



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SIMONE RAMOS DE CASTRO

DESENVOLVIMENTO DE UM HIDROGEL PARA LIBERAÇÃO
DE ANESTÉSICO E ANTINEOPLÁSICOS ENCAPSULADOS EM
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA
TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA

DEVELOPMENT OF A HYDROGEL FOR RELEASE OF
ANESTHETIC AND ANTINEOPLASTIC ENCAPSULATED IN
NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS FOR BREAST CANCER
TREATMENT

CAMPINAS

2021

SIMONE RAMOS DE CASTRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM HIDROGEL PARA LIBERAÇÃO DE
ANESTÉSICO E ANTINEOPLÁSICOS ENCAPSULADOS EM
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA
TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA**

**DEVELOPMENT OF A HYDROGEL FOR RELEASE OF ANESTHETIC
AND ANTINEOPLASTIC ENCAPSULATED IN NANOSTRUCTURED
LIPID CARRIERS FOR BREAST CANCER TREATMENT**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutora em Biologia
Funcional e Molecular, na Área de
Bioquímica.*

*Thesis submitted to the Institute of Biology,
University of Campinas in fulfillment of the
requirements for the degree of Doctor in
Functional and Molecular Biology, in the area
of Biochemistry.*

Orientadora: PROFA. DRA. LÍGIA NUNES DE MORAIS RIBEIRO

Coorientadora: PROFA. DRA. ENEIDA DE PAULA

ESTE ARQUIVO VIRTUAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA SIMONE RAMOS DE CASTRO, E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LÍGIA
NUNES DE MORAIS RIBEIRO

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C279d Castro, Simone Ramos de, 1986-
Desenvolvimento de um hidrogel para liberação de anestésico e antineoplásicos encapsulados em carreadores lipídicos nanoestruturados para tratamento de câncer de mama / Simone Ramos de Castro. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Lígia Nunes de Moraes Ribeiro.

Coorientador: Eneida de Paula.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Doxorrubicina. 2. Ciclofosfamida. 3. Nanopartículas. 4. Agentes antineoplásicos. 5. Mamas - Câncer. I. Ribeiro, Lígia Nunes de Moraes, 1986-. II. Paula, Eneida de, 1963-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of a hydrogel for release of anesthetic and antineoplastics encapsulated in nanostructured lipid carriers for the treatment of breast cancer

Palavras-chave em inglês:

Doxorubicin

Cyclophosphamide

Nanoparticles

Antineoplastic agents

Breast - Cancer

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Lígia Nunes de Moraes Ribeiro [Orientador]

Giovana Maria Fioramonti Calixto Balian

Thaise Gonçalves de Araújo

Estefânia Vangelie Ramos Campos

Selma do Nascimento Silva

Data de defesa: 17-12-2021

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-9427-5328>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0222092685770651>

Campinas, 17 de dezembro de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Lígia Nunes de Moraes Ribeiro

Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

Dra. Estefânia Vangelie Ramos Campos

Dra. Selma do Nascimento Silva

Dra. Giovana Maria Fioramonti Calixto Balian

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular da Unidade Instituto de Biologia.

"Dedico este trabalho as professoras Dra. Eneida e Dra. Lígia, sem a dedicação, apoio e o estímulo de vocês eu jamais teria concluído esse projeto".

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

À minha família por acreditar, apoiar e confiar nos meus sonhos. Um agradecimento especial a minha, és um exemplo de amor, honestidade, trabalho e determinação, é por seu incentivo, apoio e compreensão que esta conquista foi possível.

Ao professor Dr. Marcelo Bispo e a sua ex-aluna Samara, pela ajuda nos testes de citotoxicidade e por colocar à disposição seu laboratório.

Ao professor Wagner Favaro as suas alunas Bianca e Ianny, pela ajuda nos testes e por colocar à disposição seu laboratório.

Aos meus companheiros de trabalho Ludmilla Moura, Juliana, Fernando, Gustavo e Priscila, vocês tornaram meus dias mais leves e a longa caminhada menos cansativa.

A aluna de mestrado Talita Cesarim, que foi tudo pra mim nos meus momentos de dificuldade, ajudando em inúmeros experimentos, sem o seu apoio tudo que realizei durante o doutorado não seria possível.

A minha orientadora Dra. Lígia, que além de me orientar se tornou uma amiga, você é uma pessoa que nasceu para brilhar, sua dedicação, determinação e profissionalismo a tornaram essa excelente profissional. Obrigada pelo apoio incansável, compreensão e carinho.

Especialmente à minha coorientadora Profa. Dra. Eneida de Paula, que me acolheu em seu laboratório e me confiou projetos importantes. Profa. Eneida, obrigada pelas incontáveis horas de dedicação, por todo conhecimento que você compartilhou comigo, pelo apoio e por todas as oportunidades que você me proporcionou, nenhuma palavra seria capaz de descrever minha gratidão e admiração por você.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - processo 2019/17784-0 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro a esse projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. O câncer de mama é o mais frequente nas mulheres, tornando-se um importante problema de saúde pública. Suas características patológicas são altamente heterogêneas. O tratamento quimioterápico é a terapia farmacológica padrão-ouro. No entanto, tem efeitos colaterais muito danosos à mulher, como náuseas, diminuição da libido, alopecia, menopausa, infertilidade, aumento de peso e diminuição da lubrificação vaginal. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um hidrogéis contendo DOX_{BASE} ou DOX_{AO} (formas anidra) e CFM (antineoplásicos) encapsulados em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) para o tratamento de câncer de mama. As nanopartículas contendo DOX_{BASE} ou DOX_{AO} (formas anidra) e CFM encapsulados foram obtidas pelo método de emulsificação-sonicação, com a matriz lipídica composta pelos lipídios naturais manteiga de ucuuba e óleo de copaíba, estabilizadas pelo surfactante poloxamer F68. A caracterização físico-química evidenciou partículas com tamanho < 250 nm, baixa polidispersão (PDI < 0,2), potencial zeta negativo (ZP > -20 mV), *ca.* na faixa de 10¹³ CLN/mL e pH de ~3,6 e 7,8. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) determinou sua morfologia esférica. A taxa de eficiência de encapsulação foi superior a 90 % para DOX_{BASE} ou DOX_{AO} e cerca de 30 % CFM. Além disso, os CLN mostraram-se estáveis por 12 meses armazenados a 25 e 4 °C. No estudo *in vitro* de liberação, os CLN prolongaram o tempo de liberação de DOX_{BASE}/DOX_{AO} e CFM por mais de 24 h e 12 h, respectivamente. O ensaio de viabilidade celular em células tumorais (MCF7) demonstrou a potencialização do efeito de ambos os antineoplásicos, evidenciada pela significativa redução da viabilidade celular das células neoplásicas ao longo de 7 dias de tratamento, sendo mais acentuada nas primeiras 72 h de tratamento, corroborando com os resultados do teste *in vitro* de liberação. A formulação CLN_{DOXBASE/CFM} foi então incorporada em uma matriz de poloxamer PL 407. O hidrogel resultante apresentou propriedades reológicas desejáveis. Ensaio preliminares da atividade antineoplásica dos hidrogéis em tumores intra-mamários de ratas confirmaram que os antineoplásicos DOX e CFM encapsulados em CLN e incorporados em hidrogel de poloxamer geraram um sistema inovador que atuou na potencialização da atividade antineoplásica e na redução da toxicidade local dos fármacos.

Palavras-chaves: doxorrubicina, ciclofosfamida, nanopartículas, antineoplásicos, câncer de mama.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of mortality worldwide. Breast cancer is the most frequent in women, making it an important public health problem. Its pathological features are highly heterogeneous. Chemotherapy is the gold standard drug therapy. However, it has very harmful side effects for women, such as nausea, decreased libido, alopecia, menopause, infertility, weight gain and decreased vaginal lubrication. Therefore, this work aimed to develop hydrogels containing DOX_{BASE} or DOX_{AO} (anhydrous forms) and CFM (antineoplastics) encapsulated in nanostructured lipid carriers (NLC) for the breast cancer treatment. The nanoparticles containing DOX_{BASE} or DOX_{AO} (anhydrous forms) and CFM were obtained by the emulsification-sonication method, with the lipid matrix composed of the ucuuba butter and copaiba oil natural lipids, stabilized by the surfactant poloxamer F68. The physicochemical characterization provided particles with size < 250 nm, low polydispersity (PDI < 0.2), negative zeta potential (ZP > -20 mV), *ca.* in the range of 10¹³ CLN/mL and pH of ~3.6 and 7.8. Transmission electron microscopy (TEM) determined its spherical morphology. The encapsulation efficiency rate was over 90 % for DOX_{BASE} or DOX_{AO}, and around 30 % CFM. In addition, NLC were stable for 12 months, stored at 25 °C and 4 °C. In the *in vitro* release study, NLC prolonged the release of DOX_{BASE}/DOX_{AO} and CFM for more than 24 h and 12 h, respectively. The cell viability assay in tumor cells (MCF7) demonstrated the potentiation of the effect of both antineoplastic, evidenced by the significant reduction in the cell viability of cancer cells over 7 days of treatment. It was more pronounced in the first 72 h of treatment, corroborating with the results of the *in vitro* release test. Then, NLC_{DOXBASE/CFM} formulation was incorporated in a poloxamer PL 407 matrix. The resultant hydrogel exhibited desirable rheological properties. Preliminary assays of antineoplastic activity in intramammary tumors of rats confirmed that the antineoplastic DOX and CFM loaded NLC and incorporated in poloxamer hydrogel is an innovative system that acted in the antineoplastic activity increase and in the reduction of the local toxicity of drugs.

Keywords: doxorubicin, cyclophosphamide, nanoparticles, antineoplastic, breast cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura molecular de doxorubicina (DOX).	19
Figura 2: Estrutura molecular de ciclofosfamida (CFM).	20
Figura 3: Representação esquemática dos dois diferentes tipos de nanopartículas lipídicas (SLN e CLN) carreadoras de fármacos.....	21
Figura 4: Estrutura postulada do conjugado iônico doxorubicina e ácido oleico (DOX _{OA})...26	
Figura 5: Administração <i>in vivo</i> das formulações após a instalação bem sucedida do tumor..36	
Figura 6: Cromatograma com as áreas dos picos de DOX-HCL (4,79 min) e CFM (7,69 min)	37
Figura 7: Curva analítica média de DOX-HCl (A) e CFM (B), na faixa de concentração de 2 - 150 μ M (DOX-HCl) e 0,5 - 4 mM (CFM), respectivamente.....	38
Figura 8: Curva analítica obtida para DOX _{BASE} /DOX _{AO} no intervalo de concentração de 1 a 20 μ M (excitação de 490 nm e emissão de 580 nm).....	40
Figura 9: Resultados das análises de tamanho de partícula médio (A) e PDI (B) dos CLN nas temperaturas de armazenamento (4 °C e 25 °C).....	42
Figura 10: Resultados das análises do potencial zeta (A) e pH (B) dos CLN nas temperaturas de armazenamento (4 °C e 25 °C).	43
Figura 11: Encapsulação de CLN _{DOXBASE/CFM} e CLN _{DOXAO/CFM}	45
Figura 12: Micrografia dos CLN _{CONTROLE} (A, B), CLN _{DOXBASE/CFM} (C e D) e CLN _{DOXAO/CFM} (E e F), em duas diferentes ampliações: 60.000x (A, C e E) e 100.000x (C, D e F), obtidas a 60 kV.....	46
Figura 13: Cinética <i>in vitro</i> de liberação de DOX-HCl e CFM em solução aquosa e encapsulada em CLN (CLN _{DOXBASE/CFM} e CLN _{DOXAO/CFM}), em tampão PBS pH 7,4; n=6.	48
Figura 14: Avaliação da citotoxicidade de DOX/CFM livre e encapsuladas em CLN sobre células MCF7 após tratamento por 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias, pelo método de Alamar Blue. DOX/CFC _{livre} (A), CLN _{controle} (B), CLN _{DOXBASE/CFC} (C) e CLN _{DOXAO/CFC} (D).....	51
Figura 15: Foto digital dos hidrogéis de poloxamers contendo DOX/CFM livres e encapsulados nos CLN.....	52

Figura 16: Temperatura de Transição sol-gel (Tgel) das formulações de Poloxamer 407 a 25 %, em função a variação de temperatura. (A, B, C, D). Formulações de PL ₄₀₇ CONTROLE 25 % (A), PL407 25 % + CLN _{CONTROLE} (B), PL407 25 % + CLN _{DOXBASE+CFM} (C) e PL407 25 % + CLN _{DOXAO+CFM} (C).....	54
Figura 17: Variação da viscosidade dos hidrogéis em função da temperatura.....	55
Figura 18: Valores de modulo elástico (G') (A) e modulo viscoso (G'') (B) em função da variação de frequência de 0,1-10Hz, temperatura de 32,5 °C.....	56
Figura 19: Razão de inibição do crescimento tumoral (IR) após administração intraperitoneal de PL 407 25 % + DOX/CFM _{livre} , CLN _{DOXBASE/CFM} e PL 407 25 % + CLN _{DOXBASE/CFM}	58
Figura 20: Local de aplicação intraperitoneal das formulações	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Subtipos moleculares, características gerais e tratamentos dos cânceres de mama.	17
Tabela 2: Principais resultados obtidos com a encapsulação de quimioterápicos.....	22
Tabela 3: Condições cromatográficas para quantificação de DOX-HCl e CFM.	27
Tabela 4: Equações da reta e coeficientes de correlação (r^2) obtidos através das curvas analíticas de DOX-HCl e CFM, construídas em três dias consecutivos.	38
Tabela 5: Resultados dos testes de precisão: intra-dia (DPR1, DPR2 e DPR3) e inter-dias, obtidos com medidas de três concentrações diferentes de DOX-HCl e CFM.	39
Tabela 6: Resultados do teste de precisão. Comparação entre a concentração teórica e as obtidas experimentalmente para DOX-HCl em três dias de experimentos.	39
Tabela 7: Resultados de exatidão do método quantitativo para determinação da DOX-HCl e CFM por CLAE.	40
Tabela 8: Número de partículas/mL determinados por NTA.	44
Tabela 9: Eficiência de encapsulação de DOX _{BASE} / DOX _{AO} e CFM pelos CLN, durante o tempo de armazenamento a 4 e 25 °C (* p<0,05).	45
Tabela 10: Parâmetros da cinética de liberação de DOX e CFM dos CLN por diferentes modelos de liberação <i>in vitro</i> e respectivos coeficientes de determinação (R^2).	49
Tabela 11: Valores de IC ₅₀ em 24 h, obtidos no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo método de Alamar Blue.	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Tipos de cânceres de mama	15
1.2 Doxorrubicina (DOX)	18
1.3 Ciclofosfamida (CFM)	19
1.4 Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)	20
1.5 Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e antineoplásicos	21
1.6 Hidrogéis como Sistemas para Liberação de Fármacos	23
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Materiais	25
3.2 Síntese da forma hidrofóbica de doxorrubicina (DOX _{BASE} /DOX _{AO})	25
3.3. Determinação da metodologia de quantificação de cloridrato de doxorrubicina (DOX-HCl) e ciclofosfamida (CFM) por CLAE	26
3.4. Quantificação de doxorrubicina base e doxorrubicina ácido oleico por espectroscopia de fluorescência	27
3.5. Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo DOX e CFM	28
3.6. Medidas de tamanho e índice polidispersão das partículas (PDI)	28
3.7. Medida do potencial Zeta (ZP)	28
3.8. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	29
3.9. Medidas do Potencial Hidrogeniônico (pH)	29
3.10. Determinação do teor de DOX _{BASE} , DOX _{AO} e CFM nas nanopartículas.	29
3.11. Avaliação da eficiência de encapsulação (%EE) de DOX _{BASE} e CFM	30
3.12. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	30
3.13. Estabilidade físico-química das formulações	31
3.14. Ensaio de cinética de liberação <i>in vitro</i> de DOX e CFM	31
3.15. Ensaio de Citotoxicidade em células de MCF7	32
3.15.1 Cultura de células	32

3.15.2 Viabilidade celular com ensaio de resazurina (Método de Alamar Blue)	33
3.16 Desenvolvimento das formulações de hidrogéis contendo os CLN.	33
3.17 Caracterização físico-química dos hidrogéis contendo CLN _{DOXBASE/CFM} ou CLN _{DOXAO/CFM}	33
3.17.1 Reologia dos hidrogéis	34
3.17.2 Determinação da temperatura de transição sol-gel ($T_{sol/gel}$) utilizando a técnica de reometria oscilatória.	34
3.17.3 Determinação das Propriedades Viscoelásticas dos géis utilizando Reometria oscilatória.	34
3.18 Ensaio <i>in vivo</i> de eficácia antineoplásica dos hidrogéis (preliminares)	35
3.18.1 Indução Tumoral	35
3.18.2 Atividade antitumoral <i>In vivo</i>	35
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Determinação da metodologia de quantificação de cloridrato de doxorubicina (DOX-HCl) e ciclofosfamida (CFM) por CLAE	37
4.2 Quantificação de doxorubicina hidrofóbica por espectroscopia de fluorescência	40
4.3 Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo DOX _{BASE} ou DOX _{AO} e CFM (CLN _{DOX/CFM})	41
4.4 Medidas de tamanho e índice polidispersão das partículas (PDI)	41
4.5 Medida do potencial Zeta (ZP)	42
4.6 Medidas do Potencial Hidrogeniônico (pH)	43
4.7 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	44
4.8 Avaliação da eficiência de encapsulação (%EE) de DOX _{BASE} / DOX _{AO} e CFM	44
4.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	46
4.10 Estabilidade físico-química das formulações	46
4.11 Ensaio de cinética de liberação <i>in vitro</i> de DOX e CFM	47
4.12 Ensaio de Citotoxicidade em células de MCF7 – Método Alamar Blue	50
4.13 Desenvolvimento das formulações de hidrogéis contendo os CLN	52
4.14 Caracterização físico-química dos hidrogéis contendo CLN _{DOXBASE/CFM} e CLN _{DOXAO/CFM}	53
4.14.1 Reologia dos géis	53

4.15	Ensaio <i>in vivo</i> de eficácia antineoplásica dos hidrogéis (preliminares)	57
4.15.1	Atividade antitumoral <i>In vivo</i>	57
5	CONCLUSÕES	60
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
7	ANEXOS	71

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo (HARBECK; GNANT, 2017). No Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022 estão projetados para ocorrer 625 mil novos casos de câncer, e para 2020 estimavam-se cerca de 260 mil mortes por câncer (IARC, 2020; INCA, 2020).

