

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Irma Danielle Rodrigues Pedro

**DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS
CONTENDO PACLITAXEL**

Diamantina

2018

Irma Danielle Rodrigues Pedro

**DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS
CONTENDO PACLITAXEL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Carneiro
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Elaine Amaral Leite

Diamantina

2018

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

P372d	<p>Pedro, Irma Danielle Rodrigues Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo paclitaxel / Irma Danielle Rodrigues Pedro. – Diamantina, 2018. 83 p. : il.</p> <p>Orientador: Guilherme Carneiro Coorientadora: Elaine Amaral Leite</p> <p>Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Câncer de mama 2. MDA-MB-2311. 2. Liberação controlada 3. Biodistribuição. I. Carneiro, Guilherme. II. Leite, Elaine Amaral. III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;">CDD 615</p>
--------------	---

Elaborada com dados fornecidos pelo (a) autor (a).

Irma Danielle Rodrigues Pedro

**DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS
CONTENTO PACLITAXEL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Carneiro

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Elaine Amaral Leite

Data aprovação: 28/02/2018

Dr.^a Natássia Caroline Resende Corrêa
Instituto de Biotecnologia - UFU

Prof. Dr. João Vinícios Wirbitzki da Silveira
Instituto de Ciência e Tecnologia - UFVJM

Prof. Dr. Guilherme Carneiro
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UFVJM

Diamantina - MG

Dedico esse trabalho aos meus pais e irmão.
São meus principais
educadores.

Dedico também ao meu companheiro.
Meu refúgio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me auxiliar sempre! Me concedendo sabedoria e força.

Aos meus pais, Marilene e João, por todo amor, carinho e atenção. Me acompanham em todos os momentos, me acolhem, me apoiam, me orientam. Gratidão por tudo! E pelo meu irmão, Felipe, que mesmo não estando presente fisicamente, com ele que aprendi a ler e escrever, sei que de longe ainda me ajuda e protege.

A todos os meus familiares, obrigada pela torcida, orações e por muitas vezes entenderem a minha ausência.

Ao professor Guilherme, pela oportunidade e pelos ensinamentos profissionais.

À professora Elaine, obrigada pelo incentivo, pela confiança, atenção, paciência e todas as conversas inspiradoras

À professora Helen, obrigada pela disponibilidade! Por toda estrutura para cultivo e ensaio dos experimentos biológicos. Sempre auxiliando tecnicamente e pessoalmente.

Ao professor João Vinícios, por ser sempre prestativo! Sempre gentil, muito obrigada por toda atenção e disposição em me ajudar a utilizar a sonda de ultrassom.

Ao professor Verly, pelas ideias discutidas e pela disponibilização do IVTF.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Avançada, pelas caracterizações realizados com a MEV e o DRX.

Aos alunos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – UFMG, por toda ajuda e colaboração com os experimentos, foram essenciais. Em especial a Lívia, sempre me procurando para saber se estava tudo bem.

Ao Laboratório de Radioisótopos, principalmente ao professor André e aos alunos Janaína e Sued, gratidão por me receberem e me tratarem com tanta atenção! Obrigada por ajudarem com os camundongos!

Ao LDTF, obrigada ao professor Álvaro por todos os momentos de suporte. Obrigada a todos os alunos, Taci, Dan, Osmar, Kamila e todos aqueles que dividiram um tempinho comigo.

Aos colegas da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo companheirismo e aprendizado.

Aos meus amigos, amigos e farmacêuticos, minha casinha! Vocês são pessoas iluminadas, não tenho palavras para agradecer por todo conhecimento compartilhado, somando risadas e choros, fizeram esses anos em Diamantina os mais especiais. Contribuíram com minha formação pessoal e profissional, sei que teremos muitos outros momentos, só precisamos de um artigo novo e uma boa cozinha para conversarmos! Gratidão! Flavinha, Gabriel, Amanda, Igor (amigos farmacêuticos, engenheiro, geógrafa e mestres!), Isabela (como o dia muda com seu sorriso), Gabi, Paulinha, Guizan. Amo vocês, viu?!

E ao meu companheiro, Gabriel, obrigada, muito obrigada! Agradeço por ouvir minhas preocupações, por me ajudar a resolve-las, e torcer mim. Você é um anjo da guarda em minha vida. Palavras de agradecimento são poucas, que tenhamos uma longa caminhada juntos. Agradeço a Deus por ter colocado uma pessoa tão especial em meu caminho.

A todos os funcionários, colegas, professores e amigos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

Carl Gustav Jung

RESUMO

Paclitaxel (PTX) é um fármaco antitumoral, amplamente utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, como o de mama, ovário, cabeça e pescoço, entre outros. No entanto, a sua baixa solubilidade aquosa ($<1,0 \mu\text{g/mL}$; $\log P = 3,96$) é uma limitação para seu uso por via intravenosa. A formulação utilizada em seu principal produto comercializado está associada ao uso de solvente orgânico e tensoativos que proporcionam alta toxicidade. A incorporação de PTX em nanocarreadores lipídicos foi considerada uma alternativa não tóxica interessante para sua veiculação, mas a quantidade do fármaco é baixa. Este estudo teve como objetivo viabilizar a incorporação de PTX aos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) suficiente para avaliar sua resposta biológica, por meio da citotoxicidade e por biodistribuição, utilizando imagens cintilográficas. Os CLN propostos foram preparados por homogeneização à quente seguida de ultrassonicação. Após a incorporação de PTX na concentração de 1 mg/mL nos CLN, observou-se alta encapsulação ($0,9 \pm 0,03 \text{ mg/mL}$) e as nanopartículas apresentaram tamanho médio de 220 nm com potencial zeta de aproximadamente -20 mV . As análises dos CLN-PTX por difração de raio-X e infravermelho revelaram ausência dos picos e bandas, respectivamente, característicos do PTX, sugerindo que o fármaco está integrado à matriz lipídica do CLN. Elevada estabilidade de armazenamento, a 4°C e em meio de cultura a 37°C , foi observada para a formulação analisada. O estudo de citotoxicidade na linhagem celular de câncer de mama humano (MDA-MB-231) demonstrou atividade citotóxica mais pronunciada para CLN-PTX comparada ao PTX livre, e não foi encontrada citotoxicidade significativa contra células de fibroblastos (L929). Adequada pureza radioquímica ($>90\%$) foi obtida nos testes de estabilidade de radiomarcagem *in vitro* dos CLN-PTX em plasma e solução salina. Além disso, o estudo *in vivo* demonstrou uma acentuada captação no fígado e no baço para as nanopartículas e um acúmulo significativo na região tumoral para o CLN-PTX comparado ao PTX-livre. Em conjunto, esses resultados demonstraram que o PTX foi incorporado com sucesso nos CLN, com características físico-químicas adequadas para a administração intravenosa, sugerindo o seu uso como uma estratégia promissora no tratamento do câncer de mama.

Palavras chave: Câncer de mama, MDA-MB-231, Liberação controlada, Biodistribuição.

ABSTRACT

Paclitaxel (PTX) is an antitumor drug, widely used in the treatment of various types of cancer, such as breast, ovary, head, and neck. However, its low aqueous solubility ($<1.0 \mu\text{g/mL}$; $\log P = 3.96$) is a limitation for intravenous use. The formulation employed in its main marketed product is associated with use of organic solvent and surfactants, which provide high toxicity. The incorporation of PTX into lipid nanocarriers was considered an interesting nontoxic alternative for their delivery, but the amount of the drug is low. The objective of this study was to enable the incorporation of PTX into nanostructured lipid carriers (NLC) sufficient to evaluate its biological response (cytotoxicity and biodistribution) using scintigraphic images. The proposed NLC were prepared by hot homogenization followed by ultrasound. After the incorporation of PTX at the concentration of 1 mg/mL in the NLC, high encapsulation ($0.9 \pm 1.3 \text{ mg/mL}$) was observed and the nanoparticles had an average size of 220 nm with a zeta potential of approximately -20 mV . The analysis of the NLC-PTX by X-ray and infrared diffraction revealed absence of the peaks and bands, characteristic of PTX, respectively, suggesting that the drug is integrated into the NLC lipid matrix. High storage stability at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ and in culture medium at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ was observed for the analyzed formulation. The cytotoxicity study in the human breast cancer cell line (MDA-MB-231) demonstrated more pronounced cytotoxic activity for NLC-PTX compared to free PTX and no significant cytotoxicity was found against fibroblast cells (L929). Adequate radiochemical purity ($> 90\%$) was obtained in in vitro radiolabeling stability tests of NLC-PTX in plasma and saline solution. In addition, the in vivo study demonstrated a marked uptake in the liver and in the spleen for the nanoparticles and a meaningful accumulation in the tumor region for NLC-PTX compared to free PTX. Taken together, these results demonstrated that PTX was successfully incorporated into NLC, with physicochemical characteristics suitable for intravenous administration, suggesting its use as a promising strategy in the treatment of breast cancer.

Keywords: Breast cancer, MDA-MB-231, Controlled release, Biodistribution.

Figura 1 - Representação esquemática das fenestrações em um vaso sanguíneo acometido com o tumor.....	16
Figura 2 – Fórmula estrutural do paclitaxel (PTX).....	20
Figura 3 – Representação esquemática das transições polimórficas nas NLS carregando fármaco.....	24
Figura 4 - Diferentes tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados.....	26
Figura 5 - Representação esquemática da aplicação de nanopartículas associadas ao efeito de permeabilidade e retenção (EPR).....	28
Figura 6 – Representação esquemática da preparação dos CLN pelo método de homogeneização a quente seguido por sonicação.....	35
Figura 7 - Reação de oxi-redução da resazurina em resorufina após conversão pelas enzimas do sistema de transporte do metabolismo.....	39
Figura 8 - Teor de encapsulação e concentração do PTX incorporado nos CLN em função do PTX adicionado.....	48
Figura 9 - Difrátogramas dos componentes sólidos (A) e dos CLN com e sem PTX e da mistura física (B).....	50
Figura 10 - Espectros de absorção no IV dos componentes sólidos e dos CLN liofilizados. ...	51
Figura 11 - Micrografias dos CLN-PTX em aumento de 118.000x (A), 75.000x (B) e 15.000x (C).....	52
Figura 12 - Estabilidade dos CLN-PTX ao longo de 70 dias, em relação ao diâmetro e IP (A), potencial zeta (B) e retenção do PTX (C).....	54
Figura 13 - Liberação in vitro do PTX (%) a partir dos CLN e dispersão micelar (PTX livre) em DMEM suplementado.....	55
Figura 14 - Atividade hemolítica dos veículos e do PTX incorporado em dispersão micelar ou em CLN com diferentes concentrações (0,05 e 0,10 mg/mL).....	56
Figura 15 - Viabilidade de células da linhagem L929 (A) e MDA-MB-231 (B) após 24 e 48 horas de tratamento.....	58
Figura 16 - Efeito do tratamento com CLN-PTX e PTX livre 100 nM na formação de colônias de células MDA-MB-231.....	60
Figura 17 - Estudo de estabilidade de marcação de ^{99m} Tc-CLN-PTX em solução salina 0,9% (p/v) e em plasma de camundongo.....	62

Figura 18 – Imagens cintilográficas de camundongo Swiss com tumor implantado após administração da dispersão micelar com PTX, 30 minutos (A) e 120 minutos (B) e dos CLN PTX 30 minutos (C) e 120 minutos (D).....63

Tabela 1 - Nanopartículas lipídicas carreando PTX para o tratamento de câncer.....	30
Tabela 1 - Nanopartículas lipídicas carreando PTX para o tratamento de câncer – continuação.	31
Tabela 2 – Composição dos CLN (% p/v).....	34
Tabela 3 - Caracterização físico-química dos CLN-PTX obtidos, quanto a diâmetro, IP e potencial zeta.....	45
Tabela 4 - Caracterização físico-química dos CLN mediante aumento na concentração de PTX, quanto a diâmetro, IP e potencial zeta.....	46
Tabela 5 - Valores de IC ₅₀ calculados para as linhagens de células tumorais e normais.....	59
Tabela 6 - Relação alvo/não alvo entre tumor e músculo contralateral de camundongo Swiss acometidos por tumor sólido de Ehrlich a partir da ROI.....	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1	Câncer.....	14
2.1.1	<i>Câncer de mama.....</i>	<i>16</i>
2.2	Quimioterapia.....	18
2.2.1	<i>Paclitaxel.....</i>	<i>20</i>
2.3	Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados.....	23
2.3.1	<i>Aplicação das nanopartículas no tratamento do câncer.....</i>	<i>27</i>
2.3.2	<i>Nanopartículas lipídicas contendo PTX incorporado.....</i>	<i>28</i>
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	Objetivo Geral.....	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
4	MATERIAS E MÉTODOS.....	32
4.1	Materiais.....	32
4.2	Métodos.....	33
4.2.1	<i>Obtenção dos CLN.....</i>	<i>33</i>
4.2.2	<i>Caracterização físico-química das nanopartículas.....</i>	<i>35</i>
4.2.2.1	<i>Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio.....</i>	<i>35</i>
4.2.2.2	<i>Determinação do potencial zeta das partículas.....</i>	<i>35</i>
4.2.2.3	<i>Determinação do teor de encapsulação.....</i>	<i>36</i>
4.2.2.4	<i>Difração de raios X.....</i>	<i>36</i>
4.2.2.5	<i>Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier</i>	<i>37</i>
	<i>_____</i>	
4.2.2.6	<i>Microscopia eletrônica de varredura.....</i>	<i>37</i>
4.2.3	Avaliação da estabilidade.....	37
4.2.3.1	<i>Avaliação da estabilidade em meio biológico.....</i>	<i>38</i>
4.2.4	Avaliação da atividade hemolítica.....	38
4.2.5	Estudos de atividade in vitro.....	39
4.2.5.1	<i>Avaliação da viabilidade celular.....</i>	<i>39</i>
4.2.5.2	<i>Ensaio de clonogenicidade.....</i>	<i>40</i>
4.2.6	Marcação radioquímica das CLN-PTX.....	41

4.2.6.1 <i>Controle de pureza radioquímica</i>	42
4.2.6.2 <i>Estabilidade in vitro da radiomarcção</i>	42
4.2.7 <i>Biodistribuição em camundongos Swiss</i>	42
4.2.7.1 <i>Obtenção do modelo experimental de tumor de Ehrlich</i>	43
4.2.7.2 <i>Obtenção das imagens cintilográficas</i>	43
4.3 Análises Estatísticas	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Obtenção e caracterização físico-química das nanopartículas	45
5.1.1 <i>Difração de raios-x</i>	48
5.1.2 <i>FTIR</i>	50
5.1.3 <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	51
5.2 Avaliação da estabilidade	52
5.2.1 <i>Avaliação da estabilidade em meio biológico</i>	55
5.3 Avaliação da atividade hemolítica	56
5.4 Estudos de atividade citotóxica in vitro	57
5.4.1 <i>Avaliação da viabilidade celular</i>	57
5.4.2 <i>Ensaio de clonogenicidade</i>	59
5.1 Marcação radioquímica das CLN-PTX	61
5.1.1 <i>Pureza radioquímica e estabilidade da radiomarcção</i>	61
5.1.2 <i>Estabilidade in vitro da radiomarcção</i>	61
5.2 Biodistribuição dos CLN-PTX em camundongos Swiss	62
6 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

O paclitaxel (PTX) é um fármaco derivado da casca do teixo do Pacífico, o *Taxus brevifolia*, e atua ao promover a agregação dos microtúbulos a partir dos dímeros de tubulina. Ele estabiliza os microtúbulos prevenindo a despolimerização e isso causa a inibição da reorganização da rede de microtúbulos, passo essencial para as funções celulares (SURAPANENI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013). Embora seja utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, a baixa solubilidade do PTX em meio aquoso representa um empecilho para a sua administração intravenosa (BINDER, 2013). Sendo assim, a formulação utilizada na clínica contém uma alta concentração de Cremophor[®] EL (óleo de rícino polietoxilado), um tensoativo associado a significativa toxicidade, como reações de hipersensibilidade, mielossupressão e neuropatia periférica (GELDERBLOM *et al.*, 2001; PICARD; CASTELLS, 2014). Para superar essas limitações, novas formulações contendo PTX incorporado em transportadores coloidais têm sido desenvolvidas e têm demonstrado relativa redução da toxicidade e manutenção da atividade antitumoral (BAEK *et al.*, 2012; VIDEIRA *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2015; MARCIAL *et al.*, 2017). Assim, um produto foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de câncer, o Abraxane[®] (ZHANG *et al.*, 2013). Embora algumas nanopartículas lipídicas, como nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), também tenham sido estudados como estratégias para facilitar a administração intravenosa de PTX (BAEK *et al.*, 2012; VIDEIRA *et al.*, 2013; MARCIAL *et al.*, 2017), em todos eles a quantidade de fármaco carregado é muito baixa. Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma nova formulação de CLN contendo PTX para o tratamento do câncer de mama (MARCIAL *et al.*, 2017). Os resultados mostraram que o PTX foi incorporado com sucesso aos CLN, apresentando adequadas características físico-químicas e atividade citotóxica considerável. No entanto, a quantidade de fármaco presente no sistema é baixa para permitir a administração intravenosa em modelos experimentais *in vivo*. Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver CLN carreando concentrações de PTX superiores àquelas avaliadas previamente e avaliar o comportamento físico-químico e biológico mediante realização de estudos *in vitro* e *in vivo* em modelos experimentais de tumor de mama.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer é uma doença que possui mundialmente elevadas taxas de incidência e mortalidade. Em 2015, foi a segunda principal causa de morte em todo o mundo, responsável por 8,8 milhões de óbitos, sendo que aproximadamente 70% destes ocorreram em países de baixa e média renda (WHO, 2017). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o acometimento do câncer na população corresponda a 20 milhões de novos casos, por ano, até 2025 (STEWART; WILD, 2014). O câncer é um termo genérico que engloba um grande grupo de doenças, as quais possuem como característica comum a proliferação e a diferenciação celular anormais, podendo invadir tecidos adjacentes ou espalhar-se para órgãos distantes (INCA, 2016; WHO, 2017). Essas alterações são decorrentes da interação entre fatores genéticos e ações externas, representadas por agentes químicos (fumaça do tabaco, agrotóxicos), físicos (radiações) e biológicos (infecções) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; IARC, 2017). Os processos de proliferação e diferenciação (especialização morfológica e funcional) celular são cruciais para que a formação e recomposição de tecidos que exercem papéis específicos e vitais para os seres vivos. Esses dois processos são regulados por fatores internos e externos, integrados entre si, que garantem o desenvolvimento em níveis homeostáticos e, assim, o correto desenvolvimento dos sistemas (DEBERARDINIS *et al.*, 2008). Desta forma, o ciclo celular envolve diversos mecanismos regulatórios complexos em pontos estratégicos do processo, capaz de verificar a viabilidade de continuar ou bloquear a divisão celular.

O ciclo celular dos eucariotos pode ser dividido nas seguintes fases G_1 , S, G_2 , M, G_0 . Na fase G_1 , a célula encontra-se em intensa síntese de RNA e proteínas, estando aumentada de tamanho e se preparando para a duplicação do material genético em resposta aos fatores de crescimento e sinais internos. A fase S é a etapa em que ocorre a duplicação do DNA. A fase G_2 precede a mitose, com alta atividade metabólica. Na mitose (M) ocorre a divisão celular. Algumas células permanecem na fase G_0 , em que não há estímulos de crescimento ou proliferação, de forma que quanto maior a permanência neste estágio menor a ocorrência de divisão celular (HUNT *et al.*, 2011). A regulação do ciclo celular ocorre principalmente na transição da fase G_1/S e G_2/M , etapas em que são observadas pausas no processo para verificação e, caso necessário, ativação dos mecanismos de reparo do DNA. Defeitos nesse sistema de checagem são as principais causas de instabilidade genômica, configurando uma situação crítica para o

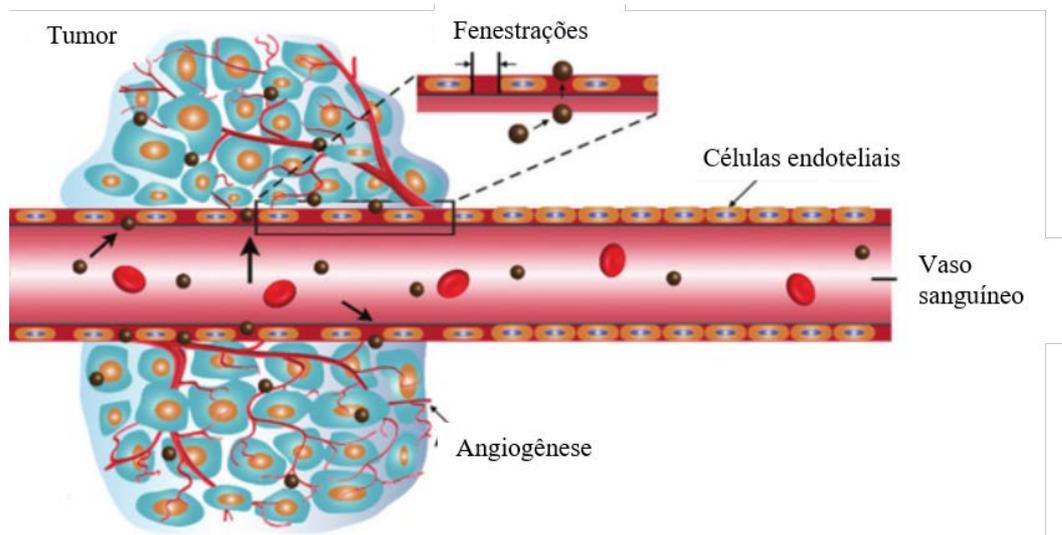
desenvolvimento de câncer (RIBATTI, 2016; SHERR; BARTEK, 2017). Como resultado de uma divisão celular descontrolada pode-se ocasionar tumores malignos. Tais tumores possuem crescimento rápido, maior resistência a hipóxia, deslocamento considerável devido à menor adesividade entre as suas células e a capacidade de originar metástases, processo que é responsável por até 90% da mortalidade associada ao câncer (CHAFFER; WEINBERG, 2011).

