-polysorbate 80 coating) and LNC-3 (lecithin-chitosan-polysorbate 80 coating).....79

Figura 10. Test of microbial activity Mueller-Hinton Agar medium: LNC-1, a) before and b) after the use of the sterile filter units; LNC-2, c) before and d) after the use of the sterile filter units and LNC-3, e) before the use of the sterile filter units. Note: LNC-1 (polysorbate 80 coating); LNC-2 (lecithin-polysorbate 80 coating) and LNC-3 (lecithin-chitosan-polysorbate 80 coating).....80

Figura 11. Test of the microbial activity in BHI broth: a) LNC-1; b) LNC-2; c) LNC-3 and d) negative control of microbial growth. Note: LNC-1 (polysorbate 80 coating); LNC-2 (lecithin-polysorbate 80 coating) and LNC-3 (lecithin-chitosan-polysorbate 80 coating).....80

Figura 12. Graphical Abstract – antibacterial activity of the nanoformulations containing fusidic acid.....116

Figura 13. Chemical structure of fusidic acid (FA).....116

Figura 14. Synthesis of nanoformulations after the self-assembling of materials.....117

Figura 15. Size distribution curves by Laser Diffraction (*DL*) (A), Dynamic Light Scattering (*DLS*) (B) and (C) by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Zeta potential profile distribution (D). LNC: lipid-core nanocapsule; LNC-CS: chitosan-coated lipid-core nanocapsule; LNC-FA: fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule; LNC-FA-CS: chitosan-coated fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule.....118

Figura 16. Release profile of fusidic acid as a function of time: FA-Solution (aqueous solution of fusidic acid) and LNC-FA (fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule).....119

Figura 17. Transmission electron microscopy analysis: (A) photomicrograph of LNC-FA (fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule) (bar = 200 nm), (B) 3D of the nanocapsule surface (LNC-FA) (bar $x = 80$ nm) and (C) surface histogram of nanocapsule (distance - pixels = 130 nm); and (D) photomicrograph of LNC-FA-CS (chitosan-coated fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule) (bar = 200 nm), (E) 3D of the nanocapsule surface (LNC-FA-CS) (bar $x = 400$ nm) and (F) surface histogram of nanocapsule (distance - pixels = 560 nm).....120

Figura 18. Heat map showing the antibacterial activity of the nanoformulations against *Staphylococcus aureus* (A), *Enterococcus faecalis* (B) and (C) *Staphylococcus epidermidis* strains. Control positive (medium + bacterial) and control negative (only medium). FA-Solution: aqueous solution of fusidic acid; CS-Solution: aqueous solution of chitosan; LNC: lipid-core nanocapsule; LNC-CS: chitosan-coated lipid-core nanocapsule; LNC-FA: fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule; LNC-FA-CS: chitosan-coated fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule.★ Minimum inhibitory concentration (MIC). Treatment concentrations varied from $1.74 \times 10^{+2}$ to $3.40 \times 10^{-1} \mu\text{mol L}^{-1}$ (Fusidic Acid - FA), 6.67×10^0 to $1.30 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$ (Chitosan - CS), 1.41×10^{-3} to $1.38 \times 10^{-6} \mu\text{mol L}^{-1}$ (Nanocapsules - NC) and, $4.25 \times 10^{+6}$ to $8.30 \times 10^{+3}$ number of nanocapsules

(PND) per colony forming unit (CFU). Note: The orange color indicates inhibitory activity, while the purple/blue colors indicate microbial growth.....121

Figura 19. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) analysis: (A) LNC: lipid-core nanocapsule and LNC-FA: fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule; (B) LNC: lipid-core nanocapsule and LNC-FA: fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule and LNC-FA-CS: chitosan-coated fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule.....134

Figura 20. MIC results from for *Staphylococcus aureus*: FA-Solution: aqueous solution of fusidic acid (A); CS-Solution: aqueous solution of chitosan (B); LNC: lipid-core nanocapsule (C); LNC-CS: chitosan-coated lipid-core nanocapsule (D); LNC-FA: fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule (E) and (F) LNC-FA-CS: chitosan-coated fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule. All control refers to absorbance read at 625 nm before incubation. * Indicate significant differences $p < 0.0370$. ****Indicate significant differences $p < 0.0001$135

Figura 21. MIC results from for *Enterococcus faecalis*: FA-Solution: aqueous solution of fusidic acid (A); CS-Solution: aqueous solution of chitosan (B); LNC: lipid-core nanocapsule (C); LNC-CS: chitosan-coated lipid-core nanocapsule (D); LNC-FA: fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule (E) and (F) LNC-FA-CS: chitosan-coated fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule. All control refers to absorbance read at 625 nm before incubation. * Indicate significant differences $p < 0.0352$. ** Indicate significant differences $p < 0.0059$. ****Indicate significant differences $p < 0.0001$136

Figura 22. MIC results from for *Staphylococcus epidermidis*: FA-Solution: aqueous solution of fusidic acid (A); CS-Solution: aqueous solution of chitosan (B); LNC: lipid-core nanocapsule (C); LNC-CS: chitosan-coated lipid-core nanocapsule (D); LNC-FA: fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule (E) and (F) LNC-FA-CS: chitosan-coated fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule. All control refers to absorbance read at 625 nm before incubation. ** Indicate significant differences $p < 0.0089$. ****Indicate significant differences $p < 0.0001$138

