



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RAFAELLA MORENO BARROS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS FUNCIONALIZADOS COM ÁCIDO FÓLICO PARA
VEICULAÇÃO DE DOXORRUBICINA NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE
MAMA**

CAMPINA GRANDE-PB
2021

RAFAELLA MORENO BARROS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS FUNCIONALIZADOS COM ÁCIDO FÓLICO PARA
VEICULAÇÃO DE DOXORRUBICINA NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE
MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito para obtenção do título de Mestre

Orientador:
Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior

CAMPINA GRANDE-PB

2021

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

B277a Barros, Rafaella Moreno.

Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico para veiculação de doxorubicina no tratamento do câncer de mama [manuscrito] / Rafaella Moreno Barros. - 2021.

62 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.

"Orientação : Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior, Departamento de Farmácia - CCBS."

1. Nanotecnologia. 2. Sistemas de liberação de fármacos.
3. Neoplasia maligna. 4. Câncer de mama. I. Título

21. ed. CDD 615.58

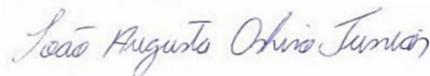
RAFAELLA MORENO BARROS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS FUNCIONALIZADOS COM ÁCIDO FÓLICO PARA
VEICULAÇÃO DE DOXORRUBICINA NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE
MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: 26 / 02 /2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Juliana de Souza Alencar Falcão
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

AGRADECIMENTOS

A Deus “a inteligência suprema, causa primária de todas as coisas”. Ele me ampara, me conforta, me fortalece e me abençoa com saúde e sabedoria para eu lutar pelos meus sonhos. Seu amor é incondicional e sempre honrarei Teu nome.

À minha mãe Socorro Moreno e minha irmã Fabyola Moreno, duas mulheres que são meus exemplos de força e superação. Grata por todo amor e por terem me guiado pelos caminhos da educação e do bem.

Ao meu amigo e irmão de alma, Leandro Silva por todo apoio e conselhos. Você me ensinou o significado da palavra amizade. Nosso amor já vem de outras vidas.

Ao meu orientador e amigo, prof. Dr. João Augusto Oshiro Jr por sempre está presente, por acreditar em mim. Meu “Pai Científico” que me acolheu, orientou, corrigiu e me ajudou a vencer as dificuldades. Um exemplo de profissional e pesquisador que irei me espelhar e seguir.

À mestrandia Kammila Martins, pela ajuda no desenvolvimento dessa pesquisa e construção do trabalho e ao aluno de IC Diego Paulo, por todo auxílio durante os experimentos.

Ao PPGCF da UEPB e a todo o corpo docente, pela acolhida, transmissão de conhecimentos e suporte durante esse mestrado.

A todos que fazem parte do Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDPF), em especial ao prof. Dr. Bolívar P. G. de L. Damasceno.

À turma do mestrado 2019 do PPGCF, em especial, aos amigos Demis Melo e Karen Loraine, os quais dividiram comigo a rotina no LDCPF e nunca negaram ajuda quando precisei.

Ao projeto de extensão “Somos Todos Cientistas” e ao grupo de pesquisa I-Nano.

Ao prof. e amigo Dr. Ricardo Olímpio de Moura, pelo espaço para realizar o estágio de docência e por todos os conselhos e orientações.

Ao secretário do PPGCF e amigo Thiago Araújo, pela atenção quanto solicitei e pela companhia nos intervalos repletos de boas conversas e muito café.

A toda equipe que faz a limpeza e manutenção dos laboratórios da UEPB, que deixavam o ambiente agradável para que pudéssemos passar o dia e realizar nossas pesquisas.

Aos professores Dra Juliana de Souza Alencar Falcão, Dr. Elquio Eleamen Oliveira e Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano por terem aceitado colaborar com essa etapa especial da minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento financeiro concedido para a realização dessa pesquisa.

RESUMO

O câncer de mama (CM) é o segundo tipo mais comum de câncer diagnosticado entre mulheres. Dentre os fatores de risco encontra-se idade, fatores genéticos, exposições a raios X e reposições hormonais. O tratamento está diretamente relacionado com o estágio em que a doença se encontra e a descoberta precoce possibilita maior chance de cura. A doxorubicina (DOX), antibiótico da classe das antraciclinas, é comumente utilizado no tratamento, porém apresenta um curto período de meia vida, baixo grau de estabilidade e é um composto inespecífico levando a efeitos colaterais como dores, náuseas e vômitos, diarreia, além de apresentar cardiotoxicidade. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) apresentam matrizes de organização imperfeita, compostas por um agente surfactante que possibilita a incorporação de altas concentrações de substâncias quimioterápicas, além de possuir uptake celular elevado devido suas características. Ademais, uma estratégia para aprimorar o direcionamento do CLN para as células do CM é a sua funcionalização com ácido fólico, pois os receptores de folato estão cerca de 60% nos tumores de mama. Neste contexto, o objetivo do trabalho consiste no desenvolvimento e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico contendo doxorubicina para aplicação no câncer de mama. Os CLN foram obtidos pela técnica de fusão-emulsificação, utilizando um polímero modificado (pluronic-ácido fólico) sintetizado e caracterizado por Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Ademais, CLN com e sem o brometo de cetrimônio foram desenvolvidos para verificar a influência da carga catiônica ou aniônica. Os CLN desenvolvidos foram caracterizados pela técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS), microscopia eletrônica de varredura (MEV), eficiência de encapsulação (EE), liberação *in vitro* e citotoxicidade celular *in vitro*. A técnica de FTIR revelou que a síntese do polímero funcionalizado foi realizada adequadamente por meio do grupamento característico éster em 1703 cm^{-1} . Macroscopicamente, os CLN apresentaram-se homogêneos e estáveis por mais de 180 dias. O DLS mostrou que os CLNs possuíam tamanhos entre 124 e 180 nm, adequado para o sistema desenvolvido; ademais, possuíam índice de polidispersividade $< 0,3$, indicando baixa polidispersão. O potencial zeta revelou valores entre 22 e 13,2 para os CLN+ e -12,2 e -17 para os CLN-. Através da MEV, foi observado morfologia esférica e ausência de aglomerados com tamanho que corroboram com os achados no DLS. A EE foi de 79% e 102% para os CLN+ e CLN-, respectivamente. O perfil de liberação revelou que 100% foi liberado após 10h para a DOX-CLN, enquanto que, a DOX comercial foi de ≤ 30 min. A viabilidade celular foi testada em modelo MCF-7 e demonstra que os CLN- apresentaram maior citotoxicidade (87%) em

relação a DOX comercial (54%) sendo que, ambos possuíam a mesma concentração (46 μM), provavelmente, devido ao maior uptake celular que, é comprovado para quaisquer ativos incorporados em nanosistemas. O CLN+ com ou sem a DOX apresentou citotoxicidade maior (~90%), fato associado as altas concentrações do brometo de cetrimônio (1150 μM). Diante disso, é possível concluir que os sistemas desenvolvidos possuem características que os apontam como potenciais candidatos a estudos pré-clínicos *in vivo* visando elucidar toxicidade e atividade antitumoral.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Sistemas de liberação de fármacos. Neoplasia maligna de mama.

ABSTRACT

Breast cancer (CM) is the second most common type of cancer diagnosed among women. Among the risk factors are age, genetic factors, exposure to X-rays and hormonal replacements. Treatment is directly related to the stage the disease is in, and early discovery provides a greater chance of cure. Doxorubicin (DOX), an anthracycline class antibiotic, is commonly used in treatment, but has a short half-life, low degree of stability and is a non-specific compound leading to side effects such as pain, nausea and vomiting, diarrhea, in addition to cardiotoxicity. Nanostructured lipid carriers (CLN) present imperfectly organized matrices, composed of a surfactant that allows the incorporation of high concentrations of chemotherapeutic substances, in addition to having high cellular uptake due to its characteristics. In addition, a strategy to improve the targeting of the CLN to the CM cells is its functionalization with folic acid, since folate receptors are around 60% in breast tumors. In this context, the objective of the work consists in the development and characterization of nanostructured lipid carriers functionalized with folic acid containing doxorubicin for application in breast cancer. The CLN were obtained by the fusion-emulsification technique, using a modified polymer (pluronic-folic acid) synthesized and characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Furthermore, CLN with and without cetrimony bromide were developed to verify the influence of cationic or anionic charge. The developed CLNs were characterized by the technique of dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM), encapsulation efficiency (EE), *in vitro* release and *in vitro* cell cytotoxicity. The FTIR technique revealed that the synthesis of the functionalized polymer was carried out properly by means of the characteristic ester group in 1703 cm⁻¹. Macroscopically, the CLNs were homogeneous and stable for more than 180 days. The DLS showed CLNs with size between 124 and 180 nm and polydispersity <0.3. The zeta potential between 22 and 13.2 for CLN + and -12.2 and -17 for CLN-. Through SEM, spherical morphology and absence of clusters were observed. The EE was 79% and 102% for the CLN + and CLN- tested, respectively. The release profile reached ~ 100% after the 10h time and the commercial DOX released 100% in 30 min. Cell viability was tested in an MCF-7 model and demonstrates that CLN- showed greater cytotoxicity (87%) compared to commercial DOX (54%), both of which had the same concentration (46 µM), probably due to the higher cellular uptake that, is proven for any assets incorporated in nanosystems. CLN + with or without DOX showed greater cytotoxicity (~ 90%), a fact associated with high concentrations of cetrimony bromide (1150 µM). Therefore, it is possible to conclude that the developed systems have

characteristics that point them as potential candidates for pre-clinical studies *in vivo* aiming at elucidating toxicity and antitumor activity.

Keywords: Nanotechnology. Drug delivery systems. Malignant breast cancer.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido Fólico
ATV	Association of Trypsin e Versene
λ EM	Emissão
λ EX	Excitação
BC	Brometo de cetrimônio
CLN	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
CM	Câncer de mama
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMSO	Dimetil-sufóxido
d.nm	Distribuição média de tamanho
DOX	Doxorrubicina
EE	Eficiência do encapsulamento
ER	Receptor de Estrogênio
FR α	Receptor Alfa de Folato
HAP	Homogeneização de alta pressão
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
HER2 +	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 positivo
HR +	Receptor hormonal positivo
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IPD	Índice de polidispersão
KBr	Brometo de potássio
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução
mL	Mililitro
MT	Massa de DOX usada na formulação
MTT	(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio
M1	Massa de DOX em CLN
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
nm	Nanômetro
NMs	Nanomateriais
NPs	Nanopartículas
N ₂	Nitrogênio
μ L	Microlitros
μ m	Micrometro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PF-127	Pluronic F127 [®]
pH	Potencial hidrogeniônico
PR	Receptor de Progesterona
PZ	Potencial zeta
rpm/s	Rotação por minuto por segundo
SNs	Sistemas nanoestruturados
TA	Tecido Adiposo
TN	Triplo-negativo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia da mama feminina.	16
Figura 2 – Estrutura química da doxorubicina.	21
Figura 3 – Cronologia do desenvolvimento tecnológico de SNs utilizados na área farmacêutica.	24
Figura 4 – Diferenças estruturais e características das NLS e CLN.....	25
Figura 5 – Nanocarreadores de primeira e segunda geração.	26
Figura 6 – Composição, tipos e algumas vias de aplicação de CLNs para tratar diversas situações clínicas.....	29
Figura 7 – Espectros de FTIR do Ácido fólico (AF), Pluronic F127 (PF-127) e da mistura de ácido fólico e Pluronic® F127 (PF127-AF).....	39
Figura 8 – Imagem macroscópica do CLN+, CLN+DOX, CLN+AF, CLN+AF+DOX.	40
Figura 9 – Resultados do diâmetro médio (barra cinza), do índice de polidispersão (linha contínua com ponto) e do potencial zeta (barra vermelha) dos CLN+, CLN+DOX, CLN+AF, e CLN+AF+DOX, determinados durante 90 dias de estocagem.....	42
Figura 10 – Resultados do diâmetro médio (barra cinza), do índice de polidispersão (linha contínua com ponto) e do potencial zeta (barra vermelha) dos CLN-, CLN-DOX, CLN- AF, e CLN-AF-DOX, determinados durante 90 dias de estocagem.....	44
Figura 11 – Fotomicrografias de CLN (A), CLN+AF (B) e CLN+AF+DOX (C) verificados por MEV-FEG. Aumento 50,000 x.	45
Figura 12 – Curva analítica da DOX utilizando concentração entre 0,05 até 0,5 µg/mL.	46
Figura 13 – Gráfico de resíduo em relação ao cloridrato de doxorubicina em diferentes concentrações (µg/mL).	47
Figura 14- Distribuição espacial da DOX nos CLN- e CLN+.	48
Figura 15 – Ensaio de liberação <i>in vitro</i> da DOX e dos CLN+DOX e CLN-DOX.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos subtipos clínicos de acordo com a presença (+) ou ausência (-) dos receptores ER, PR, e a expressão e amplificação (*) do HER2.	17
Tabela 2 – Vantagens e desvantagens dos CLN.	28
Tabela 3 – Identificação, composição e concentração dos diferentes CLNs obtidos.	35
Tabela 4 – Tabela quantitativa da média da viabilidade celular testada em modelo MCF-7 e as comparações de amostras múltiplas pelo método de Tukey para as diferentes concentrações de CLN+, CLN+DOX, CLN+AF, CLN+AF+DOX, CLN-, CLN-DOX, CLN-AF, CLN-AF-DOX e DOX controle positivo.	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 Câncer de mama	15
2.2 Doxorrubicina	20
2.3 Sistemas nanoestruturados	23
2.3.1 <i>Carreadores lipídicos nanoestruturados</i>	26
2.3.2 <i>Carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados</i>	31
3 OBJETIVO	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 Funcionalização do polímero sintético pluronic P127[®] com ácido fólico	34
4.2 Espectrometria de infravermelho	34
4.3 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados	35
4.4 Caracterização físico-química dos CLNs	36
4.4.1 <i>Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta</i>	36
4.4.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução</i>	36
4.4.3 <i>Linearidade</i>	36
4.4.4 <i>Determinação de eficiência de encapsulação</i>	37
4.5 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	37
4.6 Ensaio de citotoxicidade	37
5 RESULTADOS	39
5.1 Espectrometria de infravermelho	39
5.2 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados	40
5.3 Caracterização físico-química dos CLNs	41
5.3.1 <i>Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta</i>	41
5.3.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução</i>	45
5.3.3 <i>Curva Analítica e Determinação de eficiência de encapsulação (EE)</i>	46
5.4 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	48
5.5 Ensaio de citotoxicidade	50
6. CONCLUSÃO	53
7. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é o mais comum tipo de câncer diagnosticado em mulheres, além de uma das principais causas de mortalidade do mundo (AKRAM et al., 2017; SUN et al., 2017; WAKS; WINER, 2019). Estudos realizados mostram que quando detectado no início de seu desenvolvimento, o CM apresenta uma taxa significativa de redução de mortalidade (WANG, 2017).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o número de mortes contabilizados no último censo realizado no Brasil (2017) chegou a 16.927 pessoas e a estimativa de novos casos em 2020 chega ao número alarmante de 66.280.

A mamografia e a ressonância magnética da região afetada são os meios de detecção mais utilizados para o câncer de mama e o tratamento envolve tanto o uso de medicamentos, como a mastectomia, que se caracteriza pela retirada total ou parcial do tecido mamário (AKRAM et al., 2017; SUN et al., 2017).

A escolha do tratamento é realizada de acordo com o quadro do paciente, podendo ser aplicado por um conjunto de atividades ou apenas a aplicação de uma delas. Em sua forma tradicional, são aplicadas a radioterapia, quimioterapia e/ou cirurgia, tendo como objetivo principal a eliminação do tumor e consequentemente maior qualidade de vida para o paciente (AKRAM et al., 2017; LIYANAGE et al., 2019; OSHIRO-JUNIOR et al., 2020).

Os maiores desafios apresentados atualmente na aplicação do tratamento são o avanço gradativo do crescimento dos tumores, assim como metástase em áreas até então saudáveis, além da resistência medicamentosa enfrentada pelos medicamentos convencionais aplicados. A manifestação de efeitos adversos também se mostra como uma grande barreira para a cura da doença, já que grande parte dos pacientes tende a desistir do tratamento em decorrência dos mesmos (AKRAM et al., 2017; LIYANAGE et al., 2019; LYMAN et al., 2018).

Antibióticos da classe das antraciclinas como doxorrubicina (DOX) e epirrubicina são empregados na combinação para o tratamento do câncer de mama (LOVITT et al., 2018). A DOX é um dos compostos mais comumente utilizados, assim como um dos mais potentes agentes quimioterápicos e já está sendo utilizada para este fim por cerca de três décadas (CAGEL et al., 2017; MITRY; EDWARDS, 2016).

O mecanismo de ação da DOX consiste em inibir as enzimas topoisomerases I e II. Estudos propõem quatro tipos distintos desse mecanismo, entretanto dois são mais descritos: 1- inibição da síntese de DNA e RNA das células, bloqueando assim o processo de replicação e transcrição; 2- geração de radicais livres que causam oxidação nas células e consequentemente

danos, tanto nas membranas celulares quanto no DNA celular. Contudo, a DOX apresenta um curto período de meia vida, baixo grau de estabilidade e é um composto inespecífico levando a efeitos colaterais como dores, náuseas e vômitos, diarreia, além de apresentar cardiotoxicidade (CAGEL et al., 2017; FRANCO et al., 2018; LOVITT et al., 2018; SHAFEI et al., 2017; WU et al., 2018).