Os tumores sólidos malignos são considerados os de tratamento mais difícil. No início do crescimento da massa tumoral, até o limite de volume tumoral de cerca de 2 mm^3 , a nutrição do tumor é baseada no mecanismo de difusão. A partir desse limite, em consequência do desenvolvimento acelerado e da necessidade imediata e aumentada de nutrientes e oxigênio bem como da remoção de produtos metabólicos gerados, é necessária uma neovascularização local, processo conhecido como angiogênese (TAYLOR *et al.*, 2015).

No entanto, a angiogênese é um processo irregular, ocasionando áreas bem irrigadas e outras com pouca ou nenhuma vascularização. Os novos vasos são frequentemente dilatados e contorcidos, sem padrões definidos de ramificações, ou seja, não apresentam delimitações como arteríolas, capilares e veias, mas sim compartilham características de todas essas estruturas (Figura 1). Além disso, os novos vasos apresentam endotélio vascular com fenestrações maiores (entre 200 a 800 nm) comparado ao endotélio vascular normal (entre 5 e 10 nm) (FANG *et al.*, 2011; OSTERGAARD *et al.*, 2013).

Aliado aos vasos sanguíneos mal-formados, os tumores sólidos apresentam menos vasos linfáticos funcionais do que os tecidos normais, dificultando sua função de drenagem. Essas características fisiopatológicas aliadas contribuem para o aumento da pressão do líquido intersticial dentro dos tumores. Este aumento dificulta a distribuição de nutrientes e comprime os vasos sanguíneos, de modo que o sangue é desviado do centro do tumor em direção à periferia, deixando o leito vascular e acumulando no espaço intersticial da região tumoral. Como resultado, a alta permeabilidade permite que macromoléculas (e nanopartículas) entrem mais facilmente no espaço intersticial e sejam retidas pela filtração linfática comprometida (TORCHILIN, 2011b; DAI *et al.*, 2017). Essas características são a base do efeito de permeabilidade e retenção aumentados (*enhanced permeability and retention* – EPR) e tem sido utilizado como estratégia para o acúmulo de fármacos na região tumoral (TORCHILIN, 2011b; MAEDA, 2015).

Figura 1 - Representação esquemática das fenestrações em um vaso sanguíneo acometido com o tumor.



Fonte: Adaptado de Dai *et al.*, 2017

2.1.1 Câncer de mama

No Brasil, dentre os diversos tipos de câncer, os tumores de mama aparecem como o segundo tipo mais incidente em pacientes do sexo feminino, representando 28,4% dos casos (57.960 casos) em 2016. Com exceção dos tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente em mulheres, exceto na região Norte, onde o câncer do colo do útero ocupa a primeira posição (INCA, 2016).

O câncer de mama é um grupo heterogêneo de doenças que apresentam comportamentos distintos. A sua diversidade pode ser observada por diferentes características morfológicas e moleculares, bem como variadas manifestações clínicas, diferentes respostas terapêuticas e evolutivas (BARROS; LEITE, 2015). O aparecimento de nódulo na mama é o sintoma mais comum, geralmente indolor, duro e irregular. Entretanto, há tumores que apresentam consistência branda, são globosos e bem definidos. Além dos nódulos, outros sinais podem ser observados, como edema cutâneo, em que a pele se assemelha a casca de laranja, retração cutânea, dor, inversão do mamilo, hiperemia, descamação ou ulceração do mamilo, linfonodos palpáveis na axila e secreção papilar com aspecto transparente, rosado ou avermelhado em função da presença ou não de sangue (INCA, 2017b).

Devido à alta heterogeneidade do câncer de mama e a fim de conhecer essas diversidades biológicas das células, tem sido proposta uma classificação tumoral mais precisa, baseada em perfis de expressão gênica, permitindo assim determinar tratamentos mais

específicos para cada modalidade de carcinoma mamário. Perou *et al.* 2000 avaliaram a expressão 8.102 genes em 65 espécimes tumorais simultaneamente e identificaram padrões moleculares de carcinomas mamários que englobam mais de 20 subtipos morfológicos

Os principais subtipos moleculares podem ser divididos entre aqueles que possuem receptores hormonais (positivos) e aqueles que não apresentam estes receptores (negativos). Para fins de diagnósticos, alguns marcadores imuno-histoquímicos são utilizados para agrupá-los, como a pesquisa de receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e receptor de fator de crescimento epidermal humano (HER2). Dentro do grupo dos positivos a receptores hormonais temos os tipos luminal A e luminal B. Dentre os cânceres de mama com receptores hormonais negativos são identificados os grupos de superexpressão do HER2, o *basal-like* (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2003) e o subtipo *claudin-low* que também possui como peculiaridade apresentar as características genômicas do câncer mas com fenótipo de células-tronco CD44+/CD24-/low (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007). Esses subgrupos tumorais dispõem de similaridades e diferenças na expressão dos seus genes, composição celular, ritmo de crescimento, vias de sinalização e, portanto, no prognósticos e na sensibilidade à terapia. A ausência de RE, RP e HER2 caracteriza um subtipo de tumor denominado câncer de mama triplo negativo (TN) (BARROS; LEITE, 2015; MARTINS *et al.*, 2017).

O subgrupo luminal recebe essa denominação devido à alta expressão de genes presentes nas células mamárias normais que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários (PEROU *et al.*, 2000). Os subtipo luminal A compreende tumores positivos para RE e/ou RP, sendo negativo para HER2. É o subtipo mais comum, representando cerca de 50 – 60% de todos os cânceres de mama, mas que possui o melhor prognóstico em relação aos demais (YERSAL; BARUTCA, 2014). São descritos como subtipo luminal B tumores que são positivos para RE e HER2, associado a altos níveis de genes ligados à proliferação, o que resulta em pior prognóstico em relação aos tumores luminal A (SORLIE *et al.*, 2001, 2003).

O subtipo HER2 é positivo para HER2 e negativo para receptores hormonais. Está associado à proliferação, diferenciação, adesão e motilidade celular, progressão tumoral, metástases, angiogênese e redução de apoptose. A presença desse receptor na mama tem sido relatada em 40 - 60% dos carcinomas ductais *in situ* e em 15 - 20% dos carcinomas invasores. Os tumores positivos para HER2 são de grau histológico intermediário ou alto e apresentam metástase linfonodal logo no diagnóstico inicial (BÁNKFALVI *et al.*, 2000; WOLFF *et al.*, 2013).

O câncer de mama TN representa 12,5 – 15% de todos os cânceres de mama. Possui um diversificado curso clínico, resultando no tipo mais agressivo, sendo observada a presença de metástases muitas vezes já no momento do diagnóstico (BADOWSKA-KOZAKIEWICZ; BUDZIK, 2016). Dentro deste grupo há os subtipos moleculares *basal-like* e *claudin-low*. O subtipo *basal-like* (basaloide) representa cerca de 75 – 80% dos tumores classificados com TN e são caracterizados por apresentarem expressão de citoqueratinas de alto peso molecular (CK 5/6 e 17). Mais comumente, esses tumores são descritos como lesões anaplásicas e metaplásicas. Uma das razões para o pior prognóstico é o alto nível de neovascularização causado pela sobreexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (PEROU *et al.*, 2000; HAUPT; RO; SCHWARTZ, 2010; BADOWSKA-KOZAKIEWICZ; BUDZIK, 2016).

Herschkowitz e colaboradores (2007) descreveram um novo subtipo chamado "*claudin-low*", que é caracterizado por uma baixa expressão de genes envolvidos com junções celulares ocludentes e glicoproteínas de adesão célula-célula, incluindo as claudinas 3, 4 e 7, as ocludinas e a caderina E. Esse subtipo apresenta um aumento da expressão de marcadores de transição epitélio-mesênquima, de marcadores endoteliais e linfocíticos, além de marcadores relacionados a células-tronco tumorais com fenótipo CD44+/CD24-. Possui baixa ou ausente expressão de marcadores de diferenciação luminal e moderada expressão de genes de proliferação (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007; PRAT; PEROU, 2009). É normalmente um carcinoma do tipo ductal invasor com alta frequência de diferenciação metaplásica e medular, que não possui ainda marcadores imuno-histoquímicos para a sua caracterização e nem terapêutica específica (PRAT *et al.*, 2010).

2.2 Quimioterapia

A quimioterapia, junto com a radioterapia e a cirurgia de remoção tumoral, é uma das modalidades de tratamento do câncer, na qual se utilizam medicamentos para destruir as células doentes que compõem o tumor. Os agentes quimioterápicos são aplicados com o intuito de alcançar a cura, diminuir a chance de reincidência ou diminuir a extensão do tumor (HAHN *et al.*, 2013; WHO, 2017).

Baseando-se na sua ação sobre o ciclo celular, os quimioterápicos podem ser classificados em ciclo-inespecíficos, ciclo-específicos e fase-específicos. Ciclo-inespecíficos são os quimioterápicos que atuam nas células que estão ou não no ciclo proliferativo como, por exemplo, as mostardas nitrogenadas. Os ciclo-específicos são aqueles que atuam somente

nas células que se encontram em proliferação, como é o caso da ciclofosfamida. Por fim, os fase-específicos são aqueles que atuam em determinada fase do ciclo celular como o metotrexato (fase S), o etoposídeo (fase G₂), a vincristina (fase M) e o paclitaxel que impede a continuidade das fases G₂/M (ALMEIDA *et al.*, 2005; INCA, 2017b).

De uma maneira geral, os fármacos antitumorais atuam promovendo a supressão do crescimento celular. Porém, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma inespecífica, agindo tanto sobre as células tumorais quanto sobre as células normais, principalmente aquelas que apresentam rápido crescimento, tais como as células gastrintestinais, capilares e do sistema imunológico. Diante disso, alguns efeitos colaterais estão associados ao tratamento quimioterápico, como a alopecia, diarreia, náuseas, vômitos e maior suscetibilidade a infecções (KESHET *et al.*, 2015; NAKAMURA; JUA; MAEDA, 2015). Além disso, falhas terapêuticas têm ocorrido em virtude do surgimento de resistência a vários medicamentos utilizados, acarretando uma resposta pouco ou não eficiente. Dentre os mecanismos de resistência estão mutações no DNA celular e alterações metabólicas, ocasionando, por exemplo, a inativação ou efluxo do fármaco, reparo no DNA, e/ou a inibição da morte celular (HOLOHAN *et al.*, 2013; HOUSMAN *et al.*, 2014).

Portanto, são almejados medicamentos que apresentem elevada eficácia antitumoral e baixa toxicidade, garantindo tratamento seguro ao paciente e índice terapêutico favorável. Por atuarem de forma inespecífica, a grande maioria dos medicamentos antineoplásicos disponível no mercado apresenta elevada toxicidade às células saudáveis e o desenvolvimento de resistência ao tratamento também tem sido reportada (HOUSMAN *et al.*, 2014). Dessa forma, a incorporação desses fármacos em sistemas nanocarreadores pode ser uma alternativa interessante para contornar este mecanismo de resistência, reduzir a toxicidade associada à sua ação em sítios inespecíficos, além de aumentar a atividade antitumoral (YOSHIZAWA *et al.*, 2014; MOITRA, 2015).

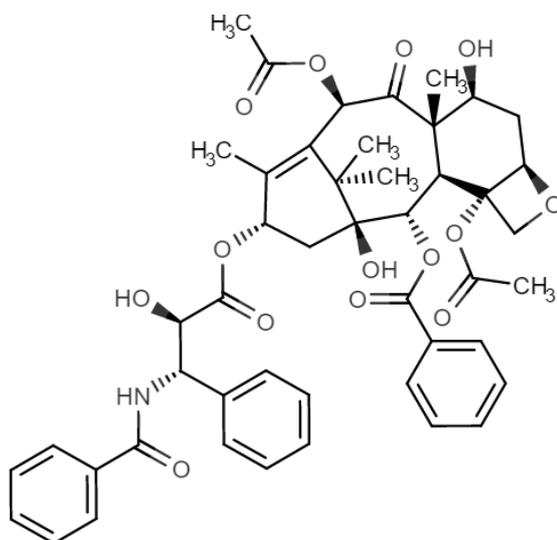
Tendo em vista a complexidade do câncer de mama TN, têm sido frequentemente adotados esquemas de poliquimioterapia utilizando combinação de fármacos que agem por mecanismos distintos no organismo, em busca de maior efetividade no tratamento. Nesses esquemas combinados, tem-se observado uma importante atuação do paclitaxel (PTX), uma vez que as células cancerígenas demonstram elevada sensibilidade na presença desse fármaco levando à regressão tumoral significativa. Atualmente, o PTX tem sido utilizado como um dos fármacos de primeira escolha no câncer de mama triplo negativo metastático (MUSTACCHI; LAURENTIIS, 2015; ZEICHNER; TERAOKI; GOGINENI, 2016).

2.2.1 Paclitaxel

O PTX é um fitofármaco, pseudo-alcalóide diterpeno que foi extraído e isolado da planta *Taxus brevifolia* (Teixo do Pacífico). Atualmente é obtido por semissíntese, por meio do processo de acetilação do precursor 10-desacetilbacatina III (10-DABIII), produto da extração do Teixo europeu (*Taxus baccata*), que é uma espécie mais abundante (SOUZA, 2004; YANG *et al.*, 2016).

Apresenta fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$ (Figura 2) e massa molar 853,93 g/mol. Quimicamente é denominado como (2 α , 5 β , 7 β , 10 β , 13 α)-4, 10- Diaceoxi -13- {[2R, 3S) - 3-(benzoil-amino) - 2-hidroxi-3-fenilpropanoil]oxi} -1,7-di-hidroxi-9-oxo-5,20-epoxi-tax-11-em-2-ilo. Sua atividade antineoplásica deve-se principalmente ao grupo benzoíla no carbono C2 e ao anel de oxetano (D), enquanto os grupamentos ligados ao carbono C3' e C13 mantêm a atividade citotóxica e o grupo hidroxila acoplado ao carbono C2' aumenta a atividade antitumoral. Em função do seu núcleo complexo formado por quatro anéis fundidos e suas cadeias laterais hidrofóbicas, a molécula é bastante lipofílica (log P = 3,96) com baixa solubilidade em água (0,03 mg/mL, a 37 °C) e possui ponto de fusão entre 216 °C - 217 °C (ZHANG *et al.*, 2013, 2014).

Figura 2 – Fórmula estrutural do paclitaxel (PTX).



O PTX apresenta atividade antineoplásica comprovada para vários tipos de tumores sólidos incluindo câncer de próstata, de cabeça e pescoço, das células não-pequenas do pulmão, do ovário e de mama, sendo os dois últimos responsáveis por 22,9% dos tipos de câncer mais incidentes em mulheres no território brasileiro (INCA, 2017b). É um agente antimicrotúbulo, que promove a estabilização dos microtúbulos a partir da ligação irreversível à subunidade β -tubulina, impedindo sua reorganização. Por aumentar a estabilização dos microtúbulos, leva à anormalidade do conjunto do fuso mitótico, impedindo a divisão celular (SURAPANENI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014).

Os microtúbulos são formados a partir de heterodímeros de tubulina, pequena família de proteínas globulares altamente conservadas, incluindo dois membros mais comuns, α - e β -tubulina, que se montam formando protofilamentos lineares. Estes protofilamentos se polimerizam para constituírem uma estrutura tubular oca composta por 13 unidades ligadas entre si. A estrutura contém uma organização na qual a subunidade α -tubulina está localizada na extremidade negativa e a subunidade β -tubulina está exposta na outra extremidade positiva (MOOBERRY, 2011). No processo de formação dos microtúbulos, o equilíbrio entre tubulina e microtúbulos é configurado com perda e ganho de subunidades (polarização e despolarização). Ocorre um processo dinâmico que permite o alongamento e encurtamento com a adição ou retirada dos heterodímeros de tubulina (MOOBERRY, 2011; STANTON *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015).

A ligação do PTX aos microtúbulos inibe o processo de despolarização, por associar-se aos núcleos α - e β - tubulina, através da intercalação por ligação ao grupo *N*- terminal do aminoácido da subunidade β , tanto na presença quanto na ausência dos fatores essenciais à montagem dessas estruturas. Essa ligação resulta em um distúrbio na formação dos microtúbulos, os quais tornam-se resistentes à despolimerização levando a uma estabilização. Dessa forma, o ciclo celular acaba sendo bloqueado, impedindo a separação dos centrômeros necessária para que ocorra o processo mitótico em sua última fase, isto é, na fase G_2/M ,

impedindo a divisão celular e conseqüentemente a proliferação das células neoplásicas (MOOBERRY, 2011; BINDER, 2013; WEAVER, 2014).

Adicionalmente, o PTX reduz a expressão de VEGF e angiopoetina-1 (Ang-1) na vasculatura tumoral, inibindo a quimiotaxia e a capacidade de invasão de células endoteliais (BOCCI *et al.*, 2013; AI *et al.*, 2016).

O PTX foi introduzido no mercado no início dos anos 1990 com o medicamento Taxol[®] (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb), cuja formulação farmacêutica contém 30 mg do fármaco na forma de dispersão micelar constituída por 5 mL de uma mistura entre

Cremophor[®] EL (CrEL) e etanol desidratado na proporção de 1:1 (v/v) para administração intravenosa (GELDERBLOM *et al.*, 2001; BINDER, 2013). O CrEL (óleo de rícino polietoxilado) é comumente utilizado em formulações farmacêuticas contendo fármacos pouco solúvel em água. É um tensoativo não-iônico, com peso molecular aproximado de ~ 3 kDa, na forma de um líquido viscoso esbranquiçado, sendo obtido pela reação de óleo de rícino (*Ricinus communis*) com óxido de etileno a uma razão molar de 1:35 (GELDERBLOM *et al.*, 2001).

O CrEL possui atividade farmacológica e tem a capacidade de promover reações adversas importantes e potencialmente fatais (MIELKE *et al.*, 2006). É capaz de induzir a liberação de histamina quando infundido rapidamente, causando hipersensibilidade grave, podendo levar à hipotensão ou dispneia com broncoespasmo. Reações alérgicas menores, como erupções transitórias e rubor também podem ocorrer. Assim, a infusão por via intravenosa pode variar de 3 a 24h dependendo do tumor e, apesar do pré-tratamento com corticosteroides e antagonistas de histamina, pequenas reações ainda ocorrem em 10 - 44% de todos os pacientes, em 1 - 3% dos pacientes com reações potencialmente fatais (TIJE *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2008; PICARD; CASTELLS, 2014).

Outra limitação do Taxol[®] é que o medicamento possui baixa estabilidade após a diluição, necessária para infusão, e terapias com esquemas de infusões mais lentas ou mesmo padronização de doses necessitando diluições prévias são dificultadas devido à baixa estabilidade dessa formulação. A sua administração ocorre mediante a diluição em salina (0,9% p/v) ou solução de dextrose 5%, porém mesmo considerando a presença do tensoativo, pode ocorrer precipitação do fármaco (SURAPANENI *et al.*, 2012; BINDER, 2013). Além disso, o CrEL pode lixiviar plastificantes de sacos de PVC para infusão e conjuntos de tubos revestidos com polietileno, rotineiramente utilizadas na prática clínica, podendo causar toxicidade hepática grave (GELDERBLOM *et al.*, 2001; HILL; SHAW; WU, 2001).

Os potenciais citotóxicos do CrEL ainda são um problema importante em relação ao uso do PTX e certamente podem comprometer os resultados globais da quimioterapia. Diante do grande potencial farmacológico do PTX e as implicações associadas à sua administração, torna-se necessário o desenvolvimento de novos veículos, de forma a reduzir os efeitos tóxicos associados ao tratamento e melhorar a sua biodisponibilidade. Novas abordagens farmacotécnicas utilizando sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados tem sido estudadas, destacando-se os lipossomas (XU *et al.*, 2013; BARBOSA *et al.*, 2015; XU; MENG, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2018), micelas poliméricas (EMAMI *et al.*, 2015; GUPTA

et al., 2015; WU *et al.*, 2015), nanopartículas lipídicas sólidas (CHIRIO *et al.*, 2014; BAEK; CHO, 2015a) e carreadores lipídicos nanoestruturados (MARCIAL *et al.*, 2017).

Alguns nanossistemas contendo PTX já estão disponíveis para uso clínico, como o Abraxane[®] (nanopartículas de albumina), Lipusu[®] (lipossomas) e Genexol-PM[®] uma formulação de (micelas poliméricas de polietilenoglicol-ácido poliático – PEG-PLA). Todos apresentam menor toxicidade quando comparados ao Taxol[®], estimulando novos estudos com o intuito de aperfeiçoar a veiculação do PTX (ZHANG *et al.*, 2013).

