



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA - DEFA

OCTAVIO VITAL BACCALLINI

**LIPOSSOMAS CONTENDO 5-FLUOROURACIL: ESTUDO DE
FORMULAÇÃO**

FORTALEZA

2023

OCTAVIO VITAL BACCALLINI

**LIPOSSOMAS CONTENDO 5-FLUOROURACIL: ESTUDO DE
FORMULAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso a ser
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Josimar de
Oliveira Eloy.

Coorientadora: Profa. Dra. Raquel
Petrilli.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B116l Baccallini, Octavio Vital.

Lipossomas contendo 5-fluoruracil : estudo de formulação / Octavio Vital Baccallini. – 2023.
63 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy.

Coorientação: Profa. Dra. Raquel Petrilli Eloy.

1. Nanotecnologia. 2. Lipossomos. 3. Fosfolipídeos. 4. Fluoruracila. 5. Câncer Colorretal. I. Título.
CDD 615

OCTAVIO VITAL BACCALLINI

**LIPOSSOMAS CONTENDO 5-FLUOROURACIL: ESTUDO DE
FORMULAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso a ser
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: 04/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raquel Petrilli Eloy
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof^a. Dr^a. Tamara Gonçalves de Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Bacharel em Farmácia Bruno Rodrigues Arruda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À primeira farmacêutica que me inspirou a chegar até aqui, minha mãe. Sou grato pela profissão que me deu e pela sua resiliência que teve para garantir meu sucesso até aqui, agradeço e peço desculpas por tudo que precisou abdicar por mim.

Ao meu pai (*in memoriam*), que nunca sairá da minha memória como um homem muito carinhoso, que me mostrou que eu também poderia ser assim.

Ao meu grande irmão, que sem saber me fez ter interesse pela ciência e inovação, agradeço por ter estado ao meu lado, e por cada abraço que me fez lembrar que nunca estarei sozinho.

À minha família Alves Vital, especialmente a minha avó Zenaide, que quando mais precisei esteve ao meu lado e me acolheu. Obrigado por ter me feito amadurecer, entender a vida e ter garra de lutar por ela, a senhora é meu exemplo de fé e lealdade.

Aos meus amigos que tornaram a jornada até aqui mais tranquila. À Ana Letícia, por sempre me ouvir e ser meu abrigo na faculdade. À Ellen, por ser a melhor companhia que um amigo poderia ter, ao Lucas, por ter sido tão divertido e iluminado. À Lara, Amanda e Gabrielle, e ao Hugo e Jonas por terem me acolhido tão bem entre vocês.

À Raysse e Sara, sou muito feliz por poder conviver com vocês, a amizade que construímos foi muito importante manter os dias mais leves e agradáveis, e agradeço por sempre serem tão gentis comigo.

Às minhas amigas da escola, que estiveram ao meu lado mesmo após tantos anos, à Raphaela, que não desiste de mim, e à Luana por compartilhar tanta alegria comigo.

Ao Prof. Dr. Josimar Eloy, pelo brilhante desempenho em sala de aula que me fez buscar me aprofundar na área. O trabalho realizado pelo professor me inspirou a traçar um caminho totalmente diferente para minha vida.

À Prof.^a Dr.^a Raquel Petrilli, por ter sido tão presente durante a orientação, a dedicação e gentileza da professora me inspira, espero poder ser tão resiliente quanto a senhora, por mais difícil que o experimento seja!

Aos colegas, amigos e colaboradores do grupo GPNANO-CEDEFAR, que sempre compartilharam seus conhecimentos e habilidades e tornaram possível a apresentação desse trabalho, especialmente à Raissa, por toda a paciência com seu IC rebelde.

À Prof.^a Dr.^a Tamara Gonçalves de Araújo, e ao Farm. Bruno Rodrigues pela gentileza e o tempo empenhado em participar desta banca examinadora.

À FUNCAP pelo projeto de pesquisa correspondente ao processo número MLC-0191-00296.01.00/22.

RESUMO

O Câncer de colorretal (CCR) é a terceira causa de morte relacionada ao câncer mais comum em homens e mulheres. O tratamento de CCR baseado em quimioterapia utiliza como principal fármaco o 5-Fluorouracil (5-FU), fármaco de uso consagrado no CCR e outros cânceres. Ainda que primeira opção para tratamento de câncer metastático ou para tratamento adjuvante, seu uso possui limitações relacionadas à sua rápida metabolização e efeito citotóxico, que leva à efeitos colaterais e adversos durante o tratamento como febre, mucosite, estomatite, náuseas, vômito, diarreia, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia e anemia. Nesse contexto, a nanotecnologia tem sido aplicada para melhorar as características do 5-FU e diminuir os seus efeitos adversos através da sua encapsulação em nanocarreadores, como os lipossomas, que são vesículas compostas de uma bicamada lipídica em torno de um núcleo concêntrico. Contudo, o 5-FU é uma molécula de tamanho pequeno (130,08 g/mol) e hidrofílica, sendo um desafio encapsular ela no núcleo aquoso de lipossomas. Dessa forma, o trabalho tem como objetivo estudar o efeito da composição nas características físico-químicas de lipossomas contendo 5-FU. Para isso, foram desenvolvidos lipossomas com proporção de 70:30:5 de fosfolipídio [ou fosfatidilcolina de soja (SPC), ou fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), ou diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), ou dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)]:colesterol:disteardilfosfatidiletanolamina peguilado 2000 (DSPE-PEG2000), com 25 mg ou 50 mg de fosfolipídio como base para a formulação. Os lipossomas desenvolvidos foram caracterizados por tamanho de partícula (TP), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE%). Entre as formulações estudadas, uma foi escolhida para caracterização por Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e do perfil de liberação *in vitro*. Os resultados mostraram que o lipossoma com melhores características de físico-químicas foram os baseados em DSPC. Para caracterização por FTIR e do perfil de liberação escolheu-se um lipossoma baseado em HSPC, visto que, em uma pesquisa concomitante, foi observado a melhoria de encapsulação de 5-FU na presença de uma proteína encapsulada, em cujo projeto esse trabalho se insere. Foi possível observar alterações no espectro de infravermelho (IR) de lipossomas HSPC quando na presença de 5-FU, com alterações nas bandas relacionadas à C=O e desaparecimento da banda característica de C-F que está presente no espectro do 5-FU, sugerindo encapsulação do 5-FU. O perfil de liberação de HSPC encontrado mostrou que 96% do fármaco estava livre em meia hora de experimento, podendo ser resultado de uma limitação do método. Portanto, esse trabalho conseguiu desenvolver e caracterizar lipossomas baseados em diferentes tipos de fosfolipídios e observar seu efeito sobre as características de TP, PDI, PZ e EE%, tendo encontrado os lipossomas de DSPC como mais eficientes para encapsulação de 5-FU, e DPPC como menos eficiente. O FTIR sugere encapsulação do 5-FU no lipossoma. Futuros estudos podem ser realizados para descrever melhor o efeito da composição nos lipossomas, como microscopia de força atômica, calorimetria exploratória diferencial e difração de raio-X.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Lipossoma; Fosfolipídio, 5-FU, Câncer.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer-related cause of death in men and women. The chemotherapy-based treatment of CRC utilizes 5-Fluorouracil (5-FU) as the main drug, which is a well-established medication for CRC and other cancers. Despite being the first option for metastatic cancer treatment or adjuvant therapy, its use is limited due to rapid metabolism and cytotoxic effects, leading to side effects such as fever, mucositis, stomatitis, nausea, vomiting, diarrhea, leukopenia, neutropenia, thrombocytopenia, and anemia. In this context, nanotechnology has been applied to improve the characteristics of 5-FU and reduce its adverse effects by encapsulating it in nanocarriers such as liposomes, which are vesicles composed of a lipid bilayer surrounding a concentric core. However, 5-FU is a small-sized (130.08 g/mol) and hydrophilic molecule, posing a challenge to encapsulate it within the aqueous core of liposomes. Therefore, this study aims to investigate the effect of composition on the physicochemical characteristics of liposomes containing 5-FU. For this purpose, liposomes were developed with a ratio of 70:30:5 of phospholipid [either soybean phosphatidylcholine (SPC), hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC), distearoylphosphatidylcholine (DSPC), or dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)]:cholesterol:pegylated distearoylphosphatidylethanolamine 2000 (DSPE-PEG2000), using 25 mg or 50 mg of phospholipid as the formulation base. The developed liposomes were characterized for particle size (PS), polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP), and encapsulation efficiency (EE%). Among the studied formulations, one was selected for characterization using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and in vitro release profile analysis. The results demonstrated that liposomes based on DSPC exhibited the most favorable physicochemical characteristics. For FTIR characterization and release profile analysis, an HSPC-based liposome was chosen, as a concurrent investigation showed improved encapsulation of 5-FU in the presence of an encapsulated protein. Changes in the infrared (IR) spectrum of HSPC liposomes were observed in the presence of 5-FU, with alterations in bands related to C=O and disappearance of the characteristic C-F band present in the spectrum of 5-FU, suggesting encapsulation of 5-FU. The release profile of HSPC liposomes indicated that 96% of the drug was released within half an hour of the experiment, which may be attributed to a method limitation. Thus, this study successfully developed and characterized liposomes based on different types of phospholipids and observed their effects on PS, PDI, ZP, and EE%, with DSPC liposomes identified as the most efficient for 5-FU encapsulation and DPPC as the least efficient. FTIR analysis suggests the encapsulation of 5-FU in the liposome. Future studies could be conducted to further describe the effect of composition on liposomes using techniques such as atomic force microscopy, differential scanning calorimetry, and X-ray diffraction.

Keywords: Nanotechnology; Liposome; Phospholipid; 5-FU; Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Transformação de pólipos em tumor.....	18
Figura 2: Moléculas de Uracila e 5-FU.....	21
Figura 3: Metabolismo e mecanismo de ação do 5-FU	21
Figura 4: Representação da estrutura do lipossoma	26
Figura 5: Estruturas dos lipídios (A) SPC; (B) HSPC; (C) DSPC; (D) DPPC.....	27
Figura 6: Curva de calibração de 5-FU.....	36
Figura 7: Gráfico de distribuição de tamanho dos lipossomas – SPC (A) 25 Branco; (B) SPC 25 com 5-FU; (C) SPC 50 Branco e (D) SPC com 5-FU	39
Figura 8: Gráfico de distribuição de tamanho dos lipossomas – DSPC (A) 25 Branco; (B) DSPC 25 com 5-FU; (C) DSPC 50 Branco e (D) DSPC com 5-FU.....	41
Figura 9: Gráfico de distribuição de tamanho dos lipossomas – DPPC (A) 25 Branco; (B) DPPC 25 com 5-FU; (C) DPPC 50 Branco e (D) DPPC com 5-FU.....	42
Figura 10: Gráfico de distribuição de tamanho dos lipossomas – HSPC (A) 25 Branco; (B) HSPC 25 com 5-FU; (C) HSPC 50 Branco e (D) HSPC com 5-FU	44
Figura 11: Espectros de infravermelho de (a) 5-FU; (b) Lipossoma com 5-FU; (c) Lipossoma branco.....	48
Figura 12: Perfil de liberação passivo do lipossoma HSPC-50.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo das opções terapêuticas no CCR	19
Tabela 2: Composição dos lipossomas preparados	32
Tabela 3: Dados da curva de calibração de 5-FU.....	35
Tabela 4: Resumo das caracterizações físico-químicas e EE% dos lipossomas	38
Tabela 5: EE% dos Lipossomas	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. Referencial teórico.....	17
3.1. Câncer de Colorretal	17
3.2. 5-Fluorouracil	20
3.3. Nanocarreadores	23
3.4. Lipossomas	25
4. Metodologia.....	30
4.1. Quantificação de 5-FU por espectrofotometria.....	30
4.1.1. Linearidade	30
4.1.2. Precisão intra-ensaio	30
4.2. Preparo de lipossomas por hidratação de filme lipídico	31
4.3. Caracterização físico-química dos lipossomas	32
4.3.1. Tamanho de partícula, Índice de Polidispersão e potencial Zeta	32
4.3.2. Eficiência de Encapsulação.....	32
4.3.3. Análise de espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	33
4.3.4. Perfil de liberação de 5-FU <i>in vitro</i>	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Quantificação de 5-FU por espectrofotometria.....	35
5.2. Caracterização físico-química.....	36
5.2.1. Tamanho de partícula, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta.....	36
5.2.2. Eficiência de Encapsulação.....	45
5.2.3. Infravermelho por transformada de Fourier – FTIR	47
5.2.4. Perfil de liberação de 5-FU <i>in vitro</i>	49

6. CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colorretal (CCR) é um tipo de câncer que é responsável por uma grande parcela dos diagnósticos de câncer, sendo a terceira principal causa de câncer diagnosticada nos Estados Unidos da América (EUA) (PACAL et al., 2020; HANI et al., 2021). De acordo com a *American Cancer Society* (2023) o CCR é a terceira causa mais comum de morte relacionada ao câncer em homens e mulheres. No Brasil, desconsiderando o câncer de pele não melanoma, o CCR também é o terceiro mais frequente, tendo uma estimativa de 45.630 novos casos no triênio de 2023 a 2025, o que corresponde a um risco estimado de 21,10 casos por 100 mil habitantes (INCA, 2023).