Figura 23. Diameter size (A), PDI (B) and (C) zeta potential profiles of formulations in contact with bacteria. Medium: Mueller Hinton Broth; LNC: lipid-core nanocapsule; LNC-CS: chitosan-coated lipid-core nanocapsule; LNC-FA: fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule and LNC-FA-CS: chitosan-coated fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsule.....139

Figura 24. Infrared spectra of samples before and after contact with *Staphylococcus aureus* on the interval $4000 - 1000 \text{ cm}^{-1}$. (1) Control Negative (Mueller Hinton Broth); (2) Control Positive (Mueller Hinton Broth + bacteria); (3) CS (chitosan) - solution after contact with bacteria; (4) CS (chitosan) - solution before contact with bacteria; (5) FA (fusidic acid) - solution after contact with bacteria; (6) FA (fusidic acid) - solution before contact with bacteria; (7) LNC-FA (fusidic acid-loaded-lipid-core nanocapsules) after contact with bacteria; (8) LNC-FA (fusidic acid-loaded-lipid-core nanocapsules) before contact with bacteria; (9) LNC-FA-CS (chitosan-coated fusidic acid-loaded-lipid-core nanocapsules) after

contact with bacteria and (10) LNC-FA-CS (chitosan-coated fusidic acid-loaded-lipid-core nanocapsules) before contact with bacteria.....140

Figura 25. Infrared spectra of samples before and after contact with *Enterococcus faecalis* on the interval 4000 – 1000 cm⁻¹. (1) Control Negative (Mueller Hinton Broth); (2) Control Positive (Mueller Hinton Broth + bacteria); (3) CS (chitosan) - solution after contact with bacteria; (4) CS (chitosan) - solution before contact with bacteria; (5) FA (fusidic acid) - solution after contact with bacteria; (6) FA (fusidic acid) - solution before contact with bacteria; (7) LNC-FA (fusidic acid-loaded-lipid-core nanocapsules) after contact with bacteria; (8) LNC-FA (fusidic acid-loaded-lipid-core nanocapsules) before contact with bacteria; (9) LNC-FA-CS (chitosan-coated fusidic acid-loaded-lipid-core nanocapsules) after contact with bacteria and (10) LNC-FA-CS (chitosan-coated fusidic acid-loaded-lipid-core nanocapsules) before contact with bacteria.....141

Figura 26. Infrared spectra of samples before and after contact with *Staphylococcus epidermidis* on the interval 4000 – 1000 cm⁻¹. (1) Control Negative (Mueller Hinton Broth); (2) Control Positive (Mueller Hinton Broth + bacteria); (3) CS (chitosan) - solution after contact with bacteria; (4) CS (chitosan) - solution before contact with bacteria; (5) FA (fusidic acid) - solution after contact with bacteria; (6) FA (fusidic acid) - solution before contact with bacteria; (7) LNC-FA (fusidic acid-loaded-lipid-core nanocapsules) after contact with bacteria; (8) LNC-FA (fusidic acid-loaded-lipid-core nanocapsules) before contact with bacteria; (9) LNC-FA-CS (chitosan-coated fusidic acid-loaded-lipid-core nanocapsules) after contact with bacteria and (10) LNC-FA-CS (chitosan-coated fusidic acid-loaded-lipid-core nanocapsules) before contact with bacteria.....142

Figura 27. Synthesis of nanoformulations after the self-assembling of materials: chitosan coating, Zn⁺² coordination and ligand chelate formation.....191

Figura 28. Size distribution curves by Laser Diffraction (DL): (A and B) and by Photon Correlation Spectroscopy (PCS) (C and D). A and C - formulations prepared without lecithin and; B and D - formulations prepared with lecithin. LNC: lipid-core nanocapsule; LNC-CS: chitosan-coated lipid-core nanocapsule; LNC-CS-Zn⁺²-FA: folic acid-Zn⁺²-complex–chitosan-coated lipid-core nanocapsule. The presence of lecithin (Lipoid® S75) in the formulation is indicated using (L).....192

Figura 29. Size distribution curves of three different batches of folic acid-doxorubicin-functionalized-Zn⁺²-complex-chitosan-coated lipid-core nanocapsules (LNC-L-CS-Zn⁺²-DOX-FA) by laser diffraction (A), photon correlation spectroscopy (B); and zeta potential distribution (C).....193

Figura 30. Concentration of doxorubicin as a function of time: Direct dialysis of DOX.HCl and LNC-L-CS-Zn⁺²-DOX-FA.....194

Figura 31. Infrared spectra, first and second derived functions of the DOX.HCl (A) and (B) LNC-L-CS-Zn⁺²-DOX-FA samples on the interval from 1800 cm⁻¹ to 1400 cm⁻¹.....195

Figura 32. Transmission electron microscopy analysis of the folic acid-doxorubicin-Zn²⁺-complex-chitosan-coated lipid-core nanocapsule formulation in bar scale of 200 nm (A) and (B) 100 nm.....196