2.3 Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados

Dentre os sistemas nanocarreadores, as nanopartículas lipídica ganharam grande popularidade devido às suas múltiplas características favoráveis e a possibilidade de diversas aplicações. Dentre as vantagens obtidas, estão a liberação controlada do fármaco, a proteção contra inativação prematura no organismo, prolongar o tempo de circulação do fármaco e aumentar sua solubilidade aquosa (WAGHMARE *et al.*, 2012; ZHU; LIAO, 2015; GHARPURE *et al.*, 2015). Com isso, torna-se possível a aplicação na administração de fármacos por via oral, pulmonar, tópica, parenteral, dentre outras (WISSING; KAYSER; MULLER, 2004; SEVERINO *et al.*, 2012)

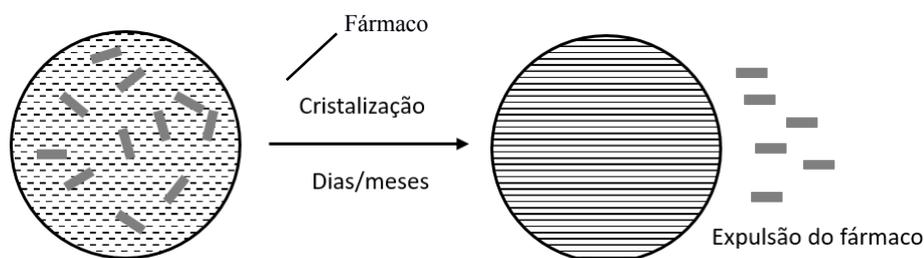
Na década de 1990, Müller *et al.* (SCHWARZ *et al.*, 1994), Gasco *et al.* (MOREL *et al.*, 1996) e Westesen *et al.* (BUNJES *et al.*, 1996), desenvolveram a primeira geração de NLS. As NLS são partículas obtidas a partir de lípides sólidos, com diâmetro médio variando de aproximadamente 50 a 1000 nm (MÜLLER, 2000). Os lípides sólidos podem ser triglicerídeos purificados, mistura de glicerídeos complexos ou ceras. Assim, as NLS são sistemas interessantes para incorporação de fármacos lipofílicos, propostas com o objetivo de obter um sistema de entrega de fármacos utilizando lípides inertes, capazes de limitar a mobilidade de fármacos incorporados nessa matriz, e, por conseguinte, produzir um sistema estável com perfil de liberação prolongada. Outra vantagem é a ausência de solventes orgânicos no processo de produção (KATHE; HENRIKSEN; CHAUHAN, 2014; NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015).

A seleção adequada dos componentes da formulação pode afetar as propriedades das partículas, como o tamanho e a compatibilidade do fármaco com o sistema. A cristalinidade lipídica também está fortemente correlacionada com os teores de incorporação e liberação de fármacos (DAS; CHAUDHURY, 2011; WAGHMARE *et al.*, 2012; NASERI *et al.*, 2015). Embora não haja diretrizes específicas, a solubilidade do fármaco na matriz e as suas

condições polimórficas são utilizados como critério para a seleção de lípides apropriados (MÜLLER, 2000; KASONGO *et al.*, 2011; KATHE *et al.*, 2014). Com o processo de reorganização do cristal e o surgimento de polimorfos mais organizados, pode ocorrer a redução dos espaços das lacunas entre as cadeias lipídicas nas quais o fármaco se deposita e isto pode acarretar tanto em uma redução da capacidade de incorporação da nanopartícula quanto em um processo de liberação do fármaco durante o período de estocagem (WISSING *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2015).

O polimorfismo é uma forma de modificação física em que, embora os lípides sejam quimicamente idênticos, eles podem existir em mais de uma forma cristalina, chamados de polimorfos. Os polimorfos geralmente possuem propriedades termodinâmicas diferentes, tais como pontos de fusão, padrões de difração de raios X e solubilidade (HEURTAULT *et al.*, 2003). Os lípides podem se cristalizar, principalmente, em estruturas tridimensionais do tipo α instável (hexagonal), β' metaestável (ortorrômbica), β estável (tricíclica), e uma forma intermediária entre β' e β a forma β_i . Como exemplo de alterações das propriedades termodinâmicas, tem-se o aumento da temperatura de fusão consoante com o aumento da estabilidade ($\alpha \rightarrow \beta' \rightarrow \beta$) (FREITAS; MÜLLER, 1999; VIANA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2015). Durante a formulação das nanopartículas o lípide solidifica e passa de um polimorfo α para β' ; no entanto, durante o armazenamento, pode ainda ocorrer a conversão irreversível para as formas mais estáveis β_i/β (Figura 3). (ABURAHMA; BADR-ELDIN, 2014; KATHE *et al.*, 2014). A taxa de transição depende do grau de homogeneidade dos lípides. Quanto são compostos por apenas um tipo de triglicerídeos, por exemplo, rapidamente se convertem na forma estável β . Quando há uma mistura aleatória de mono-, di- e triglicerídeos, podem se manter na forma β' por um tempo prolongado. Qualquer fator que favoreça esta transição pode ter um efeito significativo nas permanência do fármaco e na integridade da partícula (RIBEIRO *et al.*, 2015; YINGCHONCHAROEN *et al.*, 2016)

Figura 3 – Representação esquemática das transições polimórficas nas NLS carregando fármaco.

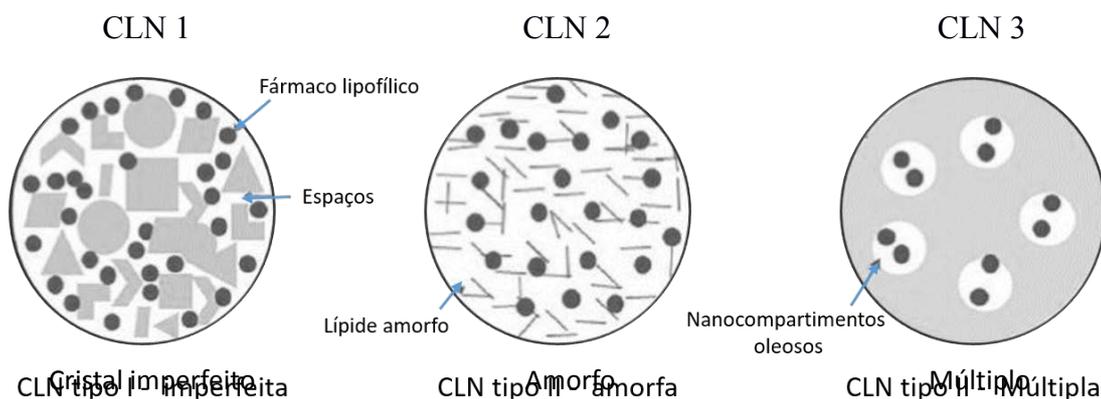


Fonte: Adaptado de Muller et al., 2002a.

No processo de melhoria dos sistemas e na redução dos inconvenientes atribuídos ao sistema das NLS, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) evoluíram como alternativa para o carreamento de fármacos (DAS; NG; TAN, 2012; SEVERINO *et al.*, 2012). A matriz dos CLN é composta por uma mistura de lípidos sólidos e líquidos (óleos). Assim, cristais menos perfeitos podem ser formados quando as moléculas lipídicas são diferentes em tamanho molecular e em forma conformacional (MÜLLER *et al.*, 2016). A associação de lípidos líquidos e sólidos promove uma matriz lipídica menos ordenada com mais imperfeições, que pode acomodar uma maior quantidade de fármaco e proporcionar maior flexibilidade para a modulação de liberação. Apesar da presença de lípidos líquidos, a matriz dos CLN é sólida na temperatura corporal (CHEN *et al.*, 2010; IQBAL *et al.*, 2012; SEVERINO *et al.*, 2012).

Foram propostos três modelos de incorporação para os CLN, dependendo dos lípidos e a proporção utilizada na formulação, como exemplificado na figura 4. Os CLN do tipo I possuem uma matriz sólida com lipídeos formados por diferentes tipos de ácidos graxos, com cadeias de tamanho variável, estruturada em cristais imperfeitos. O aumento destas imperfeições está associado com uma boa capacidade de alojamento dos fármacos. Nos CLN do tipo II, uma combinação especial entre determinados lípidos sólidos e líquidos leva a uma solidificação da matriz lipídica sem cristalização, ou seja, ela se forma no estado amorfo. Como normalmente a solubilidade do fármaco é maior no lipídeo líquido, o aumento de sua proporção em relação ao sólido pode levar a maior encapsulação do fármaco. Desta maneira, nos CLN múltiplos tipo III, há pequenos compartimentos líquidos de óleo envolvidos pela matriz sólida, o que favorece a solubilidade do fármaco no interior das gotículas e sua liberação prolongada a partir da matriz (MÜLLER *et al.*, 2002; SHAH *et al.*, 2015a).

Figura 4 - Diferentes tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados.



Fonte: Adaptado de Muller *et al.*, 2002; Gaba *et al.*, 2015; Patwekar *et al.*, 2016

NLS e CLN podem ser obtidas por diferentes técnicas (MÜLLER, 2000; PARDEIKE *et al.*, 2009). Pelo método de homogeneização a quente, a mistura do fármaco com o lipídeo é aquecida e depois dispersa em solução aquosa na mesma temperatura, sob agitação, formando uma pré-emulsão. Em seguida, aplica-se algum método que leva ao cisalhamento das partículas fazendo com que estas tenham o tamanho reduzido, como a homogeneização a alta pressão (HAP) ou a sonicação com sonda de ultrassom. HAP também pode ser aplicada a método de homogeneização a frio em que o fármaco é incorporado ao lipídeo, sendo estes fundidos e resfriados bruscamente por meio de gelo seco ou nitrogênio líquido, resultando em um sistema que é posteriormente triturado formando uma micropartícula lipídica as quais são dispersas em uma solução fria de tensoativo. Esta suspensão é homogeneizada em seguida, para que as forças de cavitação quebrem as micropartículas diretamente em nanopartículas (MÜLLER, 2000; MEHNERT; MÄDER, 2001; PARDEIKE *et al.*, 2009). A técnica de ultrassonicação consiste na quebra da gotícula presente na pré-emulsão inserindo uma sonda de ultrassom direto ao sistema. Para evitar a recristalização, durante o processo, a pré-emulsão é mantida em banho-maria com uma temperatura 5 °C acima do ponto de fusão do lipídeo sólido. Após este processo resfria-se o sistema ocorrendo a solidificação do lipídeo e a formação da nanopartícula (MEHNERT; MÄDER, 2001; PATWEKAR *et al.*, 2014; NASERI *et al.*, 2015).

Outra técnica de preparo é a microemulsificação descrita inicialmente por Gasco e colaboradores (1993). A microemulsão é um sistema termodinamicamente estável, composto de água e lipídeo estabilizado por tensoativo e é opticamente isotrópico, formado quando os compostos são misturados na proporção correta. A fase lipídica, contendo o fármaco fundido, e a fase aquosa são aquecidas separadamente em temperatura acima do ponto de fusão do lipídeo sólido. O sistema fundido de lipídeos e fármaco é posteriormente emulsionado com a

fase aquosa quente sob agitação contínua para produzir uma microemulsão quente e esta é então diluída em água fria (tipicamente 2-4 °C), sob agitação mecânica, para produzir as nanopartículas (GASCO, 1993; PATWEKAR et al., 2014; SHAH et al., 2015b).

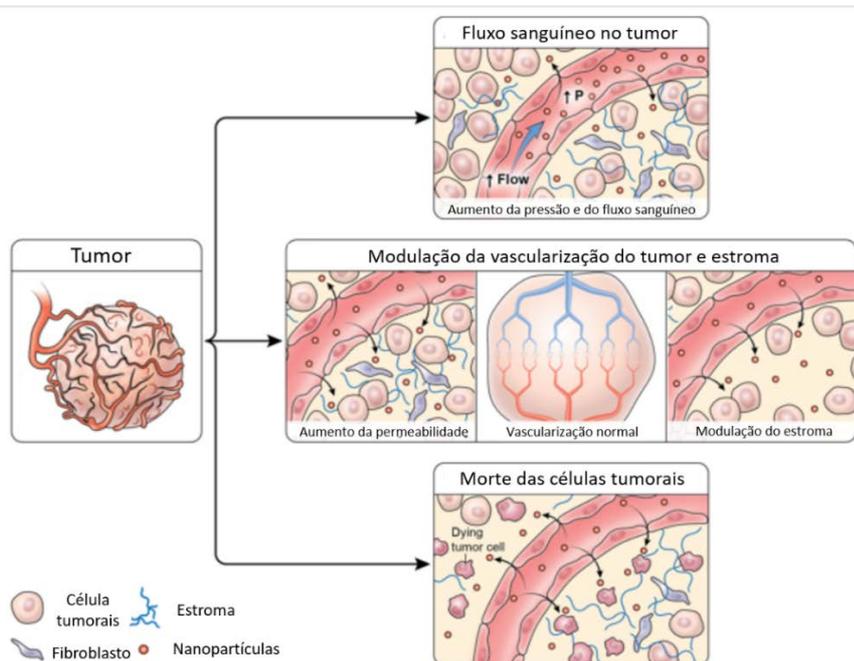
Assim, as técnicas de produção podem ser categorizadas em dois grupos: técnicas que exigem alta energia para a dispersão da fase lipídica (como HAP e ultrassonicação) e técnicas que requerem precipitação de nanopartículas a partir de sistemas homogêneos (como microemulsões e coacervação). A escolha de uma técnica adequada baseia-se nas propriedades físico-químicas do fármaco, nas características físico-químicas e na estabilidade da formulação quando aplicada a técnica (SHAH et al., 2015b).

2.3.1 Aplicação das nanopartículas no tratamento do câncer

Considerando que um desafio para a terapia do câncer é fazer com que o fármaco chegue no tumor sem que o mesmo cause danos às células normais do organismo, o uso de nanopartículas carreando fármacos antineoplásicos tem favorecido o acúmulo dos mesmos no tumor, aumentando a segurança da terapia medicamentosa (NIE *et al.*, 2007; ZHU; LIAO, 2015). As características físicas das nanopartículas podem ser usadas como uma estratégia para otimização dos tratamentos na oncologia. O tamanho e a forma das partículas, além da carga e da rigidez dos materiais utilizados irão influenciar no acúmulo nos tecidos, na adesão e na absorção celular das nanopartículas e conseqüentemente do fármaco (ZHU; LIAO, 2015). Como o tamanho das fenestrações vasculares no tumor em torno de 200 a 800 nm, nanopartículas com este tamanho máximo têm a capacidade de extravasarem e acumularem no tumor em função do efeito EPR, sendo considerado uma forma de direcionamento passivo (Figura 5) (BERTRAND *et al.*, 2014; ZHU; LIAO, 2015; XU *et al.*, 2015)

O tamanho da partícula também tem um impacto significativo no tempo de circulação após administração intravenosa. As nanopartículas apresentam um tamanho destinado a não obstruir os menores capilares, o que também reflete em menor extensão da captação celular por fagocitose, uma vez que partículas com tamanhos maiores são mais rapidamente removidas da circulação pelo sistema fagocitário mononuclear, ainda que estratégias como o revestimento por PEG também possa prolongar a circulação das nanopartículas (MINKO *et al.*, 2010; ESTANQUEIRO *et al.*, 2015).

Figura 5 - Representação esquemática da aplicação de nanopartículas associadas ao efeito de permeabilidade e retenção (EPR).



Fonte: Adaptado de Nakamura *et al.*, 2016.

2.3.2 Nanopartículas lipídicas contendo PTX incorporado

Diante dos inconvenientes relacionados ao uso de CrEL presente na formulação convencional contendo PTX atualmente comercializada, a busca por alternativas farmacotécnicas que não utilizem esse tensoativo ou solventes orgânicos tóxicos tem sido constante. Além disso, as partículas com tamanhos maiores são mais rapidamente removidas da circulação pelo sistema fagocitário mononuclear. Partículas pequenas podem circular mais livremente pelos vasos sanguíneos sem acumulação indesejável em órgãos como pulmões, baço e fígado (BLANCO; FERRARI, 2013; BERTRAND *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2015; NAKAMURA *et al.*, 2016). Nesse contexto, o uso de nanoestruturas com potencial para contornar esses problemas tem crescido consideravelmente nos últimos anos. Dentre as diversas formulações lipídicas nanoestruturadas propostas para veiculação do PTX, os CLN e as NLS tem demonstrado ganhos significativos quando comparado à formulação convencional. Alguns estudos realizados com nanopartículas com diferente composição e aplicados em modelos experimentais *in vitro* estão apresentados na Tabela 1.

Embora a maioria dos estudos relate maior citotoxicidade da formulação nanoestruturada para células tumorais comparada à formulação convencional, a capacidade de

incorporação do PTX nesses sistemas ainda é baixa. Diante disso, recentemente, no grupo de pesquisa desenvolveu NLS e CLN com diferente composição da matriz lipídica e demonstrou que os CLN apresentaram melhores perspectivas quando comparado as NLS, com características físico-químicas e biológicas favoráveis. Esse foi o primeiro estudo a reportar um aumento de atividade citotóxica em células de tumor de mama com direcionamento passivo utilizando CLN como carreador de PTX. Por outro lado, reduzida citotoxicidade para células não tumorais foi observada nesse estudo (Marcial et al., 2017). Esses dados nos estimularam a prosseguir com os estudos a fim de se obter uma formulação capaz de carrear maior concentração de PTX permitindo assim sua administração intravenosa em modelos experimentais *in vivo*.

Tabela 1 - Características de nanopartículas lipídicas contendo PTX e sua atividade citotóxica em células tumorais.

Matriz lipídica	Concentração de PTX	Teor de encapsulação (%)	Atividade citotóxica	Referência
1.NLS				
Tripalmitina Hemissuccinato de coleslerila Epikuron 200 [®] Taurocolato de sódio Butanol	1,17 nM	-	HT-29 24 h – IC ₅₀ 81,46 ± 0,26 mM 48 h – IC ₅₀ 47,16 ± 1,87 mM 72 h – IC ₅₀ 37,36 ± 6,41 mM 24 h > 48 h > 72 h	Serpe <i>et al.</i> , 2004
Trimiristina Fosfatidilcolina de ovo	6 mg/mL	25 %	OVCAR-3 e MCF-7 NLS-PTX ≈ PTX livre.	Lee <i>et al.</i> , 2007
Compritol [®] ATO 888 Poloxamer 188	1 mg/mL	77,4 ± 1,05 %	A549 NLS-PTX > PTX livre (IC ₅₀ 1,45 ± 0,12 µg/mL vs. 2,36 ± 0,13 µg/mL)	Yuan <i>et al.</i> , 2008
Lecitina	0,05 mmol	72,18 ± 3,7 %	-	
Poloxamer 188	0,25 mmol	89,0 ± 2,4 %	HepG2 NLS-PTX > PTX livre.	Pandita <i>et al.</i> , 2009
Ácido esteárico				
Lecitina	0,5 mmol	66,5 ± 1,2	-	
Precirol [®] ATO5 Polissorbato 80	82,5 – 125 µg/mL	Todos acima de 97%	MXT-B2 NLS-PTX > PTX livre (IC ₅₀ 1,69 µM vs 39,70 µM).	Videira <i>et al.</i> , 2013
			SKOV-3 NLS-PTX ≈ PTX livre (IC ₅₀ 2,4 ± 1,9 mM vs 3,7 ± 5,1 mM).	
Trilaurina Fosfatidilcolina de ovo	6 mg/mL	5,1 ± 0,6 mg/mL		Xu <i>et al.</i> , 2013

Tabela 2 - Características de nanopartículas lipídicas contendo PTX e sua atividade citotóxica em células tumorais.

Tristearina Estearilamina	0,1 p/v%	84 ± 1,4 %	A549 NLS-PTX > PTX livre (Inibição de 54,4% vs 42,8%)	Sahu <i>et al.</i> , 2014
2.CLN				
Monoestearato de glicerol Ácido oléico Poloxamer 188	0,5 mg/mL	68, 7 ± 4,5 %	CLN-PTX > PTX livre MCF-7 O IC ₅₀ 0,075 ± 0,010 µg/mL. SKOV3 O IC ₅₀ 0,053 ± 0,006 µg/mL.	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Monoestearato de glicerol Óleo de soja Lecitina de soja Brometo de cetiltrimetilamônio	0,1 mg/mL	90, 1 ± 0,7 %	B16, CT26 e HCT116 CLN-PTX > PTX livre Após 24 horas de tratamento	Yang <i>et al.</i> , 2013
Monoestearato de glicerol Poloxamer 188 Polissorbato 80 Ácido oléico Capryol™ 90	0,58 mM	89,1 ± 1,5 %	MCF-7 CLN-PTX > PTX livre (IC ₅₀ 3,53 ± 0,11 µg/ml)	Swidan <i>et al.</i> , 2016
Compritol® 888 ATO TCM Colesterol	0,1 mg/mL	90 %	CLN-PTX > PTX livre MCF-7 IC ₅₀ 25,33 ± 3,17 nM MDA-MB-231 IC ₅₀ 2,13 ± 0,21 nM PTX livre (IC ₅₀ > 500 nM)	Marcial <i>et al.</i> , 2017

* Epikuron 200 (fosfatidilcolina de soja 95%); Precirol® ATO5 (palmitoestearato de glicerila); TCM (triglicérides de cadeia média); Poloxamer 188 (co-polímero de polioxipropileno epolioxietileno); Capryol™ 90 (monocaprilato de propilenoglicol). ** HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano); OVCAR-3 e SKOV3 (adenocarcinoma de ovário humano); MCF7 e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano); A549 (adenocarcinoma pulmonar humano); HEPG2 (carcinoma hepatocelular humano); HT1080 (fibrosarcoma humano); HCT116 (câncer colorretal humano); CT26 (carcinoma de cólon murino); MXT-B2 (câncer de mama murino); B16 (melanoma murino).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados contendo paclitaxel, avaliar sua atividade em células de linhagem de câncer de mama *in vitro* e sua biodistribuição *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as formulações quanto ao diâmetro médio, potencial zeta e teor de encapsulação.
- Caracterizar os carreadores quanto ao estado de cristalização dos lipídios por técnica de difração de raios X.
- Avaliar a morfologia dos nanocarreadores por microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar a interação da matriz com PTX utilizando análise por infravermelho
- Avaliar a estabilidade preliminar.
- Avaliar o perfil de liberação da partícula em meio biológico.
- Avaliar a atividade hemolítica da formulação.
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* do PTX encapsulado nas CLN em linhagem celular de câncer de mama (MDA-MB-231).
- Realizar a radiomarcagem dos CLN e determinar a pureza radioquímica.
- Avaliar a estabilidade da radiomarcagem dos CLN em salina e plasma.
- Realizar imagens cintilográficas dos CLN-PTX em camundongos acometidos com tumor de mama Ehrlich (carcinoma mamário murino).