O tratamento do CCR consiste em terapia local e/ou sistêmica. A terapia local engloba cirurgia, na qual ocorre a ressecção do tecido tumoral, a radioterapia, que tem a intenção de causar danos às células tumorais com emissão de radiação ionizada direcionada, e radiologia intervencionista, técnica que utiliza de imagens para guiar intervenções, minimizando seu risco. Já a terapia sistêmica consiste no uso de imunoterapia e quimioterapia (PATSALIAS e KOZOVSKA, 2021).

Essa última, pode ser usada em três situações clínicas principais: como tratamento primário para câncer avançado, como tratamento neoadjuvante para câncer localizado no qual há outras terapias locais alternativas e como tratamento adjuvante do tratamento local. Após a ressecção cirúrgica, a abordagem quimioterápica pode levar ao aumento da sobrevida global de pacientes em 2 anos, quando comparada com apenas tratamento de suporte (CHU e SARTORELLI, 2017; LUCAS, O'NEIL, GOLDBERG, 2011).

Apesar de a quimioterapia ser essencial para o aumento da sobrevida dos pacientes com câncer, é também um procedimento debilitante. Seus efeitos tóxicos consistem em imunossupressão, náusea e vômito, alopecia, diarreia, dano renal, dano neurológico, dano cardíaco, neutropenia, neuropatia periférica e lesão gonadal e esterilidade (SWADA, 2009; LOPEZ-MENDEZ et al., 2022). Somado a isso, a progressão da doença traz mais sofrimento ao paciente, reduzindo consideravelmente sua qualidade de vida, visto que enquanto pacientes que sofrem com a doença há mais de 3 anos experienciam mais dor e fadiga, pacientes com pouco tempo de diagnóstico sentem mais constipação e perda de apetite (LEWANDOWSKA, et al. 2020).

Outra desvantagem da quimioterapia é a resistência à medicamentos e resistência múltipla à medicamentos (MDR). Esse fenômeno pode ser intrínseco, ocorrendo naturalmente nas células tumorais, ou adquirido, ocorrendo após a exposição à um ou mais fármacos. Independente da classificação, a ocorrência da resistência se dá por diversos mecanismos, como efluxo de fármacos aumentado, fatores genéticos, fatores de crescimento, capacidade de recuperação de DNA aumentada, e metabolismo de xenobióticos aumentado (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020). Enquanto um CCR primário sozinho dificilmente leva a morte, aproximadamente metade de CCR metastático desenvolvem resistência durante o tratamento com 5-Fluoruracil (5-FU) FU. Considerando que 90% da mortalidade de pacientes com câncer está associada a resistência à medicamentos, é um desafio importante a superar (CHEN et al., 2022; MADER; MÜLLER; STEGER, 1998). Ainda que sejam desafios de longa data, não foram superados, e a busca por formas de transpor essas desvantagens permanecem atuais.

A nanotecnologia, área que culmina da convergência de conhecimentos da física, ciência de materiais e biologia, trouxeram uma nova perspectiva para desenvolvimento de medicamentos quando se tornou possível manipular materiais em escala nanométrica. (BAYDA et al., 2019; CAO, HUANG, PEPPAS, 2020). Em estruturas nanométricas podem ser adicionados fármacos, dessa forma é produzido um sistema de entrega de fármaco, do inglês, *Drug Delivery System* (DDS). Os DDS permitem a redução do volume de distribuição, diminuição da toxicidade da droga, circulação prolongada da droga e acumulação aprimorada no tumor (ZALBA et al., 2015; STRAPASSON, 2019).

Também chamados de nanocarreadores, esses podem ser classificados de acordo com os materiais da composição: lipídicos, poliméricos e inorgânicos. Cada tipo de nanocarreador tem suas vantagens, mas os lipídicos se destacam por se autoformarem, possuírem biocompatibilidade, alta biodisponibilidade, enquanto têm a possibilidade de levar uma carga de fármaco dentro de si. Isso faz com que sejam o tipo de nanocarreador mais comum entre os aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (SAHU et al., 2021; LOPEZ-MENDEZ et al., 2022).

Entre os nanocarreadores lipídicos temos os lipossomas, que são vesículas que podem ser formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas que envolvem um meio aquoso. São bastante versáteis, visto que tem potencial de carrear moléculas hidrofílicas, no seu núcleo aquoso, e moléculas hidrofóbicas, na sua membrana lipídica, o que protege o fármaco da degradação e metabolismo na circulação (CAO, HUANG, PEPPAS, 2020; SARFRAZ et al., 2018). Outra vantagem dos lipossomas é a possibilidade de alteração da superfície da estrutura, que permite modificações funcionais ao DDS. Nesse sentido, é comum o emprego de

polietilenoglicol (PEG), para formação de lipossomas furtivos (do inglês *stealth*) capazes de escapar do reconhecimento do Sistema Retículo Endotelial (RES), o que aumenta o seu tempo de meia vida (GUIMARÃES, 2021).

Mais uma possibilidade de alterações de superfície é a conjugação de ligantes específicos de superfície, nessa estratégia uma variedade de moléculas pode ser adicionada à superfície do lipossoma, como anticorpos, fragmentos de anticorpos, peptídeos, carboidratos, vitaminas, ácidos nucleicos e glicoproteínas. O reconhecimento desses ligantes leva a internalização do lipossoma, levando a uma entrega específica em célula alvo, sendo uma forma de vetorizar ativamente uma formulação (LUIZ et al., 2022).

Utilizando a tecnologia dos lipossomas, o tratamento com (5-FU) pode ser aprimorado. Esse fármaco hidrofílico é um antimetabólito utilizado desde 1957 para o tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o CCR. Ainda que seja um medicamento com muitas vantagens frente à diversos tipos de câncer, ele enfrenta as mesmas dificuldades que a quimioterapia no geral enfrenta. Dessa forma, ao encapsular o 5-FU no núcleo aquoso do lipossoma, poderíamos tornar o tratamento de câncer eficiente, visto que esse tratamento se aproveitaria das vantagens do sistema lipossomal formado, como por exemplo apresentar melhor coeficiente de partição e atravessar melhor as barreiras biológicas (SETHY; KUNDU, 2021).

Além disso, se formulados em faixa de tamanho determinado, pode se aproveitar do efeito de permeabilidade e retenção aumentados, EPR, do inglês *Enhanced Permeability and Retention* (KALYANE et al., 2019). Esse efeito se dá porque em tecidos tumorais há crescimento de vasos que apresentam fenestrações (100 nm à 2 µm) maiores do que as encontradas em tecidos saudáveis, e dessa forma existe um direcionamento passivo para tumores quando os DDS têm tamanho superior ao tamanho das fenestrações de tecidos saudáveis (KALYANE et al., 2019; IYER et al., 2006). Ainda é discutido o curto tempo de meia vida do 5-FU, que leva a utilização de altas doses do medicamento. O encapsulamento do fármaco dentro de lipossomas pode aumentar o tempo de circulação do fármaco no organismo, contribuindo para uma liberação controlada sobre o tecido tumoral (KATHAROTIYA et al., 2021).

Contudo, apesar de o 5-FU ser uma molécula solúvel em água, ele é uma molécula muito pequena, e por isso mantê-lo encapsulado dentro do lipossoma para uso *in vivo* pode ser um desafio (THOMAS et al., 2011). No método de preparação de lipossomas por hidratação de filme, drogas hidrofílicas tendem a atingir uma encapsulação baixa, pois o meio aquoso fora do

lipossoma é muito maior que o meio aquoso no interior da vesícula (ELOY et al., 2014). Isso pode prejudicar o desenvolvimento clínico de um lipossoma com fármaco hidrofílico.

Dessa forma, o presente trabalho justifica-se por propor um estudo de formulações lipossomais contendo 5-FU, investigando a influência da composição em suas características físico-químicas, essenciais para o desenvolvimento de um DDS eficiente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o efeito da composição nas características de lipossomas de 5-FU baseados em diferentes fosfolipídios.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver lipossomas contendo 5-FU à base de SPC ou DSPC ou HSPC ou DPPC, Colesterol, DSPE-PEG2000;
- Caracterizar os lipossomas desenvolvidos quanto ao tamanho, índice de polidispersividade e potencial zeta;
- Avaliar a eficiência de encapsulação de 5-FU para diferentes composições lipossomais;
- Caracterizar interações químicas entre o fármaco e lipossoma escolhido, por Infravermelho;
- Obter o perfil de liberação de 5-FU, *in vitro*, de formulação escolhida;

3. Referencial teórico

3.1. Câncer de Colorretal

Câncer é um termo genérico para um diferente grupo de doenças, que tem em comum o desenvolvimento de células anormais que se dividem incontrolavelmente, o que pode acontecer em quase qualquer tecido, e invadem tecidos normais do corpo (LOPEZ-MENDEZ et al., 2022). Essa divisão anormal, que ocorre de forma acelerada, é causada por mutações no material genético da célula, de forma que os mecanismos que naturalmente cessariam uma divisão anormal não são eficientes, levando à proliferação das células. Quando não tratado no começo, pode levar a metástase, que é a propagação das células tumorais para tecidos diferentes do inicial, sendo um estágio de difícil tratamento e que comumente tem desfecho com morte (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

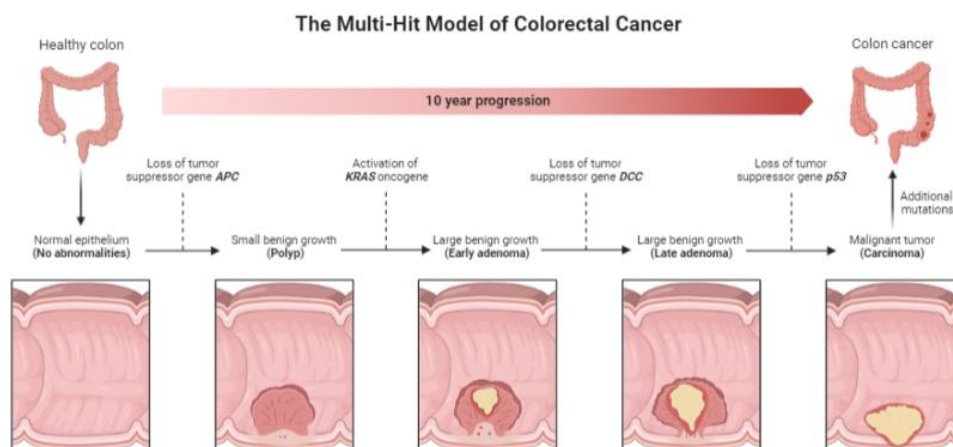
De acordo com a *WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2022)*, o câncer é uma das principais causas de morte ao redor do mundo, sendo responsável por quase 10 milhões de mortes em 2020. Ainda de acordo com a WHO (2019), o câncer de colorretal foi o terceiro maior número de casos novos de câncer em 2020, com 2,21 milhões de casos, e o segundo câncer mais responsável por mortes no mesmo ano, tendo causado 916.000 mortes (WHO, 2019). No contexto brasileiro, desconsiderando o câncer de pele não melanoma, o CCR ocupa o mesmo patamar que no cenário mundial, sendo o terceiro mais frequente. Existe uma estimativa de que ocorram 45.630 novos casos da doença no triênio de 2023 a 2025, o que corresponde a um risco estimado de 21,10 casos por 100 mil habitantes (INCA, 2023).