Figura 33. Treatment with DOX.HCl solution and LNC-^L-CS-Zn²⁺-DOX-FA for 24 and 48 h effect in reducing cell viability. Growth inhibition in OVCAR-3 (A, B and E) and T24 (C, D and F) were measured using MTT assay. Cell lines (OVCAR-3 and T24) were treated in concentrations (1, 1.5, 3.5, 6.5 and 15 μmol L⁻¹ of doxorubicin and 6.99 x 10⁻⁹, 1.05 x 10⁻⁸, 2.45 x 10⁻⁸, 4.54 x 10⁻⁸ and 1.04 x 10⁻⁷ μmol L⁻¹ of nanocapsules per well). To determine the selectivity of the folic acid, was used concentrations ranging from 1.3, 2.0, 4.8, 8.9 and 20 μmol L⁻¹ of folate acid. Data were expressed as mean ± SEM (n = 3). * Indicate significant differences p < 0.05, ** p < 0.003, *** p < 0.0008, **** p < 0.0001. DOX.HCl solution: doxorubicin hydrochloride. FA - Solution: folic acid. LNC-^L-CS-Zn²⁺-DOX-FA: folic acid-doxorubicin-double-functionalized-Zn²⁺-complex-chitosan-coated lipid-core nanocapsules formulation.....197

Figura 34. Confocal microscopy analysis of cellular uptake after 24 h of treatment with fluorescently-labeled nanoformulation. Untreated cells (control) OVCAR-3 (A) and T24 (control) (C). Treatment of cells with nanoformulation (OVCAR-3) (B) and (T24) (D). Representative graphical of the number of particles per cancer cell lines (E). To interpret the color references in this figure legend, DAPI (cell nucleus) – Blue fluorescence; Alexa Fluor® 633 (cytoskeleton) – Green fluorescence and; fluorescently-labeled nanoformulation – Red fluorescence. Data are expressed as means ± SEM from three independent experiments. Significance was considered at p < .05.....198

Figura 35. Graphical Abstract – LNC-^L-CS-Zn²⁺-DOX-FA and growth inhibition in OVCAR-3 and T24 cancer cell lines.....199

Figura 36. Zeta potential distribution of lipid-core nanocapsules (LNC).....209

Figura 37. Zeta potential distribution of chitosan-coated lipid-core nanocapsules (LNC-CS).....209

Figura 38. Zeta potential distribution of folic acid-Zn²⁺-complex–chitosan-coated lipid-core nanocapsules (LNC-CS-Zn²⁺-FA).....209

Figura 39. Zeta potential distribution of lecithin-containing lipid-core nanocapsules (LNC-^L).....210

Figura 40. Zeta potential distribution of chitosan-coated-lecithin-containing lipid-core nanocapsules (LNC-^L-CS).....210

Figura 41. Zeta potential distribution of folic acid-Zn²⁺-complex–chitosan-coated-lecithin-containig lipid-core nanocapsules (LNC-^L-CS-Zn²⁺-FA).210

Figura 42. Infrared spectra of the folic acid (FA), chitosan, lipid-core nanocapsules (LNC), chitosan-coated lipid-core nanocapsules prepared without

lecithin (LNC-CS), chitosan-coated lipid-core nanocapsules prepared with lecithin (LNC-L-CS), folic acid-Zn²⁺-complex-chitosan-coated lipid-core nanocapsules prepared without lecithin (LNC-CS-Zn²⁺-FA), folic acid-Zn²⁺-complex-chitosan-coated lipid-core nanocapsules prepared with lecithin (LNC-L-CS-Zn²⁺-FA) at the range of 4000 – 650 cm⁻¹.....211

Figura 43. Distribution of diameters for the LNC-L-CS-Zn²⁺-DOX-FA formulation by the NTA technique after a formulation dilution at 1:8000 v/v. A) Size profile by concentration (particles/mL) and B) size profile by intensity of the scattered light.....219

Figura 44. Distribution of diameters for the LNC-L-CS-Zn²⁺-DOX-FA formulation by the NTA technique after a formulation dilution at 1:10000 v/v. A) Size profile by concentration (particles/mL) and B) size profile by intensity of the scattered light.....219

Figura 45. Distribution of diameters for the LNC-L-CS-Zn²⁺-DOX-FA formulation by the NTA technique after a formulation dilution at 1:12000 v/v. A) Size profile by concentration (particles/mL) and B) size profile by intensity of the scattered light.....220

Figura 46. Treatment with DOX.HCl and LNC-L-CS-Zn²⁺-DOX-FA for 24 h effect in reducing cell viability. Growth inhibition in MDA-MB-231 and A549 (A and B) and folic acid selectivity (C and D) were measured using MTT assay. MDA-MB-231 and A549 cell lines were treated with different concentrations (1, 1.5, 3.5, 6.5 and 15 µmol L⁻¹) of doxorubicin which is equivalent to 6.99 x 10⁻⁹, 1.05 x 10⁻⁸, 2.45 x 10⁻⁸, 4.54 x 10⁻⁸ and 1.04 x 10⁻⁷ µmol L⁻¹ nanocapsules, respectively. To determine the selectivity of the folic acid, was used concentrations ranging from 1.3, 2.0, 4.8, 8.9 and 20 µmol L⁻¹ of folate acid. Data were expressed as mean ± SEM (n = 3). * Indicate significant differences p < 0.05. DOX.HCl: doxorubicin in solution. FA - folic acid solution. LNC-L-CS-Zn²⁺-DOX-FA: folic acid-doxorubicin-double-functionalized-Zn²⁺-complex-chitosan-coated lipid-core nanocapsules formulation.....248