A nanotecnologia é considerada uma promissora alternativa para combater as desvantagens e limitações apresentadas pela DOX. A terapia contendo nanotecnologia promove maiores efeitos de permeabilidade e retenção (EPR), onde determina que os tumores sólidos permitam a permeação e retenção de materiais numa faixa de 100 a 780 nm (CAGEL et al., 2017; OSHIRO-JUNIOR et al., 2020; SHAFEI et al., 2017; WU et al., 2018).

Doxil[®] foi a primeira formulação lipossomal de DOX aprovada pela FDA (EUA) e disponível comercialmente, mostrando de fato eficácia e uma redução de efeitos adversos em relação a cardiotoxicidade. Entretanto, estudos indicam que a farmacologia das partículas da formulação de Doxil[®] é bastante complexa, o que reflete de forma negativa, já que a matriz não libera de maneira eficaz a DOX no tecido alvo, além da produção de novos efeitos adversos e alto custo de produção (BI et al., 2019; LUO et al., 2017; MIKOLAJCZYK et al., 2019). Uma possibilidade para contornar as desvantagens oferecidas pelos lipossomas é o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados.

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são compostos onde sua matriz lipídica se comporta de uma maneira desorganizada e imperfeita composta por agentes surfactantes, que apresentam espaçamentos livres internos resultando em possibilidades maiores de depósito de medicamentos (OSHIRO-JUNIOR et al., 2020; TAPEINOS; BATTAGLINI; CIOFANI, 2017).

O direcionamento dos CLNs para as células do CM pode ser aprimorado através da sua funcionalização, explorando a capacidade de ligação de receptores com uma expressão significativa dos mesmos no tecido alvo em comparação com as células saudáveis do organismo. O ácido fólico é comumente utilizado, pois os receptores de folato estão expressos cerca de 60% nas células tumorais do CM, tornando os receptores folatos promissores alvos farmacêuticos (FONG; CHEN, C.; CHEN, 2017; OSHIRO-JUNIOR et al., 2020; POONIA et al., 2019).

Além disso, as membranas das células cancerígenas apresentam carga negativa, pois é composta por lipídeos aniônicos, enquanto que as células normais possuem essa estrutura lipídica catiônica. Desse modo, através do mecanismo de atração eletrostática, os CLN com superfície catiônica podem contribuir com a vetorização ao tecido tumoral (IWASAKI et al.,

2009; LV et al., 2013; FONG; CHEN, C.; CHEN, 2017; OSHIRO-JUNIOR et al., 2020; POONIA et al., 2019).

Diante deste contexto, o objetivo desse trabalho é desenvolver e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico contendo doxorubicina, os quais proporcionem mecanismos seguros e eficazes para redução de efeitos adversos em futura aplicação no câncer de mama.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer de mama

O câncer de mama (CM) é uma neoplasia maligna extracutânea que atinge ambos os sexos, sendo diagnosticada principalmente na população feminina. É uma doença heterogênea em nível molecular e suas causas não são totalmente compreendidas. Em estágio inicial (não metastático), possui chance de cura em cerca de 70-80% dos pacientes. Quando metastático, tem a capacidade de se transferir e atingir outros órgãos distantes, como ossos, fígado, pulmão e cérebro, o que contribuiu para sua alta taxa de mortalidade (HARBECK et al., 2019; LIANG et al., 2020; SUN et al., 2017).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera o CM como um grave problema de saúde pública global. O relatório divulgado pela International Agency for Research on Cancer (ONU, 2020), apontou que no ano de 2018 foram diagnosticados 2,1 milhões de novos casos de CM em mulheres, sendo categorizada como a principal causa de morte por câncer (627 mil) no sexo feminino no mundo.

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil (2019) quando se refere à saúde da mulher, esse tipo de neoplasia lidera o ranking em todas as regiões do país. Para cada ano do triênio (2020-2022) foram estimados 66.280 (29,7%) novos casos de câncer de mama e o risco previsto é de 61 casos novos a cada 100 mil mulheres.

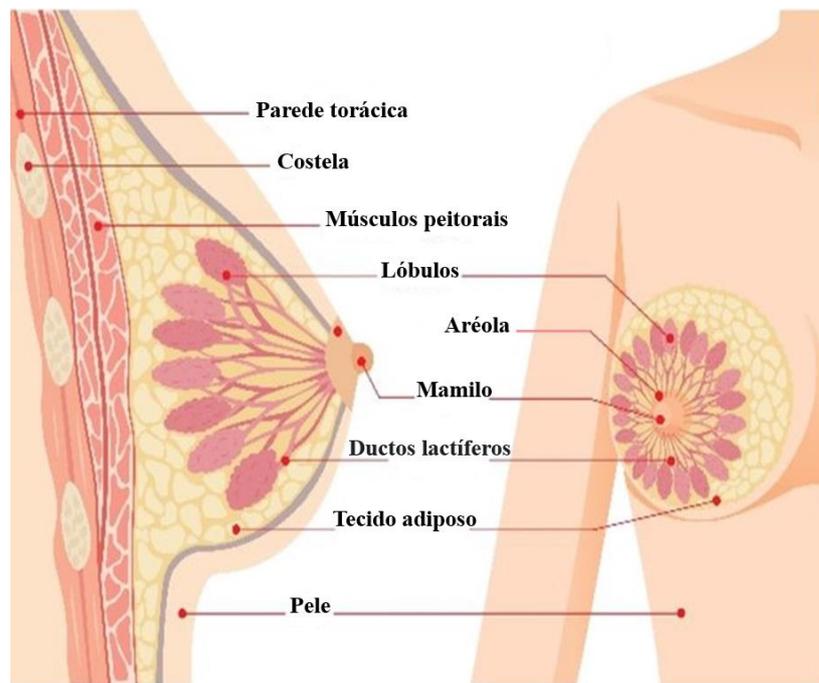
Apesar de estar presente em diferentes partes do mundo, as taxas de incidência, de mortalidade e de sobrevivência decorrentes do CM variam de uma região para outra. Recentemente, foi apontado a crescente incidência nos países em desenvolvimento, no qual o aumento da expectativa de vida, da urbanização e adoção de estilos de vidas não muito saudáveis são fatores que tendem a colaborar com o surgimento de novos casos (FRANCIES et al., 2020; MOMENIMOVAHED; SALEHINIYA, 2019).

Além desses, encontram-se na literatura outros determinantes biológicos e sociais que predispõe o surgimento de CM, como fatores genéticos, o uso de estrogênios, contato com radiação ionizante, a alta densidade mamária, o histórico de hiperplasia atípica, a baixa paridade, a baixa renda, a insegurança alimentar, o consumo de álcool, a obesidade, entre outros que ajudam a desencadear diferentes tipos dessa neoplasia (BESSONNEAU; RUDEL, 2020; CARDOSO et al., 2019).

Biologicamente, a mama possui o papel de servir como suporte nutricional para outro indivíduo. Na fase adulta, sua estrutura e tecido celular mamário sofrem alterações periódicas

marcantes, observadas principalmente durante a gravidez, e que vão involuindo com o passar da idade. Por serem visíveis, ganharam significado social, cultural e pessoal. Essas características e o conhecimento sobre a anatomia e a histologia, são importantes para orientar quando se estuda a origem, o quadro clínico e o tratamento das doenças mamárias (KOTHARI; DIORIO; DUROCHER, 2020). A figura 1 representa a anatomia desse órgão duplo no corpo feminino.

Figura 1 – Anatomia da mama feminina.



Fonte: adaptada de Grabher (2020).

O tecido celular mamário saudável possui células epiteliais normais, as quais estão hierarquicamente organizadas em: células tronco/basais mamárias bipotente (Mascas), progenitoras luminais e células luminais maduras/diferenciadas (KUMAR et al., 2018).

O tecido adiposo (TA) e o fibroglandular também constituem esse órgão par, neles encontram-se os lóbulos e ductos mamários. O TA apresenta-se em grande parte da mama, atingindo as regiões da clavícula, axila e ao redor do centro da caixa torácica. É responsável por realizar a comunicação de todas as estruturas do microambiente mamário e armazenar energia que é liberada de acordo com a necessidade do organismo. Essa energia auxilia na progressão do CM, pois o TA secreta fatores de crescimento usados para sobrevivência do tumor. O CM tem início nas células epiteliais presentes ao redor dos tecidos ductal e lobular.

Posteriormente, forma um microambiente complexo, envolvendo todas as células circundantes da mama (KOTHARI; DIORIO; DUROCHER, 2020).

Os casos de CM se diferenciam uns dos outros por meio da morfologia, fenótipo e prognóstico, que são ferramentas para auxiliar na estratégia terapêutica adequada e prever resultados clínicos. Em nível molecular o CM incluem: ativação do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2, codificado por ERBB2), ativação de receptores hormonais (receptor de estrogênio e receptor de progesterona) e/ou BRCA mutações (HARBECK et al., 2019).

Desse modo, baseando-se na presença ou ausência do receptor de estrogênio (ER), do receptor de progesterona (PR) e a expressão e amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2), foram adotados três diferentes subtipos clínicos para o CM, denominados de receptor hormonal (HR) positivo (HR+), HER2-positivo (HER2 +) e triplo-negativo (TN) (RIGGIO; VARLEY; WELM, 2020). A tabela 1 apresenta a classificação dos subtipos clínicos para o CM.

Tabela 1 – Classificação dos subtipos clínicos de acordo com a presença (+) ou ausência (-) dos receptores ER, PR, e a expressão e amplificação (*) do HER2.

<i>Subtipos clínicos</i>	<i>Receptores</i>		
	ER	PR	HER2
HR+	+	+	---
HER2+	-	-	*
TN	-	-	---

Fonte: própria

Dentre esses, o triplo negativo é considerado o mais agressivo, possui maior probabilidade de recidiva e necessita de opções de terapia direcionadas. Isso pode ser explicado pelo fato que as células-tronco do CM apresentam potencial de iniciação do tumor e, conseqüentemente, promovem a auto renovação. Portanto, desencadeiam resistência terapêutica, metástases e recorrência (SO-YEON PARK; JANG-HYUN CHOI; JEONG-SEOK, 2019; WAKS; WINER, 2019).

Utilizando conhecimentos da genética, técnicas de microarranjos de DNA e análises, foram identificados cinco subgrupos distintos do CM através de um classificador de expressão de mRNA de 50 genes (PAM50), os quais foram classificados em: luminal A, luminal B, HER-2+, basal e normal (UTSUMI et al., 2020).

Sabendo que inúmeros fatores contribuem para o aparecimento do CM, a prevenção dessa neoplasia foi dividida em três categorias: primária, secundária e terciária. De acordo com a diretriz publicada pelo World Cancer Research Fund (WCRF) e o American Institute for Cancer Research (AICR) a prevenção primária é a adoção de estilo de vida saudável, pois estudos científicos mostraram sua efetividade na redução da incidência e mortalidade decorrentes do CM (ORMAN et al., 2020; SHAMS-WHITE et al., 2019).

A prevenção secundária é realizada nos casos em que a doença pode ser identificada precocemente ou ainda não está clinicamente aparente. A OMS estabeleceu duas estratégias para auxiliar na detecção precoce do CM. A primeira, o diagnóstico precoce, consiste em reconhecer o câncer sintomático em estágio inicial, responsável por um bom prognóstico e alta taxa de recuperação. A segunda é chamada de rastreamento de base populacional, onde ocorre a identificação da doença assintomática em um alvo da população feminina aparentemente saudável (GINSBURG et al., 2020).

O teste de mamografia é um exemplo de prevenção secundária por rastreamento. As mulheres acima de 50 anos devem passar por esse procedimento anualmente. Entretanto, em países subdesenvolvidos, pode ficar inviável pois requer investimento financeiro, muitas vezes, não possuem infraestrutura e políticas públicas de saúde adequada. Um fator preocupante nessas regiões é que a maioria dos casos de CM são diagnosticados em estágio avançado (localmente avançado ou metastático), o que colabora para o crescente número de óbitos em mulheres portadoras dessa neoplasia (PASHAYAN et al., 2020; SHIRZADI et al., 2020).

É imprescindível que a população em geral receba educação em saúde, pois conhecendo o seu corpo, o paciente fica em alerta ao perceber sinais e sintomas que antes não apresentava. Dentre os cuidados pessoais, a prática do autoexame das mamas é recomendada pela OMS. Por ser prático e seguro, pode ser realizado mensalmente por todas as mulheres maiores de 17 anos (ALOMAIR et al., 2020).

Quando o paciente apresenta manifestações clínicas, é classificado no grupo da prevenção terciária. Nessa situação, o caso necessita de agilidade para obter o diagnóstico exato da doença e, desse modo, encaminhar para o início do tratamento (OLIVEIRA et al., 2019).

Dentre os diagnósticos, o histológico é considerado o principal método para detectar CM. É baseado em um padrão patológico estabelecido e destacam-se, principalmente, dois tipos de achados celulares. O mais comum é o carcinoma ductal invasivo, que acomete cerca de 50% - 75% dos pacientes. Já o carcinoma lobular invasivo é responsável por 5% - 15% dos casos, com carcinomas ductais/ lobulares mistos. Além destes, outras histologias mais raras compõem os demais casos (WAKS; WINER, 2019).

O diagnóstico do tipo molecular baseia-se em identificar dois principais alvos moleculares do CM invasivo. Ácidos microrribonucleicos (miRNAs) são um grande subgrupo de RNAs não codificantes composto de 18-25 nucleotídeos, eles atuam como biomarcadores prognósticos e diagnóstico do CM. A desregulação dos miRNAs está associada à progressão e metástase do tumor. Como função, possuem a capacidade de controlar o crescimento, a proliferação, a diferenciação e a apoptose celular. Além disso, inibem a progressão do ciclo celular e conduzem a diferenciação terminal, quando esse processo ocorre de maneira negativa, podem colaborar no desenvolvimento ou progressão do câncer (O'DAY; LAL, 2010).

O diagnóstico por imagem e a biotecnologia molecular, fornecem informações importantes utilizando os níveis de biomarcadores de imagem. Esses disponibilizam elementos que colaboram para decidir os cuidados clínicos e também pesquisas envolvendo CM. A mamografia, ultrassonografia, imagem por ressonância magnética, sistema de hibridização de ácido nucleico, sistema PCR quantitativo de fluorescência em tempo real, sistema de hibridização de proteínas, citômetro de fluxo e entre outras são utilizadas (HE et al., 2020).

Através da metodologia escolhida para o diagnóstico, o profissional da oncologia terá conhecimento, por exemplo, do grau histológico, status do linfonodo, status do receptor de hormônio e status do receptor do fator de crescimento HER2, os quais são elementos que expressam a gravidade do caso e auxiliam na escolha do tratamento mais adequado (BERTOLI; CAVA; CASTIGLIONI, 2015).

De acordo com Harbeck et al. (2019), existem dois tipos de manejo clínico: o locorregional (cirurgia e a radioterapia) e a terapia sistêmica (terapia endócrina para doença de RH+, quimioterapia, terapia anti-HER2 para doença HER2+, agentes estabilizadores ósseos, inibidores de poli (ADP-ribose) polimerase para portadores da mutação BRCA e, recentemente, imunoterapia). Contudo, alguns pacientes que manifestam características semelhantes do CM, podem apresentar diferentes resultados clínicos. Desse modo, a individualização da terapia, novas formas farmacêuticas, métodos acessíveis, dentre outros, estão sendo estudados e empregados com o objetivo de proporcionar uma resposta mais efetiva no tratamento dessa doença.

No tratamento quimioterápico, são empregados alguns insumos farmacêuticos ativos (IFA) conhecidos na literatura como doxorubicina, ciclofosfamida, trastuzumabe, fluorouracil, entre outros. Entretanto, os diversos efeitos colaterais acarretam problemas que dificultam a adesão ao tratamento e, conseqüentemente, a recuperação do bem estar do paciente (MACHADO et al., 2019).

O receptor alfa de folato (FR α) vem sendo explorado como alternativa de tratamento quimioterápico e imunoterápico. É uma proteína ligada à membrana que possui alta afinidade para o folato, que é essencial no processo de biossíntese de aminoácidos, das bases de nucleotídeos e de outros compostos metilados. Possui pouca ou nenhuma presença nos tecidos normais. Por outro lado, está presente em alta quantidade nas células cancerosas humanas, como do cérebro, mama, ovário, pulmão e rim. No CM, esse receptor está mais evidente no tipo TN. Portanto, agentes terapêuticos direcionados ao folato estão sendo desenvolvidos para atuar nos tumores que expressam o FR α , evitando que o tecido saudável absorva o agente quimioterápico e cause efeitos indesejáveis (ZAGORAC et al., 2020).

Quando o CM é considerado avançado, metastático ou em recidiva, é indicada a terapia citotóxica. Seguindo as informações expostas nos Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia do Brasil, a quimioterapia para CM pode ser administrada como agente único ou em combinação. Esse último, é direcionado para aqueles pacientes que necessitam de uma resposta farmacológica rápida. Estudos mostraram que agentes quimioterápicos combinados apresentaram aumento na taxa de resposta, do tempo para progressão de doença e um pequeno benefício de sobrevida global, mas elevou o quadro de toxicidade (BRASIL, 2014).