Apesar de ser uma doença prevalente em pacientes entre 65 e 74 anos, é mais diagnosticada em pessoas mais jovens que 50 anos, sendo esse fato justificado pela presença de diversos fatores de risco, como a obesidade, sedentarismo, padrões alimentares elevados em gorduras e proteínas, e tabagismo (HANI et al., 2021). Também existe um fator hereditário importante, visto que 20% a 30% dos casos de CCR são familiares, que podem ser divididos em síndromes sem pólipos e com pólipos. Indivíduos com síndromes hereditárias de CCR têm risco aumentado para desenvolvimento precoce do câncer, câncer metacrônico e manifestações extra cólon (WELLS; WISE, 2017; GRANADOS-ROMERO et al., 2017).

O início do CCR está associado à inativação do gene adenomatos polyposis coli, que somado ao acúmulo de diferentes mutações resultam no surgimento de pequenos pólipos. Esses pólipos por sua vez se transformam em grandes pólipos, que levam ao crescimento do câncer. Esse processo, ilustrado na **Figura 1**, pode levar entre 10 e 40 anos. Isso pode representar uma

janela importante para diagnóstico precoce da doença (SHARMA; THULASINGAM; NAGARAJAN, 2017).

Figura 1: Transformação de pólipos em tumor



Fonte: Reproduzido de *The Multi-Hit Model of Colorectal Cancer*, by BioRender.com (2023)

Os sintomas são variados e dependem do estágio da doença, bem como da localização das lesões. Em estágios iniciais da doença se observa uma série de sintomas inespecíficos, como dor abdominal, fezes sanguinolentas, alteração de hábitos intestinais, anemia, perda de peso, este último aparecendo mais em estágios mais intermediários e avançados (HANI et al., 2021; KUIPERS et al., 2015). Além dessas complicações, os estágios avançados da doença podem ocasionar obstrução ou perfuração intestinal, com consequente distensão abdominal. Nesses casos o manejo chega a ser paliativo (CHIOREAN et al., 2020; SANTOS, 2022).

O diagnóstico se utiliza da avaliação do paciente, considerando história familiar, sintomas e de resultados de exames de triagem. Por ser uma doença de desenvolvimento lento, a colonoscopia tem uma grande janela temporal para identificar o câncer em estágio pré-clínico (KUIPERS et al., 2015). Além disso, diferentemente de outros tipos de câncer, os precursores do CCR, os adenomas e lesões iniciais de câncer, são identificáveis e podem ser removidos antes de se tornarem lesões avançadas. Esse método de diagnóstico padrão-ouro permite a biópsia e avaliação histopatológica do material (SAWICKI et al., 2021).

O tratamento é guiado pela confirmação do CCR por histopatológico, estudo da localização do câncer e avaliação da presença de câncer em outros sítios. Além desses fatores, ainda podem ser avaliados biomarcadores genéticos específicos para utilização de medicina individualizada (SAWICKI et al., 2021). A abordagem do manejo terapêutico pode variar com base na localização, visto que um câncer cólico precisa de uma abordagem e um câncer retal

precisa de outra. O próprio estadiamento da doença pode mudar o tratamento. Em geral, a terapia pode ser local, englobando cirurgia, radioterapia e radiologia intervencionista; e sistêmica, com imunoterapia e quimioterapia. (KUIPERS et al., 2015; PATSALIAS e KOZOVSKA, 2021).

Um resumo das opções terapêuticas foi descrito por Santos (2015):

Tabela 1: Resumo das opções terapêuticas no CCR

Carcinoma <i>in situ</i>	Estadio localizado	Estadio regional	Estadio distante
Por não haver crescimento além da região de origem, aconselha-se a cirurgia para remoção das células de crescimento anormal, a polipectomia, isto é, remoção de pólipos ou excisão local por colonoscopia. Se dimensões forem elevadas ou permanecerem células após polipectomia, sugere-se ressecção do segmento afetado.	Por se verificar invasão celular com penetração da parede do intestino, a ressecção cirúrgica para remoção do tumor é o indicado.	Caso se verifique crescimento tumoral através da parede do intestino, deve proceder-se à ressecção do segmento em causa. Se se verificar disseminação, deve associar-se radioterapia e/ou quimioterapia. Se existir disseminação através dos nódulos linfáticos, deve associar-se quimioterapia.	Caso se verifique disseminação para órgãos ou tecidos distantes, o objetivo é prevenir a obstrução do intestino e outras complicações. Sempre que possível, devem remover-se cirurgicamente as metástases.

Fonte: Santos, 2015

A cirurgia é o principal tratamento curativo para CCR em estágio não metastático, mas seu desfecho está relacionado principalmente com a qualidade da cirurgia. Isso significa que para que seja efetiva a ressecção deve garantir que o tumor tenha sido removido, bem como sua principal zona de disseminação linfática, sendo necessário um cuidado maior com as bordas de ressecções circulares, pois podem permanecer células tumorais nessa região (QUIRKE; WEST; NAGTEGAAL, 2014; VELDE et al., 2014). O procedimento cirúrgico pode ainda ser precedido ou seguido de radioterapia. Antes da cirurgia, se as lesões são atingidas com radiação, podem diminuir de tamanho e, conseqüentemente, auxiliar na execução da ressecção. Após a cirurgia, a radioterapia também pode ser usada para reduzir o risco de recorrência local, principalmente associada à quimioterapia (HÄFNER; DEBUS, 2016).

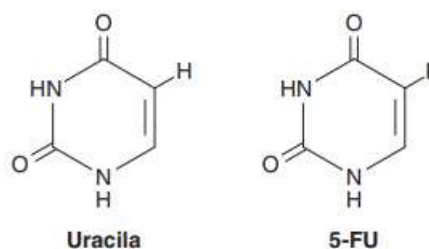
Por sua vez, a radiologia intervencionista tem o objetivo de aprimorar as técnicas cirúrgicas, tendo em vista que a formação de imagens e modelos 3D pode auxiliar o cirurgião durante o procedimento, melhorando as chances de sucesso cirúrgico (SHAFFER, 2010; WATTAMWAR; WAKE, 2022).

Ainda que o procedimento cirúrgico seja feito, uma considerável parcela dos pacientes tratados acaba vivenciando a recorrência do câncer, podendo inclusive desenvolver metástase. Nesses casos, o tratamento se utiliza de outras ferramentas, como a imunoterapia e a quimioterapia (GUSTAVSSON et al., 2015). O estudo de produtos biológicos, como os anticorpos monoclonais, ou *Mabs*, permitiu o desenvolvimento da imunoterapia, que tem como objetivo atingir receptores específicos que estão mais presentes em alguns tipos de câncer. No CCR, existem dois alvos muito estudados, o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEFG) e o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR). O de *Mabs* para o EGFR têm apresentado um aumento na sobrevida de pacientes com CCR metastático, com sobrevida geral entre 29 e 36 meses (GBOLAHAN; O' NEIL, 2019).

Contudo, os produtos biológicos são itens provenientes de uma cadeia de produção cheia de desafios. A engenharia de bioprocessos precisa lidar com um alto valor do processo de produção, bem como precisa investir em pesquisa para escalonamento de produção laboratorial para industrial (STRAATHOF et al., 2019). Sendo assim, os clássicos quimioterápicos permanecem sendo primeira opção de tratamento. A referida terapia afeta o funcionamento celular, levando a morte das células doentes. No CCR o uso de 5-Fluoruracil e outras fluoropirimidinas são utilizados como principal tratamento desde 1990, e até hoje o 5-FU é considerado tratamento primário (VODENKOVA et al., 2020; GRANADOS-ROMERO et al., 2017).

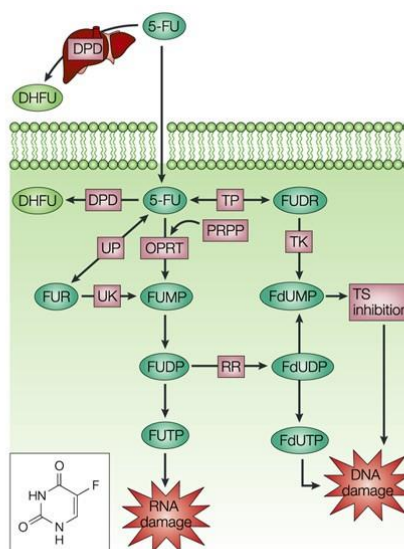
3.2. 5-Fluorouracil

O 5-Fluoruracil, ou 5-FU, é um fármaco antimetabólito utilizado desde 1957 para tratar diferentes tipos de câncer, como CCR, anal, de mama, esofágico, de cabeça e pescoço, e hepatocelular (CHU e SARTORELLI, 2017; SETHY; KUNDU, 2021). Antimetabólitos normalmente tem seu efeito citotóxico por inibirem processos de síntese celular, ou por se incorporarem no RNA e DNA, prejudicando sua função normal, sendo que o 5-FU age pelas duas vias (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). O 5-FU é uma pequena molécula (130,08 g/mol) que faz parte das fluoropirimidinas, moléculas semelhantes às pirimidinas (**Figura 2**), mas com modificações de adição de flúor. Especificamente, é análogo à uracila, tendo um átomo de Flúor incorporado na posição C-5.

Figura 2: Moléculas de Uracila e 5-FU

Fonte: CHU e SARTORELLI, 2017

O 5-FU é inativo, seu efeito se dá apenas pela sua transformação metabólica. O fármaco em questão pode ser transformado em diversos metabólitos, um deles é o fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), que perturba a atividade da enzima timidilato-sintase e da síntese de DNA, causando danos no DNA e morte celular. Após entrar nas células, o fármaco também pode ser transformado em fluoruridina trifosfato (FUTP) e fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP), que são as entidades que acabam sendo incorporadas no DNA e RNA no lugar da uridina trifosfato/deoxitimidina trifosfato (UTP/dTTP), atrapalhando a síntese de DNA e RNA e impedindo sua função normal (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; SETHY; KUNDU, 2021). A **Figura 3** resume o metabolismo e o mecanismo de ação do 5-FU:

Figura 3: Metabolismo e mecanismo de ação do 5-FU

Nature Reviews | Cancer

Fonte: LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003

Cerca de 80% do 5-FU é eliminado metabolicamente pelo fígado através da

dhidropirimidina desidrogenase (DPD), enquanto o restante é excretado pela urina. Logo, qualquer alteração na via metabólica que ocorre no fígado leva a acumulação tóxica de 5-FU (SAIF et al., 2007). E a deficiência de DPD pode ocorrer em até 5% de pacientes com câncer, portanto, nesse grupo de pacientes, a acumulação do 5-FU é mais acentuada, o que eleva a apresentação de efeitos tóxicos do medicamento (VAN KUILENBURG et al., 2012).

No sistema de classificação biofarmacêutica, o 5-FU é um medicamento de classe III, com alta solubilidade e baixa permeabilidade, característica importante para escolha da via de administração (DAI et al., 2016). Considerando o tratamento de CCR, a administração poderia ocorrer por via oral, retal e intravenosa. Contudo cada via possui suas desvantagens próprias. Levando em conta os efeitos do metabolismo de primeira passagem, a via oral apresenta uma baixa biodisponibilidade devido à metabolização de grande parte do 5-FU pela dihidropirimidina desidrogenase (DPD), que irá transformar o fármaco em dihidrofluorouracil (DHFU), metabólito inativo de 5-FU (AVENDAÑO; MENÉNDEZ, 2008).

Já a via retal possui bom efeito no segmento do reto, mas é limitada no sigmoide e colón descendente. Por ser um fármaco hidrofílico, ele é administrado também pela via intravenosa, mas essa é associada a vários efeitos colaterais sistêmicos causados pela inespecificidade do 5-FU, que causa dano celular a todas as células do corpo, e não somente nas tumorais (JAFERIAN; NEGAHDARI; EATEMADI, 2016).

Além disso, a via intravenosa ainda encontra outra dificuldade, que advém da rápida metabolização e tempo de meia-vida curto do fármaco (15 a 20 minutos). Por causa disso, a administração pode ser feita por infusão contínua, ou doses repetidas, o que aumenta o desconforto e os efeitos colaterais indissociáveis do medicamento (VELDE et al., 2014). A consequência disso é que o paciente tratado pode experimentar eventos adversos e colaterais, como febre, mucosite, estomatite, náuseas, vômito e diarreia. Outros sintomas também são comuns em toxicidade por 5-FU, como leucopenia, neutropenia, trombocitopenia e anemia (LATCHMAN; GUASTELLA; TOFTHAGEN, 2014). De acordo com CORDIER et al. (2011), em casos mais raros, ainda podem ocorrer efeitos neurotóxicos, como ataxia cerebelar e perda da função cognitiva.