Figura 47. Gene expression profile in MDA-MB-231 cell line treated with DOX.HCl and LNC-L-CS-Zn²⁺-DOX-FA at concentration of 1.5 µmol L⁻¹ of DOX during 24 h. Different letters indicate significant differences among compounds. Significant differences were considered at p < 0.05. DOX.HCl: doxorubicin in solution. LNC-L-CS-Zn²⁺-DOX-FA: folic acid-doxorubicin-double-functionalized-Zn²⁺-complex-chitosan-coated lipid-core nanocapsules formulation. MnSod: manganese superoxide dismutase; p21: protein p21, also known as cyclin-dependent kinase inhibitor 1; p53: protein 53; Casp9: caspase 9; Casp3: caspase 3; Casp8: caspase 8; Cat: catalase; Bax: apoptosis regulator Bax; Bcl2: B-cell lymphoma 2; iNOS: nitric oxide synthase; Trail: TNF-related apoptosis-inducing ligand; GAPDH: Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. GAPDH was used to normalize levels of gene expression.....249

Figura 48. Photographs (A) and (B) representative graphical of inhibition of cell migration in MDA-MB-231 line treated with control (cell + medium) and LNC-L-CS-Zn²⁺-DOX-FA at IC50 concentration during 24 h. Migration assay was

conducted until 9 h of experiment. *Indicate significant differences $p < 0.05$. **Indicate significant differences $p < 0.0052$. LNC-L-CS-Zn⁺²-DOX-FA: folic acid-doxorubicin-double-functionalized-Zn⁺²-complex-chitosan-coated lipid-core nanocapsules formulation.....251

Figura 49. Nitric oxide in MDA-MB-231 cell line treated with control, DOX.HCl and LNC-L-CS-Zn⁺²-DOX-FA at IC50 concentration during 24 h. ***Indicate significant differences $p < 0.0006$. DOX.HCl: doxorubicin in solution. LNC-L-CS-Zn⁺²-DOX-FA: folic acid-doxorubicin-double-functionalized-Zn⁺²-complex-chitosan-coated lipid-core nanocapsules formulation.....252

Figura 50. Confocal microscopy analysis of cellular uptake after 24 h of treatment in MDA-MB-231. Untreated cell (control A), treatment with fluorescently-labeled nanoformulation (B and C) and representative graphical of the number of particles in contact and/or internalized in cell line (D). To interpret the color references in this figure legend, DAPI (cell nucleus) – Blue fluorescence; Alexa Fluor® 633 (cytoskeleton) – Green fluorescence and; fluorescently-labeled nanoformulation – Red fluorescence.....253

Figura 51. Graphical abstract – LNC-L-CS-Zn⁺²-DOX-FA and growth inhibition in MDA-MB-231.....254

Figura 52. Size distribution curves by Laser Diffraction (DL) (A); dynamic light scattering (DLS) (B) and nanoparticle tracking analysis (NTA) (C). Zeta potential distribution (ZP) (D) and transmission electron microscopy analysis (TEM) (E, bar = 500 nm; and F, bar = 200 nm). Note: The results in A-D are expressed as the mean and standard deviation of triplicate batches (n=3). LNC-L-CS-Zn⁺²-DOX-FA: folic acid-doxorubicin-functionalized-Zn⁺²-complex-chitosan-coated lipid-core nanocapsules.....262

Figura 53. Nanoparticle tracking analysis (NTA): LNC-L-CS and LNC-L-CS-Zn⁺²-DOX-FA formulations superimposed (intensity of scattered light vs. diameter).....263

Figura 54. LNC-L-CS-Zn⁺²-DOX-FA inhibited the MDA-MB-213 cells colony formation. Cells were treated with DOX.HCl and LNC-L-CS-Zn⁺²-DOX-FA for 15 days. Photographs of representative of the clonogenic assay plates. Controls (Medium – DMEM) (A and B); DOX.HCl (C) and LNC-L-CS-Zn⁺²-DOX-FA (D) represented treatment with components.....264