No Brasil, o Ministério da Saúde através da portaria conjunta nº 04, de 23 de janeiro de 2018, aprovou as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama. De acordo com o documento, o tratamento medicamentoso mais efetivo para os casos avançados deve ser realizado como quimioterápicos antracíclicos (doxorubicina ou epirrubicina) e taxanos (paclitaxel, docetaxel), e outros agentes (capecitabina, gencitabina, metotrexato, 5-fluorouracila, vinorelbina, vimblastina, mitomicina, etoposido, ciclofosfamida, cisplatina, irinotecano). Além disso, a doxorubicina lipossomal, eribulina, ixabepilona, nabpaclitaxel vêm sendo adotadas. Contudo, esses dois últimos não possuem registro no país (BRASIL, 2018).

2.2 Doxorubicina

A doxorubicina (DOX) é um dos agentes quimioterápicos utilizados (isolado ou combinado) em casos graves do CM. É uma antraciclina, antibiótico antineoplásico de origem natural, isolada pela primeira vez em 1962, sendo derivada do fungo *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (CAGEL et al., 2017).

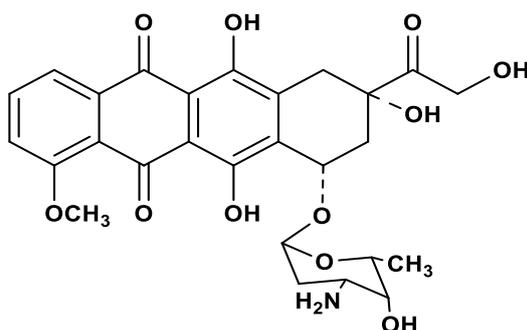
As antraciclinas possuem como principais representantes a idarrubicina e a epirrubicina (análogos naturais), e a doxorubicina e a daunorrubicina, os quais apresentam pouca diferença na estrutura química, o que proporciona padrões clínicos distintos. Enquanto que a

daunorrubicina e a idarrubicina são utilizadas em casos de leucemias agudas, a doxorubicina e a epirrubicina atuam amplamente contra tumores sólidos. Podem gerar radicais livres, o que causa cardiomiopatia incomum (BRUNTON; CHABNER; RODRIGUES, 2012).

Possui a fórmula química $C_{27}H_{29}NO_{11}$ e massa molar de $543.46 \text{ g mol}^{-1}$. Quanto a estrutura química, é formado por um anel tetracíclico fixada a um daunosamina (açúcar incomum). Quando a DOX é administrada, radicais livres são formados através de um processo dependente de ferro. De início, ocorre a redução do anel antraciclina quinona a uma hidroquinona posicionados em anéis adjacentes, fato que auxilia no ganho e na perda de elétrons, o que pode causar um quadro de cardiotoxicidade (CAGEL et al., 2017; THOMAS L. LEMKE, 2013).

O substituinte C13 da doxorubicina é o hidroximetil, o qual será responsável por retardar a ação da aldocetoreductase citosólica e a conversão para o doxorubicinol (menos ativo e cronicamente cardiotoxíco). Essa substituição irá proporcionar uma duração de ação mais longa em comparação com os análogos que têm CH_3 nesta posição (por exemplo, daunorrubicina). Figura 2 representa a estrutura química da doxorubicina (THOMAS L. LEMKE, 2013).

Figura 2 – Estrutura química da doxorubicina.



Fonte: própria.

Compreender a farmacodinâmica é importante para que a administração possa ser planejada de acordo com o uso de outros medicamentos para evitar interações e toxicidade. As antraciclina atuam bloqueando as DNA topoisomerasas, que são as enzimas responsáveis por evitar as supertorções e possibilitar a execução dos processos celulares sem danos a fita de DNA (THORN et al., 2011).

O mecanismo de ação consiste em bloquear a transcrição do DNA, inibindo enzimas críticas para o processo de replicação do DNA e/ou cortando e/ou induzindo mutações pontuais na fita de DNA. Quando interagem diretamente com o DNA, de início, intercalam a hélice de

fitas duplas inserindo-se entre os pares de bases e formando fortes interações não covalentes com as bases do DNA. O complexo altamente estabilizado deforma e desenrola o DNA, proibindo a replicação adequada. Para abrir caminho entre as fitas de DNA ligadas, um segmento do antibiótico deve ter a geometria coplanar trigonal garantida pela aromaticidade (SAWICKI et al., 2021).

A DOX intercala-se entre os pares de bases da dupla hélice do DNA, interferindo na sua síntese e inibe as enzimas topoisomerasas I e II. Os efeitos citotóxicos nas células cancerosas e efeitos tóxicos em vários órgãos podem estar relacionados à intercalação nas bases nucleotídicas e à atividade da DOX de se ligar à membrana celular lipídica. Essa intercalação inibe a replicação nucleotídica e a ação da DNA e RNA-polimerases. A interação da DOX com a topoisomerase II para formar complexos de DNA passíveis de clivagem parece ser um importante mecanismo da atividade citocida do fármaco (SILVA, 2010).

Quanto a farmacocinética, a DOX é altamente lipofílica, concentra-se no fígado, nódulos linfáticos, músculos, medula óssea, gordura e pele. É comercializada na forma de cloridrato de doxorubicina, hidrofílica, pó solúvel em água e em solução salina fisiológica para uso intravenoso. Não é absorvida via oral e, se aplicada pela via intravenosa, causa necrose tecidual. O tempo de meia-vida entre 30-40 horas e eliminação trifásica. Os efeitos colaterais mais conhecidos são mielossupressão e cardiotoxicidade. Contudo, também pode causar arritmias cardíacas, depressão da função miocárdica, flebite, esclerose das veias, hiperpigmentação do leito ungueal e conjuntivite. Portanto, surgiu a necessidade de incorporar esse Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) em novos sistemas de liberação de fármacos para otimizar sua ação e diminuir os efeitos indesejáveis (PUGAZHENDHI et al., 2018).

Outra característica importante da DOX é a sua fotossensibilidade. Esse fator é limitante ao tratar da garantia de estabilidade, pois um IFA fotossensível quando exposto a luz sofre alteração na sua estrutura química que desestabilizam sua ação terapêutica e, como também, as propriedades organolépticas das formulações farmacêuticas. Por isso, é importante que esse IFA seja incorporado em sistemas carreadores revestidos e sua manipulação seja devidamente realizada sem incidência da luz direta (IOELE et al., 2017).

Doxil® (doxorubicin hydrochloride liposome injection) é a DOX comercializada na forma farmacêutica (FF) lipossoma intravenosa. Os lipossomas protegem o IFA contra as enzimas que geram radicais livres cadiotóxicos e, conseqüentemente, diminuem a concentração no tecido cardíaco. A absorção pelas células tumorais ocorre de forma seletiva, isso é explicado devido à sua persistência na corrente sanguínea e maior permeabilidade das membranas vasculares tumorais. Entretanto, deve ser usada de maneira cautelosa para não induzir

insuficiência cardíaca congestiva fatal. O tempo de meia-vida é 55 horas e a dose recomendada é de 20 à 50 mg/m², administrada a cada 3 a 4 semanas. A eliminação é mais lenta quando comparada com a DOX convencional e os efeitos colaterais ocorrem quando a formulação é dispensada e administrada fora dos padrões estabelecidos (BARENHOLZ, 2012; RUSSELL; HULTZ; SEARSON, 2018).

Entretanto, os lipossomas possuem desvantagens como baixa solubilidade, meia-vida curta, possibilidade de oxidação de fosfolipídios e reação tipo hidrólise, vazamento e fusão de drogas / moléculas encapsuladas e custos de produção elevados. Por isso, é importante desenvolver e aprimorar sistemas carreadores que vençam essas limitações (MAJA; ŽELJKO; MATEJA, 2020).

2.3 Sistemas nanoestruturados

A nanotecnologia envolve a pesquisa e o desenvolvimento de produtos utilizando nanomateriais (NMs), os quais são caracterizados por possuir dimensões na faixa de nanoescala, variando de 1-100 nanômetro (nm). Apresentam propriedades físicas, químicas e biológicas ajustáveis que permitem o seu uso em diversos setores da indústria, como farmacêutica, alimentícia, cosméticos, têxtil, automobilística, aeroespacial, agricultura, entre outras. Classificam-se de acordo com o tamanho, a composição, a forma e a origem. (JEEVANANDAM et al., 2018).

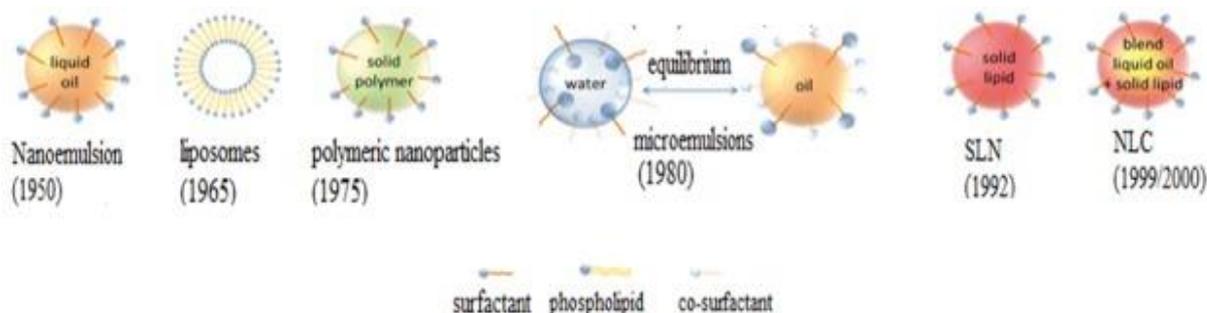
Apesar do avanço científico e tecnológico, diversos países discutem a regulamentação global ou unificada sobre nanotecnologia, pois ainda são desconhecidas as potencialidades danosas que podem causar ao corpo humano e a natureza. Agências internacionais como a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), a União Europeia, as normas ISO, Food and Drug Administration (FDA), ANF-Asia Nano Forum, entre outras, são exemplos de órgãos que estão discutindo essa problemática. Atualmente, cada país avalia de forma individual os nanoproductos e registra através de agências sanitárias e reguladoras locais (HUPFFER; LAZZARETTI, 2019).

Desde o início da década de 90 os nanomateriais vêm ganhando destaque na ciência médica, principalmente por seu uso como carreador de IFA e moléculas (peptídeos, anticorpos, RNA, etc.). Possuem a capacidade, por exemplo, de direcionar o IFA para o sítio específico, aumentar a permeação cutânea, melhorar sua absorção pelo trato gastrointestinal, proteger contra degradação física, química e enzimática, entre outros (KHOSA; REDDI; SAHA, 2018).

Por sua vez, os NMs são compostos por diferentes nanopartículas (NPs), são biodegradáveis e não tóxicos, dois fatores importantes para fabricação e uso de um biomaterial. Lipossomas, lipossomas deformáveis, virossomas, etossomos, nanopartículas poliméricas (nanocapsulas e nanoesferas), nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados, são exemplos de sistema de liberação desenvolvidos através dessas estruturas nanométricas (DUAN et al., 2020).

Os NMs utilizados na indústria farmacêutica foram desenvolvidos e estão sendo aprimorados para carrear quimioterápicos, aumentar a eficiência e diminuir a toxicidade causadas por essas substâncias. Como vantagem, apresentam maior eficiência de encapsulação, baixo teor de polímero, protegem o IFA da degradação causada pela diferença de pH, incidência de luz, diminuir a irritação decorrente do invólucro polimérico, entre outros. A figura 3 mostra a cronologia do desenvolvimento de alguns desses sistemas (ERDOĞAR; AKKIN; BILENSOY, 2019).

Figura 3 – Cronologia do desenvolvimento tecnológico de SNs utilizados na área farmacêutica.



Fonte: adaptada de Naseri, Valizadeh e Zakeri-Milani (2015).

No início da década de 90, os pesquisadores Müller (Alemanha) e Gasco (Itália) buscaram desenvolver sistemas baseados em nanopartículas para entrega de IFA e substâncias. Primeiro, obtiveram as Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), as quais são dispersões coloidais aquosas, com matriz lipídica biodegradável de sólido, sendo um carreador para ativos hidrossolúveis. Foram adotadas como alternativa ao uso de emulsões, lipossomas, micropartículas e nanopartículas poliméricas (BELOQUI et al., 2016).

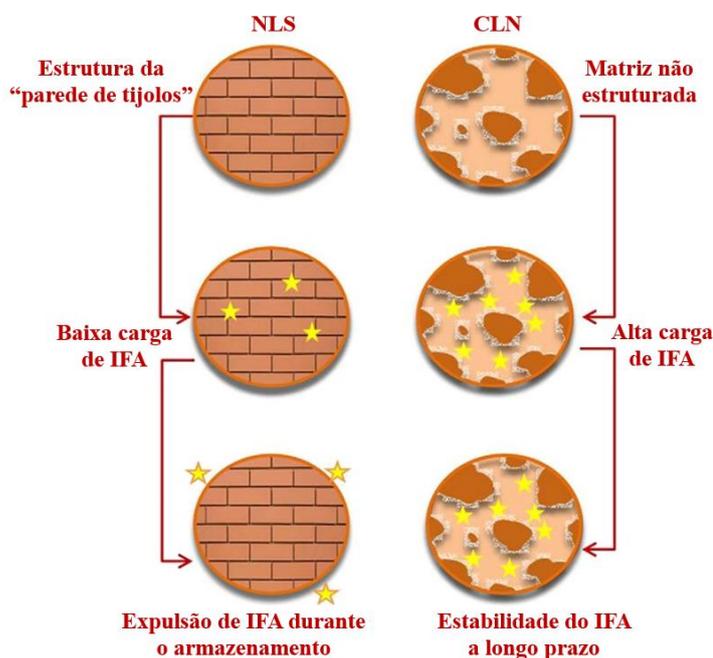
Essas NLS são constituídas de polímeros manufacturados e possuem características estruturais favoráveis, como tamanho pequeno e grande zona superficial, importantes para transportar IFA. Além disso, promovem a estabilização dos compostos incorporados, liberação controlada, oclusividade, baixa toxicidade, formação de filme na pele, entre outros. Portanto,

podem ser administradas por diversas vias, como, parenteral, oral, dérmica, visual, pulmonar e retal. (LINGAYAT; ZAREKAR; SHENDGE, 2017).

Contudo, a baixa capacidade de carga foi apontada como uma desvantagem para aplicações futuras na indústria. Visando aprimorar esse sistema, foi observado que, quando incorporados lipídios líquidos à matriz sólida na nanopartícula, ocorre aumento significativo de imperfeições na matriz sólida, fator que facilita a incorporação de maiores concentrações do ativo, além disso, mantém o sistema estável (NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015).

Sabendo a necessidade de aperfeiçoar o sistema para uso na medicina e aceitação pela indústria farmacêutica, no final da década de 90, os pesquisadores chegaram a um novo modelo denominado Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN), como mostra a figura 4.

Figura 4 – Diferenças estruturais e características das NLS e CLN.



Fonte: adaptada de Beloqui et al. (2015).

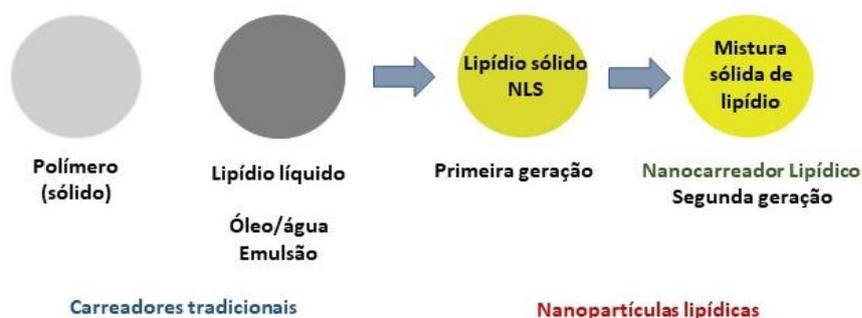
Diversos quimioterápicos, entre eles a DOX, estão sendo incorporados a esse sistema e observa-se melhorias, por exemplo, na liberação controlada, na diminuição da toxicidade, entre outros (HAIDER et al., 2020; SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012).

2.3.1 Carreadores lipídicos nanoestruturados

Os CLN são nanopartículas carreadoras de 2^o geração, formadas por uma matriz lipídica sólida não estruturada, a qual é constituída pela mistura de lipídios sólidos e lipídios líquidos (oleoso) adicionados a uma fase aquosa, que possui um ou mais surfactantes. Em estado sólido, essa mistura apresenta temperatura corporal (~37°C). Desse modo, apresentam melhor perfil de estabilidade, pois evita lixiviação durante a fase de armazenamento. Além disso, esse sistema oferece aumento da carga do IFA e, conseqüentemente, maior capacidade de encapsulação (KHOSA; REDDI; SAHA, 2018).

A figura 5 esquematiza os carreadores tradicionais e das nanopartículas lipídicas de primeira e segunda geração.

Figura 5 – Nanocarreadores de primeira e segunda geração.



Fonte: adaptada de Sharma et al. (2018).

Para obter esse sistema, é necessário selecionar criteriosamente as matérias primas a serem adotadas. Os lipídios sólidos (ex.: cera de abelha, cera de carnaúba, ácido esteárico, etc) são formados por elementos químicos com ponto de fusão acima de 40° e são biodegradáveis *in vivo*. Os líquidos (ex.: óleo de rícino, ácido oleico, óleo de palma) são bem aceitos para uso humano. Os surfactantes (iônico, não iônico, anfotérico, co-surfactante), usados para diminuir a tensão superficial são escolhidos baseando-se na via de administração e no valor de HBL. (SHARMA; BALDI, 2018).