O câncer de mama é a doença maligna mais comum em mulheres e um dos três cânceres mais comuns em todo o mundo, junto com o câncer de pulmão e de cólon, onde são responsáveis por 50 % de todos os novos diagnósticos. O câncer de mama sozinho corresponde por aproximadamente 30 % dos cânceres femininos (SIEGEL et al., 2021). No Brasil, entre 2020-2022, figurarão entre os principais tipos de câncer mais frequentes em mulheres, à exceção do câncer de pele não melanoma, serão cânceres de mama (29,7 %), cólon e reto (9,2 %), colo do útero (7,4 %), pulmão (5,6 %) e tireoide (5,4%). Estimam-se 66.280 novos casos de câncer de mama por ano, valor correspondente a um risco estimado de 61,61 novos casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2020).

1.1 Tipos de cânceres de mama

O câncer é causado por mutações genéticas que ocorrem na estrutura do DNA das células. As células ditas sadias possuem informações em seu DNA que determinam como crescer, dividir e morrer. A presença de qualquer erro nestas informações pode surgir uma grande célula com mutações que venha se tornar cancerosa (INCA, 2020). No câncer de mama, uma grande variedade de anormalidades genômicas foram documentadas, com certas alterações recorrentes suspeitas ou conhecidas por estarem diretamente envolvidas no crescimento de células malignas (PATHMANATHAN et al., 2012). O câncer de mama é considerado um tipo de câncer altamente heterogêneo sob vários pontos de vista, abrangendo perfis fenotípicos e morfológicos distintos. Portanto, possui comportamentos clínicos muito diferentes (VIALE, 2012; TANG et al., 2016). Alguns casos com crescimento lento e excelente prognóstico, enquanto outros são tumores extremamente agressivos (TAO; SHI; LU, 2015).

Os cânceres de mama por sua natureza heterogênea são classificados por suas características moleculares, cujas propriedades imunohistoquímicas (IHC) (status hormonal)

os separam em três tipos básicos: receptores hormonais positivos, receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano positivo (HER2 +) e cânceres de mama triplo-negativo (TANG et al., 2016; RUSSNES et al., 2017).

Os receptores hormonais positivos são os subtipos de cânceres de mama com receptor de estrogênio positivo (ER +) / receptor de progesterona positivo (PR +) e podem ser divididos em dois subtipos: luminal A e luminal B. Os tumores luminais A tendem a ser ER + e / ou PR + e HER2-negativos (HER2-) e baixos níveis de Ki-67 (proliferação tumoral) (HARBECK; GNANT, 2017; FENG et al., 2018). O câncer do tipo luminal A representa cerca de 40 % de todos os cânceres de mama. É de baixo grau de agressividade, crescimento lento e tende a ter o melhor prognóstico (FENG et al., 2018). Os tumores luminais B tendem a ser ER + e / ou PR + e HER2 + (ou HER2-) com elevados níveis de Ki67 (JIANG et al., 2016; TANG et al., 2016). São responsáveis por < 20 % de todos os cânceres de mama, evoluem um pouco mais rápido do que os cânceres luminais A, e seu prognóstico é um pouco pior (FENG et al., 2018). Os cânceres de mama positivos para receptores hormonais geralmente podem ser tratados com terapias hormonais, incluindo tamoxifeno e os inibidores da aromatase, anastrozol (Arimidex), letrozol (Femara) ou exemestano (Aromasin) (TANG et al., 2016).

HER2 + refere-se ao câncer de mama que é positivo para o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano, mas negativo para os receptores de hormônios (ER e PR) (TANG et al., 2016). Nos quais, evidencia-se a alta expressão dos *clusters* de genes de proliferação e HER2 e a baixa expressão dos *clusters* luminal e basal (FENG et al., 2018). HER2 é um receptor de glicoproteína transmembrana com atividade intrínseca da tirosina quinase. A ativação de HER2 através da formação de homo ou heterodímeros com outros membros da família de receptores HER leva à ativação de redes de proliferação e sobrevivência, e a superexpressão mostrou causar transformação maligna *in vivo* (PATHMANATHAN et al., 2012). A superexpressão da proteína HER2 é medida através de imunohistoquímica (IHC3 +) ou por medição de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH) (PATHMANATHAN et al., 2012; RUSSNES et al., 2017). Cerca de 15 % a 20 % de todos os cânceres de mama são HER2 +, crescem mais rápido do que os cânceres luminais e está associado a um pior desfecho clínico (pior prognóstico) na ausência de terapia (TANG et al., 2016; LOIBL; GIANNI, 2017). No entanto, eles podem ser tratados com sucesso com terapias direcionadas à proteína HER2, como Herceptin (ou trastuzumabe), Perjeta (ou pertuzumabe),

Tykerb (ou lapatinibe) e Kadcylla (ou T-DM1 ou ado-trastuzumabe emtansina) (FIGUEROA-MAGALHÃES et al., 2014; HARBECK; GNANT, 2017; RUSSNES et al., 2017).

O câncer de mama triplo-negativo / basal (TNBC): são os tumores de mama imunohistoquímicamente caracterizados por falta de receptor de estrogênio (ER-), receptor de progesterona (PR-) e HER2 (HER-) (AHN et al., 2016; FENG et al., 2018; GARRIDO-CASTRO; LIN; POLYAK, 2019). O TNBC, que é responsável por 15 % a 20 % dos casos de câncer de mama invasivo, tem um curso clínico altamente agressivo, maior potencial metastático e resultados clínicos piores (demonstrado pelas maiores recidivas e menores taxas de sobrevida). Ele geralmente se desenvolve em uma taxa mais elevada em pacientes jovens e que possuem mutações no gene BRCA1 (AHN et al., 2016; GARRIDO-CASTRO; LIN; POLYAK, 2019). A histologia mais comum observada no triplo-negativo é o carcinoma ductal infiltrante, embora um subtipo histológico raro, o carcinoma medular, também seja identificado (FENG et al., 2018). Uma vez que esse tipo de câncer de mama não superexpressa os receptores, as terapias direcionadas não são úteis. Clinicamente, esse tipo é tratado com uma combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia (TANG et al., 2016). Recentemente houve aprovação do inibidor de PARP Olaparib para portadores da mutação BRCA1 e BRCA2, que são mais propensos a desenvolver TNBC (AHN et al., 2016; FENG et al., 2018). A Tabela 1 descreve de forma resumida os tipos de câncer de mama.

Tabela 1: Subtipos moleculares, características gerais e tratamentos dos cânceres de mama.

Subtipos	Características Moleculares	Características Gerais	Opções de tratamento
Receptor Hormonal Positivo (RH+): Luminal A	ER+, PR±, HER2-, Ki67 baixo	40 %, mais comum Melhor prognóstico	Terapias hormonais Terapia direcionada
Receptor Hormonal Positivo (RH+): Luminal B	ER+, PR±, HER2±, Ki67 alto	10 % - 20 % Sobrevivência menor do que Luminal A	Terapias hormonais Terapia direcionada
HER2 (HER2+)	ER-, PR-, HER2+	5 % - 15 % Crescem mais rápido do que os cânceres	Terapia direcionada

		luminais e	
		geralmente um pior	
		prognóstico.	
Triplo negativo	ER-, PR-, HER2-	15 % - 20 %	Terapia direcionada
		Mais comum em	limitada
		mulheres negras.	
		Diagnosticado em	
		idades mais jovens.	
		Pior prognóstico	

Atualmente a quimioterapia com antineoplásicos é o tratamento mais recomendado na maioria dos casos de câncer de mama, em especial no tratamento adjuvante (após cirurgia) e neoadjuvante (antes da cirurgia) (TANG et al., 2016). A quimioterapia é mais eficaz quando combinações de dois ou mais medicamentos são utilizados. Dentre as terapias combinatórias, os regimes adjuvantes à base de antraciclinas se tornaram o padrão de tratamento para o câncer de mama em estágio inicial, no Reino Unido. O regime de DOX e CFM é uma das várias opções disponíveis, com uso generalizado em pacientes com indicação de quimioterapia, mas com risco baixo a moderado de recorrência (BRAY et al., 2010). Apesar da eficácia da quimioterapia combinatória, ambos os fármacos apresentam toxicidade sistêmica, acarretando aos pacientes inúmeros efeitos colaterais, por isso, a grande importância de se estudar alternativas que amenizem esse quadro.

1.2 Doxorrubicina (DOX)

A doxorrubicina (DOX) é um metabólito secundário de *Streptomyces peucetius* var. *Caesius*, assim como daunorubicina, epirubicina e idarubicina (OCTAVIA et al., 2012; RENU et al., 2018). A DOX pertence aos antibióticos de antraciclina, sendo constituída por um amino-açúcar (daunosamina), ligada através de uma ligação glicosídica ao C₇ de uma aglicona tetracíclica (Figura 1) (DASS; TAN; CHOONG, 2009). Este agente citotóxico interage com a dupla hélice do DNA, interferindo na síntese de ácidos nucleicos e produzindo um efeito citotóxico marcante em células na fase S. Isso ocorre porque a intercalação inibe a replicação de nucleotídeos e a ação das polimerases de DNA e RNA. O segundo mecanismo

pelo qual a DOX afeta a célula é através da inibição enzimática. A DOX liga-se e inibe a topoisomerase II, evitando a transcrição. Os grupos fenólicos do anel de DOX contribuem com funções ácidas, enquanto o grupo amino-açúcar promove a função básica, tornando a molécula anfotérica (DASS; TAN; CHOONG, 2009; PRADOS et al., 2012).

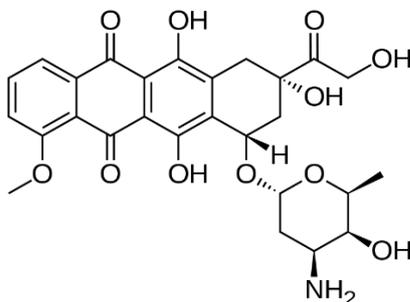


Figura 1: Estrutura molecular de doxorubicina (DOX).

A DOX é amplamente utilizada na quimioterapia contra o câncer de mama e outros tumores sólidos (SHALVIRI et al., 2012). No entanto, um dos problemas inerentes à quimioterapia baseada em DOX é que este agente antineoplásico não especifica as células de câncer de mama, afetando também o tecido saudável, causando toxicidade e efeitos colaterais que limitam a dose máxima tolerável do medicamento. É conhecida por ser cardiotóxica e seu uso pode levar ao desenvolvimento de cardiomiopatia, que às vezes não responde aos medicamentos comuns e pode progredir para falência biventricular e morte (OCTAVIA et al., 2012; RENU et al., 2018).

1.3 Ciclofosfamida (CFM)

A ciclofosfamida (CFM) é um dos agentes alquilantes anticancerígenos mais bem sucedidos já sintetizados (Figura 2) (SALGUEIRO et al., 1998). Em 1958, os esforços para modificar a estrutura química da mostarda de nitrogênio para se obter maior seletividade para as células cancerosas culminaram na síntese da CFM. Sua molécula surgiu da substituição de um anel de oxazafosforina pelo grupo metila da mostarda de nitrogênio, baseando-se na fundamentação de que algumas células cancerosas expressam níveis elevados de fosfamidase, capaz de clivar a ligação fósforo-nitrogênio (P-N), liberando a mostarda de nitrogênio. A CFM foi um dos primeiros agentes racionalmente concebidos para atingir seletivamente as células cancerígenas (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009).

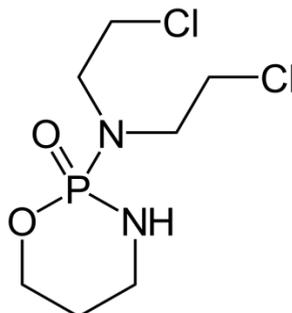


Figura 2: Estrutura molecular de ciclofosfamida (CFM).

A CFM é um pró-fármaco inativo que requer ativação enzimática e química no fígado pelo complexo P450. A mostarda de nitrogênio resultante produz os *crosslinking* (ligações intracadeia e intercadeia nas fitas de DNA) responsáveis por sua propriedade citotóxica, e em combinação com outros agentes antineoplásicos, é utilizada para o tratamento de vários tipos de cânceres, incluindo os de mama, linfóide e malignidades pediátricas. Os efeitos tóxicos da CFM incluem a supressão da medula óssea, toxicidade cardíaca e gonadal, cistite hemorrágica e carcinogênese, com dose cumulativa sendo o principal fator de risco (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009; GULFAM et al., 2012).

1.4 Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram à primeira geração de nanopartículas lipídicas descritas, derivadas da substituição da fase oleosa de nanoemulsões (lipídio líquido) por um lipídio sólido, no final do século passado. Apesar das características vantajosas, as NLS mostram algumas limitações, tais como a expulsão do fármaco durante armazenamento e baixa eficiência de encapsulação, devido à limitada solubilidade de fármacos no lipídio sólido (SCHWARZ; MEHNERT, 1997; MUHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998; FREITAS; MÜLLER, 1999). A fim de superar essas limitações, uma segunda geração de nanopartículas lipídicas foi desenvolvida, os chamados carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (PUGLIA; BONINA, 2012) (Figura 3).

A inovação de CLN consiste na adição de um lipídio líquido em temperatura ambiente ou corpórea, para formar a mistura de lipídios sólidos e líquidos que compõem o interior da nanopartícula (Figura 3). A presença do óleo (lipídio líquido na temperatura ambiente) nestes carreadores favorece a estabilidade físico-química, eficiência de

encapsulação e prolonga a liberação das moléculas ativas encapsuladas, pois impede a expulsão do fármaco das partículas durante a estocagem, por reduzir a cristalinidade da matriz lipídica (SAUPE et al., 2005).

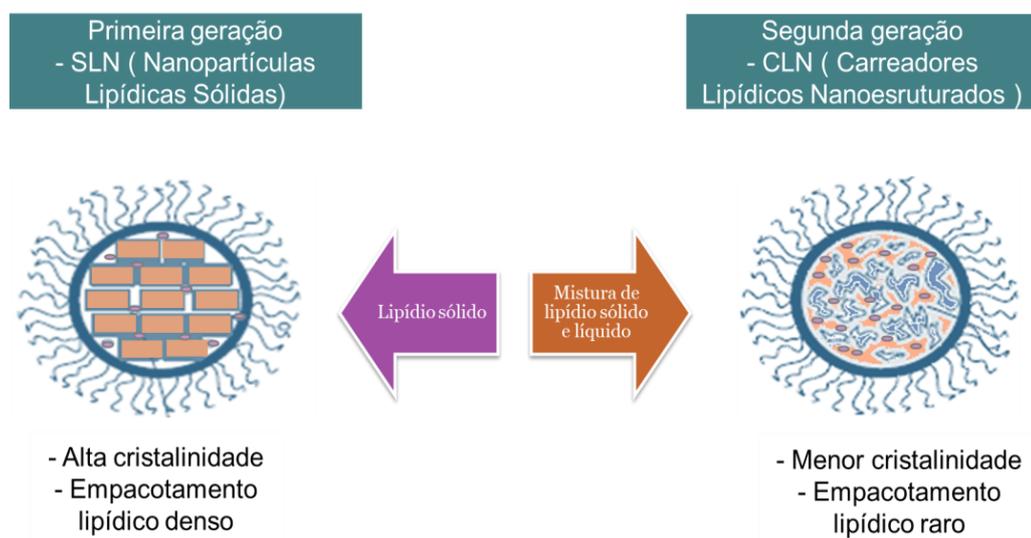


Figura 3: Representação esquemática dos dois diferentes tipos de nanopartículas lipídicas (SLN e CLN) carreadoras de fármacos.

1.5 Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e antineoplásicos

O uso de agentes quimioterápicos baseia-se na inibição da divisão de células de crescimento rápido e desordenado, característicos das células cancerosas. Infelizmente, também atinge células normais com taxas de proliferação rápida, como folículos pilosos, medula óssea e células do trato gastrointestinal, gerando os efeitos colaterais característicos da quimioterapia (RIZWANULLAH; AHMAD; AMIN, 2016). Os efeitos colaterais, a alta toxicidade e/ou a baixa eficácia continuam a ser os principais obstáculos no manejo de muitos tipos de cânceres (HAIDER et al., 2020). Porém, são os fatores que estimulam as indústrias farmacêuticas a focarem na busca do desenvolvimento de sistemas de entrega mais eficazes para os agentes quimioterápicos.

Um dos nanocarreadores promissores para o desenvolvimento de terapias direcionadas eficazes para quimioterápicos do câncer são os CLN (PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015), Na Tabela 2, descrevemos alguns estudos e as principais vantagens obtidas com a encapsulação dos quimioterápicos.

Tabela 2: Principais resultados obtidos com a encapsulação de quimioterápicos.

Moléculas encapsuladas	Limitações	Principais resultados obtidos das moléculas encapsuladas por NLC	Ref.
Tamoxifeno	Baixa biodisponibilidade Baixa solubilidade e rápido <i>clearance</i>	Aumento na concentração sanguínea (3x) e no tempo de meia-vida (7x)	(HOW et al., 2013)
Tamoxifeno		Aumento no tempo de circulação sistêmica e solubilidade	(SHETE et al., 2013)
Tamoxifeno & eritropoietina	Alta toxicidade	Diminuição da toxicidade (10x) de MCF-10A em relação LA7	(BEH et al., 2019)
Tamoxifeno & eritropoietina	Baixa citotoxicidade (MCF-7)	Maior efeito citotóxico contra MCF-7	(BEH et al., 2017)
Tamoxifeno & sulforafano	Baixa biodisponibilidade	Aumento da biodisponibilidade por via intraoral (5x)	(MANGLA et al., 2020)
Docetaxel	Elevada toxicidade sistêmica	Perfil de liberação e excreção do organismo prolongado (3x)	(VOHRA et al., 2013)
Docetaxel	Baixa eficácia terapêutica	Aumento da apoptose celular (A549) e inibição do desenvolvimento tumoral	(LIU et al., 2011)
Docetaxel & Herceptin	<i>Uptake</i> celular reduzido	Aumento do <i>uptake</i> celular (BT-474)	(VARSHOSAZ; DAVOUDI; RASOUL-AMINI, 2018)
Docetaxel & mirecetina	Apoptose celular reduzida Ineficácia efeitos colaterais sistêmicos	Aumento da apoptose celular (MDA-MBA231)	(MAROUFI et al., 2020)
Doxorrubicina & lapachona	Efeitos colaterais sistêmicos dose-dependente	Aumento da retenção do complexo em células MCF-7 ADR	(LI; JIA; NIU, 2018)
Doxorrubicina & cisplatina	Baixa inibição tumoral e limitada biodistribuição	Inibição significativa do crescimento tumoral	(DI et al., 2016)
Doxorrubicina & ácido docosahexaenóico		Aumento da biodistribuição, do <i>uptake</i> tumoral e do tempo de meia-vida.	(FERNANDES et al., 2017)
Doxorrubicina & paclitaxel	Resistência a múltiplas drogas	Superou a multirresistência farmacológica	(ZHANG et al., 2008)
Doxorrubicina & baicaleína	Multirresistência farmacológica e efeitos colaterais sistêmicos	Aumento da supressão tumoral	(LIU et al., 2016)
Doxorrubicina & esclareol	Toxicidade sistêmica acentuada Efeitos colaterais sistêmicos dose-dependente	Aumento toxicidade celular, mas ineficaz em modelo de câncer murino.	(BORGES et al., 2019)
Doxorrubicina & vitamina D	Baixa capacidade de apoptose celular	Aumento da porcentagem de apoptose celular (2x)	(SABZICHI et al., 2017)
Doxorrubicina & biotina		Melhora da atividade antiproliferativa induzindo a morte celular programada	(TRIPATHI et al., 2020)
Paclitaxel	Baixa solubilidade e alto coeficiente de partição (log P =3,96)	Acumulação melhorada do fármaco no tumor (2x)	(PEDRO et al., 2019)
Paclitaxel	Baixa solubilidade aquosa e efeitos sistêmicos severos	Maior toxicidade contra células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB231	(DE SOUSA MARCIAL; CARNEIRO; LEITE, 2017)

1.6 Hidrogéis como Sistemas para Liberação de Fármacos

Hidrogéis são formas farmacêuticas compostas principalmente por polímeros capazes de absorver grande quantidade de água. Estruturalmente são constituídos por uma (homopolímeros) ou mais (copolímeros) redes poliméricas tridimensionalmente estruturadas, formadas por cadeias macromoleculares interligadas por ligações covalentes (reticulações) ou interações físicas (OVIEDO; MÉNDEZ; GÓMEZ, 2008).