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulations containing different compositions of oil, polymer, surfactant, drug (or not) and toxicological results.....	69
Tabela 2. Nanoparticle Tracking Analysis: mean diameter, mode and diameters at percentiles 10 (D10), 50 (D50) and 90 (D90) under the size distribution curve.....	71
Tabela 3. <i>PND</i> (particle number density), concentrations of nanocapsule mol L ⁻¹ , administered volume per larvae, average weight of larvae per group, administered dose per kg of larvae.....	76
Tabela 4. Mean diameter D _[4,3] and specific surface area (SSA) by volume and number; mean diameter calculated by the Cumulant method (d _z) (z-average diameter) and by CONTIN algorithm (d _h); full width at half maximum of the diameter distribution curve (FWHM) and the polydispersity index (PDI) of the lipid-core nanocapsule formulations.....	78
Tabela 5. ζ - potential and pH measurements of the lipid-core nanocapsule formulations.....	79
Tabela 6. D _[4,3] : Volume-weighted mean diameter; SPAN: polydispersity; D _z : z-average hydrodynamic diameter; PDI: polydispersity index; D _h : Hydrodynamic mean diameter; PND: particle number density; Zeta potential; pH values; Drug content: total concentration of the drug in the formulation and EE%: encapsulation efficiency of the drug in the particles.....	123
Tabela 7. Observed rate constant <i>k</i> , α , β ; correlation coefficients (<i>r</i>), <i>MSC</i> and half-lives $t_{\frac{1}{2}}$ obtained by fitting fusidic acid release profiles to the zero-order, monoexponential and biexponential equations.....	125
Tabela 8. Analysis of particle diameter and zeta potential interaction with bacteria.....	126
Tabela 9. Infrared Assignment of the Several Samples Analyzed.....	128
Tabela 10. Analytical results obtained from linearity, precision and accuracy of the HPLC method validated for determination of fusidic acid in the formulations.....	132
Tabela 11. Concentrations of fusidic acid (FA) and/or chitosan (CS) in mg mL ⁻¹ , $\mu\text{g mL}^{-1}$ and $\mu\text{mol L}^{-1}$. <i>PND</i> (particle number density), concentrations of nanocapsule in $\mu\text{mol L}^{-1}$, and number of nanocapsules (<i>PND</i>) per colony forming unit (<i>CFU</i>).....	133
Tabela 12. Infrared assignment of the samples before and after contact with <i>Staphylococcus aureus</i>	143

Tabela 13. Infrared assignment of the samples before and after contact with <i>Enterococcus faecalis</i>	146
Tabela 14. Infrared assignment of the samples before and after contact with <i>Staphylococcus epidermidis</i>	149
Tabela 15. Laser Diffraction: volume-weighted mean diameter ($D_{[4,3]}$), diameters at percentiles 10, 50 and 90 under the size distribution curves ($d_{(0.1)}$, $d_{(0.5)}$ and $d_{(0.9)}$, and polydispersity (SPAN).....	200
Tabela 16. Photon Correlation Spectroscopy: z-average diameter (d_z) and polydispersion index (PDI).....	201
Tabela 17. Potentiometry (pH and Potential), zeta potential and conductivity values.....	202
Tabela 18. Skewness and Kurtosis analysis of the size distribution curves (laser diffraction, <i>LD</i> ; and photon correlation spectroscopy, <i>PCS</i>).....	203
Tabela 19. Observed rate constant k , α , β ; correlation coefficients (r), <i>MSC</i> and half-lives $t_{\frac{1}{2}}$ obtained by fitting doxorubicin release profiles to the zero-order, monoexponential and biexponential equations.....	204
Tabela 20. Complexation of folic acid (%) on the surface of the nanocapsules determined by two different techniques (liquid chromatography, HPLC; spectroscopy, colorimetric method).....	211
Tabela 21. Wavenumber shifts observed on infrared spectra for the nanocapsules.....	213
Tabela 23. Nanoparticle tracking analysis of the LNC- <i>L</i> -CS-Zn ⁺² -DOX-FA formulation as a function of the dilution.....	218
Tabela 24. Primers' sequences.....	255

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	29
OBJETIVOS	35
OBJETIVO GERAL.....	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
CAPÍTULO I	39
O manuscrito original foi intitulado “Galleria mellonella Larvae as an <i>In Vivo</i> Model to Evaluate the Toxicity of Polymeric Nanocapsules”.....	43
CAPÍTULO II	81
O manuscrito original foi intitulado “Antibacterial Activity against Gram-Positive Bacteria using Fusidic Acid-Loaded Lipid-Core Nanocapsules”.....	85
CAPÍTULO III	153
O manuscrito original foi intitulado “Folic acid-doxorubicin-double-functionalized-lipid-core nanocapsules: Synthesis, Chemical Structure Elucidation and Cytotoxicity Evaluation on Ovarian (OVCAR-3) and Bladder (T24) cancer cell lines”.....	157
CAPÍTULO IV	223
O manuscrito original foi intitulado “Folic acid-doxorubicin polymeric nanocapsules: a promising formulation for the treatment of triple negative breast cancer”.....	227
DISCUSSÃO	267
CONCLUSÃO	289
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	295

A nanotecnologia é um campo da ciência que estuda a manipulação da matéria em escala molecular e atômica (BRAKMANE, WINSLET, SEIFALIAN, 2012). O prefixo "nano" da palavra nanotecnologia significa um bilionésimo (1×10^{-9} nm) e é derivado da palavra grega "nanos" que denota o significado de extremamente pequeno ou anão (KAUR, SINGH, KUMAR, 2012; MATHEW, JOY, GEORGE, 2018). A nanotecnologia é considerada uma estratégia alternativa promissora para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos a fim de promover uma melhor entrega dos fármacos em locais específicos (MUDSHINGE *et al.*, 2011; MATHEW, JOY, GEORGE, 2018).