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O PTX foi doado pela Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Brasil) com pureza maior que 97%. Tween[®] 80 de grau super-refinado (Polissorbato 80; monooleato de sorbitano etoxilado) e Crodamol[®] GTCC (triglicérides do ácido cáprico e caprílico) foram cedidos pela Croda Inc (Edison, EUA). O Compritol 888 ATO[®] (behenato de glicerila; mistura de mono,

di e triglicerídeos do ácido behênico (C22) foi fornecido pela Gattefossé (Lyon, França). Colesterol, Cremophor® EL e todos os demais reagentes e solventes utilizados, acetonitrila, tetrahidrofurano (THF) de grau analítico foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA).

Nos estudos de atividade hemolítica, foi utilizado um kit de hemácias-teste (DiaCell I, II - hemácias de doadores do grupo O, em suspensão a $3 \pm 1,0\%$ fornecido pela Bio-Rad (Lagoa Santa, Brasil) e saponina fornecidos pela INLAB (São Paulo, Brasil)

Para o cultivo celular, o DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) foi obtido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA) e o meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 com glicose e L-glutamina foi adquirido da American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, EUA). A estreptomicina (100 µg/mL), a penicilina (100 UI/mL) e a tripsina/EDTA foram adquiridas da Gibco® Life Technologies (Carlsbad, EUA). A resazurina (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) e o soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

A linhagem celular MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário humano), adquirida da ATCC (Manassas, EUA), foi cedida pela Profª Drª Elaine Amaral Leite do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica (UFMG); e a linhagem L929 (fibroblastos), também adquirida da ATCC (Manassas, EUA), foi gentilmente fornecida pela Profª Drª Helen Rodrigues Martins do Laboratório de Doenças Parasitárias (UFVJM).

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção dos CLN

A formulação dos CLN foi proposta a partir de trabalho prévio do grupo (MARCIAL *et al.*, 2017). Para a obtenção dos CLN foram selecionados como matriz lipídica o Compritol® 888 ATO, associado ao Crodamol® como o lípide líquido. Foram utilizados como tensoativos o Tween® 80 e a lecitina de ovo, sendo o colesterol um co-tensoativo. Na fase aquosa (FA) foi utilizada água destilada e glicerina como agente isotonzante.

A composição de cada formulação proposta, incluindo a concentração de PTX, encontra-se descrita na Tabela 2.

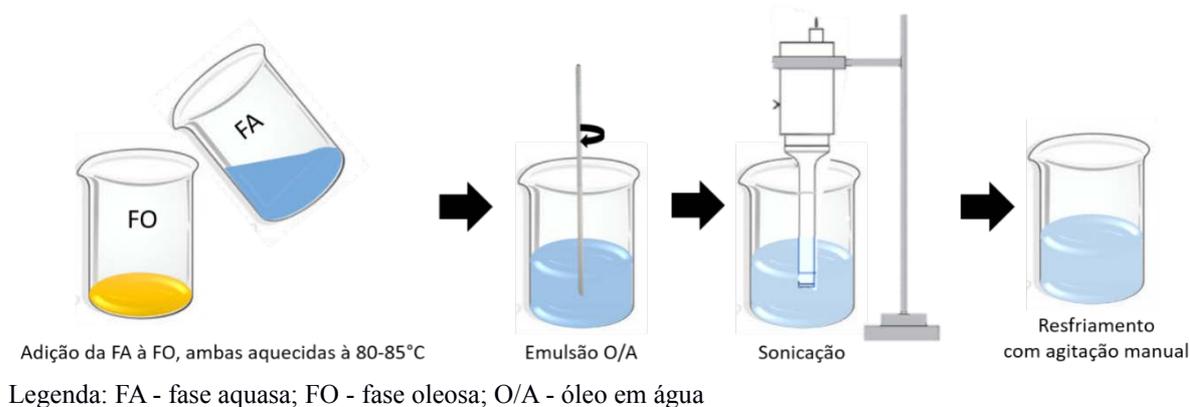
Tabela 3 – Composição dos CLN (% p/v).

COMPOSIÇÃO	CLN1	CLN 2	CLN 3	CLN 4	CLN 5	CLN 6
Fase oleosa						
PTX	0,10	0,10	0,10	0,10	0,15	0,20
Compritol 888 ATO [®]	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5
Crodamol [®]	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5
Tween [®] 80	1,0	1,5	0,5	1,0	1,0	1,0
Lecitina de ovo	-	-	0,5	-	-	-
Colesterol	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Fase aquosa						
Glicerina	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25
Água q.s.p	100	100	100	100	100	100

Foi utilizado como método de preparo a homogeneização à quente, associado a sonicação com sonda de ultrassom em alta potência (Figura 6). A fase oleosa (FO) e a FA foram pesadas e aquecidas paralelamente a 80-85 °C. Mantendo-se a temperatura, a FA foi lentamente vertida sobre a FO sob agitação manual, mantida durante dois minutos. Em seguida, a emulsão formada foi homogeneizada durante dez minutos utilizando sonda de ultrassom (Q55 sonicador; Qsonica, Church Hill Road, Newton, EUA) na amplitude de 20 %. Após este tempo, a formulação foi resfriada em temperatura ambiente sob agitação para formação das CLN. Nas formulações contendo PTX, este foi previamente solubilizado na FO fundida.

O pH das formulações foi ajustado para 7,0 com NaOH 0,1 M, utilizando um pHmetro (MS Tecnopon[®] mPA 210, Piracicaba, Brasil), e os produtos obtidos foram armazenados a 4 °C.

Figura 6 – Representação esquemática da preparação dos CLN pelo método de homogeneização a quente seguido por sonicação.



4.2.2 Caracterização físico-química das nanopartículas

4.2.2.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio

O diâmetro médio e o índice de polidispersão (IP) foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), a 25 °C, em um ângulo de incidência do laser de 90°, utilizando um contador de partículas com raio laser monocromático Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments; Worcestershire, Inglaterra). As formulações foram diluídas 10 vezes em água destilada previamente filtrada em filtro de 0,45 µm (Millipore; Billerica, EUA). As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). O valor máximo aceitável para considerar a amostra monodispersa foi de IP igual ou inferior a 0,3.

4.2.2.2 Determinação do potencial zeta das partículas

O potencial zeta foi determinado pela técnica de DLS associado a mobilidade eletroforética utilizando o Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments; Worcestershire, Inglaterra), em ângulo fixo de 90° e temperatura de 25 °C. As formulações foram diluídas 10 vezes em água destilada previamente filtrada em filtro de 0,45 µm (Millipore; Billerica, EUA). As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média ± DP.

4.2.2.3 Determinação do teor de encapsulação

O teor de PTX na formulação foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando um cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão). As condições cromatográficas empregadas foram: fase móvel composta por acetonitrila:água (55:45); fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção de 20 µL; coluna de fase reversa C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm (Sulpelco; Bellefonte, EUA). Todas as análises foram realizadas em temperatura de 25 °C. O aparato possui detector UV-Vis SPD-20AV no qual as amostras foram avaliadas em comprimento de onda de 227 nm, monitoradas e analisadas utilizando o software LabSolution.

Para a determinação do PTX total, 50 µL da formulação foram adicionados a um balão volumétrico e solubilizados em 4 mL de tetrahidrofurano. Esse procedimento desfaz as nanoestruturas liberando PTX a ser quantificado. Em seguida, a amostra foi diluída em fase móvel, filtrada em membranas de 0,45 µm (Millipore; Billerica, EUA) e injetada no cromatógrafo. Para determinar o PTX encapsulado, a formulação foi previamente filtrada em membranas de 0,45 µm (Millipore; Billerica, EUA), antes da solubilização em THF, em seguida o mesmo procedimento descrito para o PTX total foi adotado. Utilizando um método previamente validado (MARCIAL et al., 2017), foi possível calcular a concentração de PTX (µg/mL) nas amostras a partir da área do pico a partir da equação $y = 36000,2x - 161013,5$.

Em seguida, obteve-se o teor de encapsulação (TE) fármaco nos CLN utilizando a equação:

$$TE (\%) = \frac{\text{PTX encapsulado}}{\text{PTX total}} \times 100$$

Os resultados foram expressos como a média ± DP e as determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.2.4 Difração de raios X

Os experimentos de difração de raios X e infravermelho foram realizados visando melhor compreensão das interações entre os componentes da formulação com o PTX.

A difração de raios X (DRX) foi realizada utilizando o difratômetro DRX-6000 (Shimadzu; Kyoto, Japão) disponível no Departamento de Química da UFVJM. As amostras de CLN branca e CLN-PTX, previamente congeladas em nitrogênio líquido, foram liofilizadas por 24 h a -45°C (Liofilizador LS300; Terroni, São Paulo, Brasil). Os componentes sólidos puros (Compritol[®] 888 ATO, colesterol e PTX) foram submetidos a análise direta. Também foi obtida uma mistura física entre o PTX e CLN branco previamente liofilizado. Empregou-se a radiação $\text{Cu K}\alpha$, ($\lambda = 1,540560 \text{ \AA}$) e 2θ variando de 10 a 90° , com velocidade de varredura de $0,02^{\circ} 2\theta \cdot \text{s}^{-1}$.

4.2.2.5 Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier

Foram obtidos espectros de absorção na região do infravermelho das formulações previamente liofilizadas, por 24 h a -45°C no Liofilizador LS300 (Terroni; São Paulo, Brasil) e dos componentes sólidos. Foi utilizado o espectrofotômetro FTIR (do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*) modelo 640-IR (Varian; Califórnia, EUA), equipado com modo de reflectância total atenuada (ATR, Pike Technologies, modelo GladiATR), na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução 4 cm^{-1} e 32 acumulações, disponível no Departamento de Química da UFVJM.

4.2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos CLN foi avaliada a partir de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando-se um microscópio de varredura modelo VEJALMH - TESCAN (Kohoutovice – Republica Checa) As amostras foram depositadas sobre lamínulas de vidro, dispostas sobre fitas de carbono e secas em dessecador por no mínimo 24 horas em temperatura ambiente. A metalização foi realizada em ouro/paládio através da técnica da pulverização no metalizador Quorum Q150R. As imagens obtidas foram processadas e analisadas através do software próprio do equipamento.

4.2.3 Avaliação da estabilidade

Com o intuito de avaliar a permanência do PTX no interior das nanoestruturas, três lotes de formulação CLN-PTX 0,1% foram preparados, armazenados em frascos de penicilina

protegidos da luz e conservados em temperatura de 4 °C. Em intervalos de 0, 7, 15, 30 e 70 dias, uma alíquota foi retirada e os seguintes parâmetros foram avaliados: diâmetro médio, IP, potencial zeta, pH e teor de PTX encapsulado, como descrito nos itens anteriores. Todos os resultados foram expressos como média ± DP.

4.2.3.1 Avaliação da estabilidade em meio biológico

O estudo de liberação *in vitro* foi conduzido diluindo 92 µL das formulações, CLN-PTX e a dispersão micelar com PTX, em 1 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB, estreptomicina a 100 µg/mL e penicilina a 100 UI/mL.

As diluições foram mantidas em 37 °C, em agitador orbital Certomat® BS-1 (Sartorius AG; Gotinga, Alemanha) com agitação constante a 400 rpm. Após tempos específicos (0, 15, 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas), foram retiradas alíquotas e a fração liberada foi obtida separando as nanopartículas pelo método de ultrafiltração com centrifugação por 15 minutos a 14.000 rpm, em 25 °C, utilizando o dispositivo Amicon® com *cut-off* 10 kDa (Millipore; Billerica, EUA) previamente passivado *overnight* em solução com 5% de Tween 20® Croda Inc (Edison, EUA). A concentração total de PTX e a fração liberada foram dosadas por HPLC.

A quantidade de PTX liberada foi calculada utilizando a equação:

$$\% \text{ PTX liberado} = \frac{\text{PTX filtrado}}{\text{PTX total}} \times 100$$

4.2.4 Avaliação da atividade hemolítica

O ensaio, adaptado de Jain e colaboradores (2012) foi realizado adicionando 500 µL da suspensão de hemácias a 3% (Diacell) em microtubos de 2 mL e em seguida 500 µL dos seguintes tratamentos aos seus respectivos tubos: Cre:EtOH; PTX livre; CLN-PXT e CLN-Branco. Como controle negativo, 500 µL de salina (0,9% p/v) foram adicionados à suspensão de hemácias e como controle positivo, 500 µL de solução de saponina. Os microtubos foram então armazenados por 1h em agitação a 400 rpm em temperatura de 37°C. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi retirado e adicionado a placa de 96 poços. A quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante foi determinada por espectrofotometria em

comprimento de onda de 540 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada por meio da fórmula abaixo. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão e as determinações realizadas em triplicatas.

$$\% \text{ Hemólise} = \left[\frac{\text{Abs} - \text{Abs}_{\text{controle negativo}}}{\text{Abs}_{\text{controle positivo}} - \text{Abs}_{\text{controle negativo}}} \right] \times 100$$

Abs = Absorbância da amostra

Abs_{controle negativo} = Absorbância do controle negativo

Abs_{controle positivo} = Absorbância do controle positivo

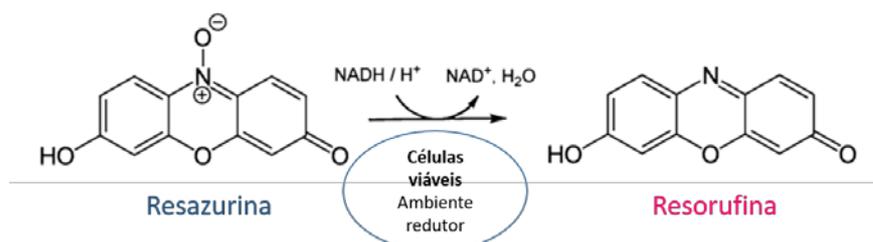
4.2.5 Estudos de atividade *in vitro*

Os estudos de atividade *in vitro* foram conduzidos utilizando a linhagem de células normais L929 (fibroblastos de rato) e de células neoplásicas MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano). As células L929 foram cultivadas em meio RPMI 1640 e as células MDA-MB-231 foram cultivadas em DMEM. Os meios de cultivo foram suplementados com 10% de SFB e os antibióticos estreptomicina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e penicilina a 100 UI/mL. As culturas de células foram mantidas em garrafas T-75 em estufa umidificada em ambiente de 5% de CO_2 a 37 °C.

4.2.5.1 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando ensaio de metabolização da resazurina (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) em resorufina (Figura 7). Para este ensaio foram utilizados como tratamentos CLN-PTX 1 mg/mL, CLN branco e dispersão micelar de PTX (6 mg/mL) em CrEL:etanol (1:1).

Figura 7 - Reação de oxi-redução da resazurina em resorufina após conversão pelas enzimas do sistema de transporte do metabolismo.



Fonte: Adaptado de Czekanska, 2011

As células foram recolhidas das garrafas utilizando 1 mL de tripsina/EDTA 0,25% (v/v) (Gibco Life Technologies; Carlsbad, EUA) e centrifugadas a 200 g por 7 minutos. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer com o uso de microscópio óptico e a concentração celular foi ajustada com meio de cultura. Assim, alíquotas das células em suspensão de MDA-MB-231 ($2,0 \times 10^4$ células/poço) ou L929 ($1,0 \times 10^5$ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas em 37 °C e 5% de CO₂ para permitir a adesão antes da adição dos tratamentos.

Após a incubação, as células foram tratadas com as formulações, adicionadas aos poços (20 µL) em concentrações de 2500; 500; 100; 20; 4; 0,8 e 0,16 0,032 nM de PTX, sendo o CLN branco diluído da mesma forma que o CLN-PTX. Após o tratamento, as placas foram incubadas por 24 ou 48 horas.

Passados esses períodos, 20 µL de solução de resazurina (Sigma-Aldrich; Saint Louis, USA) 0,01% (p/v) foram adicionados a cada poço e as placas foram novamente incubadas por 4 horas. Estimou-se a viabilidade celular utilizando a taxa de redução da resazurina (cor púrpura), mediante avaliação da fluorescência gerada pela resorufina (cor rósea) em comprimento de onda igual a 595 nm.

Os valores de fluorescência obtidos dos poços onde as células foram mantidas apenas em meio de cultura, sem tratamento, foram considerados como 100% de viabilidade celular. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle das células. Todas as amostras foram testadas em quadruplicata em três experimentos independentes e expressas como média \pm DP.

4.2.5.2 Ensaio de clonogenicidade

O ensaio de clonogenicidade foi realizado conforme protocolo estabelecido por Franken e colaboradores (2006). Assim, alíquotas das células MDA-MB-231 foram semeadas em triplicata na densidade de $5,0 \times 10^4$ células/mL em placa de 24 poços e incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ em 37 °C por 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com a dispersão micelar de PTX em CrEL:EtOH (1:1) e CLN-PTX na concentração de 100 nM.

Após 48 horas do tratamento as células tripsinizadas foram coletadas, as triplicatas reunidas em tubos para centrifugação (250 x g por 7 minutos) e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Em seguida, 150 células de cada replicata foram replaqueadas em placas de 6

poços com 3 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB. As placas foram incubadas em estufa contendo 5 % de CO₂ em 37 °C por 10 dias, sendo o meio trocado a cada 3 dias.

Passado este tempo, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e os poços foram lavados com solução de PBS. As colônias foram, então, fixadas adicionando a cada poço 2 mL de solução contendo 6% (v/v) de glutaraldeído e 0,5% (p/v) de cristal violeta em água. As placas foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. A solução fixadora foi removida, as placas foram lavadas cuidadosamente com água por imersão e mantidas em temperatura ambiente até secagem completa.

O número de colônias formadas a partir das culturas controle foi usado no cálculo de eficiência de plaqueamento (PE) de acordo com a equação abaixo:

$$PE = \frac{\text{número de colônias formadas no controle}}{\text{número de células plaqueadas}} \times 100\%$$

O valor de PE e o número de colônias formadas a partir das culturas tratadas foram usados para o cálculo da fração de sobrevivência (FS) de acordo com a equação:

$$FS = \frac{\text{número de colônias formadas após o tratamento}}{\text{número de células plaqueadas} \times PE}$$

4.2.6 Marcação radioquímica das CLN-PTX

As CLN-PTX preparadas foram submetidas ao método de marcação com o isótopo radioativo tecnécio-99 metaestável (^{99m}Tc). Uma alíquota de 200 µL de formulação foi adicionada a um frasco, seguida da adição de 100 µL de uma solução de cloreto estanho (SnCl₂), 1,0 mg/mL em ácido clorídrico 0,25 M. O pH do sistema foi ajustado para 7,0 com solução de hidróxido de sódio 0,1 M. O frasco foi lacrado e submetido a vácuo para evitar a oxidação do estanho. Em seguida foram adicionados 3,7 MBq de pertecnetato de sódio (Na^{99m}TcO₄) em solução salina 0,9% (p/v), o sistema foi agitado e mantido em repouso por 15 minutos. Os testes foram realizados em quadruplicata e todos os resultados foram expressos como média ± DP. A radiomarcagem da dispersão micelar do PTX em Cre:EtOH (1:1) foi realizada conforme protocolo previamente estabelecido por Monteiro e colaboradores (2017).

4.2.6.1 Controle de pureza radioquímica

O rendimento da marcação foi determinado pela quantificação das impurezas comumente encontradas nos processos de marcação, o tecnécio-99m livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e o tecnécio-99m hidrolisado ($^{99m}\text{TcO}_2$). Inicialmente, realizou-se a cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel 60 para determinar o percentual de $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Em cada placa de CCD (10 cm x 1 cm), foi aplicada uma gota de formulação radiomarcada. Após a eluição utilizando-se como fase móvel acetona, as placas foram secas, dobradas e a radioatividade foi determinada em um contador gama de poço (ANSR; Abbot, EUA). A porcentagem de $^{99m}\text{TcO}_2$ foi determinada após a filtração da formulação radiomarcada em filtro de 0,45 μm (Millipore; Billerica, EUA) e quantificando a atividade radioativa contida no filtro e no filtrado. O rendimento de marcação foi obtido a partir da fórmula abaixo:

$$\% \text{ marcação} = 100 - (\%^{99m}\text{TcO}_4^- + \% ^{99m}\text{TcO}_2)$$

4.2.6.2 Estabilidade *in vitro* da radiomarcação

Os testes de estabilidade da marcação foram desenvolvidos em dois meios distintos: salina 0,9% (p/v) e em plasma de camundongo. Os testes foram realizados em quadruplicata e todos os resultados foram expressos como a média \pm DP.