Dentre os hidrogéis, destacam-se as formulações termorreversíveis à base de poloxamers. Os poloxamers são copolímeros formados por unidades de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP), organizadas em estruturas que se arranjam em tri-blocos de $OE_x - OP_y - OE_x$, não tóxicos e capazes de formar gel *in situ* (ZENG et al., 2014). Os poloxamers apresentam um caráter anfifílico, devido à diferença de hidrofobicidade dos monômeros de OE e OP. Essa característica é responsável pela capacidade de se auto-organizarem em micelas, quando em solução aquosa e acima de uma determinada concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC). Soluções aquosas de poloxamers mantidas em baixas temperaturas (abaixo de 10 °C) apresentam tanto as unidades de OE quanto de OP solúveis em água. Porém com o aumento da temperatura, soluções na faixa de concentração de 15 % a 30 % sofrem desidratação das unidades hidrofóbicas de OP e se agregam, enquanto as unidades hidrofílicas de OE permanecem hidratadas. Sendo assim, essas micelas se auto-organizam em fases cúbico-ordenadas, produzindo estruturas parcialmente rígidas, mas com alta viscosidade. Esse fenômeno reversível, conhecido como termogelação, é caracterizado por uma temperatura de transição *sol-gel* ($T_{sol-gel}$), uma vez que, abaixo dessa temperatura, esses materiais permanecem fluidos enquanto que acima se apresentam semissólidos, recebendo assim a denominação de hidrogéis termorreversíveis (BATRAKOVA; KABANOV, 2008; KLOUDA; MIKOS, 2008).

Dentro do contexto, no qual a DOX e CFM apresentaram propriedades excelentes quando encapsuladas nos CLN, os hidrogéis foram utilizados como estratégia para atuarem como sistemas de entrega de drogas, a fim de prolongar a ação terapêutica e reduzir os efeitos tóxicos dos antineoplásicos encapsulados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de hidrogel contendo antineoplásicos (DOX e CFM) encapsulados em CLN, como um potencial tratamento contra o câncer de mama.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificação de DOX e CFM por CLAE
- Síntese de DOX_{base} e DOX_{AO}
- Desenvolvimento de CLN contendo os antineoplásicos DOX e CFM encapsulados;
- Caracterização físico-química dos CLN, avaliando a encapsulação de DOX e CFM e a estrutura das partículas e suas interações;
- Estudo da liberação de DOX e CFM, a partir dos CLN;
- Avaliação da citotoxicidade *in vitro* das formulações;
- Desenvolvimento e caracterização das formulações de hidrogéis termorreversíveis contendo os CLN desenvolvidos;
- Caracterização reológica dos hidrogéis;
- Avaliação da atividade antineoplásica *in vivo* das formulações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

- Acetato de Uranila (Sigma-Aldrich, EUA)
- Acetonitrila P.A. (Merck Millipore, Alemanha)
- Ácido fosfórico (Labsynth Ltda, Brasil)
- Ácido Oleico (Labsynth Ltda, Brasil)
- Dimetilsulfóxido (Sigma Chem. Co., EUA)
- DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Nutricell, Brasil),
- Estreptomicina (Nutricell, Brasil)
- Etanol (Labsynth Ltda, Brasil)
- Penicilina (Nutricell, Brasil)
- Pluronic F68 (Sigma Chem. Co., EUA)
- Poloxamer 407 (Sigma Chem. Co., EUA)
- Solução de tampão fosfato de sódio 1,5 M, pH 7,4 (Cultilab, Brasil)
- Soro fetal bovino (Cultilab, Brasil)
- Cloridrato de Doxorrubicina, MM 579,98 g.mol⁻¹ (AK Scientific, Inc. EUA)
- Cloridrato de Ciclofosfamida, MM 265,11 g.mol⁻¹ (AK Scientific, Inc. EUA)
- Trietilamina (TEA) (Merck Millipore, Alemanha)
- Manteiga de ucuuba (Phytoterapica, Brasil)
- Óleo de copaíba (Phytoterapica, Brasil)
- Hidróxido de sódio 98% (Labsynth Ltda, Brasil)
- Resazurina (Sigma Chem. Co., EUA)

3.2. Síntese da forma hidrofóbica de doxorrubicina (DOX_{BASE}/DOX_{AO})

A DOX é comercializada na forma protonada (cloridrato de DOX), com maior solubilidade em meio aquoso. No entanto, para uma incorporação eficiente nos CLN, a forma base (desprotonada) é a desejada. Para converter a forma hidrofílica de DOX na sua forma hidrofóbica foram utilizados os seguintes métodos:

Método 1: 10 mg de DOX-HCl foram dissolvidos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), em seguida, para neutralização do sal cloridrato, 100 µL de trietilamina (TEA) e 20

μL de NaOH (1 M) foram adicionados à amostra, deixada sob agitação durante a noite, obtendo-se DOX na forma base (DOX_{base}) para uso subsequente (ABDOLAHPOUR et al., 2017).

Método 2: O conjugado à base de DOX-AO (ácido oleico) foi preparado usando um método de coprecipitação, onde uma solução aquosa do cloridrato de DOX (5 mg/mL) foi adicionada a um tubo de centrifuga, em seguida, uma solução de bicarbonato de sódio (50 mg/mL) foi adicionada ao tubo sob agitação magnética para neutralizar as cargas do sal catiônico de DOX. Em seguida, uma solução de AO (50 mg/mL) em etanol foi adicionada à mistura acima sob agitação. Após agitação contínua durante 1 h, a mistura foi centrifugada (5000g/ min) durante 30 min. Finalmente, o precipitado de coloração vermelha foi coletado, correspondente ao composto DOX_{AO} . A DOX_{AO} resultante foi lavada três vezes com água destilada e depois seca a 40°C e armazenada a 4°C (ZHAO et al., 2016). A estrutura postulada de DOX_{AO} é mostrada na Figura 4.

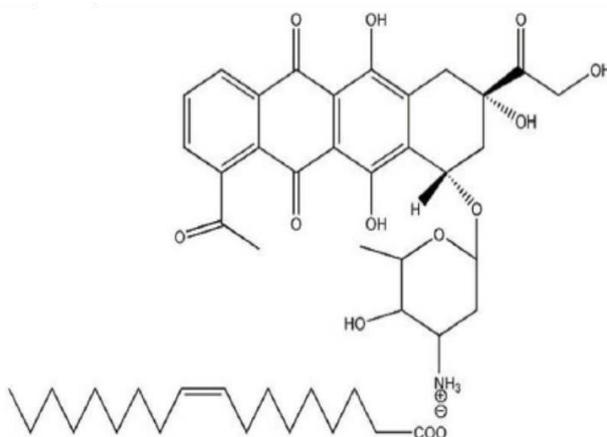


Figura 4: Estrutura postulada do conjugado iônico doxorubicina e ácido oleico (DOX_{OA}).

3.3. Determinação da metodologia de quantificação de cloridrato de doxorubicina (DOX-HCl) e ciclofosfamida (CFM) por CLAE

A DOX-HCl e CFM foram quantificadas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). As condições adotadas na metodologia analítica para quantificação estão descritas na Tabela 3, adaptada (LARSON; KHAZAEI; DILLON, 2003; AHMAD et al., 2011).

Tabela 3: Condições cromatográficas para quantificação de DOX-HCl e CFM.

Amostra	DOX-HCl e CFM foram diluídas em PBS 5 mM a pH 7,4. As curvas de calibração foram preparadas nas concentrações de 2 - 150 μ M e 0,5 - 4 mM de DOX-HCl e CFM, respectivamente.
Fase Móvel	PBS 0,05 M: Acetonitrila 65:35 (v/v) contendo 0,5 mL/L de trietilamina a pH 3,7 (ajustado com ácido fosfórico 2 M).
Injeção	30 μ L
Fluxo	0,75 mL.min ⁻¹
Temperatura	25 °C
Detector	UV: 254 nm (DOX-HCl) e 180 nm (CFM)
Coluna	C18 (2) Luna 5 μ 250 x 4,6 mm

As condições analíticas e a metodologia de quantificação dos fármacos foram validadas segundo parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003; ICH, 2005). A validação do método analítico foi realizada pela análise dos parâmetros: precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção, especificidade, linearidade e sensibilidade; as análises foram realizadas em triplicatas por três dias consecutivos.

A metodologia de quantificação de DOX-HCl e CFM por CLAE foi utilizada para determinar a eficiência de encapsulação (%EE) dos CLN e para avaliação do perfil de liberação dos fármacos.

3.4. Quantificação de doxorrubicina base e doxorrubicina ácido oleico por espectroscopia de fluorescência

A DOX_{BASE} e DOX_{AO} não puderam ser detectadas por CLAE e, alternativamente, utilizou-se o método de espectroscopia de fluorescência. DOX_{BASE} e a DOX_{AO} foram diluídas separadamente em HCl 0,12 M com etanol e filtradas (0,45 μ M). As curvas de calibração foram preparadas nas concentrações de 1,0 - 20 μ M e subsequentemente quantificadas (excitação/emissão: 490/580 nm) em espectrofluorímetro (Hitachi modelo F-4500), utilizando uma cela com caminho ótico de 10 mm (FUNDARÒ; CAVALLI, 2000), na temperatura ambiente, em triplicata nos 3 dias consecutivos.

3.5. Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo DOX e CFM

Os CLN foram preparados através do método de emulsificação-ultrasonicação (MENDES et al., 2013). Ambos os lipídios (ucuuba - sólido e copaíba - líquido) foram aquecidos em banho-maria 10 °C acima da temperatura de fusão da manteiga de ucuuba = 53 °C (RIBEIRO et al., 2021). Uma quantidade pré-determinada dos fármacos DOX_{BASE} ou DOX_{AO} e CFM foram adicionados e misturados sob agitação magnética, até completa solubilização na fase oleosa. Logo após, a fase aquosa contendo surfactante P68 foi adicionada na fase lipídica (ambas na mesma temperatura de aquecimento), e a amostra foi homogeneizada sob agitação de 10000 rpm por 3 min, em UltraTurrax (Ika Werkestaufen, Alemanha). Em seguida, a pré-emulsão (O/A) formada foi sonicada em potência de 50 W e 20 kHz de frequência nominal para formação das nanopartículas, em ciclos de 30 s (ligado/desligado) durante 30 min, sob aquecimento constante. Ao término, a nanoemulsão formada foi arrefecida em banho de gelo até 25 °C e armazenada para caracterizações posteriores.

3.6. Medidas de tamanho e índice polidispersão das partículas (PDI)

O diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por espalhamento dinâmico de luz – DLS (*Dynamic Light Scattering*), utilizando o equipamento Zetasizer Nano Series (NS90, Malvern[®] Instruments, Reino Unido). As medidas foram realizadas em triplicata, diluindo-se 100 vezes em água deionizada, à temperatura de 25 °C, em cubetas de poliestireno (10 mm de caminho óptico). Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.7. Medida do potencial Zeta (ZP)

Os valores de potencial zeta *ZP* foram obtidos por microeletroforese Doppler a laser, utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano Series (NS 90, Malvern[®] Instruments, Reino Unido). Nessa técnica um campo elétrico é aplicado a uma dispersão de partículas, que passarão a se mover com velocidade relacionada ao seu potencial elétrico de superfície

(LOWRY et al., 2016). Essa velocidade é medida por uma técnica interferométrica a laser, chamada M3 PALS (espalhamento de luz com análise de fases), através da qual é possível fazer o cálculo da mobilidade eletroforética e, a partir desta, inferir o ZP e sua distribuição. As medidas de ZP foram feitas em triplicata, após diluição das suspensões de NLC com água deionizada (2 μ L da formulação para 1998 μ L de água deionizada) em cubetas apropriadas, de poliestireno, à temperatura de 25 °C. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.8. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

Os experimentos de NTA foram realizados no equipamento NanoSight NS300 (NanoSight - Malvern[®], Reino Unido), que utiliza um vídeo-microscópio para analisar as propriedades de espalhamento de luz e o movimento browniano de partículas individuais em suspensão. As medidas foram feitas após diluição das amostras em água deionizada (1:5.000 v/v) e as análises realizadas sob feixe de laser verde ($\lambda = 532$ nm), a 25 °C.

3.9. Medidas do Potencial Hidrogeniônico (pH)

Os valores de pH das formulações de CLN foram avaliados utilizando pHmetro Digimed[®] DM-22 a 25 °C, previamente calibrado com os padrões de pH 7,0 e 4,0. As medidas foram realizadas em triplicata e os dados expressos como a média \pm desvio padrão.

3.10. Determinação do teor de DOX_{BASE}, DOX_{AO} e CFM nas nanopartículas.

Para avaliação do teor de DOX e CFM nas formulações, retirou-se 100 μ L da amostra e dissolveu-se em 1900 μ L de metanol. Expôs-se a amostra a banho ultrassônico por 20 min e posteriormente realizou-se centrifugação a 4100 g / 20 min. Os sobrenadantes foram coletados, diluídos e analisados por CLAE ou espectroscopia de fluorescência, segundo os métodos validados.

3.11. Avaliação da eficiência de encapsulação (%EE) de DOXBASE e CFM

A eficiência de encapsulação de DOX base e CFM nas formulações de CLN foram determinadas pelo método de ultrafiltração-centrifugação (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002), nas amostras frescas e por até 365 dias. Inicialmente 0,4 mL da amostra foi transferida para uma unidade de filtração com poros de 10 kDa (Millex, millipore) acoplada ao tubo tipo eppendorf e centrifugada por 20 min a 4100 g. A solução filtrada foi coletada e os fármacos livres foram quantificados por CLAE (CFM) ou espectroscopia de fluorescência (DOX_{base} ou DOX_{AO}). A eficiência de encapsulação (%EE) foi calculada conforme a Equação 1.

$$\% \text{ EE} = \frac{\textit{fármaco total} - \textit{fármaco livre}}{\textit{fármaco total}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: fármaco total e livre corresponde, à quantidade total (teor) de DOX_{BASE}/DOX_{AO} ou CFM quantificada na suspensão de CLN e no filtrado, respectivamente.

3.12. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As análises morfológicas dos CLN foram feitas utilizando-se microscópio eletrônico de transmissão (MET). Inicialmente 0,9 mL da formulação de CLN contendo ou não os fármacos (DOX e CFM) foi diluída em 1,01 mL de água deionizada. Em seguida, 50 µL dessa suspensão foram adicionados ao grid de cobre FCF200-Cu (Koch Electrum Microscopy, Brasil). Após 2 min, o excesso de amostra foi retirado e uma gota de solução aquosa de acetato de uranila a 2 % adicionada sobre a mesma, no intuito de melhorar o contraste das imagens. Após 1 min o excesso foi novamente retirado e, na sequência, uma gota de água deionizada foi adicionada ao grid, por 2 min, seguida da retirada do excesso novamente. Após o preparo da amostra no grid, as mesmas permaneceram em repouso por 4 h, à temperatura ambiente para sua total secagem. As leituras das amostras foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão LEO906E (Zeiss, Alemanha) pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/Unicamp, em 60 kV com aumento de 100.000 vezes.

3.13. Estabilidade físico-química das formulações

As formulações de CLN contendo os antineoplásicos foram avaliadas pelo acompanhamento dos seguintes parâmetros: tamanho de partícula, PDI, ZP e número de partículas/mL, analisados mensalmente, durante 12 meses a 4 °C e 25 °C. As análises estatísticas ANOVA/Tukey foram empregadas para avaliar a existência de diferenças estatísticas ao longo de tempo de análise em relação a cada parâmetro ($p < 0,05$).

3.14. Ensaio de cinética de liberação *in vitro* de DOX e CFM

Para os ensaios de cinética de liberação *in vitro* foram utilizadas células de difusão vertical do tipo Franz (área de permeação 0,6 cm²). Uma célula de Franz é composta, principalmente, por duas partes: o compartimento doador e o receptor, separados por uma membrana semipermeável. No compartimento doador, a formulação é adicionada e por difusão, somente o fármaco passa através da membrana e chega ao compartimento receptor que está preenchido com tampão PBS pH 7,4. Nesse sistema, foi utilizada uma membrana de policarbonato (diâmetro 19 mm, com poro de exclusão molecular de 100 nanômetros, da Nuclepore Track-Etch Membrane, Whatman®) como modelo de barreira, a qual separava a amostra (0,4 mL no compartimento doador) do compartimento receptor, contendo aproximadamente 12 mL de uma solução de tampão fosfato-salino (PBS) 5 mM em pH 7,4. A solução do compartimento receptor foi mantida sob leve agitação (300 rpm) a 37 °C, durante todo período do experimento. Em intervalos padronizados, 0,2 mL de amostra eram retirados do compartimento receptor (e o volume total recuperado com adição da solução tampão PBS) até completa liberação, sendo DOX e CFM quantificadas de acordo com seus respectivos métodos analíticos.