Outra barreira no tratamento com 5-FU é o desenvolvimento de resistência. Nas células somáticas de câncer, pode ocorrer uma resistência inata a quimioterapia em consequência de alterações genéticas. A resistência também pode ser desenvolvida com a história natural doença, tendo em vista que tumores malignos são geneticamente instáveis, a quimiorresistência pode aparecer durante o tratamento (HAMMOND; SWAIKA; MODY, 2015).

O complexo processo de resistência pode resultar de fatores intrínsecos, como a heterogeneidade intra-tumoral, causa por uma variedade de propriedade genéticas, epigenéticas, transcriptômicas e proteômicas das células tumorais (MANSOORI et al., 2017). Além disso, as células cancerosas podem entrar em um estado dormente ou silencioso, que se mantem e sobrevivem em pacientes tratados, levando a recorrência da doença em sítios distantes do inicial. Essas células são inerentemente menos sensíveis ao tratamento sistêmico, sendo um ponto crítico para entender a progressão e processo de resistência da doença (GAO et al., 2017).

Ainda há a influência de fatores extrínsecos no surgimento de resistência, como a alteração do pH no ambiente tumoral, a diminuição do aporte de oxigênio, e sinalização parácrina entre o estroma e as outras células tumorais. A análise das características do microambiente tumoral mostrou que angiogênese, hipóxia e supressão imunológica mediada por macrófagos resultam em pior prognóstico (JUNTTILA; DE SAUVAGE, 2013).

Nesse contexto, têm se buscado alternativas tecnológicas para melhoramento da veiculação do 5-FU, com objetivo de melhorar sua biodisponibilidade, potencializando seu efeito antitumoral, ao mesmo tempo que se busca diminuir os efeitos colaterais associados ao seu uso (ENTEZAR-ALMAHDI et al., 2020). Sendo assim, a pesquisa farmacêutica vem desenhando e desenvolvendo materiais para formulações inteligentes de 5-FU a partir da utilização de nanotecnologia (ZALBA et al., 2015).

3.3. Nanocarreadores

A nanotecnologia é uma área de desenvolvimento relativamente nova, que culmina da interseção entre diferentes áreas do conhecimento, como física, ciência de materiais e biologia. Essa interseção permitiu a manipulação de materiais em escala nanométrica, que entre várias aplicações, também está sendo utilizada para produção de novas formas farmacêuticas. A produção de materiais nos quais torna possível adicionar um fármaco dentro de nanocarreadores, que via a melhoria de diversas características do fármaco (BAYDA et al., 2019). Entre as vantagens desses sistemas de entrega para o uso farmacêutico podemos citar que eles permitem a diminuição da toxicidade da droga, sua circulação prolongada e bem como melhoria na absorção do medicamento (ZALBA et al., 2015; STRAPASSON, 2019).

No câncer, seu uso pode ser pautado principalmente na especificidade da sua fisiopatologia. Em 1986, MATSUMURA e MAEDA reportaram o efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR). Esse efeito ocorre devido à um defeito nas estruturas formadas na

angiogênese do câncer, de maneira que os vasos sanguíneos recém-formados recebem mais nutrientes e oxigênio, o que aprimora rápido o desenvolvimento do câncer. Somado a isso, a falta de drenagem linfática condiciona o ambiente tumoral a retenção do material que chega ali. No entanto esse efeito não é observado em tecidos normais, e a partir dessa observação começou a investigar formas de atingir o tecido tumoral protegendo o tecido saudável. Nesse sentido, outras pesquisas demonstraram que nanocarreadores com tamanho entre 100 e 200 nm se acumulavam com eficácia em tecidos tumorais, sem afetar as células saudáveis (MARUYAMA, 2011; IYER et al., 2006; KALYANE et al., 2019).

Esses nanocarreadores podem ser de diversos tipos: inorgânicos, poliméricos e lipídicos. Os inorgânicos se utilizam de materiais inorgânicos com boas características físicas, elétricas e magnéticas que permitem uma precisa manipulação das suas características físico-químicas. Têm se desenvolvido pesquisas com nanopartículas (NPs) com potencial para atuarem como DDS, como as nanopartículas de sílica mesoporosa, de ouro, óxido de grafeno. Apesar de terem boa estabilidade e potencial de alteração, uma das suas principais desvantagens está na toxicidade de alguns dos compostos inorgânicos utilizados (SHI et al., 2020).

Na prática, desde o primeiro produto baseado em NP inorgânica aprovado no FDA, o CosmoFer®, que é uma nanopartícula de óxido de ferro para tratamento de anemia, até aprovação do Hensify®, nanopartícula de óxido de háfnio cristalino para tratamento de sarcoma de partes moles, aprovado pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em 2019, foram pelo menos 25 NP inorgânicas aprovadas no mercado. Além de agentes terapêuticos, também existe registro de NP inorgânicas para uso em imagem diagnóstica, como o Resovist®/Cliavist®, que são NPs de óxido de ferro superparamagnético para ressonância magnética do fígado (HUANG et al., 2020)

Já os poliméricos são mais versáteis e podem ser sintetizados a partir de polímeros naturais ou sintéticos por diferentes métodos. São formulações que se destacam, por exemplo, por alta biocompatibilidade, solubilidade em água e estabilidade. Podem carrear fármacos de diversas formas, agregados nas superfícies, conjugados quimicamente com os polímeros usados, presos na matriz polimérica ou ainda encapsulados no núcleo da partícula. Apesar da diversidade, podem ter desvantagens como agregação e toxicidade (BEGINES et al., 2020); MITCHELL et al., 2020).

O Abraxane® é um exemplo de sucesso no mercado, trata-se de um nanocomplexo de albumina ligada à paclitaxel, que tem diâmetro de aproximadamente 130 nm e se tornou um dos medicamentos anticâncer mais vendidos, assim se tornando um marco para a nanotecnologia no campo farmacêutico (IQBAL et al., 2021). Também há outros

nanocarreadores, baseados em polímeros sintéticos, que estão em desenvolvimento, mas com aprovação em algum país, como o PICN®, uma solução de paclitaxel estabilizada com polímero polivinilpirrolidona e lipídios, que é aprovado na Índia (NIZA et al., 2021).

Já os nanocarreadores lipídicos podem ser descritos como lipossomas e como nanopartículas lipídicas (LNP) (LOPEZ-MENDEZ et al., 2022). As LNPs são estruturas feitas a partir de matrizes lipídicas sólidas ou líquidas, como as nanocápsulas, que é uma típica estrutura *core-shell*, e nanoesferas, que são esferas com uma estrutura mais homogênea na NP. Contudo são NP com alta absorção pelo fígado e baço (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012). Já os lipossomas são vesículas que podem ser uni ou multilamelares, que possuem potencial de carrear tanto fármacos lipofílicos, na sua bicamada lipídica, como fármacos hidrofílicos no seu núcleo aquoso. Esse último tipo de LNP geralmente tem sua composição alterada para melhorar seu tempo circulação e diminuir a absorção pelo sistema reticuloendotelial (TENCHOV et al., 2021).

Os lipossomas se destacam no mercado farmacêutico, sendo o principal tipo de nanocarreador aprovado no FDA. Em 1995 o primeiro agente antineoplásico encapsulado em lipossoma era aprovado no FDA, o Doxil®, que carrega doxorubicina em lipossomas peguילים, e atualmente é indicado para câncer de mama metastático, ovário, sarcomas de kaposi e mieloma múltiplo. Desde então, diferentes produtos têm chegado ao mercado e estão aprovados no FDA e EMA, chegando a ter 25 registros nas duas agências. (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2019; LOPEZ-MENDEZ et al., 2022)

No entanto, o desenvolvimento de lipossomas contendo 5-FU ainda permanece um desafio, um dos motivos apontados para a falta de sucesso no desenvolvimento dessas formulações é sua rápida liberação após sua administração. Ainda que seja solúvel em água, o 5-FU é uma molécula pequena e reter ela no núcleo dos lipossomas é difícil (THOMAS et al., 2011). Além disso é difícil alcançar encapsulação alta de 5-FU em lipossomas no método de preparo por hidratação de filme lipídico, pois mesmo sendo solúvel no meio de hidratação, o volume do meio é muito maior que o volume no núcleo do lipossoma (ELOY et al., 2014).

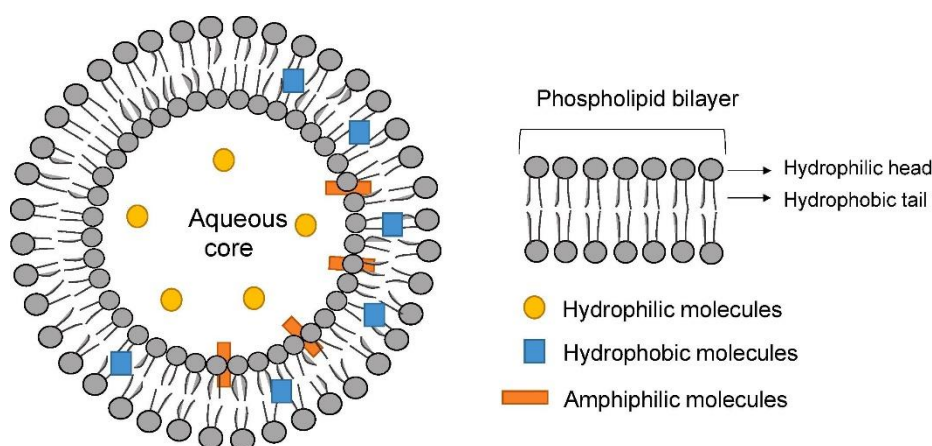
3.4. Lipossomas

Os lipossomas são estruturas clássicas, foram descritos pela primeira vez em 1961 por Bangham e seus colaboradores (BANGHAM; HORNE, 1964), e como mencionados, podem ser descritos como vesículas de lamelaridade variável: uma ou mais bicamadas lipídicas. Essas vesículas, formadas principalmente por fosfolipídios, como a fosfatidilcolina, se formam

espontaneamente na água. O seu potencial para carrear fármacos reconhecido desde sua descoberta, e desde então continuam sendo aprimorados, com alterações que permitem aumentar a estabilidade de armazenamento, a estabilidade *in vivo*, e aprimorar a especificidade do tratamento (ROZO et al., 2020).

Dessa forma, os lipossomas podem ser descritos como estruturas esféricas constituídas de uma ou mais bicamadas concêntricas formadas por fosfolípidios envolvendo um núcleo aquoso. Devido à sua estrutura particular, moléculas hidrofóbicas podem ser organizadas entre as bicamadas lipídicas, enquanto as moléculas hidrofílicas podem ser acomodadas no interior do seu núcleo aquoso (**Figura 4**). Existem formulações lipossomais aprovadas no FDA que carregam fármacos de diferentes solubilidades, como por exemplo a doxorrubicina, daunorrubicina, citarabina. Considerando essa versatilidade, o 5-FU pode ser encapsulado em lipossomas, e aproveitar da sua semelhança dos fosfolípidios com as barreiras biológicas para aumentar a sua permeabilidade por membranas (BERTOLINI, 2019; GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021).