Apesar da semelhança estrutural com os NLS, os CLN possuem três características específicas relacionadas com o local em que o IFA é integrado. Portanto, para facilitar o desenvolvimento, esse sistema foi categorizado em três tipos (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018).

O CLN do tipo I, ou cristal imperfeito, apresenta-se com matriz sólida mal estruturada. É obtida através da substituição de porções de lipídio sólido por lipídeos oleosos, como os

glicerídeos. Os cristais imperfeitos dão espaço para incorporar maiores concentrações de IFA e maiores cargas, pois uma matriz ordenada pode ocupar grande parte da área, expelindo o IFA do sistema (SALVI; PAWAR, 2019).

O CLN do tipo II, ou múltiplo, corresponde ao sistema óleo-em-lipídio-em-água obtido através da técnica de separação de fases, onde realiza-se a mistura de grande concentração de lipídio oleoso (maior solubilidade) e lipídios sólidos (menor solubilidade). O excesso de óleo na matriz sólida, causa a separação de fases e produz minúsculas gotículas oleosas dispersas uniformemente em meio aquoso. Desse modo, ocorre a liberação controlada e vazamento do IFA da matriz lipídica. Isso proporciona, por exemplo, que um IFA com maior solubilidade em óleo seja carregado e melhore sua estabilidade de carga. Resfriamento e homogeneização a quente são procedimentos usados nesse sistema (RAJALAKSHMI; DHANAPAL; SUNDHARARAJAN, 2020).

O CLN do tipo III, ou amorfo, lipídios sólidos e oleosos são misturados de maneira que evite o processo de cristalização. A matriz lipídica permanece sólida, mas com um núcleo amorfo onde o IFA será incorporado. Essa cristalização pode ocasionar a expulsão do ativo antes de finalizar o processo, para evitar isso, utiliza-se lipídios especiais como hidroxil octacosanil estearato de hidroxila, palmitato de isopropila ou triglicerídeos de cadeia média (MCT) (SHARMA; BALDI, 2018).

Quanto ao processo de fabricação, por não utilizar solvente, a homogeneização de alta pressão (HAP) costuma ser um dos métodos adotados na fabricação industrial. Geralmente, mistura-se os lipídios sólidos com os líquidos obedecendo a proporção de 70:30 até 99,9:0,1. Para estabilizar, cerca de 1,5-5% (p/v) do surfactante é adicionado a mistura lipídica contendo IFA, em temperatura aproximada 10°C acima do ponto de fusão. Após a pré-emulsificação, a homogeneização da microemulsão forma uma nanoemulsão quente. O CLN é obtido após o resfriamento (BELOQUI et al., 2016).

Além da HAP, outras técnicas de fabricação de CLN são encontradas na literatura, como microemulsão, método de emulsificação-evaporação de solvente, método de emulsificação-difusão de solvente, injeção de solvente (ou deslocamento de solvente) método, fase, método de ultra-som de emulsificação e de filme e tecnologia de extrusão a quente (DEEPAK et al., 2019).

Devido ao tamanho nanométrico e a complexidade do sistema, a caracterização físico-química dos CLN se torna um grande desafio no momento de realizar o controle de qualidade e estabilidade. Para garantir bons resultados e conseqüentemente, aprovação para comercialização e uso, são realizadas leituras do tamanho da partícula, potencial zeta,

calorimetria de varredura diferencial (DSC), raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia Raman. Além disso, é importante avaliar a eficiência de encapsulação e liberação do ativo, necessários para determinar sua ação como carreador (FANG; A. AL-SUWAYEH; FANG, 2013).

Esses sistemas inovadores para transporte de IFA atraem atenção da indústria farmacêutica, pois possuem vantagens que facilitam a produção em grande escala. Entretanto, existem algumas desvantagens que levam pesquisadores a buscar o aprimoramento desses carreadores para garantir sua aceitação e uso (IQBAL et al., 2012).

A tabela 2 apresenta algumas das principais vantagens e desvantagens desse sistema.

Tabela 2 – Vantagens e desvantagens dos CLN.

Vantagens	Desvantagens
Estrutura de cristal desordenada impede o vazamento de IFA; Carga útil do IFA elevada e controle do tamanho de partícula.	A citotoxicidade está relacionada com a natureza estrutural e com a concentração.
Superfície modificável com uso de surfactantes, prolongando o padrão de liberação controlada do IFA.	Alguns surfactantes usados no desenvolvimento do sistema apresentam ação irritante e sensibilizante.
Padrão de segmentação organizacional e alto aprisionamento de IFA lipofílicas e hidrofílicas.	Dificuldade em aprimorar CLN para o transporte de proteínas, peptídeos e genes.
Facilidade de preparação e aumento de escala, com dispersabilidade aumentada em um meio aquoso.	Insuficiência de ensaios clínicos e pré-clínicos em diversas áreas, principalmente para sistemas de uso no tecido ósseo.
Material biodegradável com baixa toxicidade <i>in vivo</i> . Melhor relação risco/benefício, facilidade para validar.	
Alta estabilidade química (compostos sensíveis à luz, oxidação e hidrólise) e física (transição polimórfica mais lenta e baixo índice de cristalinidade).	
Alta biodisponibilidade dos fármacos BCS classe II / IV e melhor biodisponibilidade oral, promovendo sua absorção intestinal.	
Ação local tópica quando aplicado e potencializador de penetração entre as células do estrato córneo.	

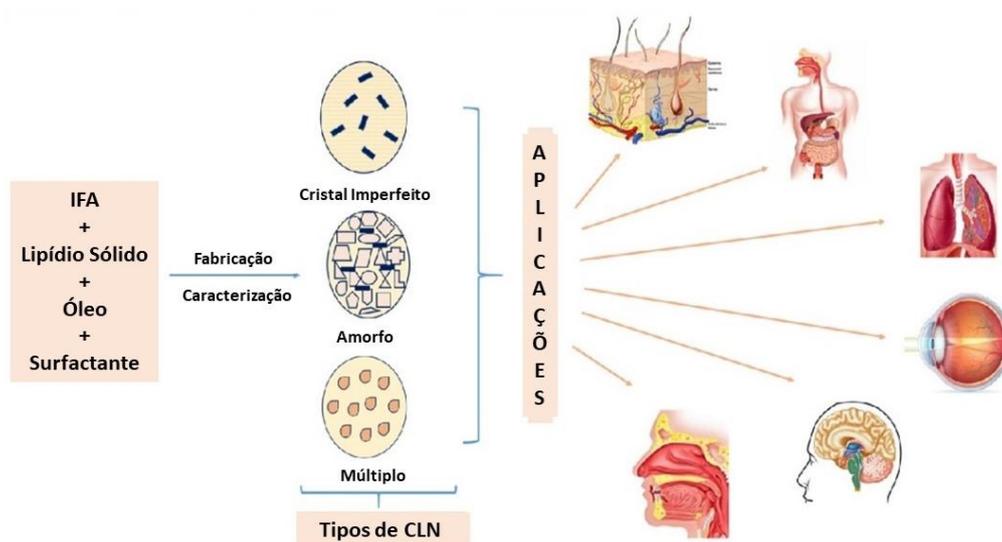
Fonte: adaptada de Rajalakshmi, Dhanapal, Sundhararajan (2020).

O desenvolvimento, a caracterização e as inúmeras vantagens fazem do CLN um bom transportador de IFA para ser aplicado por via oral, dérmica, ocular, nasal, entre outras. As

limitações existentes nessas vias, impulsionam os pesquisadores a desenvolver careadores para transportar diferentes moléculas. Atualmente, são comercializados vários produtos farmacêuticos e cosméticos usando esses nanocarreadores, os quais mostram-se promissoras para uso como dispositivo para tratar e curar diversas doenças (SALVI; PAWAR, 2019).

A figura 6 mostra alguns exemplos de aplicações nesses sistemas para diferentes vias de administração de medicamentos.

Figura 6 – Composição, tipos e algumas vias de aplicação de CLNs para tratar diversas situações clínicas



Fonte: adaptada de Khosa, Reddi e Saha (2018).

A via oral é a mais comum para administração de medicamentos e mais aceita pelos pacientes. Entretanto, processos bioquímicos e barreiras do trato gastrointestinal, por exemplo, diminuem a biodisponibilidade de IFA pouco hidrossolúveis. Outros problemas enfrentados por essa via são o metabolismo de primeira passagem, afinidade para transportadores da bomba de efluxo de glicoproteínas-P, degradação química enzimática, entre outros (GABA et al., 2015).

CLN são usados para prolongar a deposição e permanência do IFA nos olhos, esses órgãos possuem características fisiológicas e anatômicas que dificultam a administração de medicamentos. As principais barreiras encontradas são o epitélio corneano, a barreira sanguínea ocular, o fluxo sanguíneo conjuntival e a drenagem lacrimal (BAIG et al., 2020).

O tamanho manométrico e alta taxa de encapsulação possibilitaram o uso dos CLNs para entrega de IFA no cérebro. Esse órgão possui como limitações para receber tratamento medicamentoso devido a barreira hematoencefálica e o efluxo de IFA do cérebro para a circulação sanguínea. Dentre as vantagens, o CLN aumenta o tempo de retenção IFA no sangue

dos capilares cerebrais e induz um gradiente do IFA do sangue para os tecidos cerebrais (TAPEINOS; BATTAGLINI; CIOFANI, 2017).

Em tratamentos por via pulmonar, a inalação direta contribui para acelerar o início da ação e acumular IFA no local. A dose do medicamento pode ser diminuída, o que reduz os efeitos adversos e a grande área superficial desse órgão e o epitélio alveolar auxiliam na permeação do IFA. Os CLN por via pulmonar, diferente de outras formas farmacêuticas, proporcionam aumento da biodisponibilidade, liberação controlada e sustentada, biocompatibilidade, biodegradabilidade, menor toxicidade e melhor estabilidade (PATIL; DESHPANDE, 2018).

Na via parenteral, os CLN são adotados para transportar IFA pois mantém os níveis séricos constantes, constituintes biocompatíveis e biodegradáveis, liberação controlada e possibilidade de produção industrial em larga escala (AJORLOU; KHOSROUSHAHI, 2017).

A pele, maior órgão do corpo humano, apresenta limitações que dificultam o tratamento. A dificuldade para vencer as barreiras desse órgão, acabam diminuindo a eficácia de alguns medicamentos comercializados, o que leva, muitas vezes, o paciente a abandonar os cuidados. Por isso, pesquisadores procuram desenvolver CLN de via tópica que facilitem a penetração e permeação dos IFA, para fins medicamentosos e até mesmo estéticos (CZAJKOWSKA-KOŚNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019).

Outra aplicação promissora dos CLN é no tratamento de diversos tipos de câncer. Os quimioterápicos apresentam limitações como, por exemplo, baixa solubilidade, especificidade e estabilidade e alta toxicidade de tecidos saudáveis. Esse sistema é uma alternativa que pode solucionar essas e outras limitações. No CM, os transportadores nanoparticuladas são utilizados para entregar e otimizar o tratamento de vários quimioterápicos combinados ou isolados, entre eles, a DOX (SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012).

SABZICHI e colaboradores, (2017) desenvolveram um CLN carregado com vitamina D (Vit D) com objetivo de aumentar a eficácia da DOX no tratamento do CM. De acordo com os resultados foi observado que, os carreadores contendo Vit D diminuíram o percentual de proliferação celular de 7,2% para 5,1%. Por outro lado, o co-tratamento (VitD e DOX) causou um aumento de duas vezes na porcentagem de apoptose.

Os CLN carregados com DOX e cisplatina (CDDP) (D-C-CLNs), mostraram-se satisfatórios para uso no tratamento combinado de CM. *In vitro*, através do ensaio de MTT, foi observado maior grau de citotoxicidade e sinergia dos dois IFA em células tumorais MCF-7 e MCF-7/ADR. Os D-C-CLNs foram mais eficazes em comparação a solução livre (SL) ($p < 0,05$) de DOX (353,6 IM) e CDDP (92,7 IM). O teste *in vivo* mostrou aumento da atividade

antitumoral. Os CLNs apresentaram tamanhos na faixa de 100 e 110 nm, melhorando a entrega *in vivo* e o aumento da biodisponibilidade dos IFA. PZ foi positivo, importante para a eficiência da endocitose celular pelo mecanismo da interação eletrostática entre os CLNs e a superfície da célula tumoral (carga negativa), promovendo a penetração celular e internalização. A EE foi de 85 a 90%, comprovando que a técnica de emulsão-evaporação e solidificação a baixa temperatura foi adequada para o carregamento de DOX nos CLNs (DI et al., 2016).

Visando melhorar as propriedades dos carreadores e, conseqüentemente a ação dos ativos, os CLN podem ser modificados, por exemplo, através da técnica de funcionalização.

2.3.2 Carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados

A técnica de funcionalização baseia-se em inserir na composição do CLN algum excipiente que tenha a função de orientar o carreador para o alvo desejado e potencializar a sua atividade. Essa alteração estrutural consiste em melhorar a especificidade e a eficácia para auxiliar no aumento da distribuição celular local do IFA e, conseqüentemente, os otimizar os efeitos terapêuticos. Para atingir o objetivo, proteínas, peptídeos, minerais, polímeros naturais, moléculas de origem vegetal são os mais utilizados (HUANG et al., 2018; LIU; LÄMMERHOFER, 2019; RAMESHKUMAR; RAMARAJ, 2013; SINGH et al., 2018)

Essas estruturas modificadas vêm sendo estudadas em diferentes situações clínicas como, por exemplo, na medicina regenerativa, na entrega de quimioterápicos para tratamento de câncer, no tratamento da doença de Alzheimer, etc (CARNEIRO et al., 2019; PERÁN et al., 2012; YOU et al., 2021).

Por exemplo, para evitar a adsorção de proteínas, a superfície do CLN pode ser funcionalizada com moléculas que o deixem mais hidrofílico. Como também, pode-se melhorar a entrega do IFA no alvo e aumentar a especificidade. (MORAES et al., 2021).

O FR α , subexpresso nos tecidos com CM, possui uma alta afinidade pelo ácido fólico, que é internalizado por endocitose mediada por esse tipo de receptor. Portanto, CLN podem ser funcionalizados com adição de ácido fólico, ligante que promove o direcionamento de sistemas transportadores que possuem dificuldade de entrar nos tumores (UCAR et al., 2017).

Recentemente, os CLN catiônicos estão ganhando destaque. São desenvolvidos com excipiente catiônico que modifica a superfície do carreador, deixando-a com carga positiva. Esse detalhe melhora o desempenho do sistema em diversas situações, pois facilita sua interação com as células e tecidos carregados negativamente com proteínas relacionadas a apoptose (Caspase-3, Caspase-9, BAX e Bcl-2). Desse modo, ocorre aumento no tempo de permanência

do IFA no local e, como também, facilita a entrada dos nanocarreadores nas células por meio do processo de endocitose (BAIG et al., 2020).

Diante desse contexto, esse trabalho buscou desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial de CLN funcionalizados com ácido fólico para veiculação de DOX no tratamento do câncer de mama.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico contendo doxorubicina e avaliar a atividade *in vitro* contra células da linhagem MCF-7.

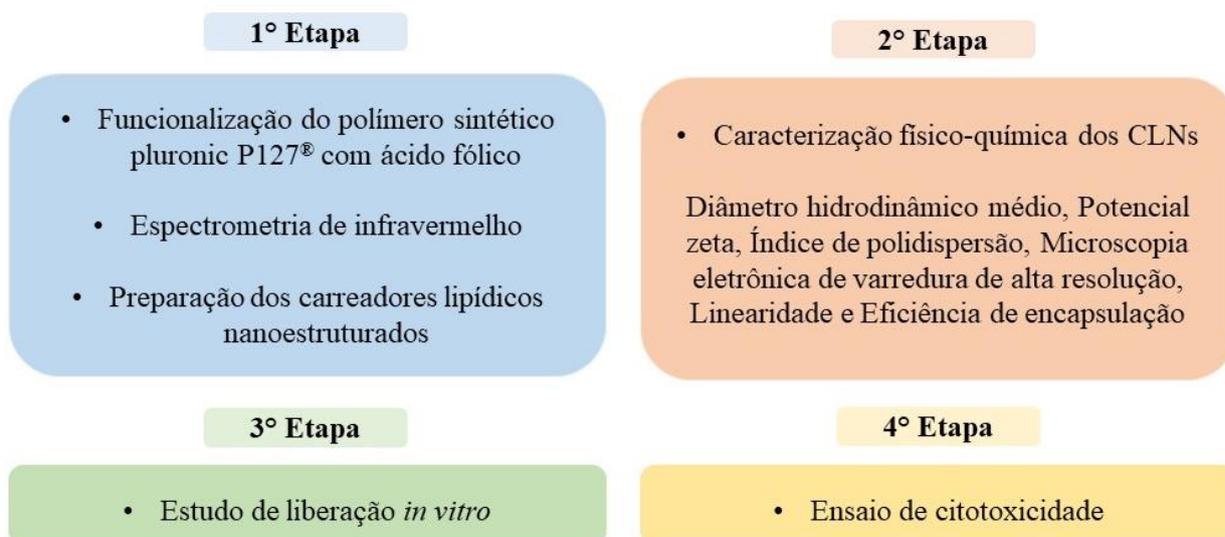
3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos a serem alcançados por este trabalho são:

- a) sintetizar a funcionalização do polímero Pluronic P127[®] com o ácido fólico;
- b) desenvolver um carreador lipídico nanoestruturado utilizando o polímero funcionalizado;
- c) incorporar o fármaco no carreador lipídico nanoestruturado;
- d) avaliar as características físico-químicas da formulação;
- e) determinar o perfil de liberação *in vitro* da formulação;
- f) avaliar a citotoxicidade da formulação em ensaio MTT com células cancerígenas MCF-7.