O software KinetDS 3.0 foi utilizado para analisar as curvas de liberação. Diversos modelos matemáticos foram testados e o melhor modelo para prever a curva de liberação dos fármacos foi selecionado a partir do coeficiente de determinação (R^2) (MENDYK; JACHOWICZ, 2007). Os modelos testados (ordem zero, primeira ordem, Hixson-Crowell e Korsmeyer-Peppas) são descritos pelas equações 2 a 5.

Modelo de ordem zero:

$$Q = k.t + Q_0$$

Equação 2

Onde Q é a quantidade de fármaco liberado, t é o tempo e Q_0 é o valor inicial de Q e k é a constante de liberação.

Modelo de primeira ordem:

$$Q = 100(1 - e^{-kt}) \quad \text{Equação 3}$$

Onde, Q é a quantidade de fármaco liberado, t é o tempo e k é a constante de liberação.

Modelo de Hixson-Crowell:

$$Q = 100 [1 - (1 - k \cdot t)^3] \quad \text{Equação 4}$$

Onde, Q é a quantidade de fármaco liberado, t é o tempo e k é a constante de liberação.

Modelo de Korsmeyer-Peppas:

$$Q = K \cdot t^n \quad \text{Equação 5}$$

Onde, Q é a quantidade de fármaco liberado, k é a constante da taxa de liberação, t é o tempo de liberação e n = expoente de difusão que indica qual é o mecanismo de liberação.

3.15. Ensaios de Citotoxicidade em células de MCF7

O método de Alamar Blue é um teste utilizado para proliferação celular e citotoxicidade *in vitro*, onde a forma oxidada do alamar blue (azul escuro e de baixo rendimento de fluorescência intrínseca) pode ser reduzida pelas células viáveis, tal que o corante torna-se vermelho/rosa, com alto rendimento de fluorescência. Assim, a extensão dessa conversão é um reflexo da viabilidade celular, podendo ser quantificada por sua densidade ou fluorescência para maior sensibilidade (NAKAYAMA et al., 1997; O'BRIEN et al., 2000).

3.15.1 Cultura de células

As células cancerosas de mama MCF 7 foram cultivadas em frascos de cultura de 25 ou 75 cm² com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Lonza), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, Brasil) e 1 % de antibiótico

PenStrep (Gibco, Brasil), aqui referido como meio completo. Durante todo o curso dos experimentos, as células foram mantidas a 37 °C, com uma atmosfera de 5 % de CO₂ em uma incubadora Panasonic COM170AICUVL-PA.

3.15.2 Viabilidade celular com ensaio de resazurina (Método de Alamar Blue)

Para avaliar a viabilidade celular na presença das formulações, células MCF 7 (0,5 x 10⁵ células / poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Depois, as células foram tratadas com DOX_{LIVRE}, CFM_{LIVRE}, CLN controle e CLN_{DOX/CFM} diluído em meio DMEM sem soro e antibiótico e incubadas por 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias. Em seguida, o meio foi substituído por 100 µL de resazurina (0,015 mg / mL; Sigma-Aldrich) diluído em soro e meio DMEM sem antibiótico e incubado por 3 h. Finalmente, a fluorescência da resazurina ($\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 560/590$ nm) foi medida usando Cytation 5 Hybrid Multidetector Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). Os valores foram expressos em porcentagem de redução de resazurina em relação ao controle, no qual as células não foram expostas aos compostos testados.

3.16 Desenvolvimento das formulações de hidrogéis contendo os CLN.

Foram preparados hidrogéis de poloxamer por dispersão direta de 25 mL da formulação de CLN_{DOXBASE/CFM} ou CLN_{DOXAO/CFM} previamente preparada (de acordo com o item 3.4), em 25 mL da solução de PL 407 (Pluronic[®] F-127, Sigma-Aldrich[®]) a 25% (p/v), mantidas a 4 °C, sob agitação (300 rpm) por pelo menos 2 h (SCHMOLKO, 1972). Para obter os hidrogéis contendo os antineoplásicos livres na concentração equivalente às dos CLN, foram adicionados 25 mL da solução aquosa contendo 5 mg/mL de DOX-HCL e 30 mg/mL CFM na solução de poloxamer 407.

3.17 Caracterização físico-química dos hidrogéis contendo CLN_{DOXBASE/CFM} ou CLN_{DOXAO/CFM}

3.17.1 Reologia dos hidrogéis

Experimentos de reologia permitem a elucidação de propriedades viscoelásticas dos sistemas preparados. Tal técnica permite a determinação da temperatura de transição sol-gel ($T_{\text{sol/gel}}$) de amostras termorreversíveis (ARTZNER et al., 2007). As propriedades reológicas dos géis foram avaliadas por meio de um reômetro rotacional de tensão controlada e geometria cone-placa (Kinexus, instrumento Malvern[®] Corporation, Reino Unido). As amostras foram analisadas, usando os seguintes ensaios:

3.17.2 Determinação da temperatura de transição sol-gel ($T_{\text{sol/gel}}$) utilizando a técnica de reometria oscilatória.

A determinação da $T_{\text{sol/gel}}$ foi realizada utilizando reometria oscilatória, com geometria de cone-placa combinadas (JONES et al., 2009). A amostra de cada formulação foi cuidadosamente aplicada à placa inferior do reômetro de forma que o cisalhamento da formulação fosse minimizado, e deixou-se o sistema equilibrar durante pelo menos 5 min antes da análise. Após o tempo decorrido, uma análise de varredura de temperatura linear foi realizada na faixa de temperatura de 10-50 °C a uma frequência definida (1 Hz) e taxa de aquecimento de 5 °C/min⁻¹). O módulo de armazenamento (G'), módulo de perda (G'') e a viscosidade dinâmica (η) foram calculados usando o software do Reômetro Kinexus, modelo pro+ (Kinexus, instrumento Malvern[®] Corporation, Reino Unido). A temperatura de gelificação foi identificada como sendo a temperatura à qual a amostra exibiu uma mudança de um comportamento predominantemente viscoso ($G'' > G'$) para uma predominantemente elástica ($G' > G''$) (MAYOL et al., 2008).

3.17.3 Determinação das Propriedades Viscoelásticas dos géis utilizando Reometria oscilatória.

As propriedades viscoelásticas dos géis foram elucidadas também por reometria oscilatória. Amostras de cada formulação foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior do reômetro e uma análise de varredura de frequência foi realizada durante o intervalo de 0,1 - 10,0 Hz de frequência, após a aplicação de um estresse constante e temperatura fixa de 32,5 °C. Assim, o armazenamento de cisalhamento ou módulo elástico (G'), bem como a perda de

cisalhamento ou módulo viscoso (G''), a viscosidade dinâmica (η') e a tangente de perda ($\tan \delta$) foram medidas em função da frequência. Onde o G' dá informação sobre a elasticidade ou a energia armazenada no material durante a deformação, enquanto que G'' descreve o caráter viscoso ou a energia dissipada na forma de calor (JONES et al., 2009).

3.18 Ensaios *in vivo* de eficácia antineoplásica dos hidrogéis (preliminares)

3.18.1 Indução Tumoral

Para a avaliação da atividade antitumoral, foram utilizadas ratas fêmeas da linhagem Sprague-Dawley com aproximadamente 12 semanas de idade, mantidas em uma dieta normal para ratos e com acesso gratuito a água potável. Os grupos de ratas foram pareados por peso ($n = 6$). Para indução dos tumores mamários, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de 1-Methyl-1-nitrosourea (MNU) com 50 mg MNU/ kg de peso corporal, e após 15 dias foi administrada uma segunda dose (CHAN et al., 2007; MANNI et al., 2010). Os procedimentos com animais descritos acima foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (5030-1/2018 - CEUA/UNICAMP).

3.18.2 Atividade antitumoral *In vivo*

Os tumores palpáveis começaram a se desenvolver na 5^a semana, e seu aparecimento foi registrado semanalmente até o momento do sacrifício. Após esse período os animais sofreram as seguintes intervenções experimentais:

(1) Solução fisiológica 0,9% (controle negativo);

(2) Hidrogel PL 407 25% + DOX/CFM_{LIVRE} (2 mg/kg e 20 mg/Kg, respectivamente);

(3) CLN_{DOXBASE/CFM} (2 mg/kg e 20 mg/Kg, respectivamente);

(4) Hidrogel PL 407 25% + CLN_{DOXBASE/CFM} (2 mg/kg e 20 mg/Kg).

Para o estudo, foi selecionada apenas a formulação CLN_{DOXBASE/CFM}, composta por: (CLN – manteiga de ucuuba - sólido e copaíba) + DOX_{base}/CFM, baseando-se na maior

atividade citotóxica *in vitro*. As aplicações foram via intraperitoneal e 1x/semana por 4 semanas (Figura 5). A escolha da dosagem da terapia medicamentosa foi baseada na conversão de doses clínicas em humanos (extrapolação alométrica) e estudos prévios usando estas drogas em ratos (FAN et al., 2017).



Figura 5: Administração *in vivo* das formulações após a instalação bem sucedida do tumor.

Ao longo do estudo, as ratas foram pesadas e os tumores foram medidos com paquímetro a cada 7 dias. Ao final do experimento (Dia 30), as ratas foram sacrificadas e os volumes dos tumores foram calculados a partir da Equação 6 (FERNANDES et al., 2016):

$$V = (d1)^2 \times d2 \times 0,5 \quad \text{Equação 6}$$

Onde d1 e d2, representam o diâmetro menor e maior, respectivamente.

A razão de inibição tumoral (% IR) foi calculada nos dias 15 e dia 30 do ensaio, como mostra a equação a seguir:

$$IR = 1 - \left(\frac{\text{RTV médio do grupo tratado com o medicamento}}{\text{RTV médio do grupo de controle}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde, RTV = Volume do tumor D15 ou D30 / Volume do tumor D0.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da metodologia de quantificação de cloridrato de doxorrubicina (DOX-HCl) e ciclofosfamida (CFM) por CLAE

Utilizando as condições cromatográficas descritas na Tabela 3, obteve-se a separação de dois picos cromatográficos referentes à DOX-HCl e CFM, cujos tempos de retenção foram de 4,78 e 7,69 min, respectivamente. Conforme o cromatograma (Figura 6), não houve outros picos no mesmo tempo de retenção dos fármacos em solução e nem quando as amostras de CLN foram analisadas, descartando-se assim, a presença de quaisquer impurezas dos componentes. Esses dados revelam a especificidade do método avaliado.

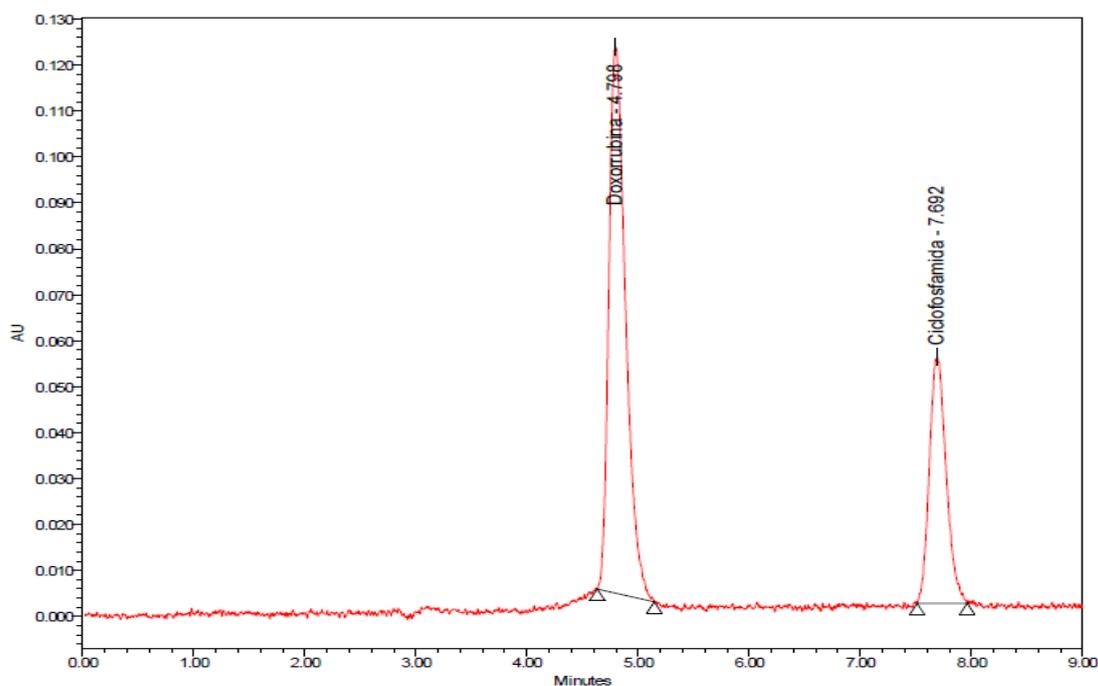


Figura 6: Cromatograma com as áreas dos picos de DOX-HCL (4,79 min) e CFM (7,69 min).

As soluções estoque de DOX-HCl e CFM foram preparadas por dissolução na fase móvel. As concentrações usadas para a construção da curva de calibração variaram de 2 - 150 μ M (DOX-HCl) e 0,5 - 4 mM (CFM), com oito pontos subsequentes. A linearidade do método foi determinada a partir da curva analítica média, derivada das nove curvas individuais, medidas em três dias consecutivos (3 por dia), como mostra a Figura 7.

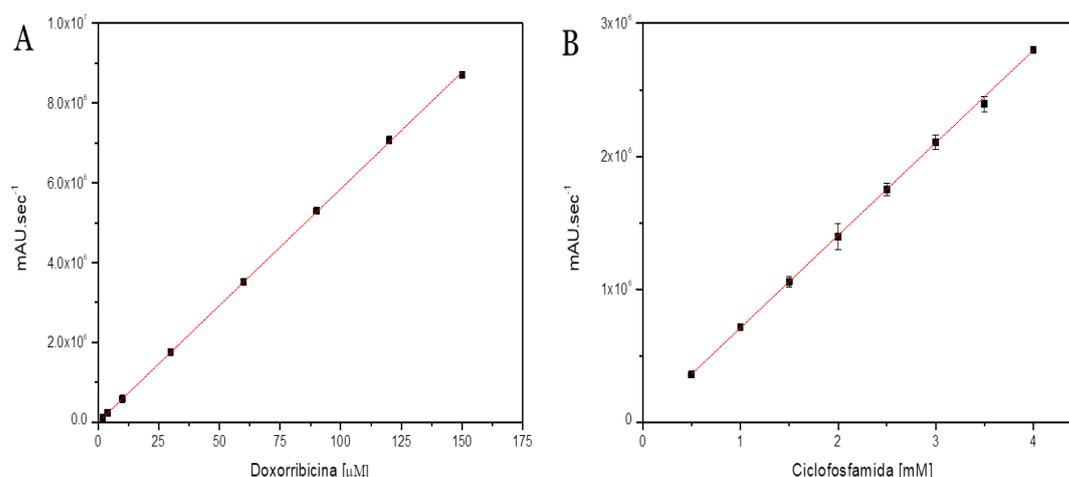


Figura 7: Curva analítica média de DOX-HCl (A) e CFM (B), na faixa de concentração de 2 - 150 μM (DOX-HCl) e 0,5 - 4 mM (CFM), respectivamente.

Os coeficientes de correlação (r^2) de DOX-HCl e CFM, foram superiores a 0,999 nos 3 dias avaliados, de acordo com as recomendações da RE 899 da ANVISA (ANVISA, 2003), como mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Equações da reta e coeficientes de correlação (r^2) obtidos através das curvas analíticas de DOX-HCl e CFM, construídas em três dias consecutivos.

DOX-HCl	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Regressão linear	$y=5,91E^{+7}x-8176,1$	$y=5,93E^{+7}x-8203,6$	$y=5,779E^{+7}x - 1009,9$
r^2	0,9999	0,9999	0,9999
CFM	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Regressão linear	$y=696343,52x+11659,93$	$y=696096,17x+12549,73$	$y=696134,54x+ 12496,94$
r^2	1	0,9999	0,9999

As regressões lineares das curvas de concentração para os fármacos DOX-HCl e CFM (Tabela 4) foram utilizadas para calcular o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), a partir do intercepto e da inclinação da curva analítica, respectivamente. Segundo estas análises, DOX-HCl obteve LD = 0,21 μM e LQ = 0,70 μM , e a CFM LD = 2,2 μM e LQ = 7 μM .

A Tabela 5, apresenta os dados de precisão intra-dia e da precisão inter-dias de DOX-HCl e CFM, respectivamente, determinados a partir dos desvios padrão relativos (DPR) das concentrações, nos diferentes dias. Em todos os casos a DPR foi $\leq 3\%$, estando assim, de acordo com as orientações da ANVISA (ANVISA, 2003).

Tabela 5: Resultados dos testes de precisão: intra-dia (DPR1, DPR2 e DPR3) e inter-dias, obtidos com medidas de três concentrações diferentes de DOX-HCl e CFM.

[DOX-HCl] (μM)	DPR Dia 1 (%)	DPR Dia 2 (%)	DPR Dia 3 (%)	DPR Inter-dia (%)
10	0,96	1,41	1,05	1,03
60	1,24	0,40	0,60	0,86
120	0,54	0,16	0,92	0,87
[CFM] (mM)				
1,5	1,04	1,54	2,21	2,42
2,5	2,09	2,19	1,09	2,06
3,5	2,28	0,92	2,61	2,38

Os valores obtidos experimentalmente de DOX-HCl e CFM foram comparados com os valores teóricos. Os resultados estão descritos na Tabela 6 e a partir destes, o método foi avaliado como preciso. As porcentagens de recuperação dos 3 dias de análise encontram-se na Tabela 7 e estão dentro dos valores preconizados pela resolução da ANVISA, 2003, de 98 % – 102 %, demonstrando a exatidão do método.

Tabela 6: Resultados do teste de precisão. Comparação entre a concentração teórica e as obtidas experimentalmente para DOX-HCl em três dias de experimentos.

[DOX-HCl*] (μM)	[DOX-HCl**] \pm DP (μM) Dia 1	[DOX-HCl**] \pm DP (μM) Dia 2	[DOX-HCl**] \pm DP (μM) Dia 3	[DOX-HCl**] \pm DP (μM) Inter-dia
10	9,91 \pm 0,09	9,96 \pm 0,14	9,93 \pm 0,10	9,93 \pm 1,03
60	59,96 \pm 0,74	60,34 \pm 0,24	59,68 \pm 0,36	59,99 \pm 0,86
120	120,78 \pm 0,65	119,59 \pm 0,19	121,48 \pm 1,11	120,62 \pm 0,87
[CFM*] (mM)				
1,5	1,52 \pm 0,02	1,50 \pm 0,12	1,53 \pm 0,15	1,52 \pm 0,04
2,5	2,55 \pm 0,08	3,43 \pm 0,21	2,55 \pm 0,34	2,55 \pm 0,07
3,5	3,54 \pm 0,07	3,43 \pm 0,36	3,54 \pm 0,08	3,50 \pm 0,08

*Concentração teórica de DOX-HCl/CFM; **Concentração dosada de DOX-HCl/CFM

Tabela 7: Resultados de exatidão do método quantitativo para determinação da DOX-HCl e CFM por CLAE.