Dentre os diversos nanocarreadores propostos, as nanopartículas poliméricas têm sido amplamente usadas devido à sua capacidade de promover uma liberação controlada e aumentar a eficácia para a entrega de fármacos, proteínas, peptídeos e genes até o sítio específico (MIKI *et al.*, 2010; MATHEW, JOY, GEORGE, 2018). Nas nanopartículas poliméricas, os fármacos podem estar dispersos na matriz polimérica (nanoesferas) ou confinado em um núcleo polimérico (nanocápsulas) (NIKAM, RATNAPARKHIAND, CHAUDHARI, 2014; RIZVI, SALEH, 2018). Neste sentido, o desenvolvimento de um tipo específico de nanocápsulas poliméricas compostas por triglicerídeos de cadeia média, monoestearato de sorbitano, poli(ϵ -caprolactona) e polissorbatato 80 foi proposto pelo nosso grupo de pesquisa em 2001 (GUTERRES *et al.*, 2001), sendo nomeada como nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) em 2009 (JAGER *et al.*, 2009).

Neste contexto, o modelo de larvas de *Galleria mellonella* têm sido propostos para a avaliação dos efeitos de toxicidade de patógenos; no entanto, ainda existem poucos estudos para nanomateriais, o que torna esse modelo interessante para avaliar a toxicidade de nanopartículas poliméricas revestidas com diversos materiais. O modelo de *G. mellonella* possui diversas vantagens como: as larvas pesam cerca de 250 mg, a sua criação tem um baixo custo, podem ser criadas em temperaturas entre 20 °C e 30 °C e para infecção larval estudos; e os testes podem ser realizados a temperaturas entre 15 °C e 37 °C (REJASSE *et al.*, 2012; JONES *et al.*, 2010). Além disso, é possível determinar e monitorar a virulência bacteriana após sua infecção e também estabelecer a porcentagem de sobrevivência bacteriana (RAMARAO, NIELSEN-LEROUX, LERECLUS, 2012; GUILLEMET *et al.*, 2010).

Adicionalmente, o uso de antibióticos que se ligam ao ribossomo para inibir a síntese de proteínas, tais como o ácido fusídico, têm sido uma excelente opção para o tratamento de infecções bacterianas (FERNANDES 2016; BORG *et al.*, 2015). O ácido fusídico possui um ácido carboxílico α , β -insaturado ($C_{31}H_{48}O_6$) com um grupo acetoxila e dois grupos hidroxila (CURBETE e SALGADO 2016). O ácido fusídico pode ser usado em diversas formulações para uso oral, intravenoso e tópico (TURNIDGE 1999), sendo um agente de escolha indicado para o tratamento de estafilococos (FERNANDES 2016; CURBETE e SALGADO 2016). Considerando que as nanopartículas poliméricas exibem excelente atividade bactericida/bacteriostática em respaldo ao aumento da relação área-volume da superfície das partículas (ENGLER *et al.*, 2012; KAR *et al.*, 2010); o ácido fusídico se torna um potencial candidato para ser encapsulado e direcionado para inibir o crescimento de diversos patógenos.

Nas últimas décadas, o uso de nanopartículas funcionalizadas tem sido objeto de estudos para diversas aplicações biomédicas (SUBBIAH, VEERAPANDIAN, YUN, 2010; ELLAH, ABOUELMAGD, 2017). Através da funcionalização de superfície é possível controlar de forma previsível o direcionamento das nanopartículas para locais específicos (NEOUZE, SCHUBERT, 2008; ELLAH, ABOUELMAGD, 2017; VAHED *et al.*, 2018). Nesse sentido, o ácido fólico têm sido um ligante de escolha para estudos de direcionamento, pois possui alta estabilidade durante todo o seu transporte, baixo custo e, além disso, pode ser conjugado em nanocarreadores (SCARANO *et al.*, 2013). Diversas linhagens de células cancerosas, tais como de rim, pulmão, mama, cólon e ovário possuem superexpressão de receptores de folato (CHENG *et al.*, 2013), tornando o ácido fólico um atrativo ligante para a superfície de nanocarreadores. Neste contexto, a doxorrubicina é um fármaco amplamente utilizado na quimioterapia do câncer e pertence à família das antraciclinas (THORN *et al.*, 2011). Sua atuação, eliminando células que estão em divisão celular, retarda a propagação da doença, fazendo com que o potencial da doxorrubicina para o tratamento do câncer seja um dos mais potentes. Além disso, a doxorrubicina é um fármaco aprovado para o tratamento do câncer pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (CARVALHO *et al.*, 2009).

Sendo assim, a hipótese levantada nesta tese foi desenvolver, testar a segurança e a versatilidade dos nanocarreadores poliméricos.

A estrutura desta tese está ilustrada no organograma abaixo (Fig. 1).