Em solução salina 0,9% (p/v), o frasco contendo os CLN-PTX marcados foi mantido à temperatura ambiente e nos tempos de 1h, 2h, 4h e 24h, foram retiradas alíquotas para a quantificação de impurezas ($^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$), como descrito anteriormente.

Para mimetizar a estabilidade da marcação dos CLN-PTX na corrente sanguínea, foi utilizada uma proporção de 200 μL de CLN-PTX radiomarcadas para 500 μL de plasma de camundongo. A mistura foi mantida a 37°C e, nos tempos de 1h, 2h, 4h e 24h, foram retiradas alíquotas para a quantificação de impurezas ($^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$), como descrito previamente.

4.2.7 Biodistribuição em camundongos Swiss

Para o estudo foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, com 6 semanas de idade, adquiridos do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, mantidos dentro de gaiolas (44 x 33 x 17cm), e em estante com ar filtrado e controle de temperatura, com acesso livre a

ração e água. Os animais foram mantidos na sala de experimentação animal do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, cujo ambiente possui controle de umidade e temperatura. O experimento foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFMG, pelo protocolo número 348/2017.

4.2.7.1 Obtenção do modelo experimental de tumor de Ehrlich

As células de tumor ascítico de Ehrlich (2×10^6 células), derivadas de adenocarcinoma mamário de camundongos, foram inoculadas intraperitonealmente em camundongos Swiss fêmeas ($n = 2$ animais). Oito dias após a inoculação, os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg), sendo que o líquido ascítico contendo as células tumorais foi coletado e transferido para um tubo Falcon. Após esse procedimento, os animais foram sacrificados com sobredose de anestésico (30 mg/kg de xilazina e 240 mg/kg de cetamina). O líquido ascítico foi imediatamente submetido à centrifugação a 3000 r.p.m. por 5 minutos, numa temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* contendo as células foi ressuspensionado em solução salina 0,9% (p/v). O procedimento foi repetido até a obtenção de um líquido denso e claro, com o mínimo possível de fibrinas e hemácias.

Em seguida, realizaram-se a contagem e a determinação da viabilidade celular. Para a contagem das células tumorais, utilizou-se microscópio óptico com o auxílio de uma câmara de Neubauer e solução de azul de Tripán 0,4% (p/v) como corante. As células coradas pelo azul de Tripán foram consideradas inviáveis e as células translúcidas foram consideradas viáveis. Uma suspensão de células viáveis foi então preparada em uma densidade média de $2,5 \times 10^7$ células/mL. Essas células foram implantadas por via subcutânea no flanco direito de cada camundongo em ($2,5 \times 10^6$ células em 0,1 mL). Os animais foram mantidos até que o tumor atingiu diâmetro médio de 5 mm. Ao atingir o tamanho requerido, os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos experimentais ($n = 7$ animais cada) os quais foram utilizados para a obtenção de imagens cintilográficas.

4.2.7.2 Obtenção das imagens cintilográficas

Esse estudo foi conduzido nos animais acometidos com tumor de Ehrlich após administração da dispersão micelar de PTX em Cre:EtOH e da formulação de CLN-PTX

ambos radiomarcados com ^{99m}Tc . Cada animal recebeu, pela veia caudal, 3,7 MBq dos sistemas radiomarcados. Após os tempos de 30 minutos e 2 horas, os animais foram anestesiados com solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e, em seguida, colocados sob uma gama câmara Nuclide™ TH 22, Mediso (Budapeste, Hungria) e mantidos em posição de decúbito ventral para a aquisição das imagens cintilográficas. Foi utilizada uma janela 20% simétrica, para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) obtidas foram armazenadas em uma matriz 256 x 256. Após a aquisição das imagens, o sangue (volume total do camundongo) foi coletado por punção cardíaca até a eutanásia por exsanguinação.

4.3 Análises Estatísticas

Os valores médios e os desvios-padrão (DP) foram calculados para todos os experimentos descritos anteriormente. A análise estatística foi feita por meio de análise de variância *one-way* (ANOVA), com pós-teste de Tukey. Um modelo de regressão não-linear foi utilizado para determinar os valores de IC50. Para todas as análises foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0. Para todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e caracterização físico-química das nanopartículas

Estudos anteriores desenvolvidos por Marcial e colaboradores (2017) demonstraram que o PTX foi incorporado com sucesso aos CLN e esta formulação apresentou características físico-químicas apropriadas para a administração intravenosa, bem como uma estabilidade aumentada em comparação a outros nanocarreadores lipídicos. Além disso, CLN-PTX foi mais efetivo contra células de tumor de mama humano (MCF-7 e MDA-MB-231) e menos tóxico para células não tumorais (fibroblastos) em comparação com o PTX veiculado em uma dispersão micelar semelhante ao produto comercial, o Taxol® (MARCIAL *et al.*, 2017).

No intuito de carrear maior quantidade de PTX, a proposta inicial desse estudo foi otimizar a formulação previamente desenvolvida mediante alteração da composição da matriz lipídica e/ou proporção de tensoativos e matriz lipídica. As características das formulações obtidas estão descritas na Tabela 3.

Inicialmente, foi mantida a mesma formulação descrita por Marcial e colaboradores (2017). Os dados obtidos demonstraram um diâmetro médio das partículas em torno de 200 nm (182 ± 23 nm), mas IP igual a $0,50 \pm 0,01$, característico de um sistema heterogêneo. Diante disso, foi aumentada a concentração de tensoativo (CLN 2) e alterado o sistema tensoativo mantendo a concentração total como a CLN 1 (CLN 3), no entanto, as formulações permaneceram heterogêneas, com o IP maior que 0,3. Por fim, alterou-se a proporção da matriz lipídica (CLN 4), utilizando-se uma proporção de 3:1 entre lípide sólido e líquido. Com isso, foi observado diâmetro médio próximo a 200 nm (213 ± 9 nm) e uma redução drástica do IP para 0,24, característico de um sistema monodisperso.

Tabela 4 - Caracterização físico-química dos CLN-PTX obtidos, quanto a diâmetro, IP e potencial zeta.

Formulação	Diâmetro (nm)	IP	Potencial zeta (mV)
CLN 1	182 ± 23	$0,50 \pm 0,01$	-21 ± 5
CLN 2	173 ± 25	$0,39 \pm 0,15$	-17 ± 3
CLN 3	215 ± 39	$0,49 \pm 0,20$	-21 ± 4
CLN 4	213 ± 9	$0,24 \pm 0,01$	-18 ± 3

*Valores expressos com média \pm desvio padrão (n = 3).

A solubilidade do fármaco na matriz lipídica é conhecida como uma condição importante para o seu aprisionamento mais eficiente na nanopartícula. Além disso, a matriz cristalina menos perfeita como a apresentada pelo CLN, proporciona mais espaço para acomodação do fármaco (MÜLLER, 2000; KASONGO et al., 2011; BAEK et al., 2012; HOSNY et al., 2015; BAEK; CHO, 2015b).

A partir da formulação CLN 4, testou-se o preparo dos CLN aumentando a concentração de PTX para 1,5 e 2,0 mg/mL. Os resultados do diâmetro médio, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta estão apresentados na Tabela 4. Pode-se observar que a associação do PTX acarretou ao CLN um aumento no diâmetro médio entre de 166 nm para até 254 nm ($p < 0,05$). Todas as formulações, contendo ou não PTX, apresentaram índices de polidispersão menores que 0,3, caracterizando sistemas monodispersos.

Tabela 5 - Caracterização físico-química dos CLN mediante aumento na concentração de PTX, quanto a diâmetro, IP e potencial zeta.

Concentração de PTX (mg/mL)	Diâmetro (nm)	IP	Potencial zeta (mV)
-	166 ± 2	0,18 ± 0,01	-23 ± 2
1,0	220 ± 11*	0,21 ± 0,01	-18 ± 6
1,5	231 ± 9*	0,24 ± 0,10	-21 ± 4
2,0	254 ± 31*	0,26 ± 0,06	-23 ± 2

* Representa diferença significativa em relação aos CLN brancos. Dados expressos em média ± DP (n=3). O nível de significância foi considerado para valores de $p \leq 0,05$ (teste de Tukey).

O diâmetro médio da partícula e a homogeneidade de distribuição do diâmetro tem um impacto significativo na aplicação intravenosa (IV). Essas características podem influenciar o acúmulo nos tecidos, a adesão, a penetração celular das nanopartículas e conseqüentemente do fármaco (ZHU; LIAO, 2015). O diâmetro médio entre 200 e 800 nm, como os observados nos sistemas obtidos neste estudo, favorecem a passagem dos CLN pelas fenestrações dos vasos sanguíneos que irrigam os tumores da mama devido ao efeito EPR, possibilitando maior acúmulo das nanopartículas no tumor, em comparação ao fármaco livre (TORCHILIN, 2011a; ZHU; LIAO, 2015)..

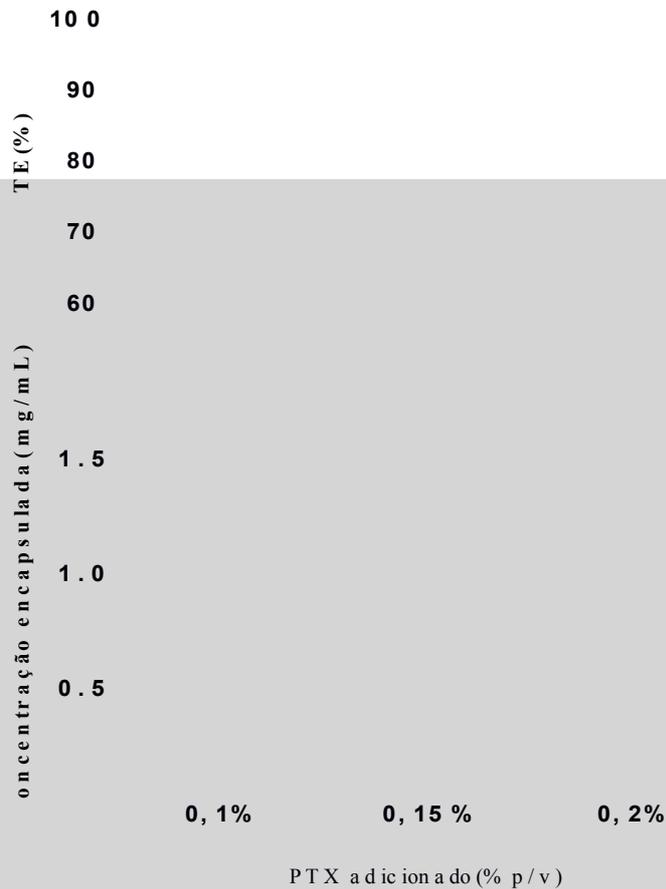
As formulações também cumprem os requisitos exigidos pela Farmacopeia Americana, para o uso de uma formulação lipídica para administração injetável. De acordo com esta especificação, o diâmetro médio das partículas deve ser menor ou igual a 500 nm e a

concentração percentual de partículas maiores que 5 μm deve ser menor que 0,05% do total da fase dispersa. Essas condições previnem a ocorrência de embolia pulmonar e a oclusão de capilares menores, uma vez que esses possuem em média 5 μm de diâmetro (USP 39, 2016; FOLKMAN, 2008).

O potencial zeta apresentado por todas as formulações foi negativo, com valores de -18 a -23 mV. A análise do potencial zeta é útil para entender e caracterizar as dispersões coloidais, pois é o método mais utilizado para estimar a carga superficial e interações repulsivas entre as partículas de um colóide, sendo diretamente associada à estabilidade dos sistemas (MOHANRAJ *et al.*, 2006; HONARY; ZAHIR, 2013; AGIMELEN *et al.*, 2017). Em geral, sistemas com potencial zeta superior a 30 mV são considerados estabilizados por mecanismos elétricos. No presente estudo, a presença do Tween[®] 80, um tensoativo não iônico etoxilado, confere impedimento estérico às nanoestruturas, impedindo-as fisicamente de se aglomerarem, o que conseqüentemente resulta em sistema mais estável. Os resultados de potencial zeta encontrados no presente trabalho mostram concordância com os obtidos para CLN contendo PTX desenvolvidos por Macial e colaboradores (2017) com valores próximos a -11,0 mV.

Com relação à concentração de PTX encapsulada (Figura 8), observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) no TE com o aumento da concentração de PTX de 1,0 mg/mL ($93 \pm 3\%$) para 1,5 mg/mL ($68 \pm 1\%$) e 2,0 mg/mL ($58 \pm 0,2\%$). Assim, a concentração efetivamente encapsulada permaneceu constante a despeito do aumento de PTX adicionado no preparo ($0,9 \pm 0,05$; $1,0 \pm 0,02$; $1,2 \pm 0,04$ mg/mL respectivamente) e, da mesma forma, o *drug loading* ($2,9 \pm 0,2$, $3,2 \pm 0,06$ e $3,8 \pm 0,01\%$). Como o lípide possui certa capacidade de carregamento do fármaco, a adição em excesso deste conduziu ao aumento do fármaco não encapsulado. Estes dados sugerem que ocorreu saturação do sistema, não permitindo a incorporação de quantidades maiores que 1,0 mg/mL de PTX. Desta forma, a formulação proposta para CLN-PTX 1,0 mg/mL acarretou aumento de aproximadamente dez vezes na quantidade de PTX incorporado em CLN por Marcial e colaboradores (2017). Portanto, essa formulação obtida a partir da concentração de 1,0 mg/mL de PTX foi considerada adequada para ser utilizada nos estudos subsequentes.

Figura 8 - Teor de encapsulação e concentração do PTX incorporado nos CLN em função do PTX adicionado.*



*Representa a diferença significativa entre os teores de encapsulação encontrado para as diferentes concentrações de fármaco (em relação à adição de 0,1 % de PTX). Dados expressos em média \pm DP (n=3). O nível de significância foi considerado para valores de $p \leq 0,05$ (teste de Tukey)

5.1.1 Difração de raios-x

A difração de raios-X nos fornece informações sobre o comprimento dos espaçamentos curtos e longos da treliça lipídica e estão fortemente correlacionadas a incorporação do fármaco à matriz. Os cristais têm a capacidade de difratar um feixe incidente de raios X, por estes raios apresentarem comprimentos de onda muito próximos às distâncias entre os átomos ou moléculas que formam a rede cristalina (MÜLLER, 2000; BUNJES *et al.*, 2002). A Figura 9 mostra os dados obtidos por difração de raios X para os componentes

sólidos dos CLN (Comprimido ATO 888[®], colesterol e PTX) e para as CLN na ausência e presença de fármaco assim como a mistura física (CLN-Branca + PTX).

Na figura 9A é possível observar os picos de difração de raios-X característicos dos componentes das CLN. Os picos de difração para o Comprimido[®] 88 ATO podem ser facilmente observados, apresentando um pico em alta intensidade em 21,22° e um pico de menor intensidade em 23,43°, espaçamentos curtos característicos da forma β' (CASTRO *et al.*, 2008; FINI *et al.*, 2011). As mesmas peculiaridades observadas para o Comprimido[®] 888 ATO foram detectadas na figura 9B em todas as formulações. No entanto, os dados de difração do CLN (figura 9B) revelaram difrações ligeiramente mais amplas do que as observadas para o lípido puro (figura 9A). Esse fato pode ser explicado possivelmente pela menor perfeição da rede cristalina na formulação em comparação com o lípido (CASTRO *et al.*, 2008).

Em contraste, a análise da CLN-PTX revelou ausência dos picos de difração característicos do PTX, sugerindo que o fármaco está integrado à matriz lipídica do CLN. Além disso, a adição de um lípido líquido a formulação contribui para desorganização na rede cristalina, geralmente colaborando para maior capacidade de alojamento do fármaco nas partículas (SOUTO *et al.*, 2006; MUCHOW *et al.*, 2008).

Um pequeno terceiro pico a 0,460 nm foi observado nos CLN indicando a formação parcial de β_i . De acordo com Larsson (1966), os espaçamentos curtos de triglicérides podem ser descritos como α (subcélula hexagonal com espaçamento de rede de 0,42 nm), β' (subcélula perpendicular ortorrômbica com espaçamentos de rede de 0,42 a 0,43 nm e 0,37 a 0,40 nm) e β (subcélula paralela com um espaçamento de rede forte de 0,46 nm). No entanto, formas intermediárias também podem ser encontradas, como a forma β_i , apresentada por Precht (1988).

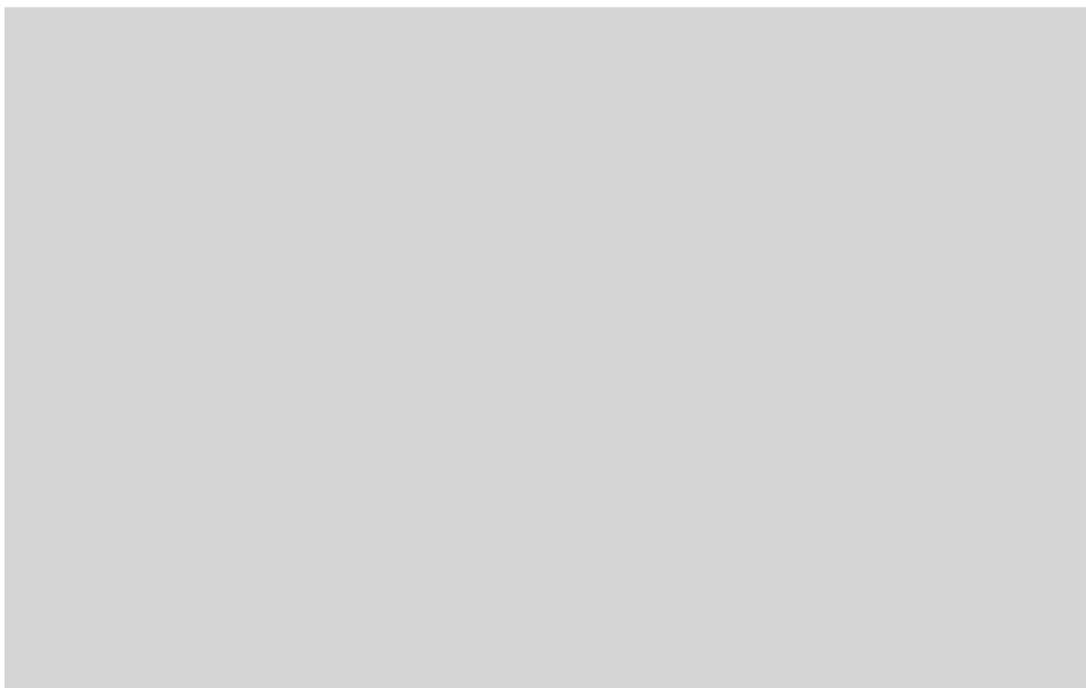
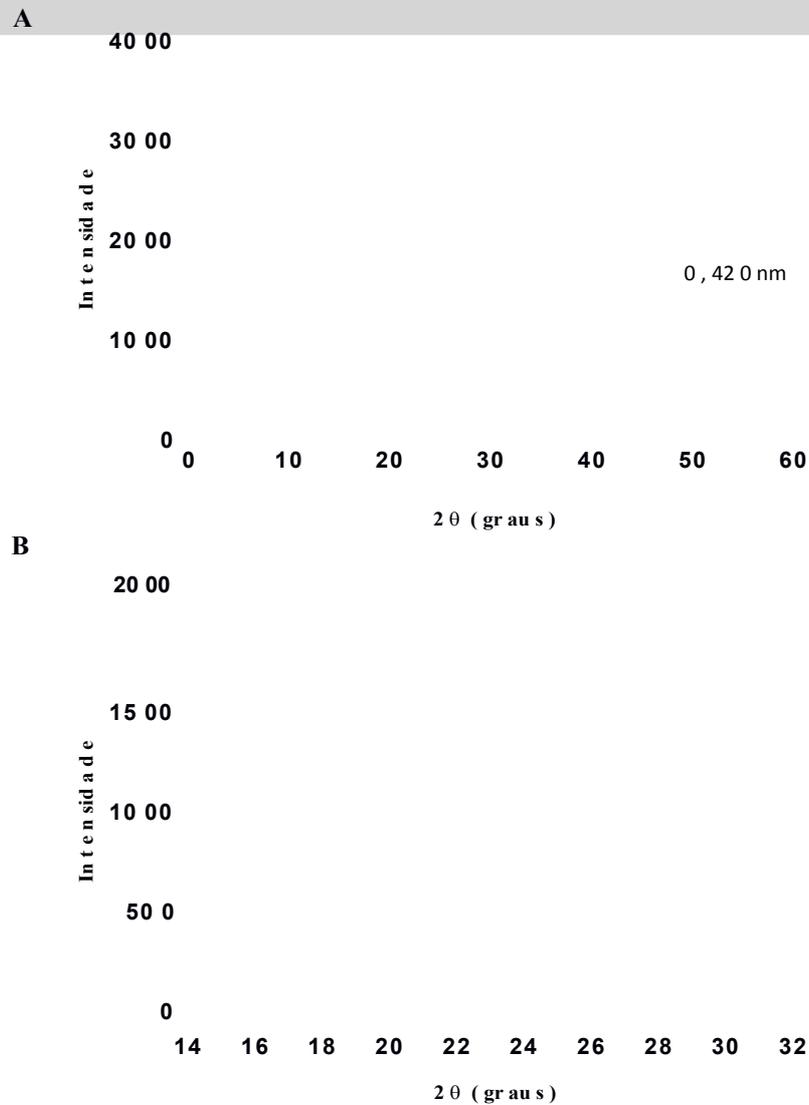


Figura 9 - Difratoogramas dos componentes sólidos (A) e dos CLN com e sem PTX e da mistura física (B).