[DOX-HCl*] (μM)	%recuperação			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Inter dias
10	99,1	99,6	99,4	99,2
60	99,9	100,6	99,5	100
120	100,6	99,7	101,2	100,5
[CICLO*] (mM)				
1,5	101,2	100,19	101,8	101,4
2,5	101,9	101,89	101,9	101,8
3,5	101,1	98,07	101,2	100,1

4.2 Quantificação de doxorubicina hidrofóbica por espectroscopia de fluorescência

O método de espectroscopia de fluorescência foi utilizado para quantificação das formas hidrofóbicas de DOX (DOX_{BASE} e DOX_{AO}), pois as mesmas não apresentaram pico de retenção pelo método de CLAE, quando utilizando o método anteriormente validado no item 3.3. A curva analítica obtida para o padrão de DOX hidrofóbica está apresentada na Figura 8. Observa-se que a concentração é diretamente proporcional a intensidade de fluorescência de DOX, no intervalo de concentração avaliado.

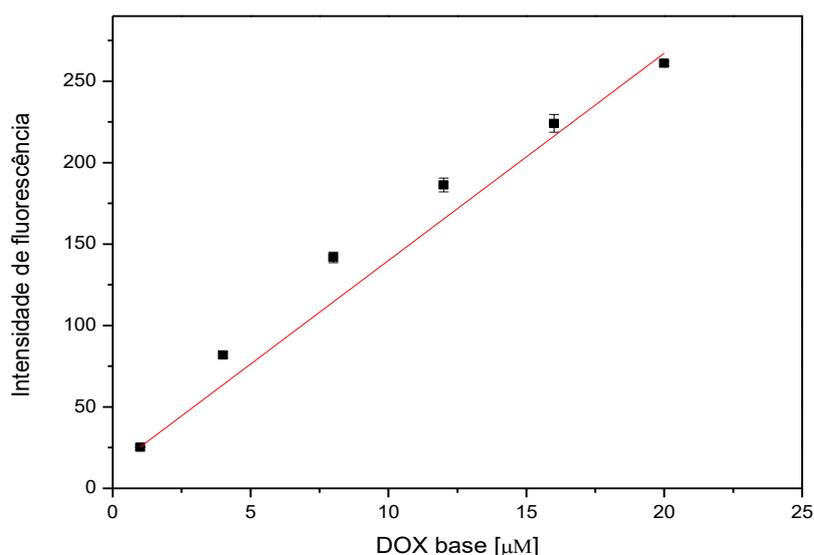


Figura 8: Curva analítica obtida para $\text{DOX}_{\text{BASE}}/\text{DOX}_{\text{AO}}$ no intervalo de concentração de 1 a 20 μM (excitação de 490 nm e emissão de 580 nm).

Para garantir a confiabilidade do método analítico proposto para quantificar DOX, foram avaliados alguns parâmetros tendo como referência o guia para validação de métodos analíticos da ANVISA, de 2003. Os parâmetros avaliados foram: (1 – 20 μM), linearidade ($r^2 = 0,999$), limite de detecção ($\text{LD} = 0,018 \mu\text{M}$), limite de quantificação ($\text{LQ} = 0,06 \mu\text{M}$) e a equação da reta $y=12,73x+12,69$. A avaliação dos parâmetros analíticos foi realizada em triplicata, por três dias consecutivos.

4.3 Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo DOX_{BASE} ou DOX_{AO} e CFM (CLN_{DOX/CFM})

Os CLN desenvolvidos apresentam como componentes de sua matriz lipídica, a manteiga de ucuuba (lipídio sólido, LS) e o óleo de copaíba (lipídio líquido, LL), na concentração de 20 %, e razão 70:30 LS:LL; foram estabilizados pelo tensoativo Pluronic F68 (5 %). As concentrações dos fármacos na formulação foram: 5 mg/mL para DOX_{BASE} ou DOX_{AO} e 30 mg/mL para CFM. Após o preparo a formulação apresentou cor rosada e aspecto aparentemente homogêneo.

4.4 Medidas de tamanho e índice polidispersão das partículas (PDI)

Os tamanhos médios das partículas dos CLN desenvolvidos foram de: $239,4 \pm 5,4$ nm (CLN_{CONTROLE}), $221,4 \pm 2,3$ nm (CLN_{DOXBASE/CFM}) e $237,9 \pm 4,7$ nm (CLN_{DOXAO/CFM}), e seus valores de PDI $0,19 \pm 0,03$ (CLN_{CONTROLE}), $0,16 \pm 0,01$ (CLN_{DOXBASE/CFM}) e $0,16 \pm 0,04$ (CLN_{DOXAO/CFM}) (Figura 9).

Embora o tamanho médio e o PDI das nanopartículas tenham diminuído na presença dos fármacos, não houve diferença estatística significativa entre as formulações ($p > 0,05$) (ANOVA/ Teste Tukey), indicando que a incorporação do fármaco não influenciou significativamente no tamanho das partículas. Valores de PDI inferiores a 0,2 são característicos de distribuição de populações de tamanho monodisperso, com baixa variabilidade e possivelmente sem nenhuma agregação (RIBEIRO et al., 2017; CASTRO et al., 2021). O diâmetro médio das partículas e o PDI são as características mais importantes para os CLN, pois estão diretamente relacionados à sua estabilidade físico-química (LAKSHMI; KUMAR, 2010; TAMJIDI et al., 2013).

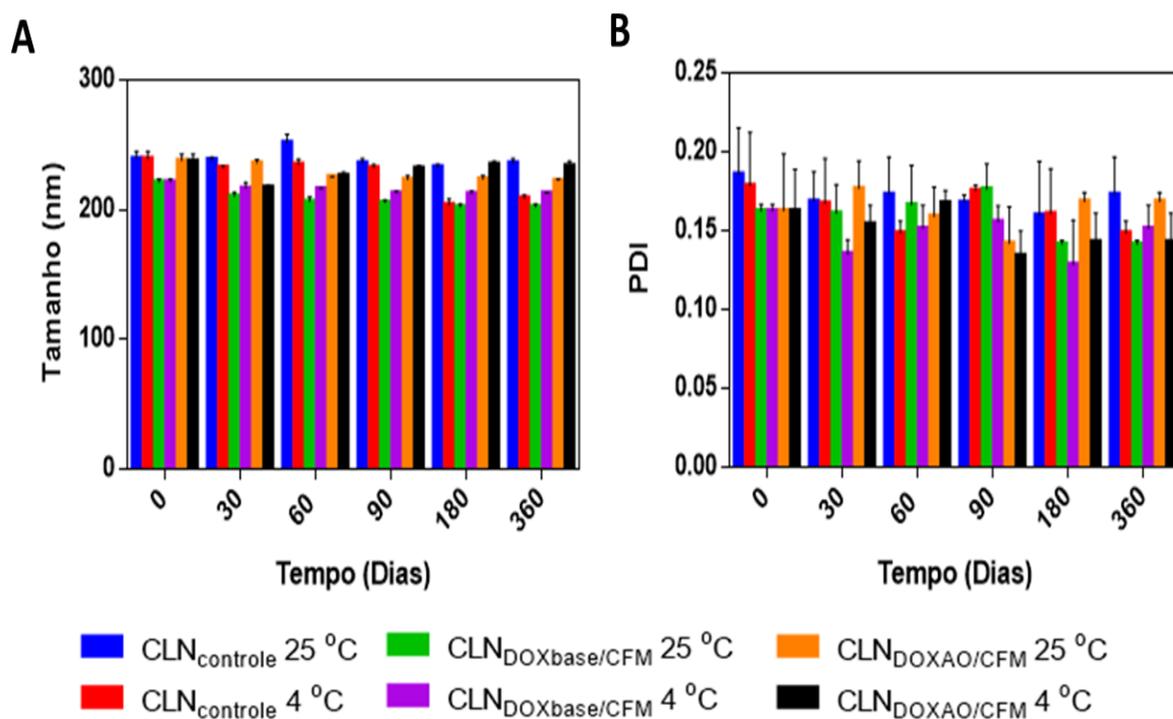


Figura 9: Resultados das análises de tamanho de partícula médio (A) e PDI (B) dos CLN nas temperaturas de armazenamento (4 °C e 25 °C).

4.5 Medida do potencial Zeta (ZP)

Os valores de *ZP* das formulações variaram entre: $-28,6 \pm 0,21$ mV (CLN_{CONTROLE}), $-36,5 \pm 0,23$ mV (CLN_{DOXBASE/CFM}) e $-25,5 \pm 0,57$ mV (CLN_{DOXAO/CFM}) (Figura 10). Os resultados demonstraram diferenças significativas apenas entre os *ZP* das formulações CLN_{CONTROLE} vs CLN_{DOXBASE/CFM}, onde apenas uma das nanopartículas desenvolvidas apresentou aumento no número de cargas negativas. Por isso, acredita-se que não seja decorrente da presença do fármaco, mas possivelmente da metodologia de obtenção da DOX_{BASE}, onde para obtenção de CLN_{DOXBASE/CFM} foi necessário o aumento do pH. No entanto, os valores encontram-se dentro dos esperados para formulações coloidais de boa estabilidade.

Os valores de *ZP* maiores do que +20 mV, ou mais negativos do que -20 mV predizem uma boa estabilidade física da dispersão de nanopartículas, pois se todas as partículas em suspensão têm um alto potencial zeta (negativo ou positivo), repelem-se mutuamente e não haverá tendência para que as partículas se agreguem (BIRIUKOV;

FIBICH; PŘEDOTA, 2020; LUNARDI et al., 2021). Em geral, as nanopartículas lipídicas são carregadas negativamente, desde que, não sejam compostas por lipídios catiônicos sintéticos (HAN et al., 2008).

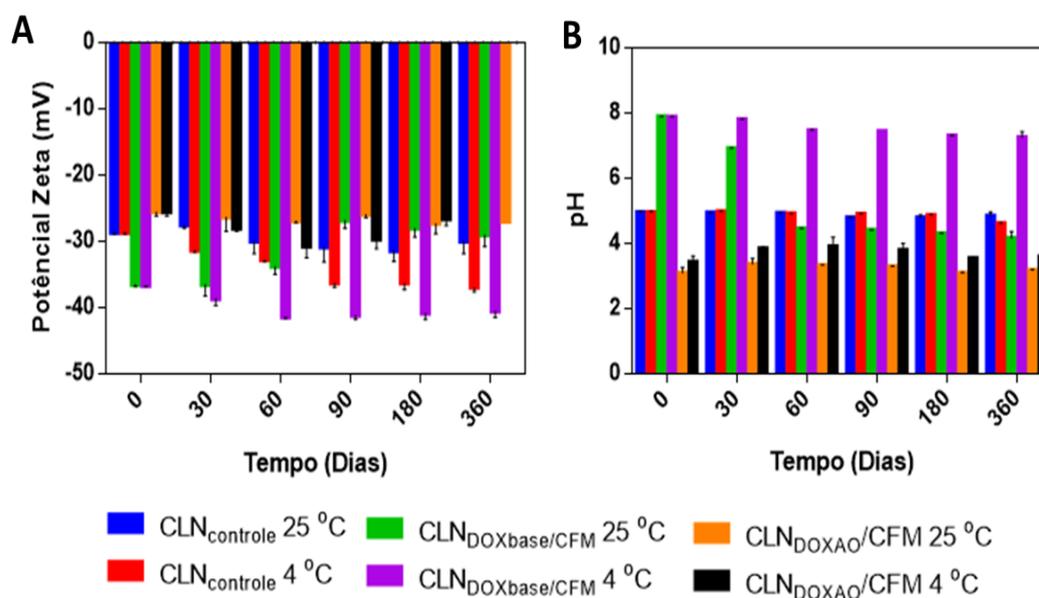


Figura 10: Resultados das análises do potencial zeta (A) e pH (B) dos CLN nas temperaturas de armazenamento (4 °C e 25 °C).

4.6 Medidas do Potencial Hidrogeniônico (pH)

Os carreadores lipídicos desenvolvidos obtiveram valores de pH em torno de $4,95 \pm 0,03$ (CLN_{CONTROLE}), $7,88 \pm 0,01$ (CLN_{DOXBASE/CFM}) e $3,1 \pm 0,18$ (CLN_{DOXAO/CFM}) (Figura 10). A diferença de pH entre as formulações possivelmente ocorreu devido à presença as diferentes formas da DOX encapsulada por CLN: básica (CLN_{DOXBASE/CFM}) e conjugada com AO (CLN_{DOXAO/CFM}). Pode-se observa que a formulação CLN_{DOXBASE/CFM} quando armazenada a temperatura ambiente sofreu uma variação significativa em seu pH quando comparada ao controle e ao longo do tempo, influenciando na sua estabilidade. O mesmo não foi observado para a mesma amostra armazenada em geladeira (4 °C).

4.7 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A técnica de NTA possibilita a medida simultânea (análise multiparamétrica) das nanopartículas em suspensões líquidas, fornecendo dados de distribuição de tamanho, da concentração de partículas e sua visualização direta e em tempo real (GROSS et al., 2016). Seu uso e implicações têm guiado diversos estudos biológicos, como viabilidade celular, ensaios de citotoxicidade e nanotoxicidade e estudos de eficácia *in vivo* nas áreas farmacêutica e ambiental, bem como no tratamento clínico (por exemplo, monitoramento e diagnóstico em leucemia linfocítica crônica) (RIBEIRO et al., 2018).

Na Tabela 8, podemos observar que o número de partículas/mL obtidos foi de cerca $4 - 6.10^{13}$, não apresentando variação expressiva entre os CLN carreando DOX/CFM e os controles, suportando a hipótese de que os fármacos não causaram desordem no sistema.

Tabela 8: Número de partículas/mL determinados por NTA.

Tempo (Dias)	Número de partículas/ mL (10^{13})					
	1	30	60	90	180	360
CLN _{CONTROLE} 25 °C	6,2±0,5	6,5± 0,5	6,3±0,4	6,2±0,1	6,3±0,4	5,0±0,3
CLN _{CONTROLE} 4 °C	5,6±0,3	5,2±0,3	6,3±0,3	5,2±0,5	5,4±0,2	5,8±0,2
CLN _{DOXBASE/CFM} 25 °C	6,3±0,3	6,4±0,1	5,8±0,3	6,0±0,1	6,2±0,4	5,8±0,5
CLN _{DOXBASE/CFM} 4 °C	6,0±0,2	6,7±0,2	5,9±0,2	5,7±0,1	5,6±0,3	5,7±0,3
CLN _{DOXAO/CFM} 25 °C	5,6±0,2	5,4±0,5	5,4±0,4	5,6±0,1	5,4±-0,2	5,4±0,2
CLN _{DOXAO/CFM} 4 °C	6,6±-0,3	6,8±0,2	6,4±0,1	6,6±0,6	5,8±0,3	6,0±0,3

4.8 Avaliação da eficiência de encapsulação (%EE) de DOX_{BASE}/ DOX_{AO} e CFM

A eficiência de encapsulação inicial, ou seja, a quantidade inicial de fármaco presente no interior das nanopartículas foi superior a 94,3 % para DOX e 26,8 % de CFM (Tabela 9). Os resultados obtidos demonstram que as conversões da DOX para sua forma hidrofóbica foram eficazes, agregando uma elevada lipofilicidade às mesmas, característica que favoreceu para sua interação com os lipídios estruturais dos CLN, determinando assim, alta %EE. Como podemos visualizar na Figura 11, o volume do filtrado apresenta-se de cor mais clara em CLN_{DOXAO/CFM}, indicando maior taxa de retenção nas nanopartículas. Por outro lado, como o esperado, CFM apresentou uma baixa %EE, justificada por sua maior hidrofiliabilidade.



Figura 11: Encapsulação de $CLN_{DOX_{BASE}/CFM}$ e $CLN_{DOX_{AO}/CFM}$.

Tabela 9: Eficiência de encapsulação de DOX_{BASE}/DOX_{AO} e CFM pelos CLN, durante o tempo de armazenamento a 4 e 25 °C (* $p < 0,05$).

Formulações	% EE					
	DOX			CFM		
	Tempo (dias)					
	1	180	365	1	180	365
$CLN_{DOX_{BASE}/CFM}$ 25 °C	94,3	86,4	77,38*	34,2	30,5	26,4*
$CLN_{DOX_{BASE}/CFM}$ 4 °C	94,3	90,7	88,5	34,2	32,7	30,3
$CLN_{DOX_{AO}/CFM}$ 25 °C	98,3	96,8	90,5	26,8	24,6	22,6
$CLN_{DOX_{AO}/CFM}$ 4 °C	98,3	92,8	89,2	26,8	23,6	20,6

As análises ao longo do tempo evidenciaram que no $CLN_{DOX_{BASE}/CFM}$ ocorreu uma redução significativa na % EE de ambos os fármacos quando armazenados na temperatura de 25 °C, corroborando com as variações dos valores de pH nas mesmas condições de armazenamento. Por outro lado, $CLN_{DOX_{AO}/CFM}$ apresentou variação significativa de na %EE ($p > 0,05$). Portanto, pode-se sugerir que CLN contendo DOX_{AO}/CFM é o sistema mais estável a longo prazo armazenado em diferentes temperaturas. Além disso, DOX_{BASE}/CFM pode ser um excelente sistema de encapsulação, desde que seja estocado a 4 °C. Após 1 ano, todas as formulações preparadas e armazenadas em distintas condições apresentaram %EE maior que 70 % e 22 % para DOX e CFM, respectivamente.

4.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A obtenção das imagens por de microscopia eletrônica de transmissão (MET) tiveram como objetivo obter informação sobre o formato e o tamanho das nanopartículas lipídicas. As micrografias revelam que as partículas apresentam morfologia aproximadamente esférica e com superfícies suaves na ausência ou presença dos fármacos (DOX/CFM), evidências que certificam que a encapsulação de ambos não perturba a integridade das nanopartículas produzidas (Figura 12).