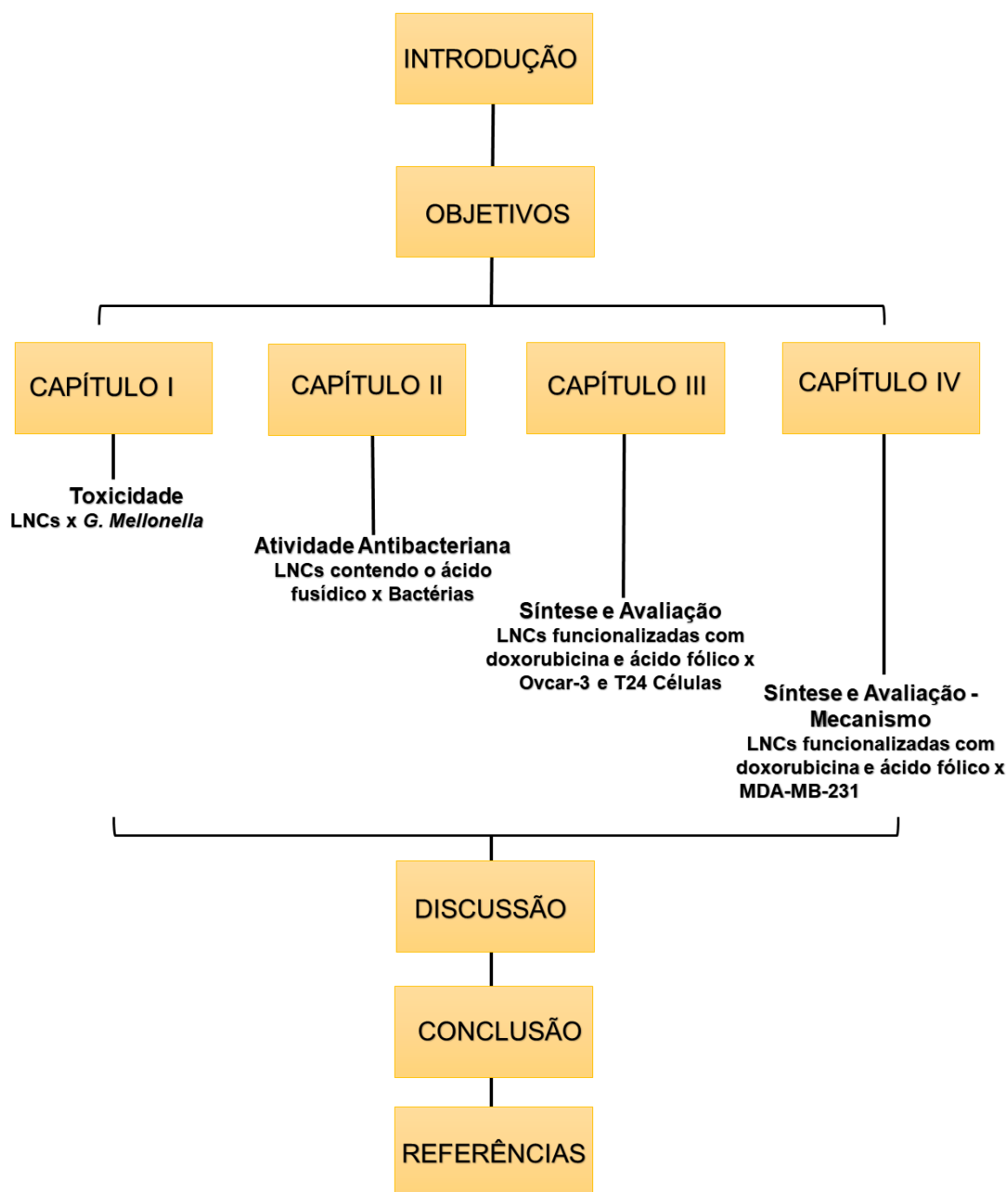


Fig. 1. Estrutura da tese: Capítulo I) Avaliação de toxicidade *in vivo* em modelo de larvas de *Galleria mellonella*; Capítulo II) Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *E. faecalis* e *S. epidermidis*); Capítulo III) Síntese e avaliação da atividade antitumoral *in vitro* contra culturas de câncer de ovário e bexiga e; Capítulo IV) Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* contra cultura celular de câncer de mama com superexpressão de receptores de folato.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a segurança e a versatilidade das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNCs) funcionalizadas com polissorbato 80, ou com lecitina-polissorbato 80, ou com lecitina-quitosana-polissorbato 80 - contendo ou não ácido fusídico - assim como, funcionalizadas com lecitina-quitosana-polissorbato 80 e com cloridrato de doxorrubicina e ácido fólico através da formação de um complexo de coordenação com zinco-II.

Em respaldo disso, usamos o modelo de larvas de *Galleria mellonella* como um novo modelo alternativo *in vivo* para determinar a toxicidade das nanocápsulas de núcleo lipídico com diferentes revestimentos. Bem como, a nanoencapsulação do ácido fusídico foi proposta como uma plataforma versátil para vetorização passiva contra bactérias Gram-positivas. Adicionalmente, em virtude da versatilidade das nanocápsulas de núcleo lipídico para fornecer uma complexação organometálica, propusemos uma dupla funcionalização de superfície com doxorrubicina e ácido fólico para vetorização-passiva-ativa e sua avaliação antitumoral contra cultura de células de câncer de ovário e bexiga. Complementarmente, procuramos entender o mecanismo de ação das nanocápsulas de núcleo lipídico com dupla funcionalização de superfície com doxorrubicina e ácido fólico (vetorização-passiva-ativa) em uma linhagem de câncer de mama triplo negativo com superexpressão de receptores de folato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO I:

O objetivo foi propor o uso de larvas de *G. mellonella* como modelo *in vivo* para avaliar a toxicidade de formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) com diferentes revestimentos de superfície. As formulações de LNC (sem fármacos) foram revestidas com polissorbato 80 (LNC-1), lecitina e polissorbato 80 (LNC-2) ou lecitina, quitosana e polissorbato 80 (LNC-3).