Figura 4: Representação da estrutura do lipossoma



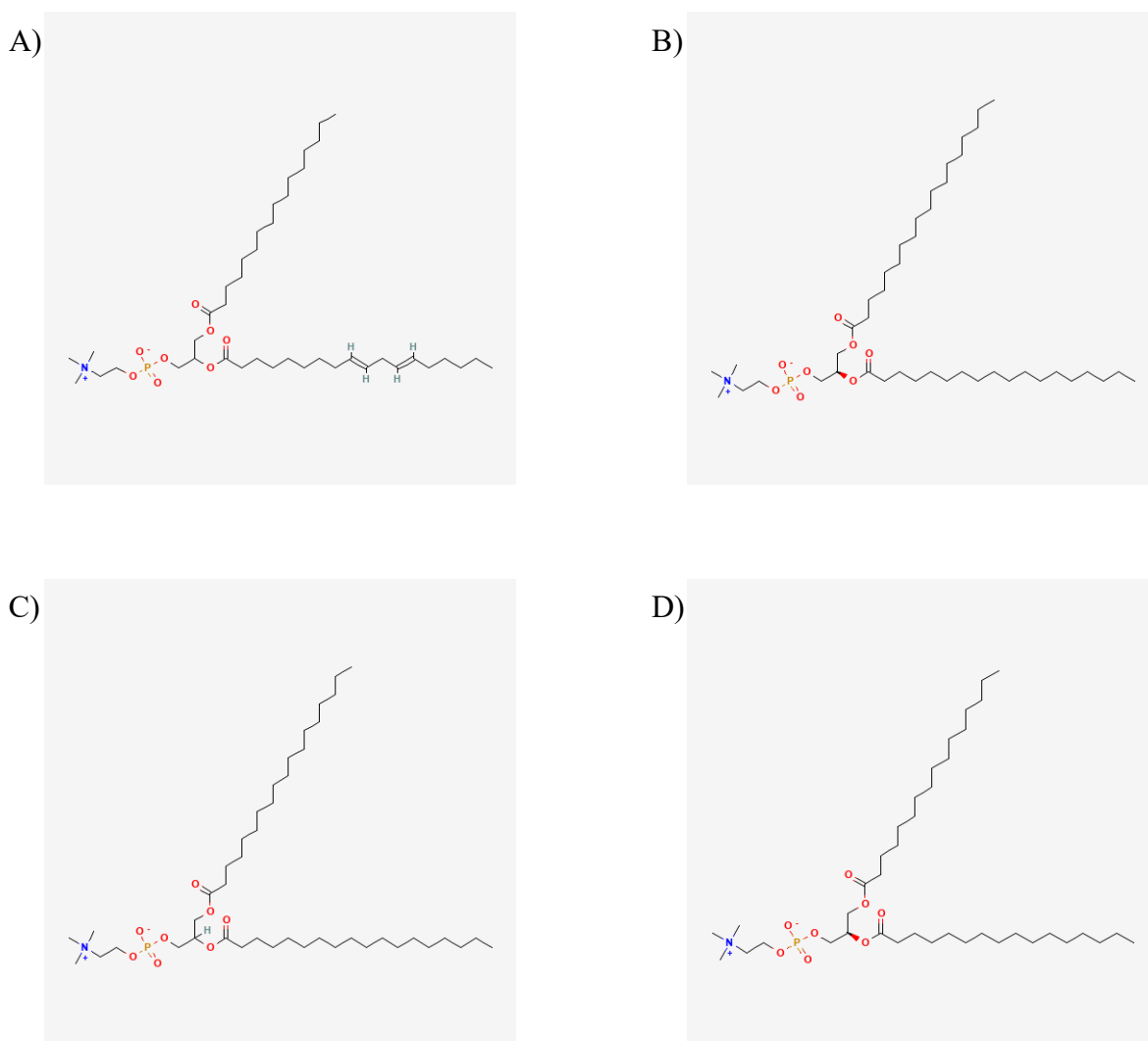
Fonte: GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021

Um lipossoma pode atingir um bom grau de eficiência a partir da escolha da sua composição, de forma que esse carreador pode ter tamanho, carga superficial, modificações de superfície, e rigidez de membrana determinado pela influência de diferentes componentes. O principal componente de um lipossoma são os fosfolípidios, lípidios anfílicos composto de uma molécula de glicerol ligada a um grupamento fosfato e duas cadeias de ácidos graxos, saturados ou insaturados (GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021). O grupo fosfato ainda pode estar ligado a uma outra molécula orgânica, e de acordo com essa molécula, os fosfolípidios podem ser classificados como Ácido fosfatídico (PA), Fosfatidilcolina (PC),

Fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG) e fosfatidilserina (PS) (TSUJI et al., 2019).

Os fosfolípidios são componentes majoritários da membrana celular, tendo biocompatibilidade. Eles podem ser de fontes naturais, como a fosfatidilcolina de soja (SPC), ou sintéticas, como seu derivado fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC). Os fosfolípidios sintéticos podem ter uma maior estabilidade quando comparados aos naturais, fruto das modificações feitas na molécula. Exemplos de lípidios sintéticos são os diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) e dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021; MONTEIRO et al., 2014). Esses lípidios são marcados por pequenas diferenças, o SPC, extraído da soja, possui insaturações nas cadeias apolares, enquanto o HSPC, é sua versão hidrogenada. Já o DSPC possui uma cadeia apolar mais longa que o DPPC. As estruturas dos lípidios podem ser observadas nas figuras abaixo:

Figura 5: Estruturas dos lípidios (A) SPC; (B) HSPC; (C) DSPC; (D) DPPC.



Fonte: Pubchem (2023)

Outra diferença entre os lipídios é sua rigidez e temperatura de transição de fases (T_C), quando abaixo dessa temperatura, o lipossoma assume uma conformação mais rígida, conhecida como fase gel, nessa fase a permeabilidade da membrana é diminuída visto que os lipídios estão empacotados mais próximos entre si. Conforme a temperatura do meio aumenta, e passa da T_C , os lipídios se tornam menos rígidos, se distanciam e formam mais espaços vazios entre si, quando isso acontece o lipossoma passa para uma fase fluída-cristalina, que é marcada por permeabilidade acentuada em relação a fase gel (CHEN et al., 2018). Dessa forma, quanto maior a T_C , mais rígida a estrutura do fosfolipídio, e menos permeável será o lipossoma.

A T_C dos fosfolipídios citados é diferente entre si, o SPC, com cadeias alifáticas poliinsaturadas, possui $T_C < 0^\circ\text{C}$, enquanto HSPC, exemplo de fosfolipídio saturado, tem $T_C = 55^\circ\text{C}$ (HOOGEVEST; FAHR, 2019). Já o DSPC, com cadeias alifáticas C18, possui $T_C = 55^\circ\text{C}$, e o DPPC, com cadeias alifáticas C16 possui $T_C = 41^\circ\text{C}$ (CHEN et al., 2018). Esses fosfolipídios são os responsáveis por formarem as bicamadas em meio aquoso, e isso se dá pelo caráter anfifílico dessas moléculas. Os grupamentos polares interagem com a água enquanto as cadeias hidrofóbicas são repelidas pela água e se montam nas bicamadas lipídicas (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

Outro componente importante de lipossomas é o colesterol, sua presença na bicamada afeta a permeabilidade do lipossoma aumentando sua rigidez, isso acontece porque à baixo da T_C , a presença de colesterol aumenta a fluidez da cadeia de hidrocarbonetos pois enfraquece as interações de van der Waals entre as cadeias de hidrocarbonetos dos ácidos graxos e impede a cristalização dos lipídios, enquanto acima da T_C , a presença do colesterol diminui a fluidez da cadeia de hidrocarbonetos pois as cadeias que interagem com os anéis rígidos e palnos do colesterol estão parcialmente imobilizadas. Dessa forma, o colesterol aumenta o grau de orientação e reduz a taxa de movimento na fase líquida cristalina da membrana lipídica., e os fosfolipídios ficam empacotados de uma forma mais densa e isso resulta em maior resistência mecânica e menor permeabilidade. Além disso, o colesterol pode servir como âncora para outras moléculas, como PEG e ácido desoxirribonucleico (DNA), permitindo a aplicação de lipossomas como furtivos ou vetorizados (HOSTA-RIGAU et al., 2013).

Mais um componente de destaque é o polietileno glicol (PEG), sua presença em formulações lipossomais tem como intuito melhorar sua estabilidade de armazenamento e estabilidade *in vivo*. Isso acontece, pois, a presença de PEG leva a uma força de estabilização estérica que impede a agregação de lipossomas. A presença deste polímero hidrofílico também

causa a formação de uma camada hidrofílica na superfície que impede interações hidrofóbicas e eletrostáticas com proteínas do plasma ou células. Dessa maneira, a opsonização de lipossomas é dificultada, melhorando seu escape do RES (LOMBARDO et al., 2016). Foi relatado que formulações com PEGs de maior peso molecular possuem maior tempo de meia vida na circulação quando comparados com PEGs de baixo peso molecular (GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021).

Os lipossomas ainda podem receber uma modificação de superfície que tem o objetivo de direcionar eles para um alvo específico presente em certos tipos de células, esses são chamados de lipossomas direcionados. Nesse contexto, o DSPE-PEG tem um importante na funcionalização de lipossomas, visto que podem ser produzidos derivados com grupos funcionais reativos que servem como âncora para as moléculas de direcionamento. Um exemplo é o DSPE-PEG-Maleimida, que pode ser utilizado como base para conjugação de anticorpos através da reação de tiolação com anticorpo (ZHANG; ZHANG, 2020). Os ligantes, ou moléculas de direcionamento, podem ser: anticorpos que reconhecem fatores superexpressos na superfície da célula alvo, como por exemplo, o Cetuximab, um anti-EGFR, que pode direcionar o tratamento a tumores que superexpressam o receptor do fator de crescimento endotelial (EGFR) (CHU; TSENG; CHOU, 2015); pequenas moléculas, como folato, que são superexpressos em diferentes tipos de tumores sólidos, como o de mama (FARRAN et al., 2020); ou peptídeos, que são usados como forma de aumentar a penetração celular quando conjugados à nanopartículas (YOO et al., 2019). Essa categoria eleva o nível de seletividade dos DDS (RIAZ et al., 2018).

4. Metodologia

4.1. Quantificação de 5-FU por espectrofotometria

Um método espectrofotométrico para quantificação de 5-FU em lipossomas foi desenvolvido e validado. Soluções estoque de concentração de 500 µg/ml em tampão fosfato (PBS) e diluições independentes foram realizadas obtendo-se soluções de 5-FU em PBS nas concentrações de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 e 6,0 µg/ml. A absorbância das soluções foi monitorada em 265 nm utilizando-se PBS como branco em espectrofotômetro UV-VIS (U-2910, HITACHI). Para validação parcial do método foram avaliados a linearidade, precisão intra ensaio, limites de detecção e limites de quantificação, levando em consideração os parâmetros preconizados pela ANVISA (Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017).

4.1.1. Linearidade

Para avaliação da linearidade, três séries de soluções padrões de 5-FU, nas concentrações de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 e 6,0 µg/ml, foram preparadas por diluição da solução estoque em PBS. A absorbância foi monitorada em 265 nm.

4.1.2. Precisão intra-ensaio

A precisão intra-ensaio foi determinada pela análise de replicatas de diferentes concentrações, preparadas e analisadas no mesmo dia. A precisão foi avaliada pela medida da absorbância de 3 diferentes concentrações, 0,25, 2,0 e 6,0 µg/ml, $n = 3$., totalizando 9 determinações. Os resultados de precisão foram calculados usando o Desvio Padrão Relativo (DPR) (Equação 1).

Equação 1: DPR

$$DPR\% = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100$$

Onde: DPR = Desvio Padrão Relativo; DP = Desvio Padrão; CMD = Concentração Média Determinada

Os resultados foram avaliados de acordo com as diretrizes da ANVISA (Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017).

4.2. Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado a partir dos parâmetros da curva de calibração obtida, de acordo com o preconizado na RDC nº166 de 2017 da ANVISA que apresenta a equação 2.

Equação 2: Cálculo do limite de detecção

$$LD = \frac{3,3\sigma}{IC}$$

Onde: LD = limite de detecção; σ = Desvio padrão; IC = Inclinação da curva.

4.3. Limites de quantificação

O limite de quantificação foi determinado a partir dos parâmetros da curva de calibração obtida, de acordo com o preconizado na RDC nº166 de 2017 da ANVISA que apresenta a equação 3.

Equação 3: Cálculo do limite de quantificação

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC}$$

Onde: LQ = Limite de quantificação; σ = Desvio padrão; IC = Inclinação da curva.

4.4. Preparo de lipossomas por hidratação de filme lipídico

Os lipossomas foram desenvolvidos pelo método de hidratação de filme lipídico, como descrito por Petrilli et al., 2018. Foi seguida a proporção de 70% de fosfatidilcolina (SPC ou HSPC ou DSPC ou DPPC), 30% de colesterol e 5% de disteroilfosfatidiletanolamina peguilado (DSPE-PEG2000). Os componentes pesados foram dissolvidos em 2,5 mL de clorofórmio, que foi evaporado em rotaevaporador, nas condições de 100 rpm à 65° C, por 30 minutos. Em seguida, o filme lipídico formado foi hidratado por 60 minutos à 37° C, com 5 mL de tampão PBS, pH 7,4, ou com solução aquosa tamponada (pH 7,4) contendo 5-FU na concentração de 260 µg/ml. Lipossomas hidratados grandes multilamelares foram então submetidos a banho ultrassônico, por 15 minutos, e por fim à sonicação em ultrassom de haste (Sonicador Qsonica – Modelo: Q500) nas condições de 20% de amplitude, ausência de pulso, por 5 minutos (PETRILLI et al., 2018).