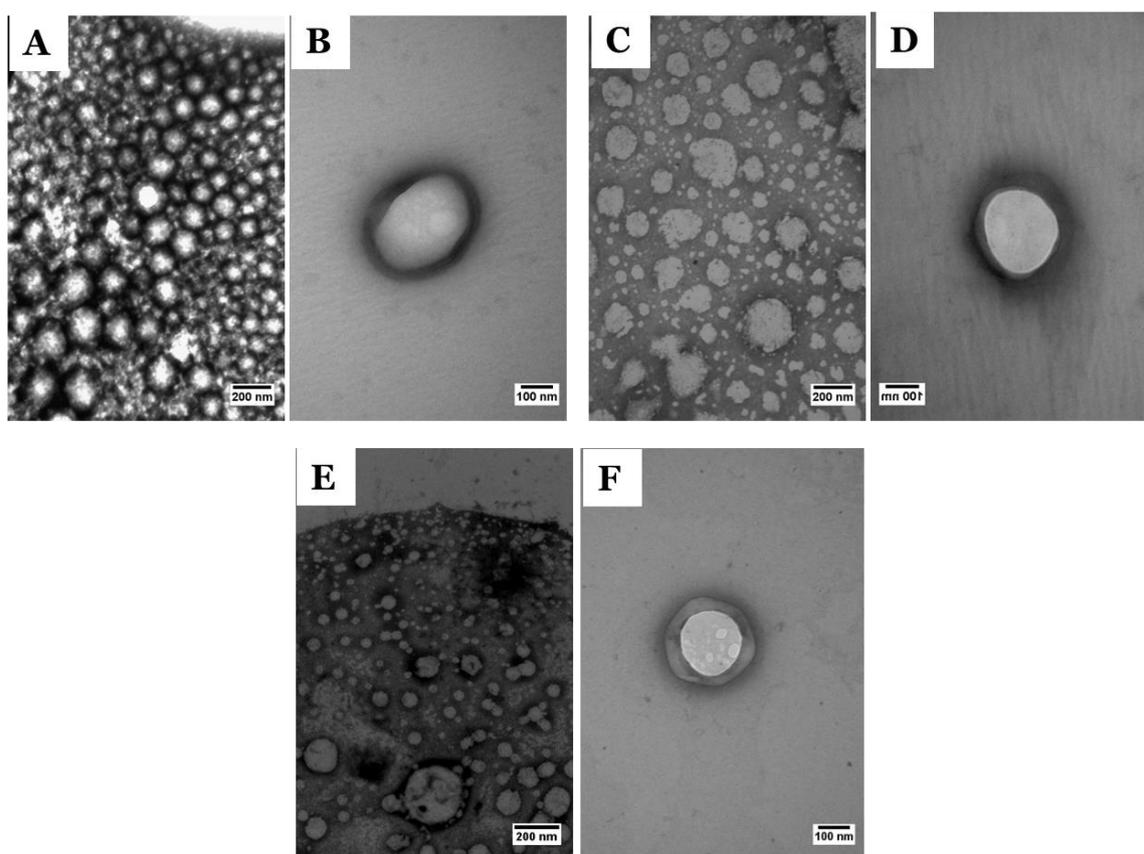


Figura 12: Micrografia dos $CLN_{CONTROLE}$ (A, B), $CLN_{DOXBASE/CFM}$ (C e D) e $CLN_{DOXAO/CFM}$ (E e F), em duas diferentes magnificações: 60.000x (A, C e E) e 100.000x (C, D e F), obtidas a 60 kV.

4.10 Estabilidade físico-química das formulações

As formulações foram estocadas a temperatura ambiente (25 °C) e em geladeira (~4 °C) pelo período de 12 meses. Ao longo do tempo (1, 30, 60, 90, 180 e 360 dias) foram avaliadas de acordo com os seguintes parâmetros: tamanho médio das partículas (nm), PDI,

potencial zeta (mV), pH, concentração de nanopartículas/mL e %EE (Figura 9 e Tabela 8). As análises revelaram que o tamanho médio, PDI e concentração de partículas dos CLN desenvolvidos não apresentaram nenhuma variação significativa ($p > 0,05$). Por outro lado, os valores de potencial zeta, pH e %EE sofreram alterações relevantes nas temperaturas 25 °C para CLN_{DOXBASE/CFM} ($p < 0,05$) e ~4 °C CLN_{DOXAO/CFM} ($p < 0,05$). O principal parâmetro que apresentou variação significativa foi detectado pela queda da %EE, pois a possível expulsão do fármaco do interior da nanopartícula pode ter influenciado na queda das cargas negativas do PZ, e, conseqüentemente, na redução do pH ao longo do tempo de análise (Figura 10 e Tabela 9).

Portanto, a incorporação da DOX/CFM não desestabilizou inicialmente os sistemas coloidais, porém, apresentam temperaturas de estocagens distintas para melhor estabilidade. Dessa forma, sugere-se que as formulações CLN_{DOXBASE/CFM} e CLN_{DOXAO/CFM} sejam armazenadas nas temperaturas 25 °C e 4 °C, respectivamente, a fim de evitar essa queda na encapsulação. Com este estudo a longo prazo garantiu-se o controle de qualidade ou tempo de prateleira das formulações em diferentes condições.

4.11 Ensaio de cinética de liberação *in vitro* de DOX e CFM

Os testes de liberação *in vitro* de formulações permitem analisar o perfil de liberação dos fármacos, relacionando-o com a modulação de sua liberação a partir da matriz lipídica das nanopartículas. Permite ainda comparar a capacidade de diferentes sistemas em reter o fármaco incorporado durante um tempo mais longo e classificá-los como sistema de liberação sustentada/controlada (KAUR et al., 2015). Relata-se que fatores como: tamanho de partícula, matriz lipídica, agente tensoativo, concentração de fármaco na matriz de lipídica e a classe do fármaco podem influenciar seu perfil de liberação do fármaco a partir de CLN (MUHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998; DAN, 2014; ÜNER; KARAMAN; AYDOĞMUŞ, 2014; NAGAICH; GULATI, 2016).

O estudo de liberação *in vitro* de DOX e CFM foi realizado por 24 h a 37 °C, respeitando a condição *sink*. DOX-HCl e CFM em solução aquosa, empregados como controle, apresentaram 100 % de liberação após o período de 7 a 8 h de experimento, respectivamente. Enquanto isso, os CLN_{DOXBASE/CFM} apresentaram taxa de liberação de DOX_{BASE} de 40,9 % e CFM 80,1 %, e nos CLN_{DOXAO/CFM} de DOX_{AO} de 21,03 % e CFM

73,4%, após 8 h de estudo. Foi demonstrado que são sistemas eficientes de liberação sustentada, cuja liberação está relativamente ligada à sua capacidade de encapsulação (Figura 13). Segundo Nautyal et al. (2015), a quantidade de fármaco na superfície das partículas, além da fração não-encapsulada (livre na fase aquosa), é liberada de forma rápida, responsáveis pelo efeito *burst*. Enquanto o fármaco incorporado no núcleo das partículas é liberado de uma forma prolongada. Estudos revelam que a interação da matriz lipídica dos CLN com o fármaco provavelmente é o principal fator de modulação da taxa de liberação do composto encapsulado (CASTELLI et al., 2005).

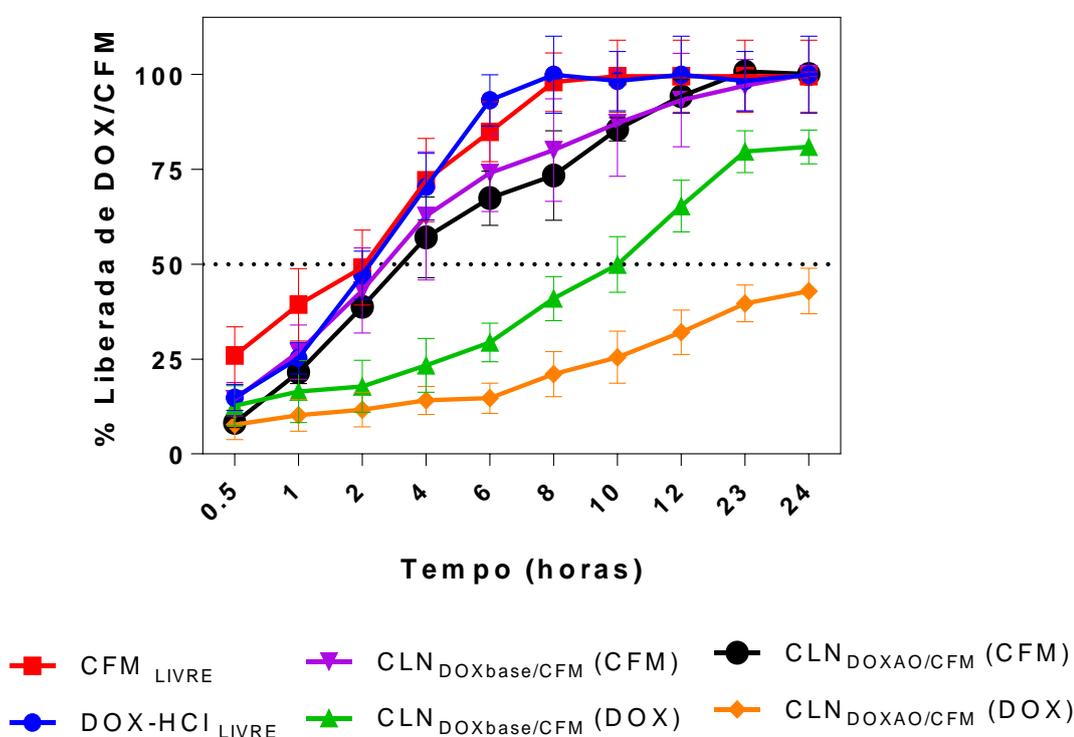


Figura 13: Cinética *in vitro* de liberação de DOX-HCl e CFM em solução aquosa e encapsulada em CLN ($CLN_{DOXBASE/CFM}$ e $CLN_{DOXAO/CFM}$), em tampão PBS pH 7,4; n=6.

Com a finalidade de analisar o mecanismo de liberação dos fármacos a partir dos CLN, os resultados encontrados foram investigados empregando os modelos matemáticos de liberação: de zero e primeira ordens, Hixson-Crowell e Korsmeyer-Peppas, pela análise da regressão linear de cada equação, conforme dados na Tabela 10, empregando-se o programa

KinectDS3. O coeficiente de determinação (R^2) foi utilizado como um indicador do melhor ajuste para cada um dos modelos considerados.

Tabela 10: Parâmetros da cinética de liberação de DOX e CFM dos CLN por diferentes modelos de liberação *in vitro* e respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Modelos	Ordem zero	Primeira ordem	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas
CLN _{DOXbase/CFM} (DOXbase)	0,938	0,854	0,893	0,945
CLN _{DOXbase/CFM} (CFM)	0,697	0,527	0,588	0,927
CLN _{DOXAO/CFM} (DOX _{AO})	0,929	0,879	0,916	0,959
CLN _{DOXAO/CFM} (CFM)	0,742	0,512	0,599	0,911

De acordo com os valores obtidos de R^2 , o modelo de Korsmeyer-Peppas mostrou-se o mais apropriado para descrever a liberação de ambos os fármacos pelos CLN. Este modelo é geralmente usado para analisar a liberação de formas de dosagem farmacêuticas lipídicas, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido, ou quando mais de um tipo de fenômenos de liberação podem estar envolvidos (LOBO; COSTA, 2001). Resultados semelhantes já foram descritos para explicar o perfil de liberação de fármacos, a partir de CLN carreando diferentes classes de fármacos (NEUPANE et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Conforme o valor de n encontrado no modelo de Korsmeyer-Peppas pode-se determinar o mecanismo de liberação do fármaco (DASH et al., 2010; ÜNER; KARAMAN; AYDOĞMUŞ, 2014). Os limites considerados neste estudo foram: $n = 0,45$ caracterizando liberação por difusão Fickiana clássica, $n = 0,89$ liberação de transporte de caso-II ou liberação de ordem zero e valores de n entre $0,45 < n < 0,89$ = liberação não-Fickiana, de transporte anômalo envolvendo ambos os fenômenos (LOBO; COSTA, 2001; DASH et al., 2010; SINGHVI; SINGH, 2011). O valor de n para a formulação de CLN contendo DOX_{base} foi de 0,83 e 0,79 para CFM, e aquela contendo DOX_{AO} foi de 0,81 e para CFM de 0,77,

respectivamente. Isto indica que o mecanismo predominante na liberação de ambos os antineoplásicos foi o de transporte anômalo não-Fickiano com liberação constante. Isto significa que ocorreu um padrão combinado de liberação dos fármacos através de CLN por difusão e erosão a partir das suas matrizes lipídicas, o que mostra a capacidade do sistema em sustentar a liberação dos fármacos, em especial de DOX.

4.12 Ensaios de Citotoxicidade em células de MCF7 – Método Alamar Blue

Ensaios de citotoxicidade são amplamente utilizados como investigação preliminar da toxicidade de nanocarreadores (MENDES et al., 2015). Na Tabela 11 estão descritos os valores obtidos de IC_{50} para células de câncer de mama (MCF7) tratadas com DOX/CFM livre e encapsuladas nos CLN, após o período de 24 h. É possível observar que não houve perda na atividade citotóxica dos fármacos quando encapsulados. Além disso, houve uma potencialização do seu efeito frente às células MCF7 (Figura 14) quando tratadas com CLN_{DOXbase/CFM}. Por outro lado, os CLN_{DOXAO/CFM} reduziram significativamente a atividade citotóxica no mesmo tempo de análise, o que possivelmente está ligado à alta porcentagem de encapsulação da mesma.

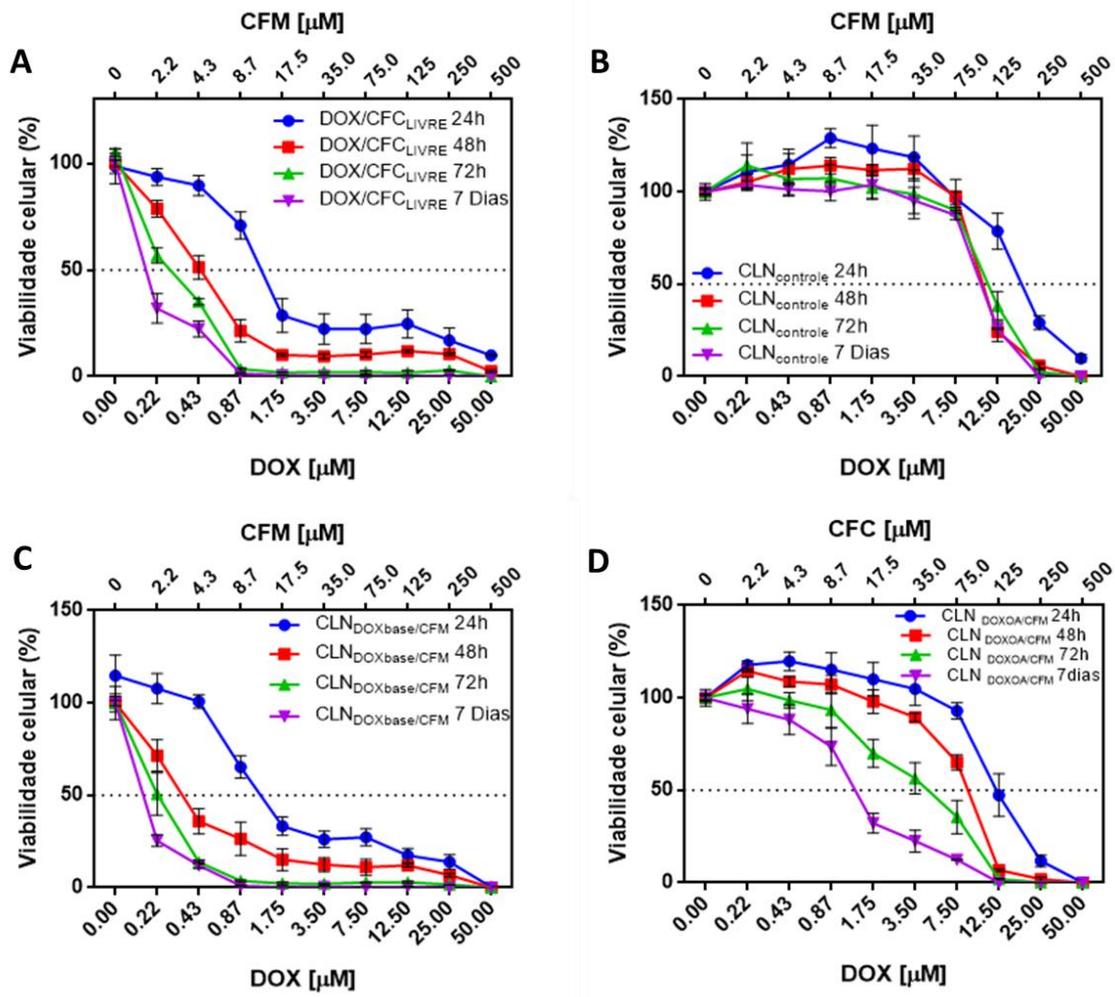


Figura 14: Avaliação da citotoxicidade de DOX/CFM livre e encapsuladas em CLN sobre células MCF7 após tratamento por 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias, pelo método de Alamar Blue. DOX/CFC_{livre} (A), CLN_{control} (B), CLN_{DOXbase/CFM} (C) e CLN_{DOXAO/CFM} (D).

Tabela 11: Valores de IC₅₀ em 24 h, obtidos no ensaio de citotoxicidade *in vitro* pelo método de Alamar Blue.

	IC ₅₀ (μM)
DOX/CFM _{livre}	0,63
CLN _{DOXbase/CFM}	0,59
CLN _{DOXAO/CFM}	22,6

A fim de correlacionar o perfil de liberação com a citotoxicidade, o estudo foi realizado durante 7 dias, os resultados mostraram redução significativa da viabilidade celular ao longo do tempo de 72 h, sendo que $CLN_{DOXbase/CFM}$ continuou apresentando efeito citotóxico maior que o fármaco livre, demonstrando uma possível melhora na internalização do mesmo. Em contrapartida, $CLN_{DOXAO/CFM}$ não alcançou a IC_{50} do fármaco livre do tempo de 24h durante o período de estudo (7 dias). Porém, manteve sua atividade citotóxica reduzida. Resultados que corroboraram para com o perfil de liberação de ambos os carreadores desenvolvidos.

4.13 Desenvolvimento das formulações de hidrogéis contendo os CLN

Os hidrogéis de poloxamers desenvolvidos de acordo com o item 3.15 foram usados para incorporar os fármacos livres DOX/CFM ($PL405\ 25\ \% + DOX/CFM_{LIVRE}$), $CLN_{CONTROLE}$ ($PL407\ 25\ \% + CLN_{CONTROLE}$), $CLN_{DOXBASE/CFM}$ ($PL407\ 25\ \% + CLN_{DOXBASE/CFM}$) e $CLN_{DOXAO/CFM}$ ($PL407\ 25\ \% + CLN_{DOXAO/CFM}$). Os géis que eram translúcidos apresentaram coloração avermelhada quando os CLN e os fármacos livres foram incorporados, em virtude da DOX que se apresenta como um pó de cor vermelho intenso (Figura 15). Além disso, os hidrogéis que em temperatura ambiente apresentavam-se com consistência de gel, quando refrigerados mostravam-se líquidos.