4 METODOLOGIA

A metodologia desse trabalho foi realizada em quatro etapas:



4.1 Funcionalização do polímero sintético pluronic P127® com ácido fólico

A funcionalização do polímero sintético pluronic F127® (PF-127) com ácido fólico (AF) seguiu a metodologia desenvolvida por Lin et al. (2009). Inicialmente, 87,58 mg de AF e 35,32 g de 1,1'- carbonildiimidazol foram dissolvidos em 3 mL de dimetil-sufóxido (DMSO) e adicionados a um balão de fundo redondo de 25 mL. A reação permaneceu ao abrigo da luz, sob agitação e atmosfera inerte de N₂ por 24 horas. Após este período, foram adicionados à reação 0,62 g de PF-127, diluído em 1 mL de DMSO. A reação foi mantida ao abrigo da luz, sob atmosfera de N₂ e agitação por 24 horas. O produto foi então submetido à diálise com água deionizada por 3 dias, utilizando membrana de acetato de celulose (Fisher, MWCO 3500). O PF-127 funcionalizado (PF127-AF) foi recuperado por liofilização e utilizado no desenvolvimento dos CLN.

4.2 Espectrometria de infravermelho

Para as análises de espectrometria de infravermelho foi utilizado o espectrômetro *Bruker Vertex 70ATR*, com resolução de 4 cm⁻¹, tempo de escaneamento de 64 segundos, de 4000 a

400 cm⁻¹. As amostras PF-127, AF e PF-127-AF foram diluídas com brometo de potássio (KBr) e preparadas na forma de pastilha (148 mg de KBr e 2 mg de amostra).

4.3 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados

A preparação dos CLNs foi realizada a partir da mistura de uma fase aquosa composta por 3,5% de PF-127-AF, 0,50% de brometo de cetrimônio (BC) e água ultra purificada; e de uma fase oleosa constituída por 2,00% de estearato de polioxietileno 40 (EP), 2,00% de triglicérides do ácido cáprico/caprílico (TGACC), e 0,9% de óleo de rícino hidrogenado e etoxilado 40 (OE) (SATO et al., 2017).

A Tabela 3 representa a identificação e composição dos CLNs funcionalizados ou não com AF, conforme componentes e concentrações que serão utilizadas em suas obtenções.

Tabela 3 – Identificação, composição e concentração dos diferentes CLNs obtidos.

Identificação dos CLNs	PF127-AF	PF127	BC
CLN+	----	3,5	0,50
CLN+AF	3,5	----	0,50
CLN+DOX	----	3,5	0,50
CLN+AF+DOX	3,5	----	0,50
CLN-	----	3,5	----
CLN-AF	3,5	----	----
CLN-DOX	----	3,5	----
CLN-AF-DOX	3,5	----	----

Fonte: dados da pesquisa.

Ambos CLNs possuíam na formulação EP, TGACC, OE e água (qsp). Os componentes de cada fase foram pesados em béqueres separados. A fase aquosa foi aquecida a 70 °C e a fase lipídica entre 5-10 °C (temperatura acima do ponto de fusão do lipídio). A fase aquosa foi vertida sobre a fase lipídica fundida em constante agitação, originando uma pré-emulsão. A dispersão da pré-emulsão foi realizada por um desruptor de células ultrassônica em 5 ciclos de 60 segundos com intervalos de 30 segundos cada, a uma amplitude de 35%. Os sistemas foram acondicionados em frascos âmbar e mantidos em geladeira (2 °C). A preparação dos CLN acrescidos de DOX utilizou da mesma metodologia, de modo que a DOX foi dispersa na fase aquosa na concentração de 500 µg/mL (920 µM). Foi utilizado o IFA cloridrato de

doxorubicina (Eurofarma®, São Paulo, SP, lote 100321A), na forma farmacêutica pó liofilizado para solução injetável, frasco ampola contendo 50 mg.

4.4 Caracterização físico-química dos CLNs

A caracterização físico-química foi determinada de acordo com os métodos:

4.4.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta

Para a caracterização dos parâmetros de distribuição média de tamanho (d.nm) e índice de polidispersão (PDI) e de potencial zeta (PZ), foi utilizado o equipamento de dispersão de luz *Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments Malvern, UK)*. A solução preparada de cada uma das amostras CLN+, CLN+AF, CLN+DOX e CLN+DOX+AF foi diluída (1:100) com água ultra purificada e vertidas em uma cubeta que foi acoplada no compartimento analisador (laser de diodo a 780 nm, 3 mW nominal, 25 °C, ângulo de espalhamento de 90°). Os CLN foram analisados durante 1, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de estocagem.

Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), em seguida, foram realizadas as comparações de amostras múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução

As morfologias e as imagens das nanopartículas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) utilizando o microscópio JEOL JSM-7500F. 10 µL de cada amostra CLN BRANCO, CLN+AF, CLN+DOX, e CLN+DOX+AF foi disposta sobre o suporte metálico, e seco em um dessecador a temperatura ambiente por 2 dias. Logo após a secagem, o suporte foi revestido com o material condutor (carbono).

4.4.3 Linearidade

A linearidade foi alcançada a partir da construção de três curvas analíticas independentes, a partir da média foi obtida a curva analítica. De início, foi preparada uma solução estoque 100 µg/mL, diluída em água destilada, resultando em soluções nas seguintes

concentrações 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 µg/mL. As medidas foram realizadas em triplicata. O espectrofotômetro de absorção e fluorescência (Cary Eclipse®) foi utilizado para a análise, com excitação (λ_{EX}) a 485 nm e emissão(λ_{EM}) a 580 nm.

4.4.4 Determinação de eficiência de encapsulação

A formulação obtida foi centrifugada a 4000 rpm por 30 min. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado, usando filtros Minisart® NML de 0,45 µm de acetato de celulose, visando retirar qualquer quantidade de DOX precipitada. O teor de encapsulação foi quantificado usando o espectrofotômetro de fluorescência *Cary Eclipse* utilizando emissão (λ_{EM}) a 580 nm com excitação (λ_{EX}) a 485 nm (largura da fenda de 10 nm). A concentração de DOX foi calculada por meio de uma curva de calibração padrão derivada para concentrações conhecidas de DOX teórica.

4.5 Estudo de liberação *in vitro*

O método de diálise direta foi utilizado para estudos de liberação *in vitro* com DOX. Aliquotas de 1 mL de CLN contendo DOX foram colocadas em SnakeSkin™ *Dialysis Tubing* (corte de 3500, Thermo Scientific, Rockford, EUA) e dispersas em 50 mL de tampão fosfato de pH 7,4, mantidas a 37 °C e agitadas com um agitador magnético a uma velocidade constante de ~100 rpm. Em intervalos de tempo determinados 15, 30min, 1, 2, 3, 4, 6, 12 e 24h, amostras de 700 µL foram retiradas e a mesma quantidade de meio fresco foi repostada. A DOX liberada foi quantificada por emissão de fluorescência (λ_{EX} = 485 nm; λ_{EM} = 580 nm). O perfil de liberação *in vitro* foi obtido correlacionando tempo (h) *versus* liberação de fármaco (%). Para comparação, a DOX pura foi testada. Para isso, a DOX na mesma concentração foi pesada e colocada dentro da membrana de diálise e a análise foi realizada conforme mencionado anteriormente (OSHIRO-JUNIOR et al., 2020).

4.6 Ensaio de citotoxicidade

A linhagem celular de câncer de mama MCF-7 foi cultivada em frascos com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo alta glicose (4,5 g/L) e suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% da mistura penicilina-estreptomicina, incubada em CO₂ a 5% a 37 °C até a monocamada celular estar confluenta (70%). As células foram então lavadas com

10 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) e tripsinizadas, adicionando 5 ml de ATV (*Association of Trypsin* (0,2%) e Versene (0,02%)). 100 μ L de suspensão celular (5×10^4 células/mL) foram semeados em placas de 96 poços e após 24 horas de incubação, o meio foi descartado e as células foram tratadas com uma suspensão de 100 μ L de DOX, CLN+DOX, CLN+AF+DOX, CLN-DOX e CLN-AF-DOX em três concentrações diferentes, 4,9 (0,5%), 9,2 (1%) e 46 μ M (5%). CLN+, CLN-, CLN+AF e CLN-AF foram utilizados como controle (OSHIRO-JUNIOR et al., 2020).

Após 24 horas, a atividade metabólica celular foi avaliada usando um ensaio de MTT (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (Sigma, São Paulo, SP, Brasil). Assim, o meio foi descartado e 10 μ L de solução de PBS contendo MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço e incubados a 37 °C. Finalmente, 100 μ L de DMSO foram adicionados em cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância no comprimento de onda dentro de um intervalo de 570-590 nm foi realizada no leitor de placas (FLUOstar Omega, BMG LABTECH).

Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e as comparações de amostras múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

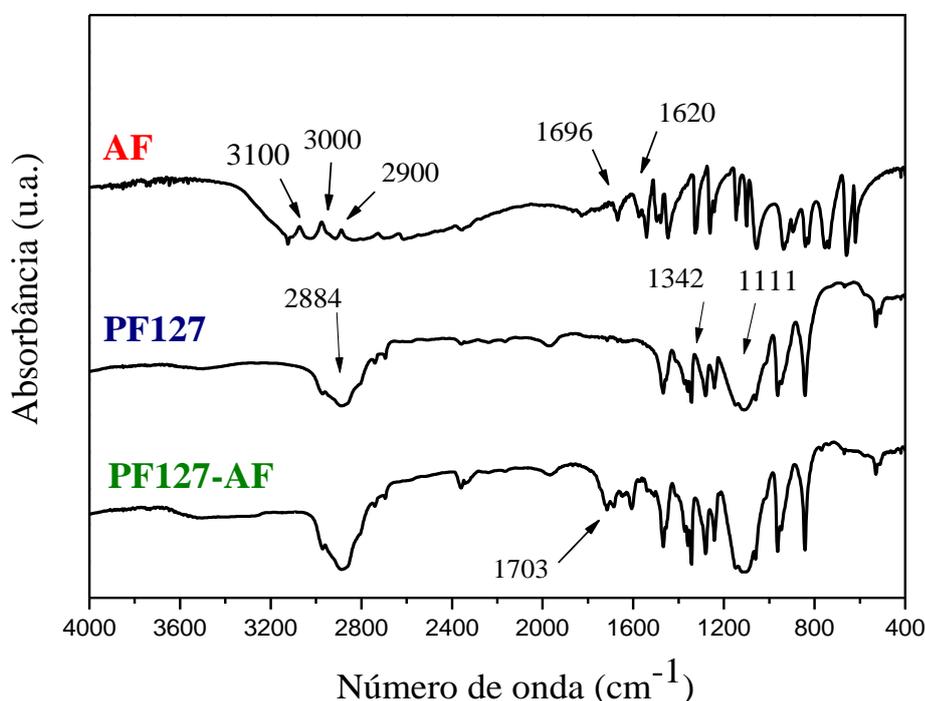
5 RESULTADOS

5.1 Espectrometria de infravermelho

Inicialmente houve a realização da síntese da molécula (PF127-AF), está sendo derivada das moléculas de ácido fólico (AF) e do polímero Pluronic® F127 (PF127).

Para garantir que as reações químicas entre as moléculas de AF e PF127 ocorreram, a técnica de FTIR foi realizada. A figura 7 apresenta os espectros contendo as bandas de absorção do AF, PF127 e da PF127-AF.

Figura 7 – Espectros de FTIR do Ácido fólico (AF), Pluronic F127 (PF-127) e da mistura de ácido fólico e Pluronic® F127 (PF127-AF).



Fonte: dados da pesquisa

AF puro apresentou bandas características em 1620 cm⁻¹ referentes ao grupo C=O, aquelas entre 3100 e 2900 cm⁻¹ são correspondentes às bandas de alongamento de hidroxila (OH) quelato da porção de ácido glutâmico e do grupo NH- do anel de pteridínico associado em amidas e CH₃ alifático, respectivamente. O pico de vibração de estiramento do CO aparece em 1696 cm⁻¹, enquanto a banda em 1607 cm⁻¹ se relaciona com o modo de flexão da vibração NH-. As bandas entre 1513 e 1485 cm⁻¹ são atribuídas à banda de absorção característica do

anel de fenila e pteridínico, respectivamente. Não há absorção entre 2600 e 2000 cm^{-1} . Quando o AF coexiste com o antraceno, pequenos desvios na posição do pico em relação AF puro ocorrem em 3411 , 1507 e 1487 cm^{-1} .

As bandas que representam o espectro de PF-127 é caracterizado por picos de absorção principais em 2884 cm^{-1} (C-H, trecho, alifático), 1342 cm^{-1} (no plano O-H) e 1111 cm^{-1} (trecho C-O).

O espectro do PF127-AF resultou em um pico característico do grupamento éster em 1703 cm^{-1} , que indica a interação entre os dois componentes ocorreu por reação de condensação conforme descrito na literatura (LI et al., 2015).

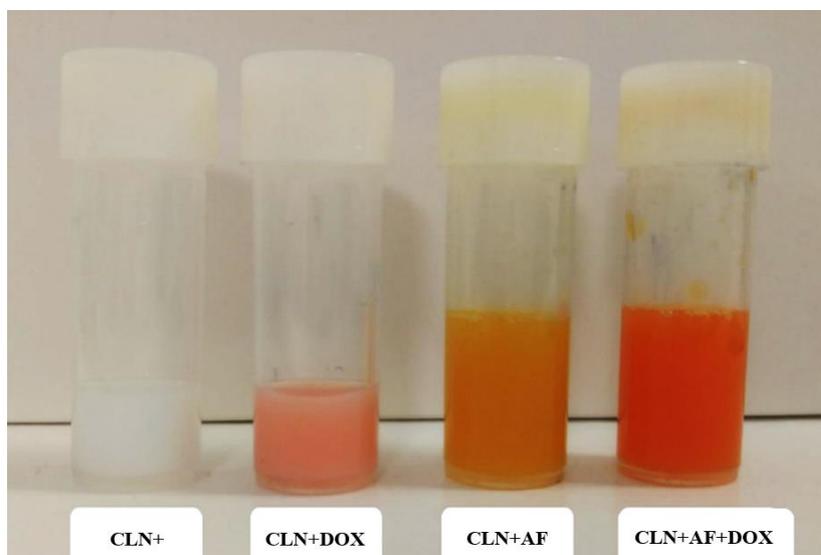
Todos os pontos da molécula do polímero foram mantidos.

5.2 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Após o estágio de síntese da nova molécula PF127-AF, os carreadores foram preparados utilizando metodologia que possibilita a transferência de tecnologia para fabricação industrial em grande escala.

A figura 8 revela as características visuais do CLN+, CLN+DOX, CLN+AF, CLN+AF+DOX.

Figura 8 – Imagem macroscópica do CLN+, CLN+DOX, CLN+AF, CLN+AF+DOX.



Fonte: dados da pesquisa.

Macroscopicamente, os CLNs obtidos apresentara-se homogêneos, com aspecto leitoso e de coloração variada de acordo com a presença ou ausência de IFA. Estas características podem ser visualizadas na Figura 8.

O CLN+ apresentou uma coloração branca/opaca devido a ausência de insumo farmacêutico com cor. O CLN+DOX apresentou uma coloração rosada, devido a coloração avermelhada do IFA. A presença do AF, pó cristalino, hidrofílico, laranja amarelado, inodoro conferiu uma coloração amarelada do sistema CLN (BANSAL et al., 2018). Enquanto, no CLN contendo DOX e AF a coloração visualizada foi alaranjada em virtude da mistura de AF (amarelo) e DOX (avermelhado). Contudo, todos os sistemas são homogêneos e, não possuem indicativos de processos de instabilidade como floculação, cremação ou coalescência. Odor característico. Todas essas características não sofreram alterações durante todo o tempo de armazenamento 180 dias.

Visando analisar a influência da ausência de brometo de cetrimônio na formulação, novos carreadores foram desenvolvidos e nomeados de CLN-, CLN-AF, CLN-AF-DOX e CLN-DOX. Estes CLNs- apresentaram características macroscópicas descritas para os CLNs+ (homogêneo, aspecto leitoso, coloração característica de acordo com ausência e presença de IFA, ausência de precipitado).