CAPÍTULO II:

O objetivo foi desenvolver uma formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) contendo o ácido fusídico e sua avaliação antibacteriana *in vitro* contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus epidermidis*. Adicionalmente, propusemos também avaliar, assim como os espectros FTIR-ATR, o diâmetro das partículas e o potencial zeta na interação nanocápsulas e bactérias.

CAPÍTULO III:

O objetivo foi investigar o papel da lecitina nas formulações para sintetizar uma nova formulação: nanocápsulas de núcleo lipídico duplamente-funcionalizada com ácido fólico-doxorrubicina (LNC-CS-*L*-Zn⁺²-DOX-FA), bem como avaliar a atividade antitumoral contra culturas celulares de câncer de ovário (OVCAR-3) e bexiga (T24).

CAPÍTULO IV:

O objetivo foi coordenar, na superfície das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), a doxorrubicina (DOX), um fármaco amplamente utilizado na quimioterapia do câncer, e o ácido fólico (FA), um ligante direcionador a células que superexpressam receptores de folato, para avaliar a eficácia da formulação (LNC-*L*-CS-Zn⁺²-DOX-FA) contra células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231).

O capítulo I desta tese foi submetido, aceito e publicado no “*Journal of Nanoscience and Nanotechnology*”. O manuscrito original foi intitulado “*Galleria mellonella* Larvae as an *In Vivo* Model to Evaluate the Toxicity of Polymeric Nanocapsules”.

CÉ, RODRIGO; SILVA, RODRIGO CAMPOS; TRENTIN, DANIELLE SILVA; MARCHI, JOÃO GUILHERME BARRETO DE; PAESE, KARINA; GUTERRES, SILVIA STANISÇUASKI; MACEDO, ALEXANDRE JOSÉ; POHLMANN, ADRIANA RAFFIN. *Galleria mellonella* Larvae as an *In Vivo* Model to Evaluate the Toxicity of Polymeric Nanocapsules. JOURNAL OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY, v. 20, p. 1486-1494, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1166/jnn.2020.17170>.

O Capítulo 1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência acima, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 43 – 80.

O capítulo II desta tese será submetido para publicação no “*International Journal of Pharmaceutics*”. O manuscrito original foi intitulado “Antibacterial Activity against Gram-Positive Bacteria using Fusidic Acid-Loaded Lipid-Core Nanocapsules”.

Rodrigo Cé, Barbara Zoche Pacheco, Taiane Medeiro Ciocheta, Fabio de Souza Barbosa, Aline de Cristo Alves, Danieli Rosane Dallemole, Vladimir Lavayen, Silvia Stanisçuaski Guterres, Martin Steppe, Adriana Raffin Pohlmann

O texto completo da parte que integra o capítulo 2 desta tese defendida que ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 85 – 151 foi suprimido por se tratar de objeto de publicação em periódico científico indexado que exige transferência de direito de cópia.

O capítulo III desta tese foi submetido para publicação no “*Pharmaceutical Research*”. O manuscrito original foi intitulado “*Folic acid-doxorubicin-double-functionalized-lipid-core nanocapsules: Synthesis, Chemical Structure Elucidation and Cytotoxicity Evaluation on Ovarian (OVCAR-3) and Bladder (T24) cancer cell lines*”.

Rodrigo Cé, Vladimir Lavayen, Gabriela Klein Couto, João Guilherme Barreto De Marchi, Barbara Zoche Pacheco, Letícia Antunes Natividade, Tiago Ost Fracari, Taiane Medeiro Ciocheta, Aline de Cristo Soares Alves, Denise Soledade Jornada, Silvia Stanisçuaski Guterres, Fabiana Seixas, Tiago Collares, Adriana Raffin Pohlmann.

O texto completo da parte que integra o capítulo 3 desta tese defendida que ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 157 – 222 foi suprimido por se tratar de objeto de publicação em periódico científico indexado que exige transferência de direito de cópia.

O capítulo IV desta tese será submetido para publicação no “*International Journal of Pharmaceutics*”. O manuscrito original foi intitulado “ Folic acid-doxorubicin polymeric nanocapsules: a promising formulation for the treatment of triple negative breast cancer”.

Rodrigo Cé, Gabriela Klein Couto, Barbara Zoche Pacheco, Danieli Rosane Dallemole, Júlia Damé Paschoal, Bruna Silveira Pacheco, Silvia Stanisquaski Guterres, Fabiana Seixas, Tiago Collares and Adriana Raffin Pohlmann

O texto completo da parte que integra o capítulo 4 desta tese defendida que ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 227 – 265 foi suprimido por se tratar de objeto de publicação em periódico científico indexado que exige transferência de direito de cópia.

O texto completo da parte que integra da discussão desta tese defendida que ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 269 – 287 foi suprimido por se tratar de objeto de publicação em periódico científico indexado que exige transferência de direito de cópia.

CONCLUSÃO

O texto completo da parte que integra a conclusão desta tese defendida que ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 291 – 294 foi suprimido por se tratar de objeto de publicação em periódico científico indexado que exige transferência de direito de cópia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

O texto completo da parte que integra as referências bibliográficas desta tese defendida que ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 297 – 312 foi suprimido por se tratar de objeto de publicação em periódico científico indexado que exige transferência de direito de cópia.