Tabela 2: Composição detalhada dos lipossomas preparados

PC/mg	Col / mg	DSPE-PEG2000 / mg
SPC / 50	7,48	9,00
SPC / 25	3,74	4,50
DSPC / 50	7,34	8,83
DSPC / 25	3,67	4,41
HSPC / 50	7,75	9,33
HSPC / 25	3,88	4,66
DPPC / 50	7,90	9,50
DPPC / 25	3,95	4,75

Fonte: elaborado pelo autor

4.5. Caracterização físico-química dos lipossomas

4.5.1. Tamanho de partícula, Índice de Polidispersão e potencial Zeta

A análise do tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI) foi realizado por meio da técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS), utilizando o equipamento ZetasizerNano ZS (Malvern Instruments) usando-se laser 10 mW HeNe operando em 633 nm com um ângulo de incidência de 90° e temperatura a 25°C. As amostras foram diluídas na proporção 1:10 com água MiliQ, e depois homogeneizadas em vórtex por 20 segundos. Para determinação de Potencial Zeta (PZ), foram utilizadas as mesmas condições e equipamentos, mas as amostras foram submetidas a técnica de microeletroforese.

4.5.2. Eficiência de Encapsulação

Para determinação da Eficiência de Encapsulação (EE%) do 5-FU, foi utilizado o método indireto, para separação da fração livre da fração encapsulada foi usada a técnica de ultrafiltração. Para quantificar o fármaco livre, uma alíquota de 1000µL das amostras foi adicionada em dispositivo Amicon® com filtro de 50 kDa, posteriormente centrifugadas a 3000 g por 15 min. Em seguida, uma alíquota de 50µL, coletada do centrifugado, foi usada para completar o volume de 5 ml com tampão PBS pH 7,4, com posterior filtração em filtro PVDF

com poro de 0,45µm (PETRILLI *et al.*, 2018). Para quantidade de fármaco total foi considerado o total teórico utilizado na preparação dos lipossomas, 260 µg/ml. Por fim, a EE% foi determinada de acordo com a equação 2:

Equação 2: Eficiência de Encapsulação

$$EE\% = \frac{[(Fármaco Total) - (Fármaco Livre)]}{Fármaco Total} \times 100$$

4.5.3. Análise de espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada para estudar a interação química entre fármaco e lipídios utilizando espectrômetro FT/IR 4100 Jasco com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) - (Jasco do Brasil Comercio de Instrumentos Científicos LTDA). A fim de diminuir a mobilidade das moléculas, assim como a absorção de água e a rede de ligação entre H₂O e outras moléculas, uma amostra de lipossoma contendo fármaco e uma amostra de lipossoma branco foram congeladas à -80°C por 24 horas, e depois liofilizadas por 48 horas no liofilizador FreeZone 4.5 Liter com temperatura a -40°C e pressão entre 0,45 e 0,12 mBar. As amostras liofilizadas e o 5-FU foram analisados em modo de transmissão, com 16 scans e resolução de 4 cm⁻¹, na região de 600 a 4000 cm⁻¹.

4.5.4. Perfil de liberação de 5-FU *in vitro*

Para avaliação do perfil de liberação de lipossomas foi adaptada a metodologia descrita por Petrilli et al (2018). Na qual 200 µl de 5-FU ou lipossoma contendo 5-FU foram colocados em contato com 7 mL de tampão PBS pH 7,4 à temperatura ambiente. As amostras foram então condicionadas em agitador orbital em 37° C e em 150 RPM. Foram preparadas amostras independentes para análise nos tempos de 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. Após o término de cada tempo, 3 mL da amostra foram centrifugados em dispositivo Amicon® com filtro de 50 kDa. Foi coletado 1 mL do centrifugado e completado com 1 mL de tampão PBS para leitura em 265 nm por espectrofotômetro. A absorbância obtida foi correlacionada pela curva de calibração e foi determinado a porcentagem de fármaco liberado após cada tempo de experimento.

4.5.5. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Para comparação estatística entre os grupos experimentais, foi utilizado one-way ANOVA seguido pelo post-test de Bonferroni. Como critério de significância foi aceito $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 8.0.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Quantificação de 5-FU por espectrofotometria

De acordo com a Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA, uma curva de calibração deve ser feita com no mínimo 5 pontos, ou seja, 5 concentrações diferentes da substância de referência, com no mínimo 3 replicatas para cada ponto, $n=3$. Como critério de aceitação, utiliza-se coeficiente de correlação (R) igual ou superior à 0,990.

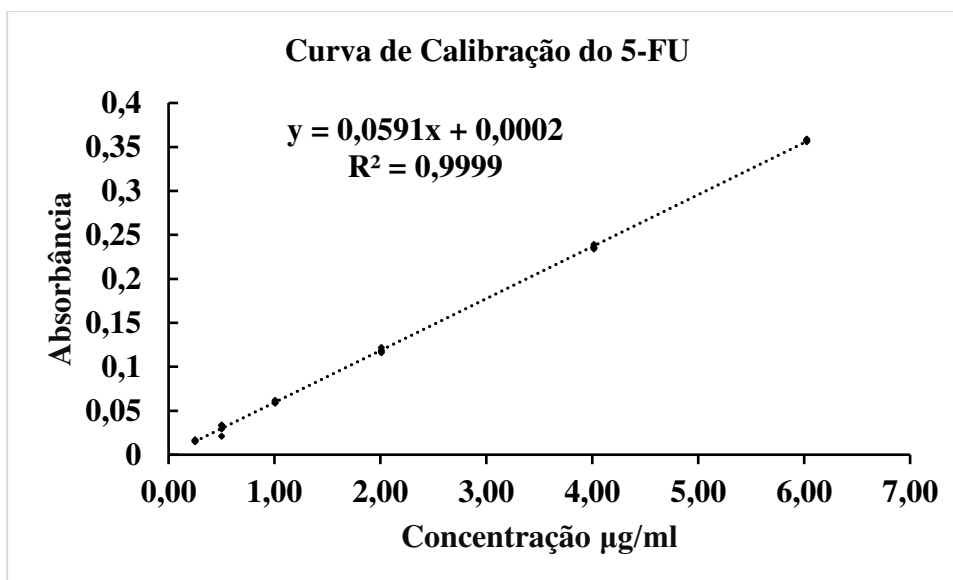
Os dados obtidos da análise foram:

Tabela 3: Dados da curva de calibração de 5-FU

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância 3	Média
0,25	0,015	0,016	0,017	0,016
0,5	0,034	0,033	0,021	0,029
1,0	0,059	0,062	0,059	0,060
2,0	0,116	0,122	0,118	0,119
4,0	0,234	0,235	0,239	0,236
6,0	0,356	0,359	0,357	0,357

Fonte: dados da pesquisa, elaborado pelo autor.

A linearidade de um método analítico é definida quando esse possui a capacidade de produzir resultados diretamente proporcionais às diferentes concentrações de um analito em um conjunto de n pontos dentro de um determinado intervalo. A curva de 5-FU (Figura 6), obtida dos dados acima, teve coeficiente de correlação igual a 0,9999, sendo considerado adequado ao intervalo avaliado (ANVISA, 2017).

Figura 6: Curva de calibração de 5-FU

Fonte: dados da pesquisa, elaborado pelo autor.

A precisão intra-ensaio, ou repetibilidade, reflete a concordância entre os valores obtidos através de medidas sucessivas sob as mesmas condições e mesmo analista em um curto período de tempo (MARSON et al., 2020). O valor de DPR para as determinações em solução de 0,25 µg/ml foi de 6,3%, em solução de 2,0 µg/ml foi de 2,6% e em solução de 6,0 µg/ml foi de 0,4%. O limite de detecção (LD) é a menor quantidade de analito que pode ser identificada na análise, sem necessariamente ser quantificada, nesse método o LD obtido foi de 0,055 µg/ml. Já o limite de quantificação (LQ), que é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão, e nesse método o LQ encontrado foi de 0,169 µg/ml respectivamente. Dessa forma, decidiu-se continuar com o método utilizado.

5.2. Caracterização físico-química

5.2.1. Tamanho de partícula, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta

O 5-FU é um medicamento de rápida metabolização, sendo necessário sua utilização em altas doses e de forma contínua ou repetida, o que causa uma série de efeitos tóxicos que dificultam o tratamento (VELDE et al., 2014). Nesse contexto, a inclusão do fármaco em DDS pode ser feita para reduzir seus efeitos tóxicos ao mesmo tempo que se busca aprimorar seu efeito terapêutico (ZALBA et al., 2015; STRAPASSON, 2019). Ainda que seja uma molécula hidrofílica, o 5-FU é uma molécula pequena e mantê-la no núcleo aquoso do lipossoma é difícil.

Além disso, pelo fato do 5-FU ser facilmente dissolvido no meio de hidratação do lipossoma, é difícil alcançar muita encapsulação no núcleo aquoso do lipossoma (THOMAS et al., 2011; ELOY et al., 2014).

A caracterização de nanocarreadores é uma etapa crítica do seu desenvolvimento, visto que a eficácia na veiculação de fármacos está relacionada às suas características de tamanho de partícula, PDI e PZ. O tamanho é um atributo muito importante quando se pensa em direcionamento passivo, considerando o efeito EPR que ocorre nos tecidos tumorais. Como discutido, foi observado que partículas de até 200 nm conseguem se acumular em tecido tumoral de forma aprimorada (MARUYAMA, 2011; IYER et al., 2006; KALYANE et al., 2019). Essa característica pode ser avaliada pela técnica de espalhamento dinâmico de luz, que permite verificar o tamanho de partícula através da dispersão da luz que ocorre devido ao movimento browniano das partículas, no caso, os lipossomas. Pela mesma técnica também é possível avaliar o índice de polidispersão, esse indicador nos mostra se aquela população de partículas possui um tamanho semelhante entre si, ou seja, se é homogênea ou não. Entende-se que o PDI próximo a 0,0 representa uma população mais homogênea, em termos de tamanho, e quanto mais próximo a 1,0, mais heterogênea é essa população. Danaei et al (2018) discute que o critério de aceitação de PDI depende da aplicação dos produtos, mas que para carreadores lipídicos usados para entrega de fármaco, um PDI de 0,3 e abaixo disso são considerados aceitáveis para uma amostra homogênea (GUIMARÃES; CAVACO-PAULO; NOGUEIRA, 2021; DANAEI et al., 2018).

Por sua vez, o PZ se trata da carga superficial das partículas, e é uma característica que está relacionada com a estabilidade de uma formulação, visto que partículas de baixa carga negativa ou positiva tendem a se coalescer e dessa forma se perde a característica de tamanho do lipossoma, enquanto partículas de alta carga negativa ou positiva se repelem e dessa forma garantem melhor estabilidade do lipossoma (GERALDO, 2008). De acordo com CHEN et al. (2012), nanopartículas podem formar dispersões estáveis quando o valor de PZ é maior que 30 mV, devido à repulsão elétrica.

Assim, foram desenvolvidos lipossomas na proporção de 70:30:5 para fosfolípido:colesterol:DSPE-PEG2000 para avaliar o efeito do SPC, DSPC, DPPC e HSPC nos lipossomas, foram estudadas as características de TP, PDI e PZ. Cada fosfolípido foi estudado em duas quantidades (com 25 mg ou 50 mg) Os resultados dessas análises podem ser observados na tabela 4:

Tabela 4: Resumo das caracterizações físico-químicas e EE% dos lipossomas

Lipossoma	TP (nm)		PDI		PZ (mV)	
	5-FU	Branco	5-FU	Branco	5-FU	Branco
SPC25	92,1 ± 1,1	82,7 ± 0,2	0,26 ± 0,003	0,021 ± 0,014	-10,9 ± 0,7	-15,5 ± 1,65
SPC50	81,7 ± 0,7	82,2 ± 1,2	0,19 ± 0,015	0,19 ± 0,008	-9,8 ± 1,0	-13,5 ± 0,6
DSPC25	124,8 ± 0,5	113,8 ± 1,2	0,19 ± 0,012	0,13 ± 0,020	-10,5 ± 0,9	-12,2 ± 1,0
DSPC50	133,4 ± 4,9	112,1 ± 1,4	0,27 ± 0,034	0,153 ± 0,019	-9,7 ± 1,2	-12,8 ± 0,6
DPPC25	94,5 ± 1,7	104,7 ± 0,2	0,15 ± 0,014	0,16 ± 0,018	-10,2 ± 0,5	-13,8 ± 1,13
DPPC50	100,4 ± 1,5	164 ± 2,7	0,17 ± 0,020	0,31 ± 0,007	-11,1 ± 1,3	-12,1 ± 0,9
HSPC25	116,5 ± 2,3	96,8 ± 0,1	0,24 ± 0,007	0,17 ± 0,011	-13,1 ± 1,5	-12,0 ± 0,9
HSPC50	113,4 ± 0,8	114,1 ± 1,8	0,19 ± 0,015	0,16 ± 0,016	-12,8 ± 0,9	-12,3 ± 0,4

Fonte: dados da pesquisa, elaborado pelo autor.