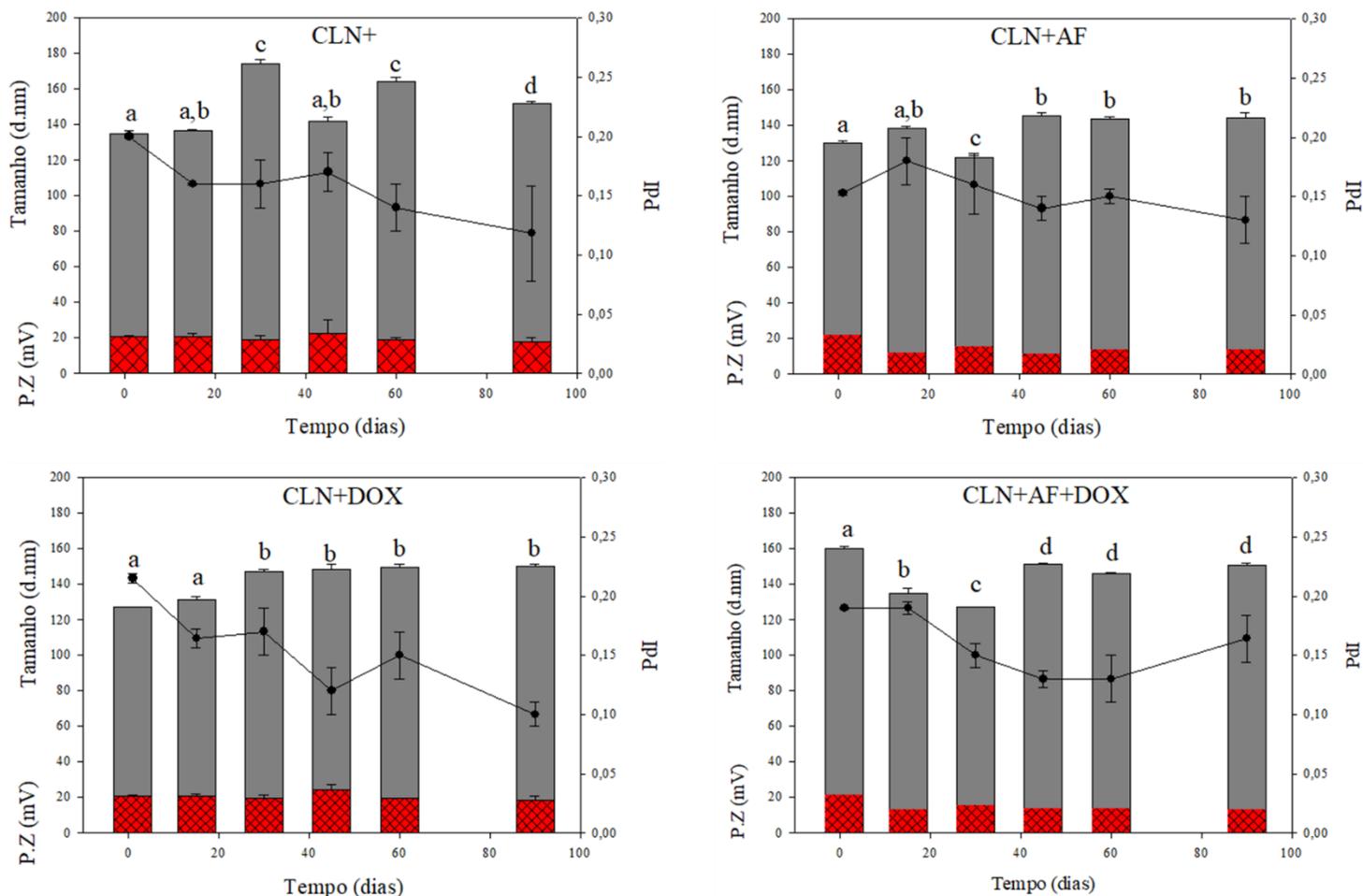
5.3 Caracterização físico-química dos CLNs

5.3.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta

Através da técnica de DLS foi observado tamanho médio das partículas, assim como o seu PDI e PZ.

A Figura 9 demonstra os resultados de diâmetro médio (d.nm), PZ e PDI para todos os CLNs desenvolvidos, durante 90 dias de estocagem.

Figura 9 – Resultados do diâmetro médio (barra cinza), do índice de polidispersão (linha contínua com ponto) e do potencial zeta (barra vermelha) dos CLN+, CLN+DOX, CLN+AF, e CLN+AF+DOX, determinados durante 90 dias de estocagem.



* Letras iguais indicam médias sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Fonte: dados da pesquisa.

De acordo com a figura 9 observa-se que, pelo período de 90 dias, os CLN apresentaram pequenas variações em relação ao diâmetro médio. Os resultados do dia 1 e do dia 90 foram: CLN+: 135 e 152 nm; CLN+DOX: 127 e 150 nm; CLN+AF: 130 e 144 nm; CLN+AF+DOX: 160 e 151 nm, respectivamente, apresentando diferença estatística. Contudo, os valores revelam estabilidade física e faixa de tamanho esperado para a nanopartícula desenvolvida (BAHARI; HAMISHEHKAR, 2016), e propício para administração endovenosa, onde sistemas entre 50 e 400 nm possuem capacidade de permeabilidade e retenção (EPR) aumentada no tecido tumoral, devido ao aumento das fenestrações capilares no local da doença (100-400 nm) (KANG et al., 2020), além de favorecer ao escape do sistema imune, nanopartículas contendo uma faixa de tamanho menor que 200 nm são furtivas ao reconhecimento de macrófagos, prolongando a

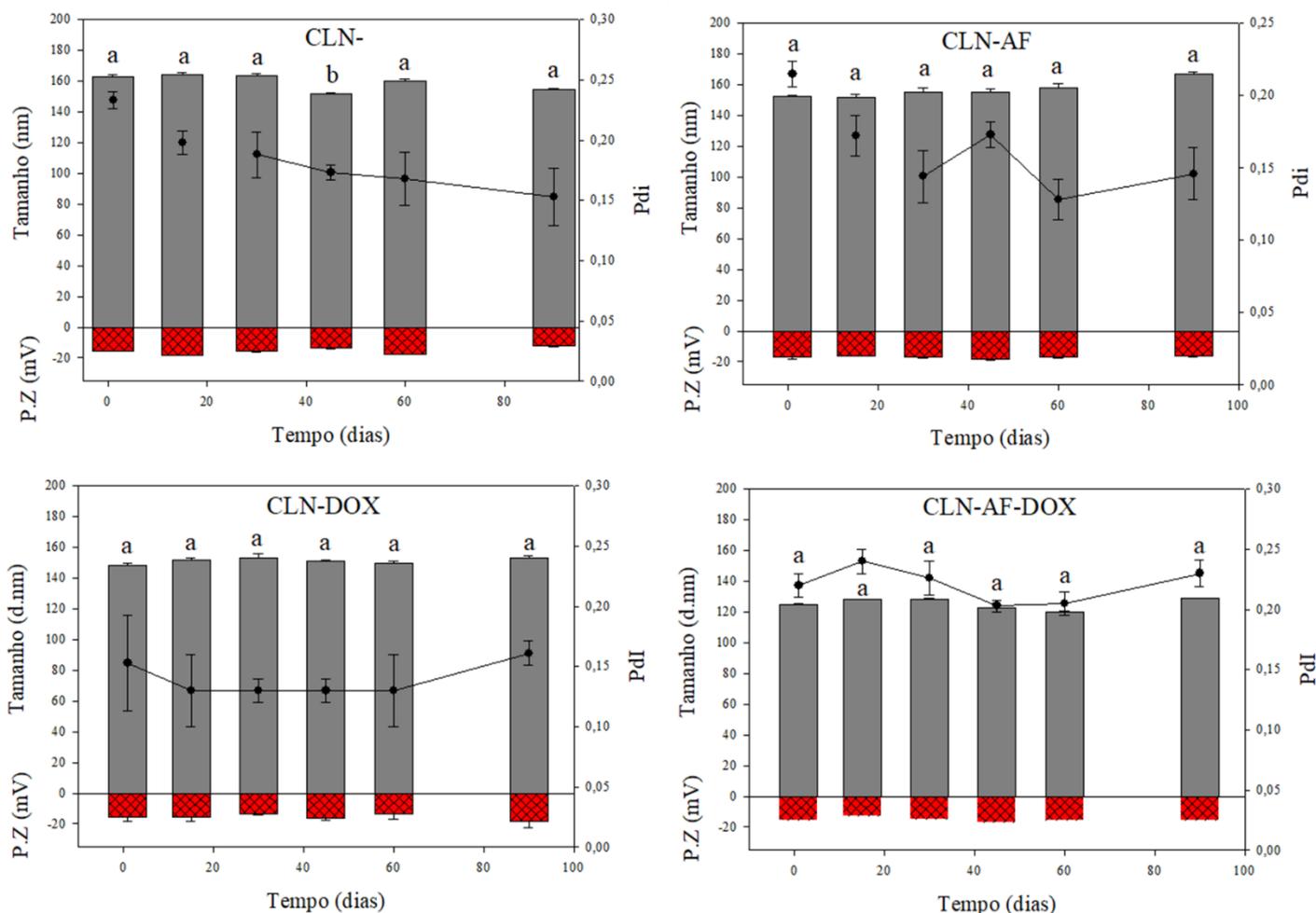
permanência no meio intravascular (DANAIEI et al., 2018). O baixo desvio de padrão, indica que os CLN são reprodutíveis.

Para os valores de PDI, a figura 9 demonstra que para CLN+, CLN+DOX, CLN+AF, e CLN+AF+DOX estes valores permaneceram menores ou iguais a 0,2, indicando baixa polidispersão dos CLN.

A análise de PZ representa a estabilidade física dos sistemas alterada de acordo com a repulsão eletrostática das cargas das partículas presentes na formulação. De acordo com a figura 9, os valores de PZ do dia 1 e do dia 90 foram: CLN+: 20,8 e 17,8 mV; CLN+DOX: 20,8 e 18,2 mV; CLN+AF: 22 e 13,5 mV; CLN+AF+DOX: 21 e 13,2 mV, respectivamente. O responsável por essa característica é o brometo de cetrimônio, o tensoativo amônio quaternário catiônico utilizado para a obtenção dos CLN.

A figura 10 demonstra os resultados de diâmetro médio (d.nm), PDI e PZ para todos os CLNs- desenvolvidos, durante 90 dias de estocagem.

Figura 10 – Resultados do diâmetro médio (barra cinza), do índice de polidispersão (linha contínua com ponto) e do potencial zeta (barra vermelha) dos CLN-, CLN-DOX, CLN-AF, e CLN-AF-DOX, determinados durante 90 dias de estocagem.



* Letras iguais indicam médias sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Fonte: dados da pesquisa.

De acordo com a figura 10, os resultados de diâmetro médio do dia 1 e do dia 90 foram: CLN-: 162 e 159 nm; CLN-DOX: 148 e 153 nm; CLN-AF: 152 e 166 nm; CLN-AF-DOX: 124 a 129 nm, respectivamente, não apresentando diferença estatística. Desse modo, permanecendo em uma faixa de tamanho desejado, apresentando pouca variação quando comparado a faixa de tamanho apresentado pelos CLN+ contendo a DOX.

Os valores de PDI permaneceram menores ou iguais a 0,2, indicando partículas com baixa polidispersividade na dispersão dos CLN. As análises de PZ apresentaram uma discrepante modificação, os valores do dia 1 e do dia 90 foram: CLN-: -15,3 e -12,2 mV; CLN-DOX: -15,2 e -18,5 mV; CLN-AF: -17 e -16,4 mV; CLN-AF-DOX: -15,4 e -15,4 mV, respectivamente. O responsável por essa característica é a ausência do brometo de cetrimônio,

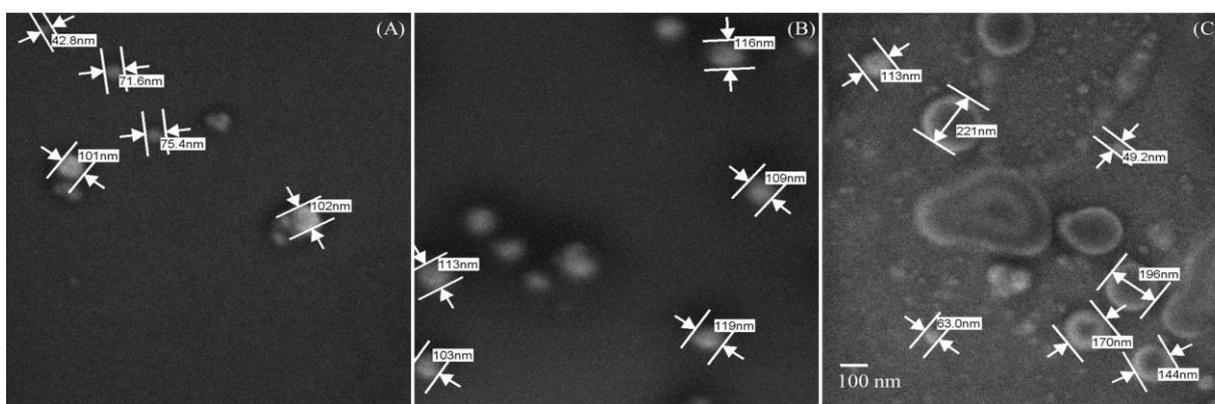
um composto amônio quaternário, que é uma pequena molécula conhecida como cátion lipofílico deslocalizado. Além disso, Pluronic F127[®] pertence a classe dos polímeros não-iônicos, possuindo grupamentos hidroxilas (-OH), os quais justificam os valores de PZ (HUANG, 2009).

5.3.2 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução

A técnica de microscopia eletrônica de varredura nos permite observar o tamanho médio das partículas da formulação, assim como a sua morfologia.

A Figura 11 apresenta as fotomicrografias de CLN+ (A), ALN+AF (B) e CLN+AF+DOX (C) verificados por MEV-FEG. Aumento 50,000x.

Figura 11 – Fotomicrografias de CLN (A), CLN+AF (B) e CLN+AF+DOX (C) verificados por MEV-FEG. Aumento 50,000 x.



Fonte: dados da pesquisa

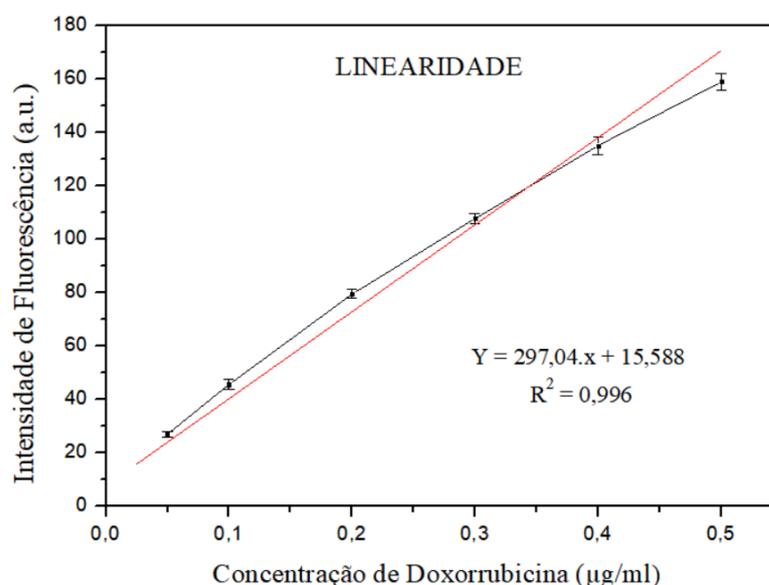
Na figura 11, é possível observar que a presença do componente AF não resultou em uma diferença significativa de tamanho quando comparamos com as imagens e dimensões do CLN (A), corroborando com os resultados já encontrados pela técnica de DLS. Entretanto, a presença do DOX, nesse estudo, mostrou algumas alterações estruturais. Também é possível observar uma morfologia esférica e com ausência de aglomerados. Possivelmente estas características foram atribuídas às cargas devido à utilização do tensoativo catiônicas BC, que favoreceram a repulsão eletrostática entre as partículas e assim, evitaram a formação de aglomerados.

5.3.3 Curva Analítica e Determinação de eficiência de encapsulação (EE)

A curva analítica foi desenvolvida para a quantificação da eficiência de encapsulação e liberação da DOX.

A figura 12 apresenta os dados da curva analítica da DOX utilizando concentração entre 0,05 até 0,5 µg/mL.

Figura 12 – Curva analítica da DOX utilizando concentração entre 0,05 até 0,5 µg/mL.



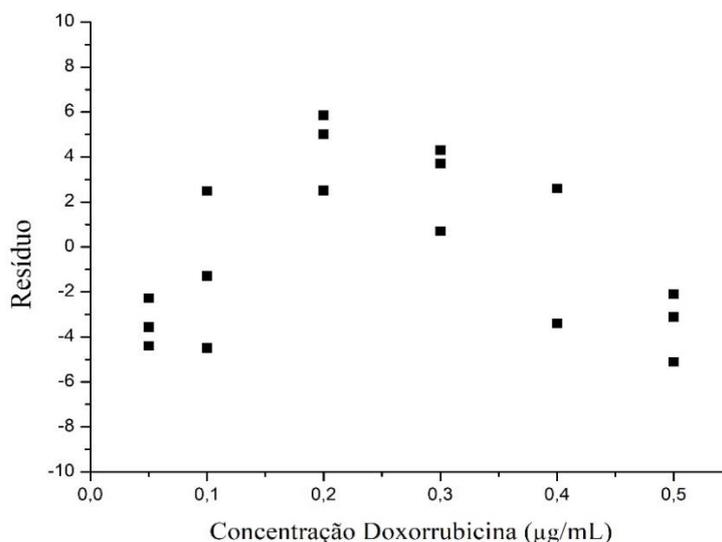
Fonte: dados da pesquisa

A equação da reta gerada foi $Y = 297,04x + 15,588$ e o coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,996 sendo, de acordo com a RDC N° 166, considerada linear e adequada para a quantificação das concentrações desconhecidas de DOX (BRASIL, 2017).