Figura 15: Foto digital dos hidrogéis de poloxamers contendo DOX/CFM livres e encapsulados nos CLN.

4.14 Caracterização físico-química dos hidrogéis contendo CLN_{DOXBASE/CFM} e CLN_{DOXAO/CFM}

4.14.1 Reologia dos géis

4.14.1.1 Determinação da temperatura de gelificação (T_{gel}) utilizando reometria oscilatória

A determinação da T_{gel} de hidrogéis termosensíveis é fundamental para prever sua consistência após a administração. Além disso, torna possível compreender o papel e a interação dos excipientes das formulações preparadas. Nesse sentido, o processo de gelificação das formulações foi avaliado através da variação dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da temperatura, a um valor constante de 1 Hz de frequência.

A T_{gel} foi determinada no ponto onde curvas de G' e G'' se interceptam no gráfico. De acordo com a Figura 16, observa-se que a T_{gel} obtida pelas formulações variou na faixa de temperatura de 22-26 °C. Especificamente, os valores de T_{gel} obtidos foram: PL407_{CONTROLE} 25 % = 23,8 °C, PL407 25 % + CLN_{CONTROLE} = 26,2 °C, PL 407 25 % + CLN_{DOXBASE+CFM} = 22,4 °C e PL 407 25 % + CLN_{DOXAO+CFM} = 22,5 °C (

Figura 16).

Os resultados foram satisfatórios, pois os valores resultantes de T_{gel} dos hidrogéis foram inferiores do que a temperatura fisiológica da pele de 32,5 °C. Dessa forma, as formulações poderiam ser topicamente aplicadas nas proximidades do tumor de mama na sua forma líquida e refrigerada, e ao contato com a pele se gelificaria mantendo-se aderida na região de interesse, liberando os ativos gradualmente e reduzindo a toxicidade sistêmica dos fármacos.

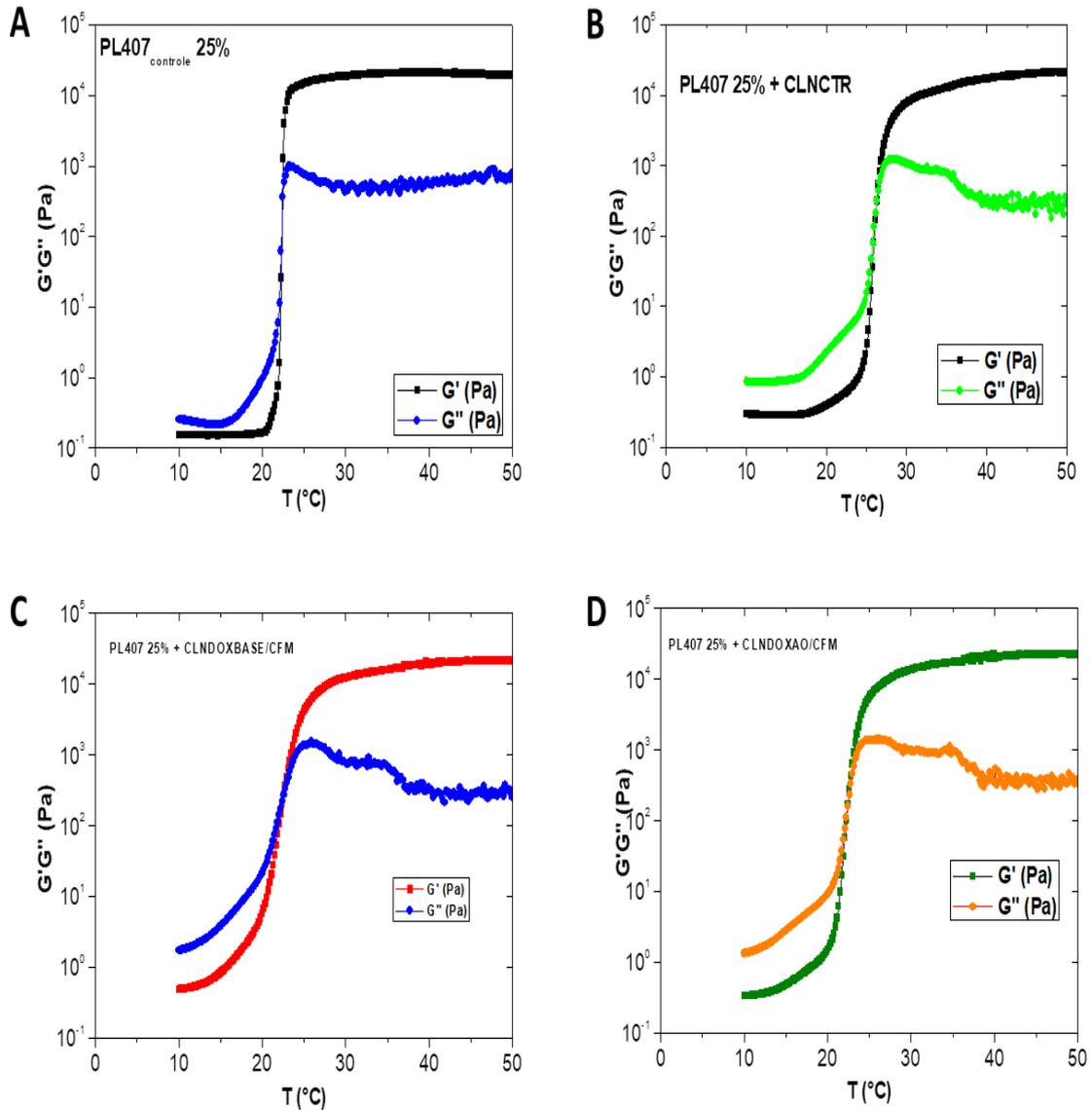


Figura 16: Temperatura de Transição sol-gel (T_{gel}) das formulações de Poloxamer 407 a 25 %, em função a variação de temperatura. (A, B, C, D). Formulações de PL₄₀₇CONTROLE 25 % (A), PL407 25 % + CLN_{CONTROLE} (B), PL407 25 % + CLN_{DOXBASE+CFM} (C) e PL407 25 % + CLN_{DOXAO+CFM} (C).

As curvas de variação de G' e G'' obtidas são típicas de sistemas termossensíveis à base de poloxamers, uma vez que o módulo de elasticidade G' apresentou-se muito baixo ($<10^1$) na fase de solução e aumentou ($<10^4$) drasticamente quando a T_{gel} foi atingida (

Figura 16). Os valores observados foram totalmente dependentes do aumento da temperatura. Ou seja, as diferentes amostras apresentaram comportamento newtoniano abaixo da temperatura de gelificação, e um comportamento não-newtoniano acima desta temperatura (MAYOL et al., 2008; JONES et al., 2009).

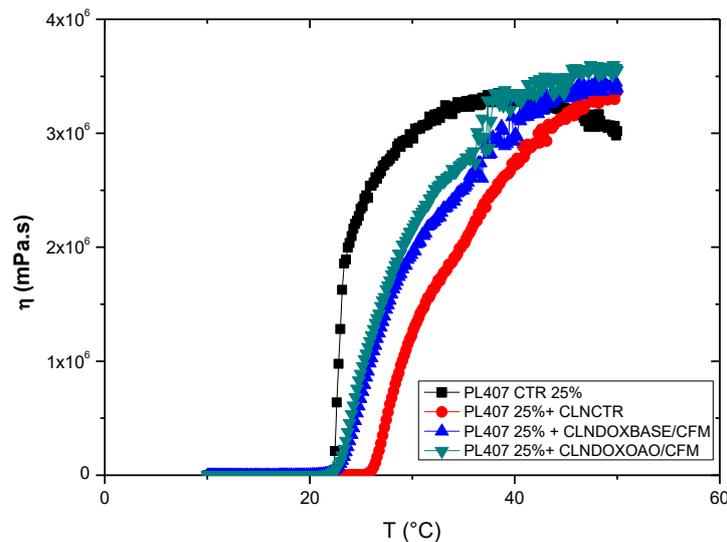


Figura 17: Variação da viscosidade dos hidrogéis em função da temperatura.

Nesse experimento também foi observada uma variação na viscosidade dinâmica (η) das amostras em relação à variação da temperatura de análise. Os valores de η descrevem a resistência do fluxo da amostra no estado estruturado quando submetidas a uma tensão de cisalhamento de 1 Hz (KARAVANA et al., 2012). A Figura 17 mostra que a η é dependente da temperatura do sistema, sendo afetada bruscamente pela T_{gel} do hidrogel. Ou seja, a

viscosidade tende a aumentar devido à formação do gel, em seguida, mantêm-se constante. Aumentos nos valores da η em função da temperatura sob baixas frequências oscilatórias, quando observadas em géis, são característicos de sistemas viscoelásticos. Os resultados obtidos estão conforme o requerido para as amostras de hidrogéis aqui avaliadas (KARAVANA et al., 2012).

4.14.1.2 Determinação das propriedades viscoelásticas dos hidrogéis utilizando reometria oscilatória

As propriedades viscoelásticas dos hidrogéis foram determinadas através dos ensaios de varredura de frequência e em deformação oscilatória de baixa amplitude, na faixa de 0,1 a 10 Hz e na temperatura fixa de 32,5 °C ($> T_{gel}$).

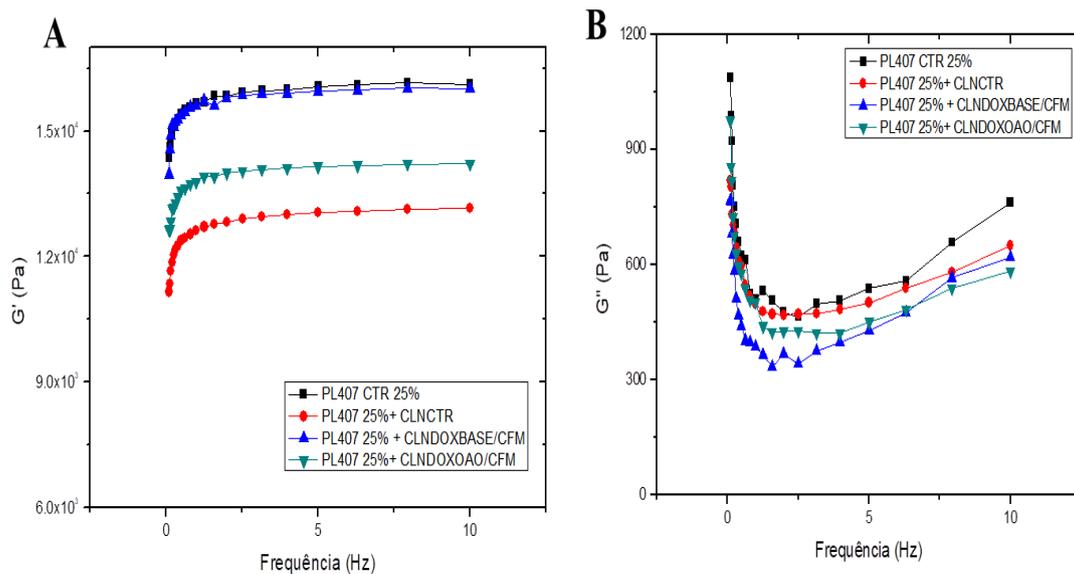


Figura 18: Valores de módulo elástico (G') (A) e módulo viscoso (G'') (B) em função da variação de frequência de 0,1-10Hz, temperatura de 32,5 °C.

As Figura 18 A e B mostram as variações dos valores de G' e G'' em função da frequência dos hidrogéis. Foi observado que os valores de G' foram maiores do que os observados para o G'' para todas as formulações. Além disso, as variações nos valores de G' e G'' não foram dependentes da frequência, o que caracteriza que os hidrogéis desenvolvidos

apresentavam comportamento pseudoplástico (não-newtoniano) na temperatura desejada de 32,5 °C (VEYRIES et al., 1999; JONES et al., 2009). Cabe ressaltar que um hidrogel deve apresentar um espectro mecânico do tipo sólido. Isto é, a relação entre eles deverá ser de $G' > G''$ por toda a gama de frequências experimentalmente acessíveis, com pouca dependência entre os módulos de frequência (KARAVANA et al., 2012). Apesar da discreta variação observadas nos valores de G' e G'' das amostras analisadas, as formulações mantiveram as características reológicas correspondentes a de gel verdadeiro (pseudoplástico) na temperatura de 32,5 °C.

4.15 Ensaios *in vivo* de eficácia antineoplásica dos hidrogéis (preliminares)

4.15.1 Atividade antitumoral *In vivo*

A atividade antitumoral de PL 407 25 % + DOX/CFM_{LIVRE}, CLN_{DOXBASE/CFM} e PL 407 25 % + CLN_{DOXBASE/CFM} foi avaliada em fêmeas da linhagem Sprague-Dawley. Como mostrado na Figura 19, o crescimento do tumor foi significativamente menor para o grupo de tratamento CLN_{DOXbase/CFM}, seguido de PL 407 25% + CLN_{DOXbase/CFM} e PL 407 25 % + DOX/CFM livre. Os resultados demonstram que a formulação que continha o fármaco encapsulado (CLN_{DOXBASE/CFM}) e a mesma incorporada no hidrogel (PL 407 25 % + CLN_{DOXbase/CFM}) apresentaram maior atividade na inibição do crescimento tumoral que os demais tratamentos. Vale ressaltar que o CLN_{DOXbase/CFM} se mostrou o melhor no controle do crescimento tumoral, indicado pelas diferenças significativas em relação a todos os outros tratamentos ($p < 0,05$). O grupo de tratamento CLN_{DOXbase/CFM} foi capaz de inibir o crescimento do tumor em 13,9 %. Enquanto isso, PL 407 25 % + CLN_{DOXbase/CFM} e PL 407 25 % + DOX/CFM livre inibiram o crescimento do tumor em apenas 5,1 % e 4,8 %, respectivamente.

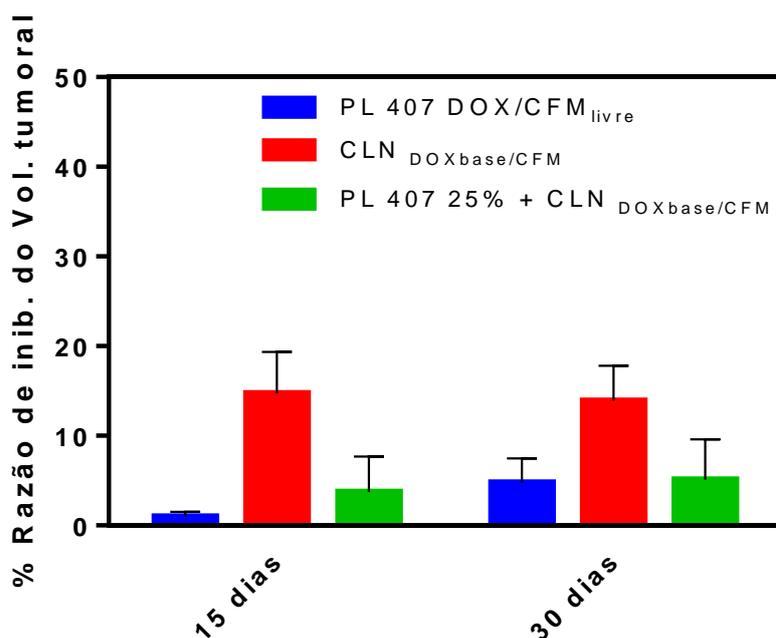


Figura 19: Razão de inibição do crescimento tumoral (IR) após administração intraperitoneal de PL 407 25 % + DOX/CFM_{livre}, CLN_{DOXBASE/CFM} e PL 407 25 % + CLN_{DOXBASE/CFM}.

Além disso, podemos observar que as formulações que continham os fármacos encapsulados possivelmente apresentaram menor toxicidade local, o que pode ser visualmente constatado pela foto digital do local de aplicação (Figura 20). Na Figura 20, verifica-se que o local onde foi aplicada a formulação PL 407 25 % + DOX/CFM livre apresentou uma lesão aparente, cujo seu desaparecimento foi maior na formulação PL 407 25 % + CLN_{DOXBASE/CFM}. Diante do exposto, supomos que além da encapsulação proteger o fármaco, o gel também pode ter exercido um efeito protetivo adjuvante a longo prazo.

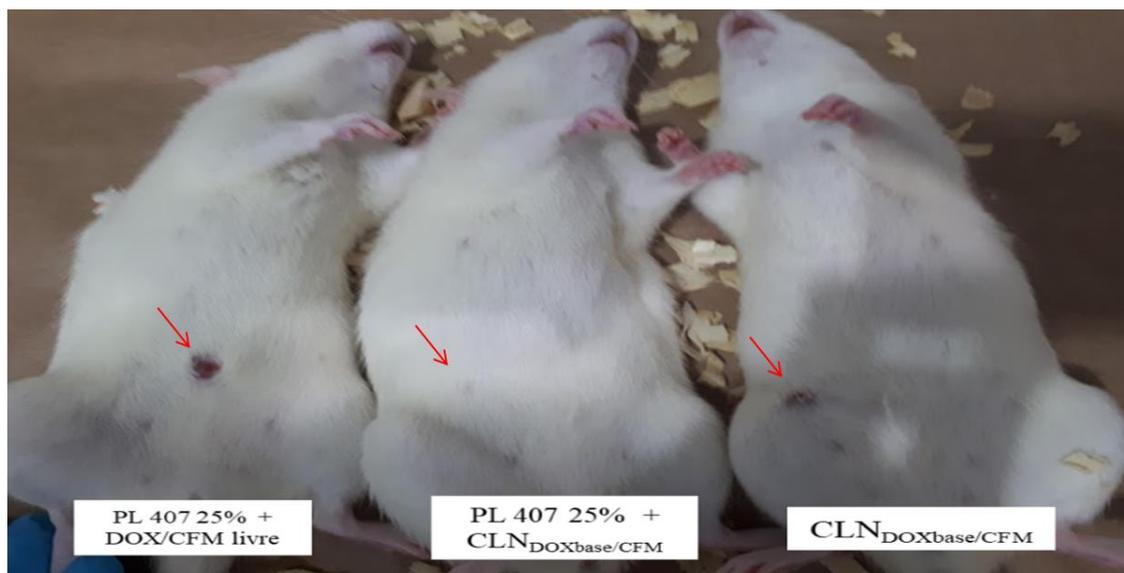


Figura 20: Local de aplicação intraperitoneal das formulações

Portanto, as formulações contendo os fármacos encapsulados nos CLN foram bastante promissoras, e ao serem incorporadas nos hidrogéis agregou-se mais uma atividade protetiva, característica interessante principalmente para fármacos tóxicos como todos os antineoplásicos. Fato que as tornou formulações candidatas potenciais como um futuro tratamento contra câncer de mama, porém análises imuno-histoquímicas, histopatológicas, dentre outras, serão futuramente realizadas para fornecer conclusões mais detalhadas a respeito da toxicidade *in vivo* dos hidrogéis termosensíveis preparados.