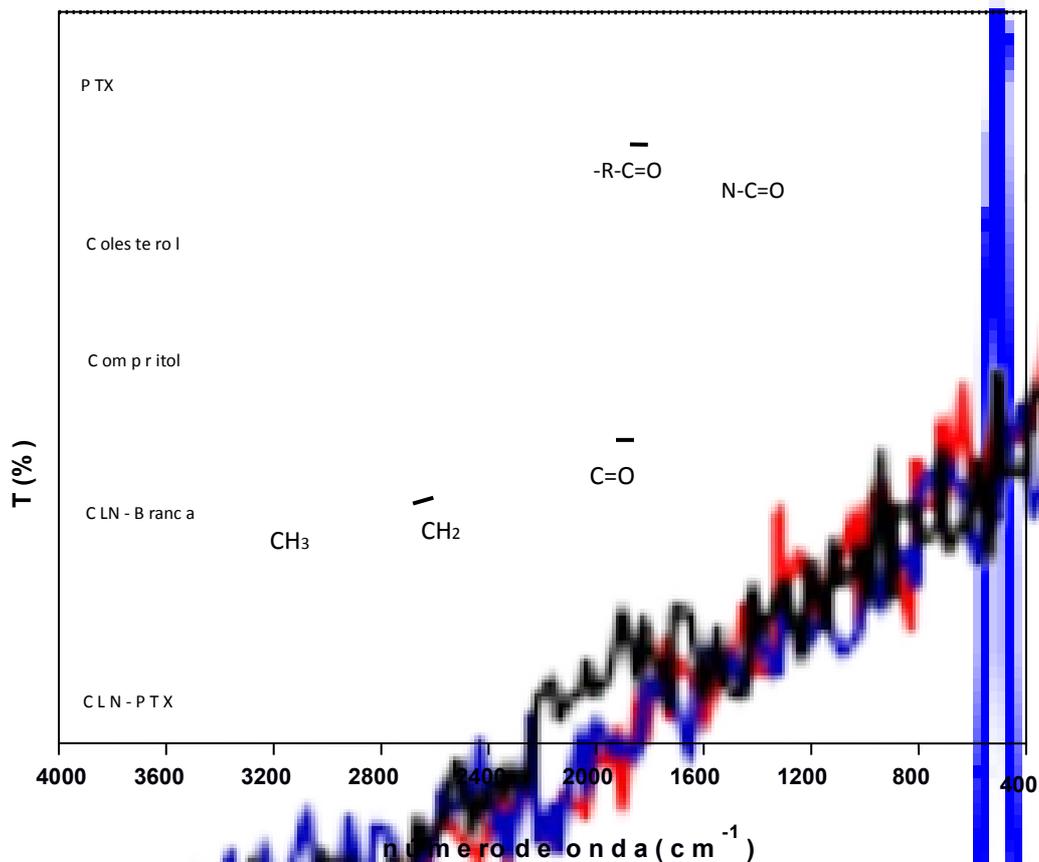
5.1.2 FTIR

Os espectros FTIR dos componentes sólidos e da formulação liofilizada foram obtidos e estão mostrados na figura 10. O espectro do PTX apresenta picos em 3479-3300 cm^{-1} correspondente a vibrações de estiramento N-H e vibrações de estiramento assimétricas e simétricas CH_2 em 2976-2885 cm^{-1} . O pico situado em 1734 cm^{-1} é atribuído à vibração de estiramento C=O a partir dos grupos éster, e em torno de 1647 cm^{-1} , atribuído a amida (RENUGA DEVI; GAYATHRI, 2010; MARTINS *et al.*, 2014). No CLN-PTX pode-se observar a presença de um pico também nesta região, atribuído a amida, e isso pode estar

relacionado ao PTX que não interagiu completamente com a matriz. O espectro do Compritol® 888 ATO mostrou bandas de absorção de alongamento C-H a 2815 e 2849 cm^{-1} e alongamento C=O a 1738 cm^{-1} (RAHMAN *et al.*, 2010).

Observou-se também a sobreposição entre o espectro obtido para CLN contendo PTX e CLN branco, demonstrando que o CLN-PTX tem o mesmo perfil de absorção no infravermelho dos CLN branco. Assim, o resultado sugere que a maior parte do PTX foi incorporado à matriz lipídica (OMWOYO *et al.*, 2014; HAIDER *et al.*, 2017).

Figura 10 - Espectros de absorção no IV dos componentes sólidos e dos CLN liofilizados.



5.1.3 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias dos CLN-PTX estão agrupadas na Figura 11. Na figura 11A foi possível observar o tamanho da nanopartícula representativa em torno de 220 nm, corroborando com os dados de diâmetro médio encontrados por DLS. Na figura 11A e 11B, é possível visualizar que os CLN apresentam morfologia esférica, entretanto, na figura 11C observam-se possíveis aglomerados, que podem estar relacionados com o processo de secagem durante a preparação da amostra, podendo causar modificações na forma da

nanopartícula. A evaporação da água pode impedir que os carreadores lipídicos permaneçam no seu formato e assim elas tentem se aglomerar (MÜLLER, 2000).

Figura 11 - Micrografias dos CLN-PTX em aumento de 11.000x (A), 75.000x (B) e 150.000x (C).



5.2 Avaliação da estabilidade

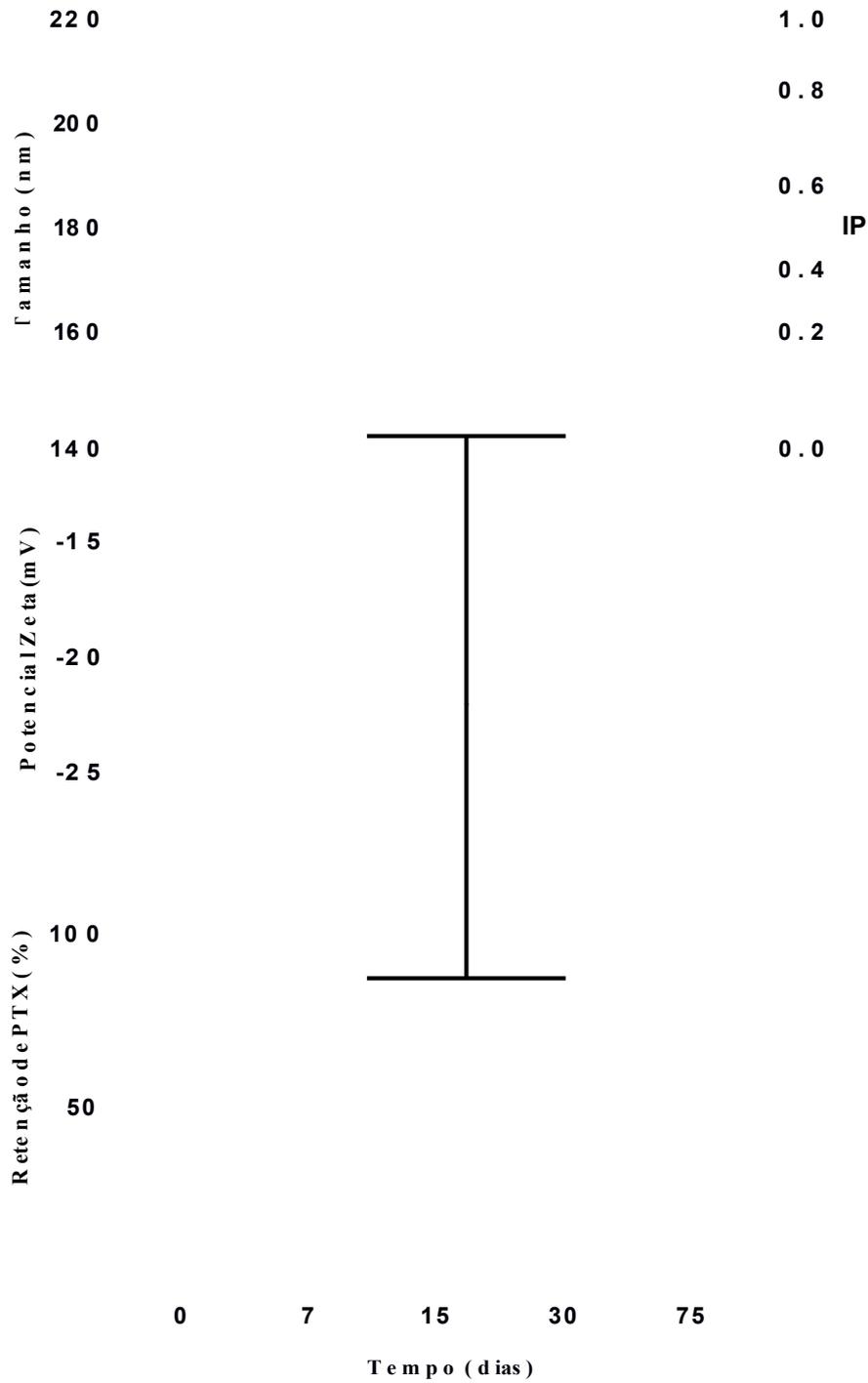
Após 75 dias de armazenamento na geladeira, o CLN-PTX apresentou uma diminuição do diâmetro médio de 201 ± 6 nm para 161 ± 4 nm, e o IP aumentou progressivamente para 0,4 (Figura 12A). O potencial zeta manteve-se negativo, reduzindo de -15 para -25 mV, sendo que a redução foi mais intensa nos primeiros 7 dias (Figura 12B).

Após 7 dias o teor de PTX reduziu 16% mas manteve-se estável até o dia 30. Entretanto no dia 70 o valor de retenção encontrado foi de $35 \pm 8\%$ (Figura 12C).

Além do elevado alto potencial zeta (próximo a 30 mV em módulo), o impedimento estérico de nanopartículas associado ao uso do polissorbato 80, um surfactante não iônico, também contribui para a estabilização física, reduzindo a agregação (SWIDAN *et al.*, 2016b; MARCIAL *et al.*, 2017). As variações encontradas após a primeira semana de armazenamento, acredita-se estarem relacionadas à reorganização polimórfica observada nos primeiros dias após a produção dos carreadores. Após 75 dias, é observada liberação do fármaco do sistema com diminuição da retenção do PTX como consequência de rearranjo lipídico associado à diminuição do diâmetro médio das partículas (SOUTO *et al.*, 2006; ÜNER, 2015). Não foi observado alteração no pH durante o tempo avaliado.

A

Figura 12 - Estabilidade dos CLN-PTX ao longo de 70 dias, em relação ao diâmetro e IP (A), potencial zeta (B) e retenção do PTX (C).

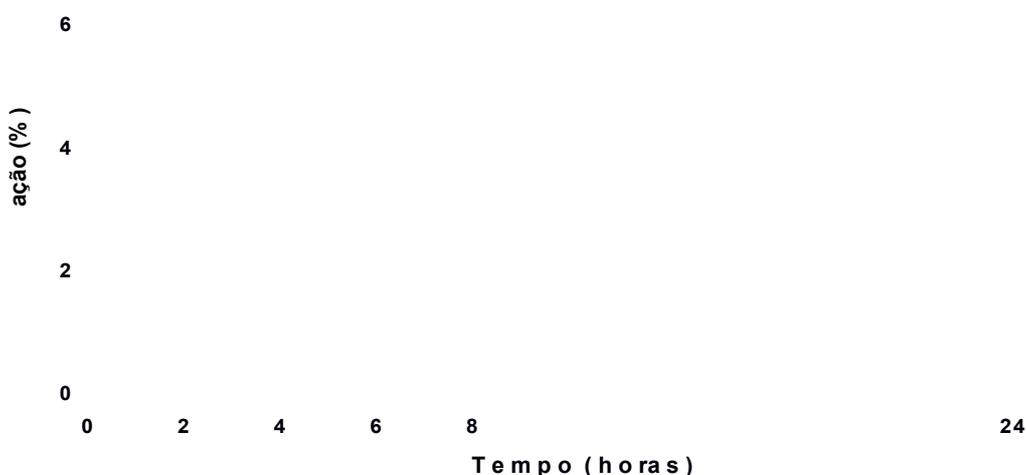


*Diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo 0

5.2.1 Avaliação da estabilidade em meio biológico

Para avaliar a estabilidade do sistema em meio biológico, realizou-se um estudo de liberação do PTX a partir da diluição de PTX livre ou CLN-PTX em meio de cultura DMEM contendo 10% SFB (Figura 13). Desde a partir de 15 minutos, a liberação do PTX a partir do CLN foi menor ($p < 0,05$) quando comparada à dispersão micelar, permanecendo maior por 24h. Aproximadamente 4% e 5% PTX foram liberados dos CLN e a dispersão micelar, respectivamente, no tempo de 8h, seguida por um platô.

Figura 13 - Liberação in vitro do PTX (%) a partir dos CLN e dispersão micelar (PTX livre) em DMEM suplementado.



*Diferença significativa ($p < 0,01$).

Da mesma forma, Swidan et al. (2016) também observaram que o PTX incorporado em NLS ou CLN foi liberado mais lentamente quando comparado ao Taxol[®], em tampão fosfato (pH 7,4) com 2% de Tween[®], sendo a liberação a partir do CLN mais lenta que NLS. Liu et al. (2011) também mostraram [REDACTED] docetaxel, um taxano da mesma forma que o paclitaxel, incorporado em SLN ou C [REDACTED] apresentou liberação sustentada. Desta maneira, esses dados sugerem uma diminuição na frequência de administração, o que é vantajoso na aplicação clínica.

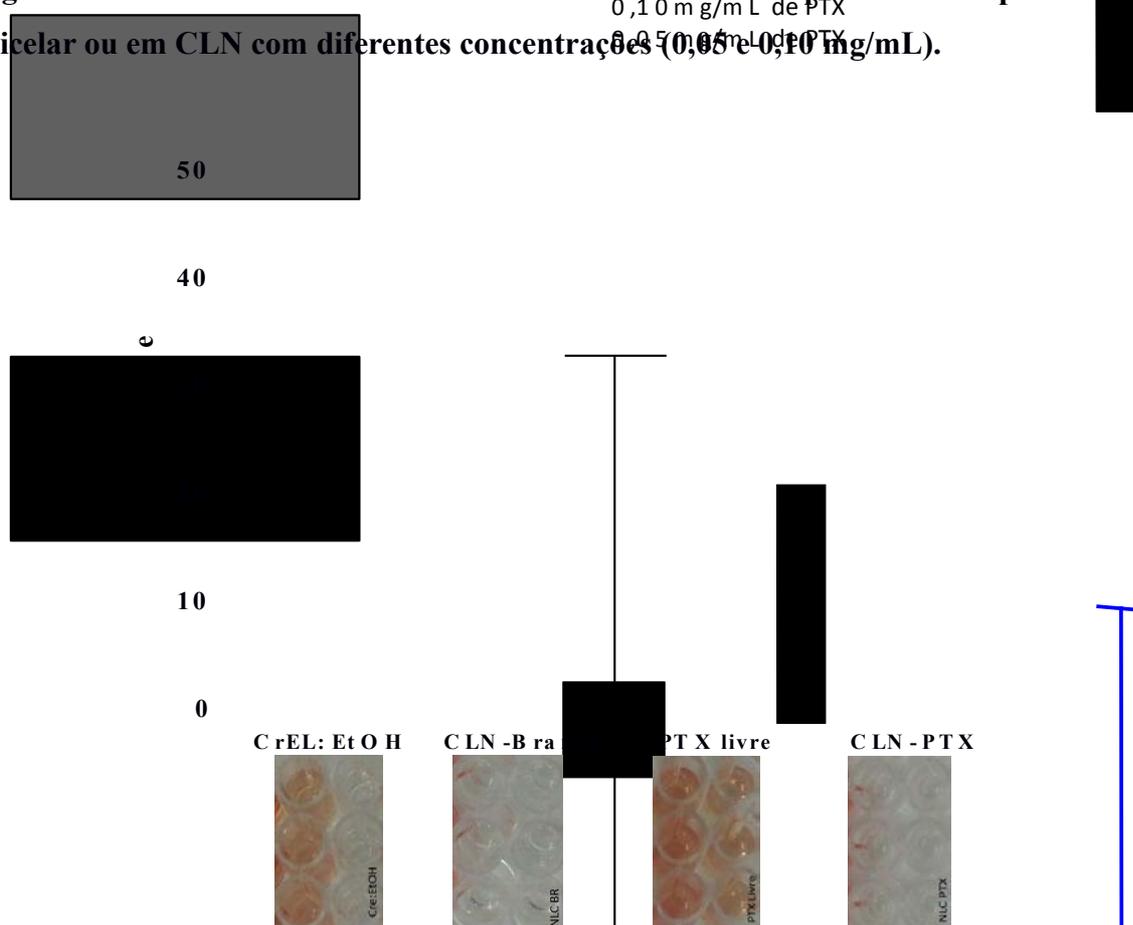
A liberação lenta do PTX pode ser devido à natureza lipofílica da PTX, que é mantido na matriz lipofílica dos carreadores. A partir da matriz, a liberação do fármaco irá ocorrer principalmente por dissolução e difusão (PALIWAL *et al.*, 2009; SWIDAN *et al.*, 2016a).

Assim, CLN-PTX mostrou o padrão de liberação mais sustentado em comparação à dispersão micelar incorporado com PTX.

5.3 Avaliação da atividade hemolítica

As hemácias são células que se encontram na corrente sanguínea, e por sua inevitável interação com as formulações farmacêuticas administradas por via intravenosa, elas são um bom indicador *in vitro* para toxicidade. Os resultados da atividade hemolítica dos veículos (CrEL:EtOH, CLN-Branca) e dos sistemas carreando o PTX estão apresentados na figura 14.

Figura 14 - Atividade hemolítica dos veículos e do PTX incorporado em dispersão micelar ou em CLN com diferentes concentrações (0,05 e 0,10 mg/mL).



*Representa diferença significativa em relação à formulação comercial

É possível observar que o veículo utilizado para dispersar o PTX livre na forma de micelas, CrEL:EtOH, apresenta elevada atividade hemolítica, significativamente maior que o CLN branco. Em 0,1 mg/mL, os valores observados foram de 24,3 ± 2,3 % para CrEL:EtOH e 5,2 ± 0,4 % para CLN branco.

*

Da mesma forma, os CLN-PTX apresentaram uma taxa de hemólise significativamente menor do que aquela apresentada pelo PTX livre, podendo ser considerada, portanto, mais segura.

Devido à baixa solubilidade em água, o PTX tem uma biodisponibilidade oral dificultada. Em função disso, a infusão intravenosa (TRISSEL, 1997; SINGLA *et al.*, 2002) de uma formulação em que o PTX é solubilizado em dispersão micelar de CrEL:EtOH tem sido utilizada por esta via de administração. No entanto, a concentração de CrEL nessa preparação é extremamente elevada (50 %) e trata-se de um agente capaz de interagir com as membranas celulares, promovendo um aumento da permeabilidade e acarretando dano celular (hemólise), com conseqüente liberação de hemoglobina e outros componentes celulares que podem levar a danos renais, esplenomegalia e quadros de anemia grave (NORNOO *et al.*, 2008; UTREJA *et al.*, 2011).