Os dados da curva analítica foram submetidos à análise de variância (falta de ajuste e significância da regressão) utilizando o teste F de Snedecor 5% com valor de $p < 0,05$ para avaliação do ajuste do modelo. Os resultados revelaram que neste modelo não houve falta de ajuste (falta de ajuste obtida = 17,31 < F tabelado 19,43) e apresentou significância da regressão (significância da regressão 2815,90 > F tabelado 245), validando o modelo dado pela equação da reta.

A figura 13 representa o gráfico de resíduo em relação ao cloridrato de doxorrubicina em µg/mL.

Figura 13 – Gráfico de resíduo em relação ao cloridrato de doxorrubicina em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$).



Fonte: dados da pesquisa.

O gráfico de resíduos (figura 13) possibilitou verificar o comportamento das variâncias dos dados na curva analítica em relação ao aumento da concentração, sendo este homocedásticos, com distribuição aleatórias, apresentando estrutura sistemática (PIMENTEL; NETO, 1996). Ademais, o Limite de detecção e o limite de quantificação foi determinado utilizando os parâmetros da curva analítica, sendo 0,0011 e 0,0033, respectivamente.

Sendo assim, os CLN+ e CLN- foram analisados após o processo de centrifugação e filtração, obtendo os resultados que revelaram que a EE da DOX no CLN+DOX, CNL+AF+DOX foi $79 \pm 2,37\%$. Enquanto, a EE para a DOX no CLN-DOX, CLN-AF-DOX alcançou um total de $102 \pm 2,94\%$, este fato deve ser possivelmente pela presença do segundo polímero (brometo de centrímônio ($[\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Br}$) que, associado ao PF127-AF estão no “shell/casca” do CLN+, e possivelmente, estejam aprisionando uma porcentagem das moléculas do cloridrato de doxorrubicina (altamente polar ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{ClNO}_{11}$)), impedindo de maneira estérica e eletrostática que os fótons de excitação em 485 nm interajam com os grupos cromóforos da DOX e emitam na intensidade de 580 nm, diminuindo assim a intensidade e consequentemente os valores de DOX detectados.

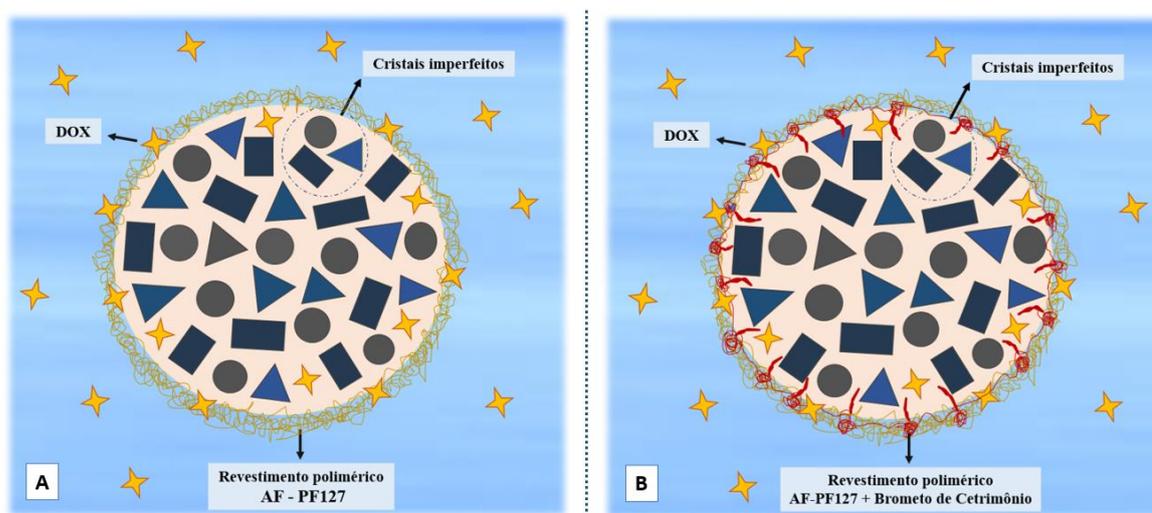
Desta forma, devido as características da DOX e do sistema, além dos procedimentos metodológicos terem sido realizados em triplicada e conferidos, hipotetizamos que 100% da DOX está presente na formulação CLN+, conforme verifica no CLN-, ainda que apenas ~80%

foi detectado. Outro ponto de sustentação desta teoria é, a solubilidade do cloridrato de doxorrubicina em meio aquoso é 10 mg/mL e no CLN temos 500 µg/mL ou 0,5 mg/mL, concentração inferior a saturação no meio aquoso.

Os resultados das características organoléticas (aspectos visuais), onde não foi observado a presença de precipitados, alteração de cor, ou separação de fases após a centrifugação corrobora com essa hipótese, descartando a possibilidade de alteração da molécula.

O modelo apresentado na figura 14 ilustra a distribuição espacial da DOX nos CLN- e CLN+.

Figura 14- Distribuição espacial da DOX nos CLN- e CLN+.



Fonte: própria

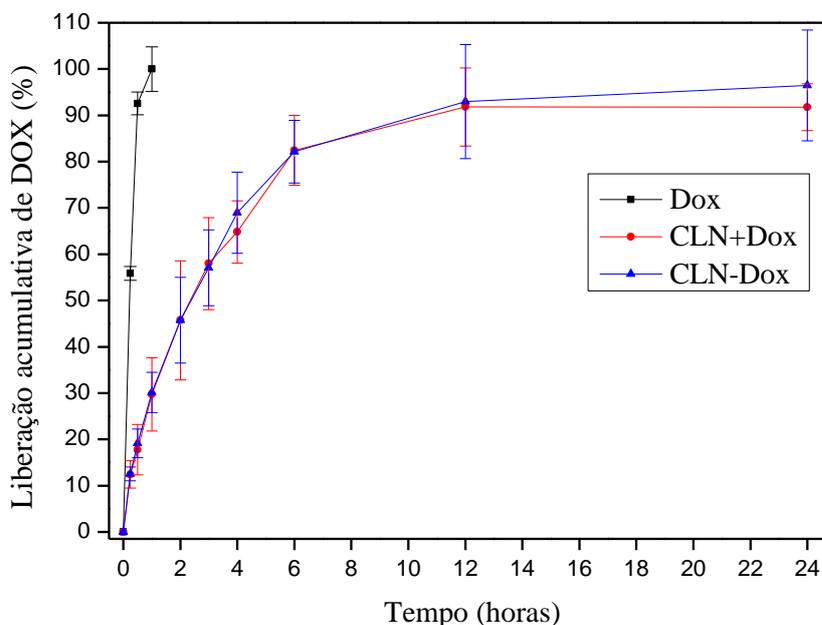
Na literatura, diferentes estudos, apresentam valores de EE em nanopartículas, lipossomas, nanodiscos, nanogéis e micelas é de 79%, 82%, 85%, 95%, 86%, respectivamente (DARGE et al., 2021; JIANG et al., 2020; MOHAMMADI; ARABI; ALIBOLANDI, 2020; TANG et al., 2018; THELU et al., 2018; YANG, 2020).

5.4 Estudo de liberação *in vitro*

Para o ensaio de liberação *in vitro* a DOX comercial foi utilizada como grupo controle, com o intuito de comparação entre os resultados obtidos em relação a liberação da mesma no CLN.

A figura 15 representa os resultados obtidos através do estudo de liberação *in vitro* da DOX e dos CLN+DOX e CLN-DOX.

Figura 15 – Ensaio de liberação *in vitro* da DOX e dos CLN+DOX e CLN-DOX.



Fonte: dados da pesquisa.

Por meio da figura 15, os resultados que assim como a DOX livre, os CLN+DOX e CLN-DOX sofreram um efeito de explosão inicial, apresentando cerca de 80% da liberação nas primeiras cinco horas e ficando próximo aos 95% após atingirem as 10 horas, se mantendo estáveis. Não houve diferença significativa entre os carreadores. A DOX livre apresentou 100% da liberação após 30 minutos, demonstrando que em relação a formulação convencional comercial, foi observado uma melhora na farmacocinética, prolongando a liberação da DOX.

Este perfil de liberação pode ser explicado pelo caráter hidrofílico da DOX, ou seja, uma grande concentração está dispersa molecularmente na fase aquosa, e uma porção menor está presente na interfase lipídio/shell polimérico e shell polimérico/fase aquosa. Fato este que, correlacionado com os resultados de EE, poderiam sugerir que 20% estão nessas interfases, ligados por forças atrativas como eletrostáticas e ligação de hidrogênio e ou aprisionados por impedimento estérico que prolonga a difusão da DOX para o meio de liberação.

Devido aos resultados entre CLN- e CLN+ possuírem a mesma taxa de liberação em função tempo, podemos induzir que, o possível maior impedimento estérico no CLN+ (2 polímeros) não influenciou de forma significativa na liberação.

5.5 Ensaio de citotoxicidade

A tabela 4 apresenta a viabilidade celular testada em modelo MCF-7 para diferentes concentrações de CLNs+, CLNs- e DOX controle positivo, assim como o resultado do teste estatístico. O estudo foi realizado em triplicata

Tabela 4 – Tabela quantitativa da média da viabilidade celular testada em modelo MCF-7 e as comparações de amostras múltiplas pelo método de Tukey para as diferentes concentrações de CLN+, CLN+DOX, CLN+AF, CLN+AF+DOX, CLN-, CLN-DOX, CLN-AF, CLN-AF-DOX e DOX controle positivo.

<i>Material</i>	<i>Média dos 3N</i>	<i>Teste estatístico</i>
<i>(Concentração em micro molar-DOX)</i>	<i>Viabilidade celular (%)</i>	
CLN+	10,54 ± 0,47	a
CLN+AF	11,21 ± 0,77	a
CLN+DOX 4.6	15,33 ± 0,69	a
CLN+DOX 9.2	12,84 ± 0,68	a
CLN+DOX 46	11,09 ± 0,93	a
CLN+AF+DOX 4.6	13,05 ± 0,87	a
CLN+AF+DOX 9.2	10,05 ± 0,54	a
CLN+AF+DOX 46	10,45 ± 0,69	a
CLN-	70,84 ± 0,48	b
CLN/AF -	73,01 ± 5,38	b
CLN-DOX 4.6	55,04 ± 5,40	b
CLN-DOX 9.2	36,81 ± 3,40	d
CLN-DOX 46	13,10 ± 0,54	a
CLN-AF-DOX 4.6	49,79 ± 0,87	c
CLN-AF-DOX 9.2	51,01 ± 5,57	c
CLN-AF-DOX 46	19,28 ± 0,49	a
DOX 46 Controle	46,07 ± 1,01	c, d
DMEM controle	96,36 ± 4,23	e

*Letras iguais indicam médias sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Fonte: dados da pesquisa.

Os Resultados para o CLN- e CLN-AF revelaram viabilidade celular de $70,84 \pm 0,48$ e $73,01 \pm 5,38$, respectivamente, não apresentando diferença estatística. Além disso, houve uma redução da viabilidade celular com a incorporação da DOX. Sendo que, uma tendência de morte celular em função da concentração foi observada de forma estatisticamente significativa para os CLN-DOX. As concentrações do CLN-DOX nas proporções 4,6 e 9,2 μM , não resultaram em diferença significativa em relação ao grupo controle DOX 46 μM ($46,07 \pm 1,01\%$). Contudo, quando na mesma concentração do grupo controle, os resultados revelaram de forma significativa menor viabilidade celular, atingindo $13,1 \pm 0,54$.

Para os CLN-AF, os resultados revelaram que nas concentrações de DOX 4,6 e 9,2 μM , estes não apresentam diferença significativa entre eles e com o controle DOX 46 μM . Contudo, quando a DOX incorporado no CLN-AF na concentração de 46 μM , os resultados demonstram que existe uma redução significativa em relação ao controle e estaticamente igual ao grupo dos CLN sem AF. Desta forma, podemos concluir que neste modelo o desenvolvimento dos CLN com a molécula PF127-AF não altera a viabilidade celular.

Os resultados de melhor atividade dos CLN-DOX e CLN-AF-DOX em relação ao DOX controle pode ser explicado pelas limitações do ponto de vista químico/biológico para ser transportada para o meio intracelular da célula (tamanho, caráter hidrofílico e carga superficial) e atingir o DNA no núcleo celular, assim as ligações e inativação da Topoisomerase I e II (principalmente mecanismo de ação) podem estar diminuídos neste caso, diferentemente da DOX encapsulada no CLN- ou CLN-AF. Os CLN por apresentarem um núcleo lipídico e um polímero anfifílico em sua superfície possui uma entrada celular (uptake) aumentada, fato comprovado em diferentes estudos na literatura por citometria de fluxo (ZHAO et al., 2013), como consequência, maior concentração da DOX está no meio intracelular, ocasionando maior citotoxicidade celular, como observado nos resultados.

Os CLN+ e CLN+AF independente da incorporação de DOX ou não, apresentaram viabilidade celular estatisticamente iguais, variando de $10,05 \pm 0,54$ e $15,33 \pm 0,69$, revelando que o brometo de cetrimônio (excipiente comum e diferente dos CLN-) influenciou na viabilidade celular, resultando em uma alta toxicidade para as células testadas (MCF-7). O estudo conduzido por Ito e colaboradores (2009) corrobora com esses dados. No estudo dos autores, ficou demonstrado que em concentrações acima de 100 μM o brometo é tóxico para células cancerígenas. O mecanismo de ação é baseado no aumento do cálcio citosólico, que provoca danos nos canais da membrana plasmática do retículo endoplasmático ou Ca^2 , como também, despolariza o potencial da membrana mitocondrial (marcador de células apoptóticas).

Sabendo disso, a alta toxicidade dos CLN+ se justifica devido a concentração de brometo cetrimônio adicionado (1150 μM), sendo que pelos resultados, não podemos apontar sinergismo ou melhora da atividade da DOX. Outro ponto importante é, o brometo de centrônio em sua formulação, um amônio quaternário conhecido por possuir propriedades quimiossensibilizantes capaz de burlar a resistência a múltiplas drogas. As cargas superficiais positivas, aumentam a penetração em barreiras hidrofóbicas do plasma e das membranas mitocondriais. Por sua vez, em resposta ao potencial transmembrana negativo, ocorre acumulação na mitocôndria e, conseqüentemente, a mitocôndriotoxicidade (ITO et al., 2009; TANG et al., 2020; WU et al., 2019). Todas as formulações desenvolvidas com o brometo revelaram atividade citotóxica aumentada em 10 vezes quando comparada ao grupo controle.

Entretanto, é interessante adotar os sistemas com AF, pois seu potencial de vetorização auxilia na resposta terapêutica. Apesar da carga positiva poder ser um potencial de vetorização, todavia, deve-se ter cautela na concentração de brometo de cetrimônio pois, em altas concentrações, pode lesar tecidos saudáveis. Em concentrações menores de brometo que as adotadas nesse estudo, a sobreposição de carga positiva em relação as negativas não foram possíveis, por esse fato está concentração foi estabelecida.

Segundo o Handbook de Excipientes Farmacêuticos (2009), este excipiente possui dose letal DL50 410 mg/kg, testado em modelo animal. Ademais, é utilizado na indústria farmacêutica e cosmética como excipiente antimicrobiano conservante, em diferentes formulações tais como em diferentes formulações tais como pomada dermatológica para queimaduras, colírios, spray antisséptico, xampus para dermatite seborreica, cremes, entre outros. desta forma, é seguro para administração. O database de excipientes do FDA demonstra que existem formulações para administrações por outras vias, incluindo a intramuscular, oral e endovenosa.

6. CONCLUSÃO

Com o presente trabalho foi possível determinar que a síntese da molécula PF127-AF foi realizada com eficiência e a partir disto, o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturado catiônicos e aniônicos, apresentando tamanho médio, PZ e características visualmente satisfatórias. O ensaio de liberação mostrou que, quando encapsulado nos CLN o efeito foi prolongado em relação a sua forma convencional. Contudo, os resultados de citotoxicidade celular, revelaram que, os carreadores catiônicos precisam ser reformulados devido à alta concentração de brometo, mas os carreadores aniônicos sem DOX não apresentaram efeito citotóxico e quando adicionado a DOX revelam citotoxicidade para a linhagem de células de câncer de mama MCF-7 melhores que os resultados da DOX comercial.

Portanto, os resultados obtidos permitem concluir que o CLN+ precisa de modificação na escolha do tensoativo catiônico e os resultados do CLN- possuem características que os apontam como potenciais candidatos ao estudos futuros *in vivo*.

7. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO

Durante o período de desenvolvimento deste trabalho, dois artigos científicos foram publicados e relacionados ao tema:

1- Artigo publicado no periódico *Current Pharmaceutical Design* (Qualis A3 e fator de impacto 2,430) “*Physicochemical characterization of bioactive compounds in nanocarriers*”, dos autores *Rafaella Moreno Barros, Máisa Soares Oliveira, Kammila Martins Nicolau, Mariana Rillo Sato, Karen Loraine Macena Santos, Bolivar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Maria Tereza Cuberes e João Augusto Oshiro Junior*. Ano 2020.