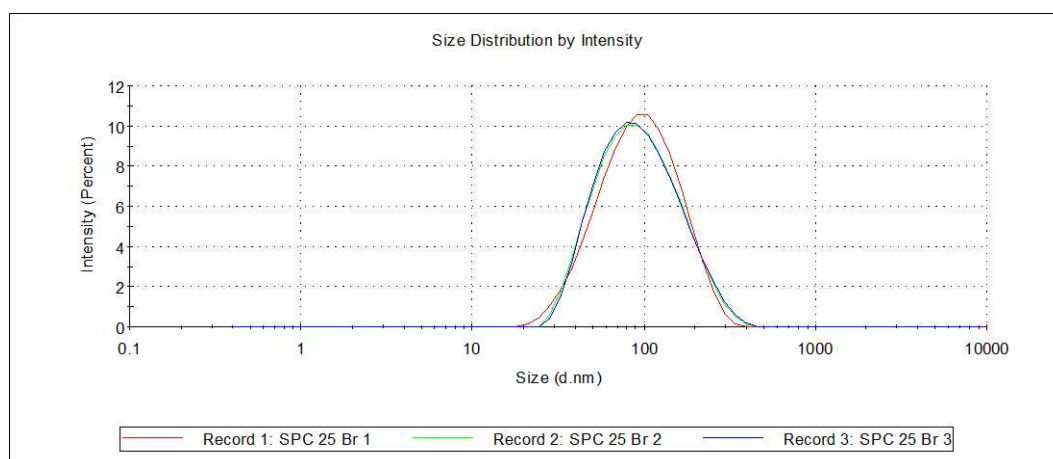
Os lipossomas desenvolvidos apresentaram tamanho de partícula nanométrico, com valores entre 81,7 nm e 164 nm. Ao comparar formulações branco com formulações com fármaco, é possível observar diferença estatística ($p < 0,05$) nas formulações baseadas SPC25, DSPC25, DSPC50, DPPC25, DPPC50 e HSPC25, no entanto não houve diferença nas formulações SPC50 e HSPC50. A encapsulação do fármaco levou ao aumento no tamanho dos lipossomas SPC25, DSPC25, DSPC50 e HSPC25, enquanto nos lipossomas DPPC25, DPPC50 levou a diminuição do tamanho. Em relação ao PDI, foi observada diferença com a inclusão do 5-FU nas formulações SPC25, DSPC25, DSPC50, DPPC50 e HSPC25, mas não foi observada diferença nas formulações SPC50, DPPC 25 e HSPC 50. Já o potencial zeta apresentou diferença com a presença do 5-FU apenas nas formulações SPC25 e 50, DSPC50 e DPPC25.

Crisóstomo e colaboradores (2022) estudaram lipossomas de 5-FU baseados em SPC e colesterol nas proporções 55:45, 60:40 e 70:30, e encontraram TP de $131,0 \pm 2,48$ nm, $148,7 \pm 3,4$ nm, e $97,2 \pm 1,25$ nm. Os resultados da proporção de 70:30 foram semelhantes com nossos achados, em que encontramos lipossomas de $92,1 \pm 1,1$ nm (SPC25) e $81,7 \pm 0,7$ nm (SPC50). Ainda assim, há uma leve redução de tamanho, o que poderia ser efeito da presença do DSPE-PEG, que ajudaria a empacotar os lipídios e reduzir o tamanho de partícula (GUIMARÃES, 2021). Contudo, houve uma diferença do PDI encontrado, enquanto no trabalho de Crisóstomo esse índice foi de $0,52 \pm 0,047$, enquanto nessa pesquisa foi encontrado um PDI de $0,26 \pm 0,003$ (SPC25) e $0,19 \pm 0,015$ (SPC50), estando dentro do critério de aceitação indicado por Danaei et al. (2018). Tal mudança também pode ser justificada pela presença de DSPE-PEG nas

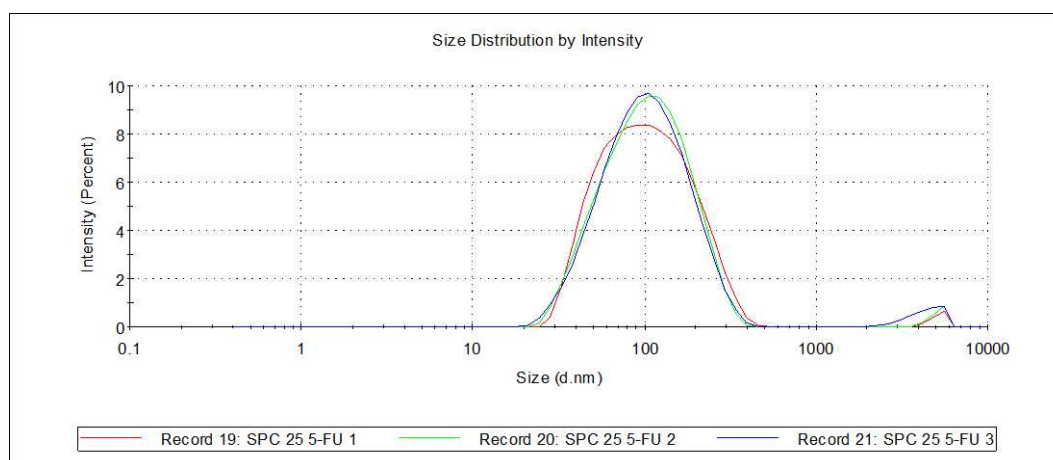
formulações do presente estudo e ausente nos lipossomas desenvolvidos por Crisóstomo e colaboradores (2022). Na figura 7, podem ser observados os gráficos de distribuição de tamanho de lipossomas SPC que mostram o tamanho e sua distribuição normal, evidenciado pela presença de curva monomodal. O PZ dos lipossomas desse trabalho foi de $-10,9 \pm 0,7$ mV para SPC25 e $-9,8 \pm 1,0$ mV para SPC50, enquanto Crisóstomo e colaboradores (2022) obtiveram PZ de $-5,7 \pm 0,93$ mV em lipossomas na proporção 70:30, o que poderia ser justificado pela maior presença de grupos PO_4^- provenientes da fosfatidiletanolamina do DSPE-PEG2000, a carga negativa resultante seria mais evidente que na proporção usada pela autora, visto que ela não utiliza esse componente na sua composição.

Figura 7: Gráfico de distribuição de tamanho dos lipossomas – SPC (A) 25 Branco; (B) SPC 25 com 5-FU; (C) SPC 50 Branco e (D) SPC com 5-FU

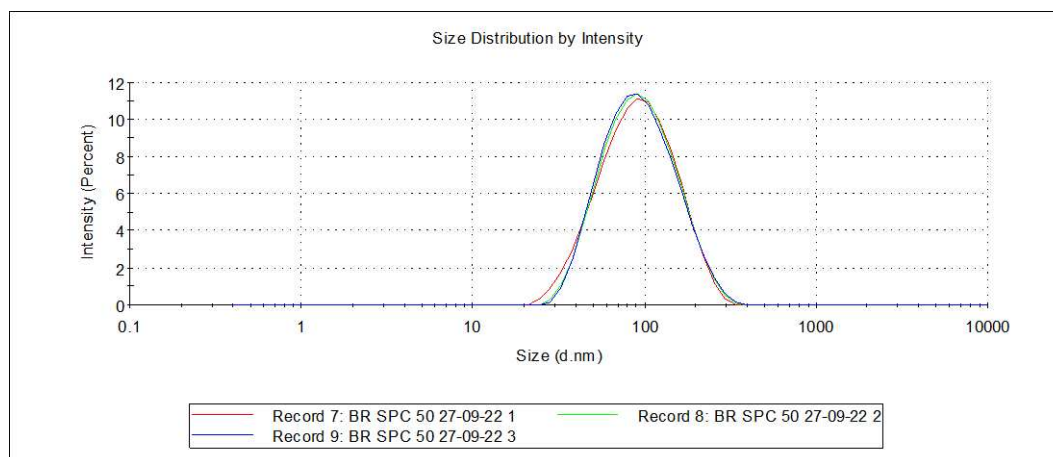
A)



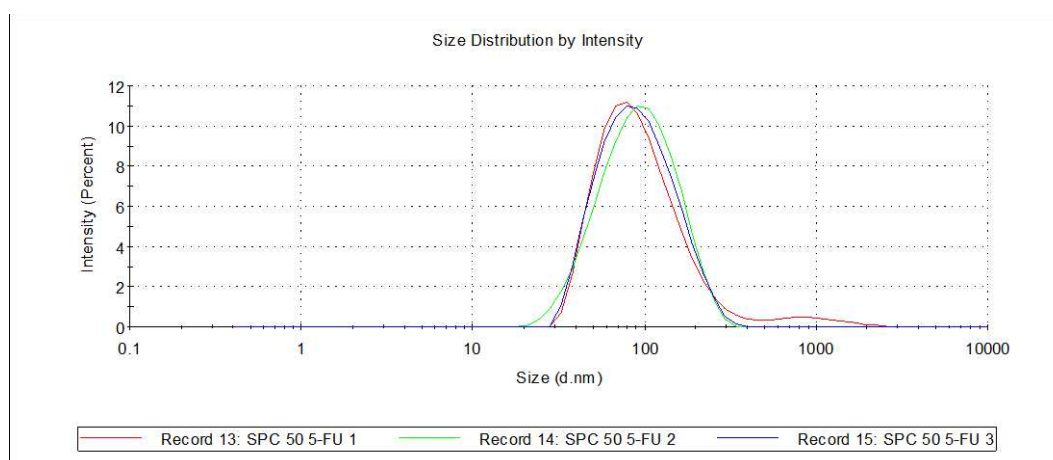
B)



C)



D)



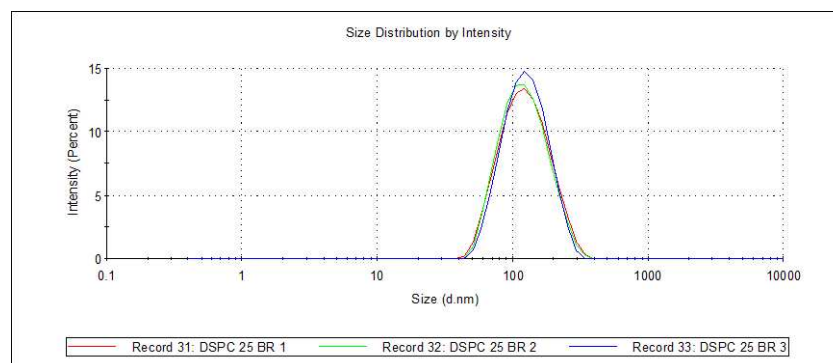
Fonte: dados da pesquisa, elaborado pelo autor.

Em relação ao DSPC, PETRILLI et al. (2018) desenvolveram lipossomas de 5-FU com base em DSPC e Colesterol, na proporção 55:45, e obtiveram TP de 115 ± 26 nm, PDI de $0,22 \pm 0,03$ e PZ de -2 ± 2 mV. Mesmo em proporção diferente, o TP de DSPC25 e DSPC50 se mantiveram semelhantes aos desta pesquisa. A distribuição de tamanho dos lipossomas DSPC está na figura 8, onde é possível observar a homogeneidade da amostra pela presença de curva monomodal. Em contrapartida o PZ foi menor que os desse trabalho, o que poderia ser explicado pela maior proporção de DSPC na formulação, que por também apresentar grupamentos PO_4^- pode resultar em uma carga superficial maior. Dessa forma, é possível

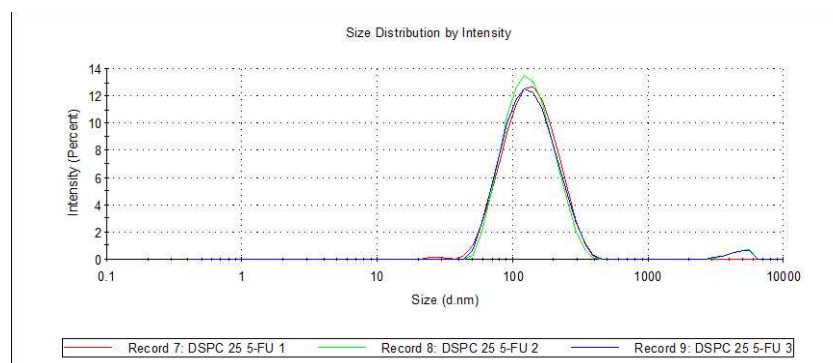
observar o efeito do caráter iônico da cabeça do fosfolípido no PZ do lipossoma.