5 CONCLUSÕES

O Câncer de mama é a doença maligna que mais acomete as mulheres. Geralmente o tratamento contempla a quimioterapia, que causa severos efeitos colaterais, além de muitas vezes ser ineficaz. Portanto, na busca de melhorar a qualidade de vida do paciente, aliada a necessidade de um aumento da potência dos antineoplásicos comercialmente disponíveis, foi desenvolvido um hidrogel promissor contendo antineoplásicos (DOX e CFM) encapsulados em CLN, como um potencial tratamento contra o câncer de mama. Inicialmente, foram preparados carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) que encapsularam DOX_{base} (3 mg/mL) e CFM (30 mg/mL). Os CLN cuja matriz lipídica foi composta de manteiga de ucuuba e óleo de copaíba foram estabilizados com 5 % de surfactante. As nanopartículas dos CLN contendo ou não os fármacos apresentaram tamanhos médios < 240 nm, PDI entre 0,163-0,186, valores na faixa de -23 a -28 mV e pH em torno de 3,6 e 4,9 para CLN_{controle} e CLN_{DOXBASE/CFM}, respectivamente. Todos os sistemas foram estáveis durante os 365 dias de armazenamento a 25 e 4 °C. Os CLN exibiram boa eficiência de encapsulação de DOX_{base} (acima de 90 %). Por outro lado, a CFM apresentou-se cerca de 30 % encapsulada, resultado esperado dado seu menor coeficiente de partição. O perfil de liberação sustentada dos fármacos (DOX/CFM) ocorreu de maneira bifásica: efeito *burst* até a primeira hora de experimento, seguido de uma liberação sustentada de ambos os fármacos. O ensaio de viabilidade celular nas células MCF7 demonstrou que houve potencialização do seu efeito citotóxico de ambos os fármacos quando encapsulados. Ao longo de 7 dias de análise, observou-se uma redução significativa da viabilidade celular nas primeiras 72 h, correlacionado com o perfil *in vitro* de liberação sustentada. A formulação CLN_{DOXBASE/CFM} foi então incorporada em uma matriz de poloxamer PL 407. O hidrogel resultante apresentou propriedades reológicas desejáveis na temperatura que mimetizava a pele (32,5 C). Ensaios preliminares de atividade antineoplásica em tumores intra-mamários de ratas evidenciaram que o sistema tópico termorreversível preparado poderá potencializar a atividade antineoplásica de DOX e CFM.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLAHPOUR, S. et al. Development of Doxorubicin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers: Preparation, Characterization, and In Vitro Evaluation on MCF-7 Cell Line. **BioNanoScience**, v. 7, n. 1, p. 32–39, 2017.

AHMAD, M. et al. A fast and simple HPLC-UV method for simultaneous determination of three anti-cancer agents in plasma of breast cancer patients and its application to clinical pharmacokinetics. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 7, p. 915–922, 2011.

AHN, S. G. et al. Molecular classification of triple-negative breast cancer. **Journal of Breast Cancer**, v. 19, n. 3, p. 223–230, 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **ANVISA**, 2003.

ARTZNER, F. et al. Interactions between poloxamers in aqueous solutions: Micellization and gelation studied by differential scanning calorimetry, small angle X-ray scattering, and rheology. **Langmuir**, v. 23, n. 9, p. 5085–5092, 2007.

BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 2, p. 98–106, 2008.

BEH, C. Y. et al. Development of erythropoietin receptor-targeted drug delivery system against breast cancer using tamoxifen-loaded nanostructured lipid carriers. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 771–782, 2017.

BEH, C. Y. et al. Enhanced anti-mammary gland cancer activities of tamoxifen-loaded erythropoietin-coated drug delivery system. **Jornal PloS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–25, 2019.

BIRIUKOV, D.; FIBICH, P.; PŘEDOTA, M. Zeta Potential Determination from Molecular Simulations. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 124, n. 5, p. 3159–3170, 2020.

BORGES, G. S. M. et al. Sclareol is a potent enhancer of doxorubicin: Evaluation

of the free combination and co-loaded nanostructured lipid carriers against breast cancer. **Life Sciences**, v. 232, n. February, p. 116678, 2019.

BRAY, J. et al. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 6, p. 1003–1009, 2010.

CASTELLI, F. et al. Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 304, n. 1–2, p. 231–238, 2005.

CASTRO, S. R. et al. A pre-formulation study of tetracaine loaded in optimized nanostructured lipid carriers. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2021.

CHAN, M. M. et al. Serial transplantation of NMU-induced rat mammary tumors: A model of human breast cancer progression. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 3, p. 474–485, 2007.

DAN, N. Nanostructured Lipid Carriers : Effect of Solid Phase Fraction and Distribution on the Release of Encapsulated Materials. **Langmuir**, v. 30, p. 13890–13814, 2014.

DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217–23, 2010.

DASS, C. R.; TAN, M. L.; CHOONG, P. F. M. Review : doxorubicin delivery systems based on chitosan for cancer therapy. . **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 61, p. 131–142, 2009.

DE SOUSA MARCIAL, S. P.; CARNEIRO, G.; LEITE, E. A. Lipid-based nanoparticles as drug delivery system for paclitaxel in breast cancer treatment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 19, n. 10, 2017.

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.

EMADI, A.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. Cyclophosphamide and cancer: Golden anniversary. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, n. 11, p. 638–647, 2009.

FAN, C. et al. Combination breast cancer chemotherapy with doxorubicin and cyclophosphamide damages bone and bone marrow in a female rat model. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 165, n. 1, p. 41–51, 2017.

FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes and Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77–106, 2018.

FERNANDES, R. S. et al. Doxorubicin-loaded nanocarriers: A comparative study of liposome and nanostructured lipid carrier as alternatives for cancer therapy. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 252–257, 2016.

FERNANDES, R. S. et al. Nanostructured Lipid Carrier Co-loaded with Doxorubicin and Docosahexaenoic Acid as a Theranostic Agent: Evaluation of Biodistribution and Antitumor Activity in Experimental Model. **Molecular Imaging and Biology**, p. 1–11, 2017.

FIGUEROA-MAGALHÃES, M. C. et al. Treatment of HER2-positive breast cancer. **The Breast**, v. 23, n. 2, p. 128–136, 2014.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 47, n. 2, p. 125–132, 1999.

FUNDARÒ, A.; CAVALLI, B. Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats. **Pharmacological Research**, v. 42, n. 4, p. 337–343, 2000.

GARRIDO-CASTRO, A. C.; LIN, N. U.; POLYAK, K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: Improving patient selection for treatment. **Cancer Discovery**, v. 9, n. 2, p. 176–198, 2019.

GROSS, J. et al. Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 30–41, 2016.

GULFAM, M. et al. Anticancer drug-loaded gliadin nanoparticles induce apoptosis in breast cancer cells. **Langmuir**, v. 28, n. 21, p. 8216–8223, 2012.

HAIDER, M. et al. Nanostructured lipid carriers for delivery of chemotherapeutics: A review. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 1–26, 2020.

HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system : Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, p. 210–216, 2008.

HARBECK, N.; GNANT, M. Breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 10074, p. 1134–1150, 2017.

HOW, C. W. et al. Tamoxifen-loaded nanostructured lipid carrier as a drug delivery system: Characterization, stability assessment and cytotoxicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 393–399, 2013.

IARC. **Cancer today**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em: 20 out. 2021.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, p. 1–13, 2005.

INCA. **Estimativa 2020: Incidência do Câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2021.

JIANG, G. et al. Comprehensive comparison of molecular portraits between cell lines and tumors in breast cancer. **BMC Genomics**, v. 17, n. 285–325, 2016.

JONES, D. S. et al. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1–2, p. 49–58, 2009.

KARAVANA, S. Y. et al. A New In-Situ Gel Formulation of Itraconazole for Vaginal Administration. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 03, n. 04, p. 417–426, 2012.

KAUR, S. et al. Nanostructure Lipid Carrier (NLC): the new generation of lipid nanoparticles. **Asian Pacific Journal of Health Sciences**, v. 2, n. 2, p. 76–93, 2015.

KLOUDA, L.; MIKOS, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical

applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 1, p. 34–45, 2008.

LAKSHMI, P.; KUMAR, G. A. Nano - Suspension technology: A Review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 35–40, 2010.

LARSON, R. R.; KHAZAELI, M. B.; DILLON, H. K. Development of an HPLC Method for Simultaneous Analysis of Five Antineoplastic Agents. **Applied Occupational and Environmental Hygiene**, v. 18, n. August 2012, p. 109–119, 2003.

LI, X.; JIA, X.; NIU, H. Nanostructured lipid carriers co-delivering lapachone and doxorubicin for overcoming multidrug resistance in breast cancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 4107–4119, 2018.

LIU, D. et al. Nanostructured lipid carriers as novel carrier for parenteral delivery of docetaxel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 262–269, 2011.

LIU, Q. et al. Co-delivery of baicalein and doxorubicin by hyaluronic acid decorated nanostructured lipid carriers for breast cancer therapy. **Drug Delivery**, v. 23, n. 4, p. 1364–1368, 2016.

LOBO, M. S.; COSTA, P. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.

LOIBL, S.; GIANNI, L. HER2-positive breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 10087, p. 2415–2429, 2017.

LOWRY, G. V. et al. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n. 5, p. 953–965, 2016.

LUNARDI, C. N. et al. Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 99, n. 3, p. 627–639, 2021.

MANGLA, B. et al. Lipid-nanopotiated combinatorial delivery of tamoxifen and sulforaphane: Ex vivo, in vivo and toxicity studies. **Nanomedicine**, v. 15, n. 26, p. 2563–2583, 2020.

MANNI, A. et al. The impact of fish oil on the chemopreventive efficacy of tamoxifen against development of N-Methyl-N-Nitrosourea-Induced rat mammary carcinogenesis. **Cancer Prevention Research**, v. 3, n. 3, p. 322–330, 2010.

MAROUFI, N. F. et al. Sensitization of MDA-MBA231 breast cancer cell to docetaxel by myricetin loaded into biocompatible lipid nanoparticles via sub-G1 cell cycle arrest mechanism. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 1, 2020.

MAYOL, L. et al. A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and in vitro release properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 1, p. 199–206, 2008.

MENDES, a. I. et al. Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: Improving antifungal activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 755–763, 2013.

MENDES, L. P. et al. Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 6, p. 1268–1274, 2015.

MENDYK, A.; JACHOWICZ, R. Unified methodology of neural analysis in decision support systems built for pharmaceutical technology. **Expert Systems with Applications**, v. 32, n. 4, p. 1124–1131, 2007.

MUHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 149–155, 1998.

MULLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 242, p. 121–128, 2002.

NAGAICH, U.; GULATI, N. Nanostructured lipid carriers (NLC) based controlled release topical gel of clobetasol propionate : design and in vivo characterization. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 12, p. 1–10, 2016.

NAKAYAMA, G. R. et al. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, n. 2, p. 205–208, 1997.

NEUPANE, Y. R. et al. Lipid drug conjugate nanoparticle as a novel lipid nanocarrier for the oral delivery of decitabine: ex vivo gut permeation studies. **Nanotechnology**, v. 24, p. 1–11, 2013.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 5426, p. 5421–5426, 2000.

OCTAVIA, Y. et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 6, p. 1213–1225, 2012.

OVIDO, R.; MÉNDEZ, N. A. N.; GÓMEZ, M. P. G. Design of a Physical and Nontoxic Crosslinked Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 57, n. 12, p. 1095–1103, 2008.

PATHMANATHAN, N. et al. Characteristics of HER2-positive breast cancer diagnosed following the introduction of universal HER2 testing. **Breast**, v. 21, n. 6, p. 724–729, 2012.

PEDRO, I. D. R. et al. Optimization and in vitro/in vivo performance of paclitaxel-loaded nanostructured lipid carriers for breast cancer treatment. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 3, n. 10, p. 1–8, 2019.

PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, n. 3, p. 52–79, 2015.

PRADOS, J. et al. Doxorubicin-Loaded Nanoparticles: New Advances in Breast Cancer Therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 9, p. 1058–1070, 2012.

PUGLIA, C.; BONINA, F. Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 4, p. 429–441, 2012.

RENU, K. et al. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, n. 10, p. 241–253, 2018.

RIBEIRO, L. N. de M. et al. Nanocarriers From Natural Lipids With In Vitro Activity Against *Campylobacter jejuni*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 1–9, 2021.

RIBEIRO, L. N. M. et al. Nanostructured lipid carriers as robust systems for topical lidocaine-prilocaine release in dentistry. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 192–202, 2016.

RIBEIRO, L. N. M. et al. Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, p. 102–112, 2017.

RIBEIRO, L. N. M. et al. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018.

RIZWANULLAH, M.; AHMAD, J.; AMIN, S. Nanostructured Lipid Carriers: A Novel Platform for Chemotherapeutics. **Current Drug Delivery**, v. 13, n. 1, p. 4–26, 2016.

RUSSNES, H. G. et al. Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. **American Journal of Pathology**, v. 187, n. 10, p. 2152–2162, 2017.

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. 0, n. 0, p. 1–9, 2017.

SALGUEIRO, A. et al. An inductively-coupled plasma method for determination of cyclophosphamide loaded to polymeric systems. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 53, n. 3, p. 248, 1998.

SAUPE, A. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) -- structural investigations on two different carrier systems. **Biomed Mater Eng**, v. 15, n. 5, p. 393–402, 2005.

SCHMOLKO, I. Artificial Skin I. Preparation and properties of Pluronic F-127 Gels of Treatment of Burns. **Journal Biomed. Mater. Res**, v. 6, p. 571–582, 1972.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, n. 2, p. 171–179, 1997.

SHALVIRI, A. et al. PH-Dependent doxorubicin release from terpolymer of starch, polymethacrylic acid and polysorbate 80 nanoparticles for overcoming multi-drug

resistance in human breast cancer cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 3, p. 587–597, 2012.

SHETE, H. et al. Long chain lipid based tamoxifen NLC. Part II: Pharmacokinetic, biodistribution and in vitro anticancer efficacy studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 584–592, 2013.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7–33, 2021.

SILVA, G. H. R. et al. Optimised NLC: a nanotechnological approach to improve the anaesthetic effect of bupivacaine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1–2, p. 253–263, 2017.

SINGHVI, G.; SINGH, M. Review: In-vitro drug release characterization models. **International Journal of Pharmaceutics Studies an Research**, v. 2, n. 1, p. 77–84, 2011.

TAMJIDI, F. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 29–43, 2013.

TANG, Y. et al. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 16, n. 5, p. 335–343, 2016.

TAO, Z.; SHI, A.; LU, C. Breast Cancer : Epidemiology and Etiology. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 72, p. 333–338, 2015.

TRIPATHI, C. B. et al. Biotin anchored nanostructured lipid carriers for targeted delivery of doxorubicin in management of mammary gland carcinoma through regulation of apoptotic modulator. **Journal of Liposome Research**, v. 30, n. 1, p. 21–36, 2020.

ÜNER, M.; KARAMAN, E. F.; AYDOĞMUŞ, Z. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of Loratadine for Topical Application : Physicochemical Stability and Drug Penetration through Rat Skin. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. May, p. 653–660, 2014.

VARSHOSAZ, J.; DAVOUDI, M. A.; RASOUL-AMINI, S. Docetaxel-loaded nanostructured lipid carriers functionalized with trastuzumab (Herceptin) for HER2-positive breast cancer cells. **Journal of Liposome Research**, v. 28, n. 4, p. 285–295, 2018.

VEYRIES, M. L. et al. Controlled release of vancomycin from Poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 192, n. 2, p. 183–193, 1999.

VIALE, G. The current state of breast cancer classification. **Annals of Oncology**, v. 23, n. 10, p. 1–4, 2012.

VOHRA, T. et al. Nanolipid carrier-based thermoreversible gel for localized delivery of docetaxel to breast cancer. **Cancer Nano**, v. 4, p. 1–12, 2013.

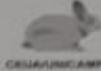
ZENG, N. et al. Influence of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal delivery of salbutamol: Relation between micellization, gelation, mechanic and release properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 467, n. 1–2, p. 70–83, 2014.

ZHANG, X. G. et al. Reversal activity of nanostructured lipid carriers loading cytotoxic drug in multi-drug resistant cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 361, n. 1–2, p. 239–244, 2008.

ZHAO, S. et al. Doxorubicin hydrochloride-oleic acid conjugate loaded nanostructured lipid carriers for tumor specific drug release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 95–103, 2016.

7 ANEXOS

CERTIFICADO (CEUA/UNICAMP)

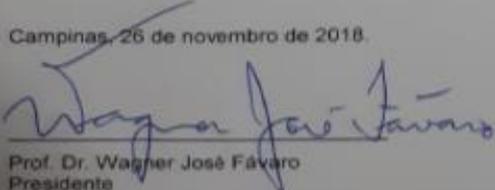
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL ANESTÉSICO CONTENDO ANTINEOPLÁSICOS ENCAPSULADOS EM CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**, registrada com o nº **5930-1/2018**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Eneida de Paula, Simone Ramos de Castro e Ludmilla David de Moura**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em **22 de novembro de 2018**.

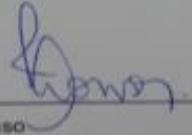
Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	15/02/2019-15/07/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	15/02/2019-15/07/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / NTacUnib 5D (Sprague-Dawley)
No. de animais:	121
Idade/Peso:	04 semanas / 110g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério 1 - Área de Fisiologia e Biofísica, DBEF/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 26 de novembro de 2018.



Prof. Dr. Wagner José Favaro
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **DESENVOLVIMENTO DE UM HIDROGEL PARA LIBERAÇÃO DE ANESTÉSICO E ANTINEOPLÁSICOS ENCAPSULADOS EM CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 18 de fevereiro, 2022

Assinatura : Simone Ramos de Castro
Nome do(a) autor(a): **SIMONE RAMOS DE CASTRO**
RG n.º 1844240-4

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **LÍGIA NUNES DE MORAIS RIBEIRO**
RG n.º MG.23.842.263