Associado a isso, além do CrEL, o próprio PTX também apresenta uma considerável atividade hemolítica (JAIN *et al.*, 2012). Portanto, a incorporação do PTX em CLN foi uma alternativa interessante para contornar esse efeito hemolítico, como demonstrado na Figura 14, possivelmente devido a maior biocompatibilidade dos componentes e possibilidade de proteção do fármaco, inibindo interação do PTX com as células (Labrovolskaia *et al.*, 2008; DURÁN *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013;

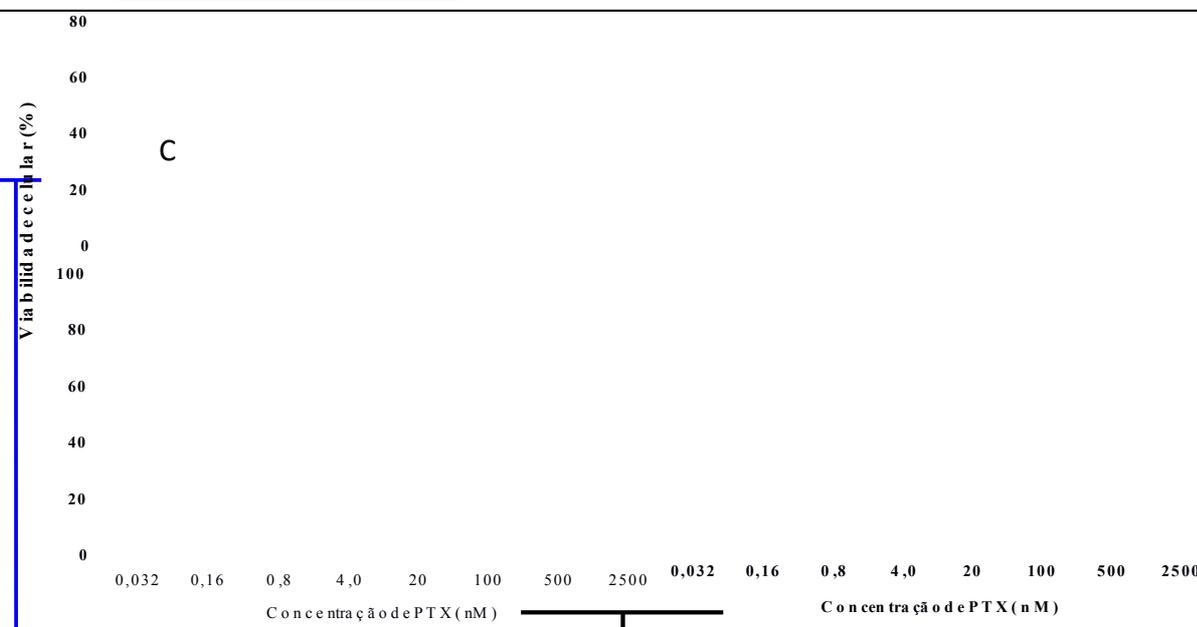
Por fim, as concentrações utilizadas foram superiores às aquelas utilizadas rotineiramente na administração por via intravenosa, o que demonstra que, mesmo induzindo pequena atividade hemolítica, o uso desse estudo é seguro e promissor para futuros estudos *in vivo*.

5.4 Estudos de atividade citotóxica *in vitro*

5.4.1 Avaliação da viabilidade celular

A fim de investigar se a citotoxicidade induzida pela sua encapsulação nos CLN, foi utilizado o ensaio de metabolização para avaliar a viabilidade celular. Desta forma, a redução na viabilidade celular das células não-tumorais (L929) e neoplásicas (MDA-MB-231) após incubação com os tratamentos. Os dados obtidos para as linhagens L929 e MDA-MB-231 são mostrados como porcentagem da viabilidade celular, são mostrados na figura

Figura 15 - Viabilidade de células da linhagem L929 (A) e MDA-MB-231 (B) após 24 e 48 horas de tratamento.



*Diferença significativa em relação ao PTX livre ($p < 0,0001$). A formulação branca foi diluída na mesma proporção que CLN-PTX.

Foi observado para a linhagem L929 (Figura 15A) que as formulações não apresentaram atividade citotóxica significativa, independente da concentração e do tempo de incubação. Fato semelhante também havia sido observado por Marcial e colaboradores (2017), que utilizaram matriz lipídica semelhante em seu estudo essa resposta foi atribuída possivelmente à reduzida captação das CLN por estas células, em comparação a linhagem tumoral.

Em relação à linhagem tumoral MDA-MB-231, verificou-se que a formulação CLN branco não induziu citotoxicidade significativa, visto que a viabilidade celular foi próxima de 100%, independente da concentração e em ambos os tempos avaliados (figura 15B). Para os tratamentos contendo PTX, foi observada redução dose-dependente da viabilidade celular e não houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos tempos de incubação. A viabilidade celular para CLN-PTX foi significativamente reduzida quando comparado ao PTX livre ($p < 0,0001$) nas concentrações superiores a 4 nM, sugerindo maior captação dos carreadores em relação à dispersão micelar em CrEL:EtOH.

**

Os valores de IC₅₀ também foram determinados e são apresentados na tabela 5. Os valores de IC₅₀ foram maiores que 2500 nM para ambos os tratamentos nas linhagens L929.

Em relação à MDA-MB-231, a IC₅₀ calculada para o tratamento com CLN-PTX foi igual a $129 \pm 0,08$ nM e $149 \pm 0,01$ nM, para 24h e 48h, respectivamente, enquanto que para o fármaco livre a IC₅₀ foi >2500 nM em ambos os tempos avaliados.

Tabela 6 - Valores de IC₅₀ calculados para as linhagens de células tumorais e normais.

		CLN-PTX	PTX livre
Células	Tempo (horas)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
L929	24	>2500	>2500
	48	>2500	>2500
MDA-MB-231	24	$129 \pm 0,08$	>2500
	48	$150 \pm 0,01$	>2500

Dados expressos em média \pm DP (n=3).

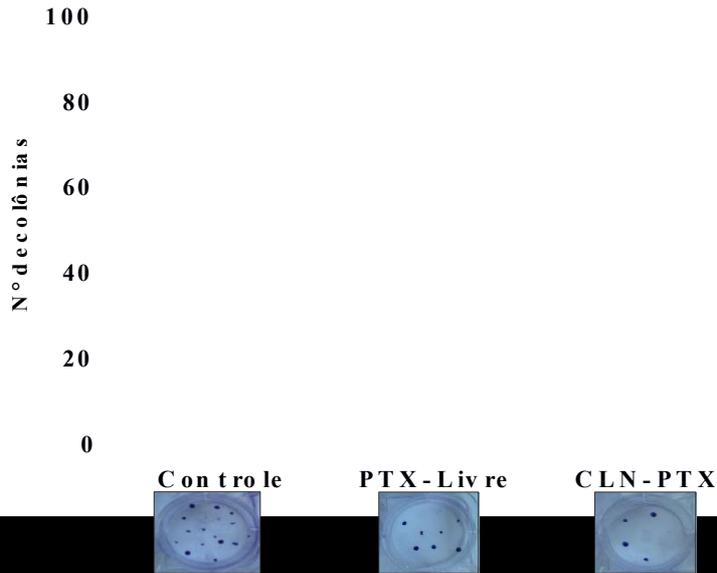
Em trabalhos anteriores, Barbosa e colaboradores (2015) avaliaram lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada carreando PTX, revestidos ou não com folato, enquanto marcial e colaboradores (2017) avaliaram CLN-PTX, utilizando o ensaio de metabolização do metiltiazoltetrazólio (MTT) para a avaliação da viabilidade celular em células MDA-MB-231. Em ambos os estudos, foram encontrados valores de IC₅₀ >500 nM para o PTX livre, assim como a maior redução da viabilidade após tratamento com o PTX nanoestruturado em comparação com o PTX livre, sugerindo maior efetividade aos nanossistemas na redução da viabilidade celular. Essas observações reforçam a maior atividade citotóxica do CLN-PTX, sugerindo que essa formulação pode ser uma estratégia promissora para transportar o PTX até as células tumorais em concentrações mais baixas e assim permitir sua administração intravenosa na terapia tumoral com menores danos as células normais.

5.4.2 Ensaio de clonogenicidade

Complementando o estudo de viabilidade celular, realizou-se o ensaio clonogênico após o tratamento com as formulações contendo o PTX para verificar a capacidade das células tumorais de formar novos clones (HOUSMAN *et al.*, 2014). Para esse estudo utilizou a concentração igual a 100 nM, em que houve diferença significativa ($p < 0,0001$) entre o

efeito de CLN-PTX em relação ao PTX livre. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Efeito do tratamento com CLN-PTX e PTX livre 100 nM na formação de colônias de células MDA-MB-231.



Dados expres

O m
significativ
CLN-PTX
tratamento

A F
solução m
Resultado
colaborado

(melanoma
respectivar
PTX livre.

O e
manter in
tratamento

o tra... e de
sobre... *et al.*,
2017

5.1 N

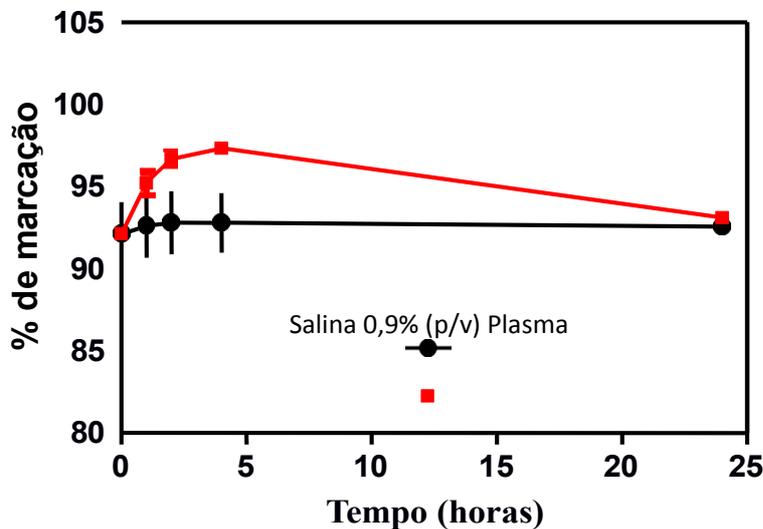
5.1.1

utiliz... foi
marc... as. A
^{99m}Tc... para
por... como
impu... ou-se
satisf... gens
cintil...
teor... e no
sang... nal a
dose... ação
(SAF

5.1.2

da lig... ebra
prote... com
PTX... CLN-
NaCl... o de
acem... entou
todos... e em

Figura 17 -
0,9% (p/v) e em plasma de camundongo.



Dados expressos em média \pm DP (n=4).

5.2 Biodistribuição dos CLN-PTX em camundongos Swiss

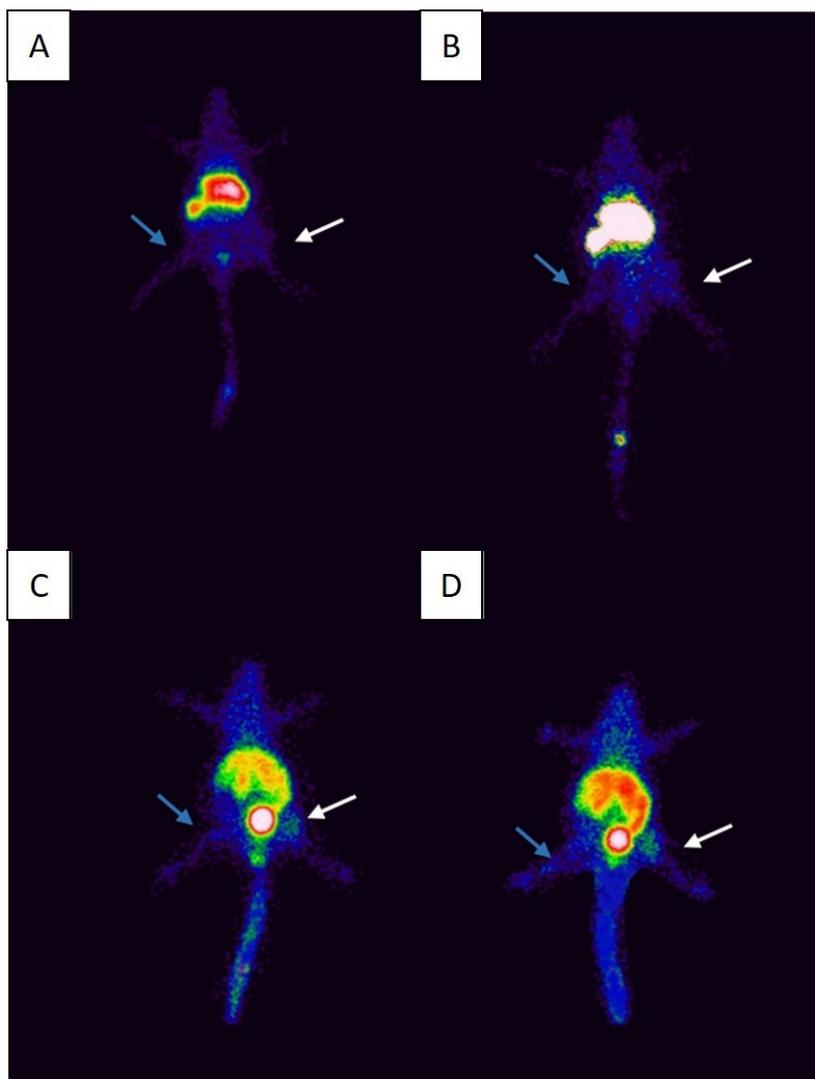
A distribuição do PTX incorporado em dispersão micelar e em CLN, avaliado por imagens cintilográficas obtidas após 30 minutos e 2h, encontra-se disposto na Figura 18. A dispersão micelar apresentou uma alta captação pelo fígado e baço e baixa mudança de biodistribuição ao longo do tempo analisado.

Como esperado para sistemas nanoestruturados, foi possível observar uma alta captação do CLN-PTX e da dispersão micelar em órgãos do sistema fagocitário mononuclear (SFM), como fígado e baço, após 30 minutos (Figura 18A e C) e 2h da administração (Figura 18B e D). Esse fato pode ser explicado pela extensa fagocitose das nanopartículas pelas células do SFM após administração intravenosa. Achados semelhantes foram observados em outros estudos, utilizando micelas e lipossomas como carreadores do PTX (MONTEIRO *et al.*, 2017, 2018).

Por outro lado, ausência de captação significativa na região da tireoide corrobora os dados obtidos no estudo de estabilidade em plasma, uma vez que o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ presente na circulação é captado preferencialmente por tireoide e estômago. As imagens cintilográficas também revelaram maior captação dos ^{99m}Tc -CLN-PTX na coxa posterior direita, região do

tumor, em comparação a coxa posterior esquerda em ambos os tempos. Além disso, essa captação pelo tumor foi mais acentuada em 2h se comparado ao tempo de 30 min (Figura 18).

Figura 18 – Imagens cintilográficas de camundongo Swiss com tumor implantado após administração da dispersão micelar com PTX, 30 minutos (A) e 120 minutos (B) e dos CLN PTX 30 minutos (C) e 120 minutos (D).



Setas em branco indicam a região tumoral (região alvo) e, em azul, o músculo contralateral

Uma análise semi-quantitativa das imagens possibilitou a obtenção da relação tumor/músculo contralateral, ou seja, a relação alvo/não-alvo. Essa avaliação foi feita a partir da contagem de pixels na imagem. Os valores obtidos demonstraram que após duas horas da administração do $^{99m}\text{Tc-CLN-PTX}$, houve um aumento significativo da relação alvo/não alvo na região do tumor quando comparado ao tratamento com a $^{99m}\text{TcPTX}$. Observou-se que após tanto após 30 minutos quanto após 2h da administração do $^{99m}\text{Tc-CLN-PTX}$, houve um

aumento significativo do direcionamento para a região do tumor quando comparado ao tratamento com o ^{99m}Tc -PTX em dispersão micelar, de 1,5 e 1,7 vezes, para 30 minutos e 2h, respectivamente (Tabela 6). Assim, o CLN apresentou melhor desempenho que a dispersão micelar em direcionar o PTX para o tumor em curto período de tempo, o que é interessante para abordagens tanto no diagnóstico quanto na terapia antitumoral.

Tabela 7 - Relação alvo/não alvo entre tumor e músculo contralateral de camundongo Swiss acometidos por tumor sólido de Ehrlich a partir da região de interesse.

ROI	30 minutos	120 minutos
Taxol	1,9 ± 0,4	2,0 ± 0,6
CLN	2,9 ± 0,8	3,4 ± 0,6*

*Representa diferença significativa quando comparado com a relação alvo/não alvo no mesmo tempo.

Essa captação aumentada pelo tecido tumoral pode ser explicada pela a característica peculiar da maioria dos tumores sólidos, que, devido à grande necessidade de suprimento de oxigênio e de nutrientes para o seu crescimento, apresenta regiões com alta taxa de angiogênese. Esses vasos porém apresentam poros maiores do que a vasculatura regular; conseqüentemente, partículas em tamanho nanométrico podem passar através das fenestrações desses vasos para tumor (BOCCI *et al.*, 2013; AI *et al.*, 2016). Os CLN utilizados no presente estudo apresentaram diâmetro médio de aproximadamente 200 nm, portanto, pode-se sugerir que esses são capazes de extravasar para o tecido adjacente e acumular nessa região tumoral. Aliado a isso tem-se o fato de que essa neovascularização não é uniforme, assim como a distribuição dos vasos linfáticos, provocando uma drenagem linfática na massa tumoral heterogênea e ineficiente (BERTRAND *et al.*, 2013; FANG *et al.*, 2011; SVENSON, 2012). Portanto, essas características inerentes aos tumores sólidos favorecem passivamente o acúmulo das nanopartículas nessa região.

6 CONCLUSÃO

Os CLN foram obtidos por um método simples e rápido. Foi observado a formação de uma matriz lipídica mais imperfeita, bem como, a formação de partículas esféricas com tamanho médio de 200 nm. Os dados do presente estudo demonstraram que a formulação de CLN contendo PTX desenvolvida apresentou características físico-químicas favoráveis a administração intravenosa e possibilitou carrear uma concentração mais elevada de PTX alcançando assim o objetivo previamente estabelecido. Outrossim, apresentou estabilidade durante o armazenamento e em meio biológico. Por liberar pouco PTX durante o tempo analisado, associou-se também a esse fato uma liberação controlada da matriz.

A formulação apresentou baixa atividade hemolítica, sugerindo um maior bem estar ao paciente. E nos estudo *in vitro* verificou-se elevada atividade antitumoral em linhagem celular de câncer de mama, bem como, baixa clonogenicidade inferindo que a formulação pode inibir a capacidade de sobrevivência das células em geral, incluindo a geração de novas células filhas.

A radiomarcção dos CLN se mostrou eficiente e estável por 24 horas, em solução salina 0,9% (p/v) e plasma murino. Os estudos *in vivo* realizados em camundongos acometidos com tumor de Ehrlich demonstraram elevada captação dos CLN-PTX na região tumoral comparada à formulação convencional, o que poderá resultar em maior resposta terapêutica *in vivo*. Portanto, essa nova formulação apresenta um elevado potencial para permitir a administração intravenosa do PTX no tratamento do câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURAHMA, M. H.; BADR-ELDIN, S. M. Compritol 888 ATO: a multifunctional lipid excipient in drug delivery systems and nanopharmaceuticals. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 12, p. 1865–1883, 2014.

AGIMELEN, O. S.; MULHOLLAND, A. J.; SEFCIK, J. Modelling of artefacts in estimations of particle size of needle-like particles from laser diffraction measurements. **Chemical Engineering Science**, v. 158, n. July 2016, p. 445–452, 2017.

AI, B.; BIE, Z.; ZHANG, S.; LI, A. Paclitaxel targets VEGF-mediated angiogenesis in ovarian cancer treatment. **American Journal of Cancer Research**, v. 6, n. 8, p. 1624–1635, 2016.

ALMEIDA, V. L. DE; LEITÃO, A.; REINA, L. DEL C. B.; et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, A. M.; BUDZIK, M. P. Immunohistochemical characteristics of basal-like breast cancer. **Wspolczesna Onkologia**, v. 20, n. 6, p. 436–443, 2016.

BAEK, J.-S.; CHO, C.-W. Controlled release and reversal of multidrug resistance by co-encapsulation of paclitaxel and verapamil in solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 617–624, 2015a.

BAEK, J.-S.; CHO, C.-W. Comparison of solid lipid nanoparticles for encapsulating paclitaxel or docetaxel. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 45, n. 7, p. 625–631, 2015b.

BAEK, J.-S.; SHIN, S.-C.; CHO, C.-W. Effect of lipid on physicochemical properties of solid lipid nanoparticle of paclitaxel. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 42, n. 5, p. 279–283, 2012.

BÁNKFALVI, À.; SIMON, R.; BRANDT, B.; et al. Comparative methodological analysis of erbB-2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. **Histopathology**, v. 37, n. 5, p. 411–419, 2000.

BARBOSA, M. V.; MONTEIRO, L. O. F.; CARNEIRO, G.; et al. Experimental design of a liposomal lipid system: A potential strategy for paclitaxel-based breast cancer treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 553–561, 2015.

BARROS, A. C. S. D. DE; LEITE, K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 25, n. 4, p. 146–155, 2015.

BERTRAND, N.; WU, J.; XU, X.; KAMALY, N.; FAROKHZAD, O. C. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 66, p. 2–25, 2014.

BINDER, S. Evolution of taxanes in the treatment of metastatic breast cancer. **Clin J Oncol Nurs**, v. 17 Suppl, n. 1, p. 9–14, 2013.

BLANCO, E.; FERRARI, M. Emerging nanotherapeutic strategies in breast cancer. **Breast**, v. 23, n. 1, p. 10–18, 2013.

BOCCI, G.; PAOLO, A. DI; DANESI, R. The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. **Angiogenesis**, v. 16, n. 3, p. 481–492, 2013.

BUNJES, H.; KOCH, M. H. J.; WESTESEN, K. Effects of surfactants on the crystallization and polymorphism of lipid nanoparticles. **Molecular Organisation on Interfaces**, v. 121, p. 7–10, 2002.

BUNJES, H.; WESTESEN, K.; KOCH, M. H. J. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, n. 1–2, p. 159–173, 1996.

CASTRO, G. A.; ORÉFICE, R. L.; VILELA, J. M. C.; et al. Characterization of a new solid lipid nanoparticle formulation containing retinoic acid for topical treatment of acne. **Powder Diffraction**, v. 23, n. S1, p. S30–S35, 2008.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559–1564, 2011.

CHEN, C. C.; TSAI, T. H.; HUANG, Z. R.; FANG, J. Y. Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and pharmacokinetics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 3, p. 474–482, 2010.