2- Artigo publicado no periódico *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (Qualis A1 e fator de impacto 2,894): “*Prospective application of phthalocyanines in the photodynamic therapy against microorganisms and tumor cells: a mini-review*” dos autores: *Karen Loraine Macena Santos, Rafaella Moreno Barros, Diego Paulo da Silva Lima, Adenia Mirela Alves, Mariana Rillo Sato, Ricardo Faccio, Bolivar Ponciano Goulart de Lima Damasceno e João Augusto Oshiro Junior*. Ano 2020.

REFERÊNCIAS

- AJORLOU, E.; KHOSROUSHAHI, A. Y. Trends on polymer- and lipid-based nanostructures for parenteral drug delivery to tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 79, n. 2, p. 251–265, 2017.
- AKRAM, M. et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 1–23, 2017.
- ALOMAIR, A. et al. Knowledge, attitude, and practice of breast self-examination toward breast cancer among female students at King Saud University in Riyadh, Saudi Arabia. **International Journal of Medicine in Developing Countries**, v. 4, n. January, p. 429–434, 2020.
- BAHARI, L. A. S.; HAMISHEHKAR, H. The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers; A comparative literature review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 2, p. 143–151, 2016.
- BAIG, M. S. et al. Development and evaluation of cationic nanostructured lipid carriers for ophthalmic drug delivery of besifloxacin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, n. December 2019, p. 101496, 2020.
- BANSAL, M. et al. **Chemopreventive Role of Dietary Phytochemicals in Colorectal Cancer**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 12
- BARENHOLZ, Y. C. Doxil ® — The first FDA-approved nano-drug : Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 117–134, 2012.
- BELOQUI, A. et al. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 143–161, 2016.
- BERTOLI, G.; CAVA, C.; CASTIGLIONI, I. Micrnas: New biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. **Theranostics**, v. 5, n. 10, p. 1122–1143, 2015.
- BESSONNEAU, V.; RUDEL, R. A. Mapping the human exposome to uncover the causes of breast cancer. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 1, p. 1–7, 2020.
- BI, D. et al. A comparative study of polydopamine modified and conventional chemical synthesis method in doxorubicin liposomes form the aspect of tumor targeted therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 559, n. 151, p. 76–85, 2019.
- BRASIL. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama. **Ministério da Saúde**, p. 38, 2018.
- BRASIL, M. DA S. DO. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial da União**, v. 2017, p. 1–21, 2017.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; RODRIGUES, D. C. **As bases farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12. ed. ed. Porto Alegre, RS: [s.n.].

CAGEL, M. et al. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 2, p. 270–281, 2017.

CARDOSO, F. et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 8, p. 1194–1220, 2019.

CARNEIRO, S. P. et al. Functionalized rifampicin-loaded nanostructured lipid carriers enhance macrophages uptake and antimycobacterial activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, n. December 2018, p. 306–313, 2019.

CZAJKOWSKA-KOŚNIK, A.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K. **Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems** **Pharmacological Reports**, 2019.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.

DEEPAK, P. et al. Nanostructured lipid carriers : A platform to lipophilic drug for oral bioavailability enhancement. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 3- s, p. 758–764, 2019.

DI, H. et al. Doxorubicin- and cisplatin-loaded nanostructured lipid carriers for breast cancer combination chemotherapy. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 12, p. 2038–2043, 2016.

DUAN, Y. et al. A brief review on solid lipid nanoparticles: Part and parcel of contemporary drug delivery systems. **RSC Advances**, v. 10, n. 45, p. 26777–26791, 2020.

ERDOĞAR, N.; AKKIN, S.; BILENSOY, E. Nanocapsules for Drug Delivery: An Updated Review of the Last Decade. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 12, n. 4, p. 252–266, 2019.

FANG, C.-L.; AL-SUWAYEH, S.; FANG, J.-Y. Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Drug Delivery and Targeting. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 41–55, 2013.

FENTAHUN DARGE, H. et al. Multifunctional drug-loaded micelles encapsulated in thermo-sensitive hydrogel for in vivo local cancer treatment: Synergistic effects of anti-vascular and immuno-chemotherapy. **Chemical Engineering Journal**, v. 406, n. September 2020, p. 126879, 2021.

FONG, Y. T.; CHEN, C. H.; CHEN, J. P. Intratumoral delivery of doxorubicin on folate-conjugated graphene oxide by in-situ forming thermo-sensitive hydrogel for breast cancer therapy. **Nanomaterials**, v. 7, n. 11, p. 1–24, 2017.

FRANCIES, F. Z. et al. Breast cancer in low-middle income countries: abnormality in splicing and lack of targeted treatment options. **American journal of cancer research**, v. 10, n. 5, p. 1568–1591, 2020.

GABA, B. et al. Nanostructured lipid (NLCs) carriers as a bioavailability enhancement tool for oral administration. **Drug Delivery**, v. 22, n. 6, p. 691–700, 2015.

GAO, X. et al. Hyaluronic acid-coated cationic nanostructured lipid carriers for oral vincristine sulfate delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 4, p. 661–667, 2017.

GINSBURG, O. et al. Breast cancer early detection: A phased approach to implementation. **Cancer**, v. 126, n. S10, p. 2379–2393, 2020.

GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E. **Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release**. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 133

HAIDER, M. et al. Nanostructured lipid carriers for delivery of chemotherapeutics: A review. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, 2020.

HARBECK, N. et al. **Breast cancer**. [s.l.: s.n.]. v. 5

HE, Z. et al. A review on methods for diagnosis of breast cancer cells and tissues. **Cell Proliferation**, v. 53, n. 7, p. 1–16, 2020.

HUANG, R. et al. Cell penetrating peptides functionalized gambogic acid-nanostructured lipid carrier for cancer treatment. **Drug Delivery**, v. 25, n. 1, p. 757–765, 2018.

HUPFFER, H. M.; LAZZARETTI, L. L. Nanotecnologia E Sua Regulamentação No Brasil. **Revista Gestão e Desenvolvimento**, v. 16, n. 3, p. 153, 2019.

IOELE, G. et al. Photosensitive drugs: a review on their photoprotection by liposomes and cyclodextrins. **Drug Delivery**, v. 24, n. 0, p. 33–44, 2017.

IQBAL, M. A. et al. Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. **Journal of Drug Targeting**, v. 20, n. 10, p. 813–830, 2012.

ITO, E. et al. Potential use of cetrimonium bromide as an apoptosis-promoting anticancer agent for head and neck cancer. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 5, p. 969–983, 2009.

IWASAKI, T. et al. Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface. **Peptides**, v. 30, n. 4, p. 660–668, 2009.

JEEVANANDAM, J. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1050–1074, 2018.

JIANG, T. et al. Doxorubicin Encapsulated in TPGS-Modified 2D-Nanodisks Overcomes Multidrug Resistance. **Chemistry - A European Journal**, v. 26, n. 11, p. 2470–2477, 2020.

KANG, H. et al. Size-Dependent EPR Effect of Polymeric Nanoparticles on Tumor Targeting. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9, n. 1, p. 8–15, 2020.

KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, n. April, p. 598–613, 2018.

KOTHARI, C.; DIORIO, C.; DUROCHER, F. The importance of breast adipose tissue in breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 1–33, 2020.

KUMAR, B. et al. Normal breast-derived epithelial cells with luminal and intrinsic subtype-enriched gene expression document interindividual differences in their differentiation Cascade. **Cancer Research**, v. 78, n. 17, p. 5107–5123, 2018.

LI, Z. et al. pH-sensitive nanoparticles of poly(L-histidine)-poly(lactide-co-glycolide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate for anti-tumor drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 11, n. 1, p. 137–150, 2015.

LIANG, Y. et al. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**, v. 60, n. August, p. 14–27, 2020.

LINGAYAT, V. J.; ZAREKAR, N. S.; SHENDGE, R. S. Solid lipid nanoparticles- A review. **Nanoscience and Nanotechnology Research**, v. 4, n. 2, p. 67–72, 2017.

LIU, S.; LÄMMERHOFER, M. **Functionalized gold nanoparticles for sample preparation: A review**. [s.l: s.n.]. v. 40

LIYANAGE, P. Y. et al. Nanoparticle-mediated targeted drug delivery for breast cancer treatment. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1871, n. 2, p. 419–433, 2019.

LOVITT, C. J.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2018.

LUO, R. et al. Distinct biodistribution of doxorubicin and the altered dispositions mediated by different liposomal formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1–2, p. 1–10, 2017.

LYMAN, G. H. et al. Integrative therapies during and after breast cancer treatment: ASCO endorsement of the SIO clinical practice guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 25, p. 2647–2655, 2018.

MACHADO, F. C. et al. Effect of curcumin-nanoemulsion associated with photodynamic therapy in breast adenocarcinoma cell line. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 9, p. 1882–1890, 2019.

MAJA, L.; ŽELJKO, K.; MATEJA, P. Sustainable technologies for liposome preparation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 165, p. 1–17, 2020.

MIKOLAJCZYK, A. et al. Release of doxorubicin from its liposomal coating via high intensity ultrasound. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 11, n. 5, p. 483–487, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil**. Brasília: [s.n.].

- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia. **Ministério Da Saúde**, v. 1, p. 356, 2014.
- MITRY, M. A.; EDWARDS, J. G. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. **IJC Heart and Vasculature**, v. 10, p. 17–24, 2016.
- MOHAMMADI, M.; ARABI, L.; ALIBOLANDI, M. Doxorubicin-loaded composite nanogels for cancer treatment. **Journal of Controlled Release**, v. 328, n. May, p. 171–191, 2020.
- MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 11, p. 151–164, 2019.
- MORAES, S. et al. Targeted nanostructured lipid carriers for doxorubicin oral delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, n. May 2020, p. 120029, 2021.
- NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 3, p. 305–313, 2015.
- O'DAY, E.; LAL, A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 2, 2010.
- OLIVEIRA, A. L. R. et al. Risk Factors and Prevention of Breast Cancer. **Propostas, Recursos e Resultados nas Ciências da Saúde** 4, v. 02, p. 67–78, 2019.
- ONU. **World Cancer Report for cancer prevention Cancer research**. Lyon: [s.n.]. v. 199
- ORMAN, A. et al. Breast Cancer: A Lifestyle Medicine Approach. **American Journal of Lifestyle Medicine**, v. 14, n. 5, p. 483–494, 2020.
- OSHIRO-JUNIOR, J. A. et al. Phthalocyanine-loaded nanostructured lipid carriers functionalized with folic acid for photodynamic therapy. **Materials Science and Engineering C**, v. 108, n. October 2019, p. 110462, 2020.
- PASHAYAN, N. et al. Personalized early detection and prevention of breast cancer: ENVISION consensus statement. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 11, p. 687–705, 2020.
- PATIL, T. S.; DESHPANDE, A. S. Nanostructured lipid carriers-based drug delivery for treating various lung diseases: A State-of-the-Art Review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1–2, p. 209–225, 2018.
- PERÁN, M. et al. Functionalized nanostructures with application in regenerative medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3847–3886, 2012.
- PIMENTEL, M. F.; NETO, B. DE B. Calibração: Uma Revisão Para Químicos Analíticos. **Química Nova**, 1996.

POONIA, N. et al. Resveratrol loaded functionalized nanostructured lipid carriers for breast cancer targeting: Systematic development, characterization and pharmacokinetic evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, n. June, p. 756–766, 2019.

PUGAZHENDHI, A. et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. **Life Sciences**, v. 200, n. 2017, p. 26–30, 2018a.

PUGAZHENDHI, A. et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. **Life Sciences**, n. 2017, p. 1–23, 2018b.

RAJALAKSHMI, G.; DHANAPAL, C. K.; SUNDHARARAJAN, R. An Insight to Nanostructured Lipid Carrier System. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics Open**, v. 10, p. 173–182, 2020.

RAMESHKUMAR, P.; RAMARAJ, R. Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional applications en Biomedical Sciences. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1005–1010, 2013.

RAYMOND C ROWE, PAUL J SHESKEY, M. E. Q. Handbook os Pharmaceutical Excipients. **Alpha**, n. 6, p. 257–262, 2015.

RIGGIO, A. I.; VARLEY, K. E.; WELM, A. L. The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer. **British Journal of Cancer**, n. October, p. 13, 2020.

RUSSELL, L. M.; HULTZ, M.; SEARSON, P. C. Leakage kinetics of the liposomal chemotherapeutic agent Doxil : The role of dissolution , protonation , and passive transport , and implications for mechanism of action. **Journal of Controlled Release**, v. 269, n. October 2017, p. 171–176, 2018.

SABZICHI, M. et al. Vitamin D-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (NLC): A New Strategy for Enhancing Efficacy of Doxorubicin in Breast Cancer Treatment. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 6, p. 840–848, 2017.

SALVI, V. R.; PAWAR, P. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, n. 990, p. 255–267, 2019.

SATO, M. R. et al. AU r o f t o n o i t a c i l b u p. p. 1–13, 2017.

SAWICKI, K. T. et al. Preventing and Treating Anthracycline Cardiotoxicity : New Insights. 2021.

SELVAMUTHUKUMAR, S.; VELMURUGAN, R. Nanostructured Lipid Carriers: A potential drug carrier for cancer chemotherapy. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2012.

SHAFEI, A. et al. A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. September, p. 1209–1218, 2017.

- SHAMS-WHITE, M. M. et al. Fund / American Institute for Cancer Research (WCRF / AICR) Cancer Prevention Recommendations : A Standardized Scoring System. **Nutrients**, v. 11, n. 7, 2019.
- SHARMA, A.; BALDI, A. Nanostructured Lipid Carriers : A Review Journal of Developing Drugs. **Journal of Developing Drugs**, v. 7, n. 2, p. 1–12, 2018.
- SHIRZADI, S. et al. Perceived barriers to mammography adoption among women in Iran: A qualitative study. **Korean Journal of Family Medicine**, v. 41, n. 1, p. 20–27, 2020.
- SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. ed. Rio de Janeiro-RJ: [s.n.].
- SINGH, S. K. et al. Glycol chitosan functionalized asenapine nanostructured lipid carriers for targeted brain delivery: Pharmacokinetic and teratogenic assessment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 1092–1100, 2018.
- SO-YEON PARK; JANG-HYUN CHOI; JEONG-SEOK, N. Targeting Cancer Stem Cells in Triple-Negative Breast Cancer. **MDPI**, v. 11, p. 1–30, 2019.
- SUN, Y. S. et al. Risk factors and preventions of breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 2017.
- TANG, J. et al. Nucleosome-inspired nanocarrier obtains encapsulation efficiency enhancement and side effects reduction in chemotherapy by using fullerenol assembled with doxorubicin. **Biomaterials**, v. 167, p. 205–215, 2018.
- TANG, M. et al. Cetyltrimethylammonium chloride-loaded mesoporous silica nanoparticles as a mitochondrion-targeting agent for tumor therapy. **RSC Advances**, v. 10, n. 29, p. 17050–17057, 2020.
- TAPEINOS, C.; BATTAGLINI, M.; CIOFANI, G. Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 264, n. August, p. 306–332, 2017.
- THELU, H. V. P. et al. Size controllable DNA nanogels from the self-assembly of DNA nanostructures through multivalent host-guest interactions. **Nanoscale**, v. 10, n. 1, p. 222–230, 2018.
- THOMAS L. LEMKE, D. A. W. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 7th ed. ed. Philadelphia, PA: [s.n.].
- THORN, C. F. et al. Doxorubicin pathways : pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 21, n. ii, p. 440–446, 2011.
- UCAR, E. et al. Synthesis, characterization and radiolabeling of folic acid modified nanostructured lipid carriers as a contrast agent and drug delivery system. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 119, n. September 2016, p. 72–79, 2017.
- UTSUMI, T. et al. Negative progesterone receptor status correlates with increased risk of breast cancer recurrence in luminal B HER2-positive and -negative subtypes. **Advanced**

Publication by J-STAGE, p. 1–6, 2020.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 321, n. 3, p. 288–300, 2019.

WANG, L. Early diagnosis of breast cancer. **Sensors (Switzerland)**, v. 17, n. 7, 2017.

WU, T. K. et al. Cetrimonium Bromide Inhibits Cell Migration and Invasion of Human Hepatic SK-HEP-1 Cells through Modulating the Canonical and Non-canonical TGF- β Signaling Pathways. **Anticancer Research**, v. 39, n. 7, p. 3621–3631, 2019.

WU, Y. P. et al. Folate-Conjugated Halloysite Nanotubes, an Efficient Drug Carrier, Deliver Doxorubicin for Targeted Therapy of Breast Cancer. **ACS Applied Nano Materials**, v. 1, n. 2, p. 595–608, 2018.

YANG, B. Preclinical study of Doxorubicine-loaded liposomal drug delivery for the treatment of head and neck cancer: Optimization by Box-Behnken statistical design. **Acta Biochimica Polonica**, v. 67, n. 2, p. 149–155, 2020.

YOU, J. et al. A review of amino-functionalized magnetic nanoparticles for water treatment: Features and prospects. **Journal of Cleaner Production**, v. 281, p. 124668, 2021.

ZAGORAC, I. et al. Correlation of folate receptor alpha expression with clinicopathological parameters and outcome in triple negative breast cancer. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 48, 2020.

ZHAO, Y. et al. A simple way to enhance Doxil® therapy: Drug release from liposomes at the tumor site by amphiphilic block copolymer. **Journal of Controlled Release**, v. 168, n. 1, p. 61–69, 2013.