CHIRIO, D.; GALLARATE, M.; PEIRA, E.; et al. Positive-charged solid lipid nanoparticles as paclitaxel drug delivery system in glioblastoma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2014.

CZEKANSKA, E. M. Assessment of Cell Proliferation with Resazurin-Based Fluorescent Dye. **Methods in Molecular Biology**. v. 740, p.27–32, 2011.

DAI, Y.; XU, C.; SUN, X.; CHEN, X. Nanoparticle design strategies for enhanced anticancer therapy by exploiting the tumour microenvironment. **Chem. Soc. Rev.**, v. 46, n. 12, p. 3830–3852, 2017. Royal Society of Chemistry.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 62–76, 2011.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 139–151, 2012.

DEBERARDINIS, R. J.; LUM, J. J.; HATZIVASSILIOU, G.; THOMPSON, C. B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 11–20, 2008.

DEWANJEE, M. K. The chemistry of ^{99m}Tc-labeled radiopharmaceuticals. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 20, n. 1, p. 5–27, 1990.

DOBROVOLSKAIA et al. Method for Analysis of Nanoparticle Heolytic Properties In Vitro. **Nano letters**, v. 8, n. 8, p. 2180–2187, 2008.

DURÁN, N.; GUTERRES, S. S.; ALVES, O. L.; ZUCOLOTTI, V. **Nanotoxicology: Materials, Methodologies, and Assessments**. 2013.

EMAMI, J.; REZAZADEH, M.; HASANZADEH, F.; et al. Development and in vitro/in vivo evaluation of a novel targeted polymeric micelle for delivery of paclitaxel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 29–40, 2015.

ESTANQUEIRO, M.; AMARAL, M. H.; CONCEIÇÃO, J.; SOUSA LOBO, J. M. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, n. 2015, p. 631–648, 2015.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 136–151, 2011.

FINI, A.; CAVALLARI, C.; OSPITALI, F.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. L. Theophylline-Loaded Compritol Microspheres Prepared by Ultrasound-Assisted Atomization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 2, p. 743–757, 2011.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: from bench to bedside. In: **Tumor Angiogenesis**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 3-28.

FRANKEN, N. A P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; BREE, C. VAN. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–9, 2006.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLNTM) and crystallinity of the lipid phase. **European Journal of**

Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 47, n. 2, p. 125–132, 1999.

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

GASCO, M. R. **Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution**. U.S. Patent n. 5,250,236, 5 out. 1993.

GELDERBLOM, H.; VERWEIJ, J.; NOOTER, K.; SPARREBOOM, A. Cremophor EL: The drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. **European Journal of Cancer**, v. 37, n. 13, p. 1590–1598, 2001.

GHARPURE, K. M.; WU, S. Y.; LI, C.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; SOOD, A. K. Nanotechnology: Future of Oncotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 14, p. 3121–3130, 2015.

GUPTA, R.; SHEA, J.; SCAFE, C.; SHURLYGINA, A.; RAPOPORT, N. Polymeric micelles and nanoemulsions as drug carriers: Therapeutic efficacy, toxicity, and drug resistance. **Journal of Controlled Release**, v. 212, p. 70–77, 2015.

HAHN, T.; POLANCZYK, M. J.; BORODOVSKY, A.; et al. Use of anti-cancer drugs, mitocans, to enhance the immune responses against tumors. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 357–376, 2013.

HAIDER, J.; MAJEED, H.; WILLIAMS, P. A.; SAFDAR, W.; ZHONG, F. Formation of chitosan nanoparticles to encapsulate krill oil (*Euphausia superba*) for application as a dietary supplement. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 27–34, 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HAUPT, B.; RO, J. Y.; SCHWARTZ, M. R. Basal-like breast carcinoma: a phenotypically distinct entity. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 134, n. 1, p. 130–133, 2010.

HERSCHKOWITZ, J. I.; SIMIN, K.; WEIGMAN, V. J.; et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J. E.; BENOIT, J. P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4283–4300, 2003.

HILL, S. S.; SHAW, B. R.; WU, A. H. B. The clinical effects of plasticizers, antioxidants, and other contaminants in medical polyvinylchloride tubing during respiratory and non-respiratory exposure. **Clinica Chimica Acta**, v. 304, n. 1–2, p. 1–8, 2001.

HOLOHAN, C.; SCHAEYBROECK, S. VAN; LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–726, 2013.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265–273, 2013.

HOSNY, K. M. K. M. . B; BANJAR, Z. M. .; HARIRI, A. H. .; HASSAN, A. H. . Solid lipid nanoparticles loaded with iron to overcome barriers for treatment of iron deficiency anemia. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, n. 9, p. 313–320, 2015.

HOUSMAN, G.; BYLER, S.; HEERBOTH, S.; et al. Drug resistance in cancer: An overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769–1792, 2014.

HUNT, T.; NASMYTH, K.; NOVAK, B. The cell cycle. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 366, n. 1584, p. 3494–3497, 2011.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <<https://www.iarc.fr/>>. .

INCA. Instituto Nacional do Cancer - Estimativa 2016. **Ministério Da Saúde**, p. 51, 2016.

INCA. Atlas da Mortalidade. Disponível em: <<http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>>.

rama_Control_Cancer_Mama/Conceito_Magnitude>. Acesso em: 10/12/2017a.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama>. Acesso em: 31/7/2017b.

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

JAIN, V.; SWARNAKAR, N. K.; MISHRA, P. R.; et al. Paclitaxel loaded PEGylated glyceryl monooleate based nanoparticulate carriers in chemotherapy. **Biomaterials**, v. 33, n. 29, p. 7206–7220, 2012.

KASONGO, W. A.; PARDEIKE, J.; MÜLLER, R. H.; WALKER, R. B. Selection and Characterization of Suitable Lipid Excipients for use in the Manufacture of Didanosine-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 12, p. 5185–5196, 2011.

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

KESHET, Y.; SCHIFF, E.; SAMUELS, N.; BEN-ARYE, E. Giving voice to cancer patients: Assessing non-specific effects of an integrative oncology therapeutic program via short patient narratives. **Psycho-Oncology**, v. 24, n. 2, p. 169–174, 2015.

LEE, K. S.; CHUNG, H. C.; IM, S. A.; et al. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 108, n. 2, p. 241–250, 2008.

LIU, D.; LIU, Z.; WANG, L.; ZHANG, C.; ZHANG, N. Nanostructured lipid carriers as novel carrier for parenteral delivery of docetaxel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2011.

LU, J.; CHUAN, X.; ZHANG, H. Free paclitaxel loaded PEGylated-paclitaxel nanoparticles: Preparation and comparison with other paclitaxel systems in vitro and in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1–2, p. 525–535, 2014.

MAEDA, H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 91, p. 3–6, 2015.

MARCIAL, S. P. DE S.; 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, p. 340, 2017.

MARTINS, K. F.; MESSIAS, A. D.; LEITE, F. L.; DUEK, E. A. R. Preparation and characterization of paclitaxel-loaded PLDLA microspheres. **Materials Research**, v. 17, n. 3, p. 650–656, 2014.

MARTINS, L. C.; REZENDE, R. M. D.; CORDEIRO, J. A. B. L.; et al. Padrão de metástase no câncer de mama triplo negativo. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 27, n. 1, p. 8–14, 2017.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 2–3, p. 165–96, 2001.

MIELKE, S.; SPARREBOOM, A.; MROSS, K. Peripheral neuropathy: A persisting challenge in paclitaxel-based regimens. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 1, p. 24–30, 2006.

MINKO, T.; PATIL, M. L.; ZHANG, M.; et al. **Cancer Nanotechnology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2010.

MOHANRAJ, V.; CHEN, Y.; CHEN, M. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research Trop J Pharm Res**, v. 5, n. June, p. 561–573, 2006.

MOITRA, K. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Stem Cells. **BioMed Research**

International, v. 2015, p. 1–8, 2015.

MONTEIRO, L. O. F.; FERNANDES, R. S.; CASTRO, L. C.; et al. Technetium-99 m radiolabeled paclitaxel as an imaging probe for breast cancer in vivo. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 89, p. 146–151, 2017.

MONTEIRO, L. O. F.; FERNANDES, R. S.; ODA, C. M. R.; et al. Paclitaxel-loaded folate-coated long circulating and pH-sensitive liposomes as a potential drug delivery system: A biodistribution study. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. September 2017, p. 489–495, 2018. Elsevier.

MOOBERRY, S. Microtubules as a target for anticancer drugs. **New Frontiers and Treatment Paradigms for Metastatic Breast Cancer**, v. 28, n. 7, p. 980–992, 2011.

MOREL, S.; UGAZIO, E.; CAVALLI, R.; GASCO, M. R. Thymopentin in solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 132, n. 1–2, p. 259–261, 1996.

MUCHOW, M.; MAINCENT, P.; MÜLLER, R. H. Lipid Nanoparticles with a Solid Matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for Oral Drug Delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 12, p. 1394–1405, 2008.

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 343–356, 2004.

MÜLLER, R. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161–177, 2000.

MÜLLER, R. H.; ALEXIEV, U.; SINAMBELA, P.; KECK, C. M. Nanostructured Lipid Carriers (NLC): The Second Generation of Solid Lipid Nanoparticles. In: N. Dragicevic; H. I. Maibach (Eds.); **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement**. p.161–185, 2016. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, 2002.

MUSTACCHI, G.; LAURENTIIS, M. DE. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: Literature review. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 4303–4318, 2015.

NAKAMURA, H.; JUN, F.; MAEDA, H. Development of next-generation macromolecular drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 1, p. 53–64, 2015.

NAKAMURA, Y.; MOCHIDA, A.; CHOYKE, P. L.; KOBAYASHI, H. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? **Bioconjugate Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 2225–2238, 2016.

NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 3, p. 305–313, 2015.

NIE, S.; XING, Y.; KIM, G. J.; SIMONS, J. W. Nanotechnology Applications in Cancer. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 9, p. 257–88, 2007.

NORNOO, A. O.; OSBORNE, D. W.; CHOW, D. S. L. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel. I: Formulation, cytotoxicity and hemolysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1–2, p. 108–116, 2008.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

ODA, C. M. R.; FERNANDES, R. S.; ARAÚJO LOPES, S. C. DE; et al. Synthesis, characterization and radiolabeling of polymeric nano-micelles as a platform for tumor delivering. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 268–275, 2017.

OMWOYO, W. N.; OGUTU, B.; OLOO, F.; et al. Preparation, characterization, and optimization of primaquine-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 3865–3874, 2014.

OSTERGAARD, L.; TIETZE, A.; NIELSEN, T.; et al. The Relationship between Tumor Blood Flow, Angiogenesis, Tumor Hypoxia, and Aerobic Glycolysis. **Cancer Research**, v. 73, n. 18, p. 5618–5624, 2013.

PALIWAL, R.; RAI, S.; VAIDYA, B.; et al. Effect of lipid core material on characteristics of solid lipid nanoparticles designed for oral lymphatic delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 184–191, 2009.

PANDITA, D., AHUJA, A., VELPANDIAN, T., LATHER, V., DUTTA, T., & KHAR, R. K. Characterization and in vitro assessment of paclitaxel loaded lipid nanoparticles formulated using modified solvent injection technique. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 5, p. 301-310, 2009.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, 2009.

PATWEKAR, SHAILESH L; PEDEWAD, SNEHAL R; POTULWAR, ASHWINI P; GAIKWAD, MANOJ S; SURYAWANSHI, ARVIND B; KHAN, S. A. Nanostructured Lipid Carriers in Stability Improvement for Cosmetic Nanoparticles. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 1, p. 168–180, 2016.

PATWEKAR, S.; GATTANI, S.; GIRI, R.; BADE, A.; SANGEWAR, B. Review on nanoparticles used in cosmetic and dermal products. , v. 3, n. 8, p. 1407–1421, 2014.

PEROU, C. M.; SÛRLIE, T.; EISEN, M. B.; et al. Molecular portraits of human breast tumors. **Nature**, v. 533, n. May, p. 747–752, 2000.

PICARD, M.; CASTELLS, M. C. Re-visiting Hypersensitivity Reactions to Taxanes: A

Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 49, n. 2, p. 177–191, 2014.

PRAT, A.; PARKER, J. S.; KARGINOVA, O.; et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast cancer research: BCR**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Mammary development meets cancer genomics. **Nature medicine**, v. 15, n. 8, p. 842–844, 2009.

RAHMAN, Z.; ZIDAN, A. S.; KHAN, M. A. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 127–137, 2010.

RENUGA DEVI, T. S.; GAYATHRI, S. FTIR And FT-Raman spectral analysis of Paclitaxel drugs. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, 2010.

RIBATTI, D. **The Role of Microenvironment in the Control of Tumor Angiogenesis**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

RIBEIRO, A. P. B.; MASUCHI, M. H.; MIYASAKI, E. K.; et al. Crystallization modifiers in lipid systems. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 3925–3946, 2015.

SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. New York, NY: Springer New York, 2010.

SAHU, P. K., MISHRA, D. K., JAIN, N., RAJORIYA, V., & JAIN, A. K. Mannosylated solid lipid nanoparticles for lung-targeted delivery of Paclitaxel. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 41, n. 4, p. 640-649, 2015.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. **Journal of Controlled Release**, v. 30, n. 1, p. 83–96, 1994.

SERPE, L., CATALANO, M. G., CAVALLI, R., UGAZIO, E., BOSCO, O., CANAPARO, R., ZARA, G. P. Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 3, p. 673-680, 2004.

SEVERINO, P.; ANDREANI, T.; MACEDO, A. S.; et al. Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. **Journal of drug delivery**, v. 2012, p. 750891, 2012.

SHAH, R.; ELDRIDGE, D.; PALOMBO, E.; HARDING, I. Composition and Structure. **Lipid Nanoparticles: Production, Characterization**, SpringerBriefs in Pharmaceutical Science & Drug Development. p.11–22, 2015a. Cham: Springer International Publishing.

SHAH, R.; ELDRIDGE, D.; PALOMBO, E.; HARDING, I. Production Techniques. **Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability**, SpringerBriefs in Pharmaceutical Science & Drug Development. p.23–43, 2015b.

SHENOY, V.; GUDE, R.; NIKAM, Y.; MURTHY; RSR. In Vitro Cytotoxic Potential of Paclitaxel-Encapsulated Lipid-Based Drug Delivery Systems. **Austin Journal of Lung Cancer Research Open**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2017.

SHERR, C. J.; BARTEK, J. Cell Cycle–Targeted Cancer Therapies. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 1, n. 1, p. 41–57, 2017.

SINGLA, A. K.; GARG, A.; AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, n. 1–2, p. 179–192, 2002.

SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America, v. 100, n. 14, p. 8418–23, 2003.

SOUTO, E. B.; MEHNERT, W.; MÜLLER, R. H. Polymorphic behaviour of Compritol888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC. **Journal of microencapsulation**, v. 23, n. 4, p. 417–33, 2006.

SOUZA, M. V. N. DE. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308–312, 2004.

STANTON, R. A.; GERNERT, K. M.; NETTLES, J. H.; ANEJA, R. Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective. **Medicinal Research Reviews**, v. 31, n. 3, p. 443–481, 2011.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. World cancer report 2014. **International Agency for Research on Cancer (Iarc)**, p. 1–2, 2014.

SURAPANENI, M. S.; DAS, S. K.; DAS, N. G. Designing Paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges. **ISRN pharmacology**, v. 2012, p. 623139, 2012.

SWIDAN, S. A.; GHONAIM, H. M.; SAMY, A. M.; GHORAB, M. M. Comparative study of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for in vitro Paclitaxel delivery. , v. 8, n. 5, p. 482–493, 2016a.

SWIDAN, S. A.; GHONAIM, H. M.; SAMY, A. M.; GHORAB, M. M. Efficacy and in vitro cytotoxicity of nanostructured lipid carriers for paclitaxel delivery. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 9, p. 018–026, 2016b.

TAYLOR, M.; COLEMAN, R. L.; SOOD, A. K. The Role of Angiogenesis in Cancer. **Targeted Therapy in Translational Cancer Research**. p.64–71, 2015.

TIJE, A. J. TEN; VERWEIJ, J.; LOOS, W. J.; SPARREBOOM, A. Pharmacological Effects of Formulation Vehicles. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 7, p. 665–685, 2003.

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 131–135, 2011a. Elsevier B.V.

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 131–135, 2011b.

TRISSEL, L. A. Pharmaceutical properties of paclitaxel and their effects on preparation and administration. **Pharmacotherapy**, v. 17, n. 5 Pt 2, p. 133S–139S, 1997.

TZACHEV, C.; SVILENOV, H. Lipid Nanoparticles at the current stage and prospects—a review article. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 18, n. 1, p. 103–115, 2013.

ÜNER, M. Characterization and Imaging of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. **Handbook of Nanoparticles**. p.1–20, 2015.

UTREJA, P.; JAIN, S.; YADAV, S.; KHANDHUJA, K. L.; TIWARY, A. K. Efficacy and toxicological studies of cremophor EL free alternative paclitaxel formulation. **Curr Drug Saf**, v. 6, n. 5, p. 329–338, 2011.

VIANA, O. D. S.; JÚNIOR, J. B.; MARIA, R.; et al. Desenvolvimento de formulações e tecnologia de obtenção de comprimidos revestidos de efavirenz – terapia anti-HIV. , v. 42, 2006.

VIDEIRA, M. A.; ARRANJA, A. G.; GOUVEIA, L. F. Experimental design towards an optimal lipid nanosystem: A new opportunity for paclitaxel-based therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 302–310, 2013.

VIDEIRA, M.; ALMEIDA, A. J.; FABRA, NGELS. Preclinical evaluation of a pulmonary delivered paclitaxel-loaded lipid nanocarrier antitumor effect. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2012.

WAGHMARE, A. S.; GRAMPUROHIT, N. D.; GADHAVE, M. V; GAIKWAD, D. D.;

JADHAV, S. L. Solid Lipid Nanoparticles: a Promising Drug Delivery. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 4, p. 100–107, 2012.

WANG, S.; QIU, J.; SHI, Z.; WANG, Y.; CHEN, M. Nanoscale drug delivery for taxanes based on the mechanism of multidrug resistance of cancer. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 224–241, 2015.

WEAVER, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 18, p. 2677–2681, 2014.

WHO. World Health Organization. The international pharmacopeia: Fourth editions 2014.

WISSING, S. .; KAYSER, O.; MÜLLER, R. . Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257–1272, 2004.

WOLFF, A. C.; HAMMOND, M. E.; HICKS, D. G.; et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 31, p. 3997–4013, 2013.

WU, D.; ZHENG, Y.; HU, X.; FAN, Z.; JING, X. Anti-tumor activity of folate targeted biodegradable polymer-paclitaxel conjugate micelles on EMT-6 breast cancer model. **Materials Science and Engineering C**, v. 53, p. 68–75, 2015.

XU, H.; LU, X.; LI, J.; et al. Superior antitumor effect of extremely high drug loading self-assembled paclitaxel nanofibers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1–2, p. 217–224, 2017.

XU, X.; HO, W.; ZHANG, X.; BERTRAND, N.; FAROKHZAD, O. Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 4, p. 223–232, 2015.

XU, X.; WANG, L.; XU, H. Q.; et al. Clinical comparison between paclitaxel liposome (Lipusu®) and paclitaxel for treatment of patients with metastatic gastric cancer. **Asian**

Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 14, n. 4, p. 2591–2594, 2013.

XU, Y.; MENG, H. Paclitaxel-loaded stealth liposomes: Development, characterization, pharmacokinetics, and biodistribution. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 350–355, 2016.

YANG, X. Y., LI, Y. X., LI, M., ZHANG, L., FENG, L. X., & ZHANG, N. Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. **Cancer letters**, v. 334, n. 2, p. 338-345, 2013.

YANG, L.; ZHENG, Z. S.; CHENG, F.; et al. Seasonal Dynamics of Metabolites in Needles of *Taxus wallichiana* var. *mairei*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 10, 2016.

YERSAL, O.; BARUTCA, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 412–24, 2014.

YINGCHONCHAROEN, P.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 3, p. 701–787, 2016.

YOSHIZAWA, Y.; OGAWARA, K. I.; KIMURA, T.; HIGAKI, K. A novel approach to overcome multidrug resistance: Utilization of P-gp mediated efflux of paclitaxel to attack neighboring vascular endothelial cells in tumors. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, p. 274–280, 2014.

YUAN, H., MIAO, J., DU, Y. Z., YOU, J., HU, F. Q., & ZENG, S. Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells. **International journal of pharmaceutics**, v. 348, n. 1-2, p. 137-145, 2008.

ZEICHNER, S. B.; TERAWAKI, H.; GOGINENI, K. A Review of Systemic Treatment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. **Breast cancer research: BCR**, v. 10, p. 25–36, 2016.

ZHANG, X. G., MIAO, J., DAI, Y. Q., DU, Y. Z., YUAN, H., & HU, F. Q. 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.

ZHANG, D.; YANG, R.; WANG, S.; DONG, Z. Paclitaxel: New uses for an old drug. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 279–284, 2014.

ZHANG, Z.; MEI, L.; FENG, S.-S. Paclitaxel drug delivery systems. **Expert opinion on drug delivery**, v. 10, n. 3, p. 325–40, 2013.

ZHU, Y.; LIAO, L. Applications of Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery: A Review. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 7, p. 4753–4773, 2015.