Figura 8: Gráfico de distribuição de tamanho dos lipossomas – DSPC (A) 25 Branco; (B) DSPC 25 com 5-FU; (C) DSPC 50 Branco e (D) DSPC com 5-FU

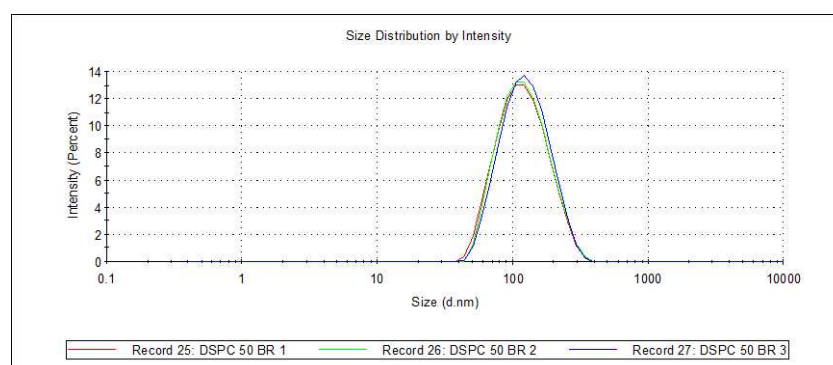
A)



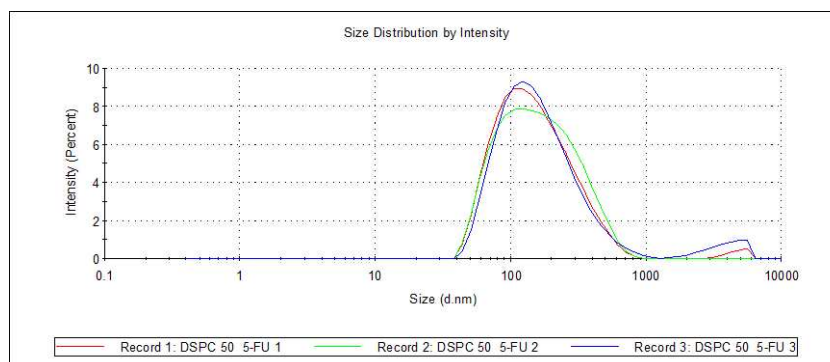
B)



C)



D)

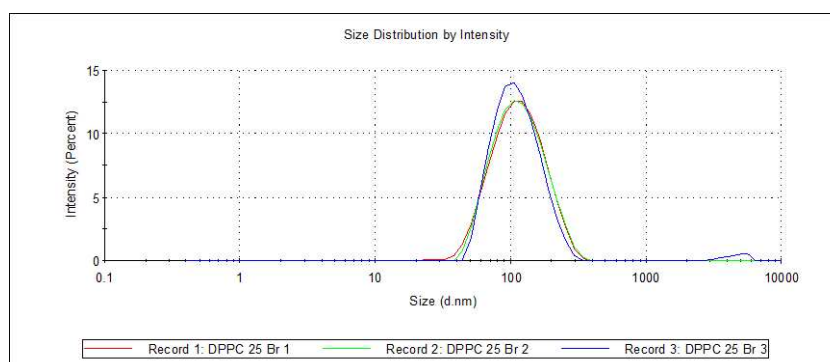


Fonte: dados da pesquisa, elaborado pelo autor.

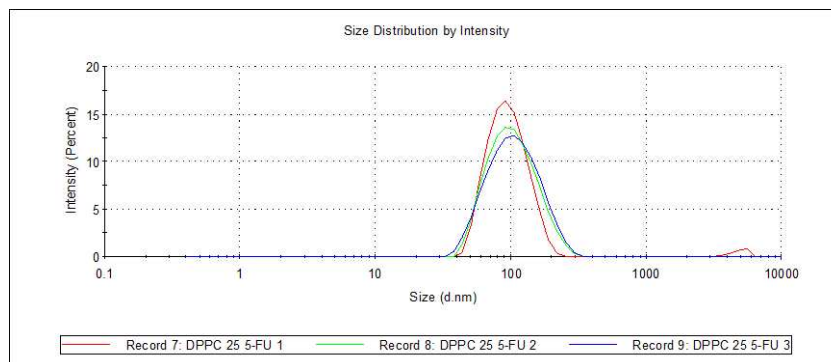
Ulker et al (2021) produziu lipossomas de DPPC:colesterol na proporção 66,67:33 pelo método da hidratação do filme lipídico com modificações contendo 5-FU, e foi encontrado lipossomas com TP de apenas 67,34 nm e PDI de 0,14, no entanto a metodologia utilizada para diminuição de tamanho foi a extrusão por membranas de porosidade de 50 nm e 100 nm, indicando que esse método talvez seja mais efetivo para controlar o tamanho de lipossomas baseados em DPPC. Katharotiya et al., 2021, por sua vez, utilizando um método de preparo semelhante ao deste trabalho, obteve lipossomas baseados em uma mistura de DPPC e DSPE-PEG2000 com TP de 157,7 nm na proporção de 1:1 fármaco:lipídios. Em proporção 1:3 obteve 119,02 nm e na proporção 1:5 obteve 132,1 nm. A proporção de 1:3 possui maior semelhança com nossos achados. Em relação ao PDI dos lipossomas DPPC foram encontrados valores baixos, 0,15 para DPPC25 e 0,17 para DPPC50, a homogeneidade das amostras estão evidenciadas na figura 9, marcadas por curva monomodal.

Figura 9: Gráfico de distribuição de tamanho dos lipossomas – DPPC (A) 25 Branco; (B) DPPC 25 com 5-FU; (C) DPPC 50 Branco e (D) DPPC com 5-FU

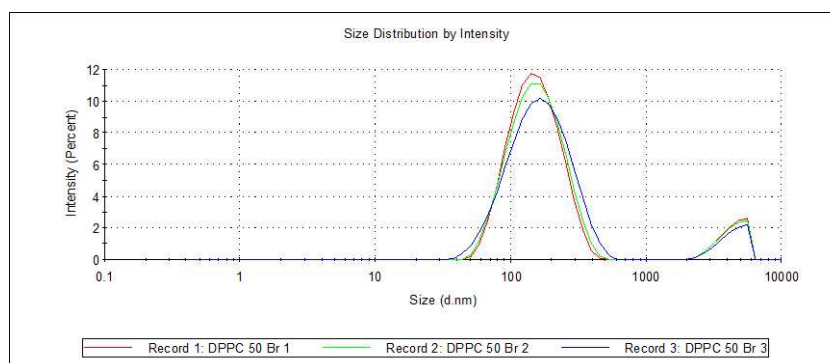
A)



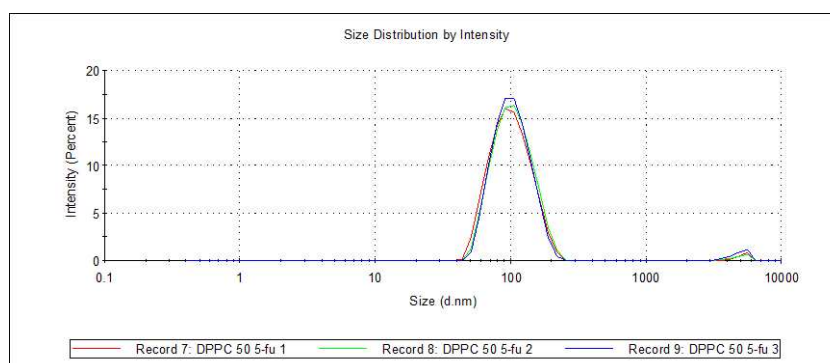
B)



C)



D)



Fonte: dados da pesquisa, elaborado pelo autor.

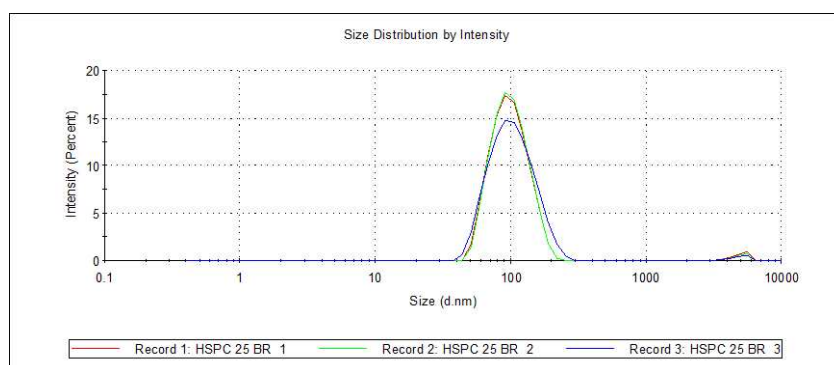
Por fim, a formulação com fármaco baseada em DPPC apresentou leve aumento da carga superficial em comparação com a formulação branco, sendo -10,2 mV para DPPC 25 e -11,2 para DPPC 50 mV. Como discutido, essa carga superficial de aproximadamente -10 mV pode ser resultado da carga líquida global resultante da presença de grupamentos fosfato na cabeça hidrofílica dos fosfolípidios (SMITH et al. (2017).

Katharotiya et al., 2021 também investigou o desenvolvimento de lipossomas baseados em HSPC e DSPE-PEG2000, no seu trabalho, lipossomas 1:5 de fármaco:lipídios apresentaram TP de $104,39 \pm 0,82$. Katharotiya discute a partir das diferentes proporções fármaco:lipídios que a uma maior quantidade de lipídio confere maior caráter lipofílico ao

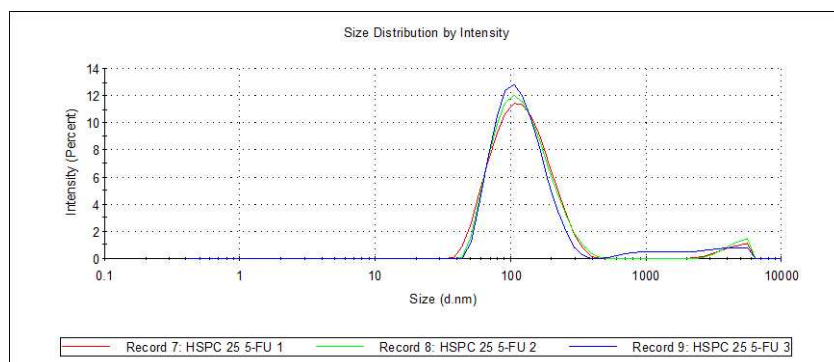
lipossoma e isso dificulta absorção de água no compartimento aquoso do lipossoma, resultando em TP menores. O PDI das duas formulações apresentou valor abaixo de 0,3, sendo consideradas homogêneas, de acordo com o critério de aceitação de Danaei et al (2018) A distribuição de tamanho dos lipossomas HSPC estão apresentadas na figura 10, demonstrando a homogeneidade das amostras pela curva de comportamento monomodal.

Figura 10: Gráfico de distribuição de tamanho dos lipossomas – HSPC (A) 25 Branco; (B) HSPC 25 com 5-FU; (C) HSPC 50 Branco e (D) HSPC com 5-FU

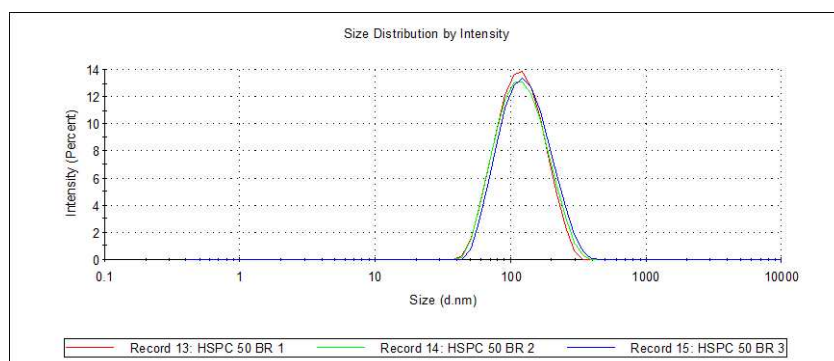
A)



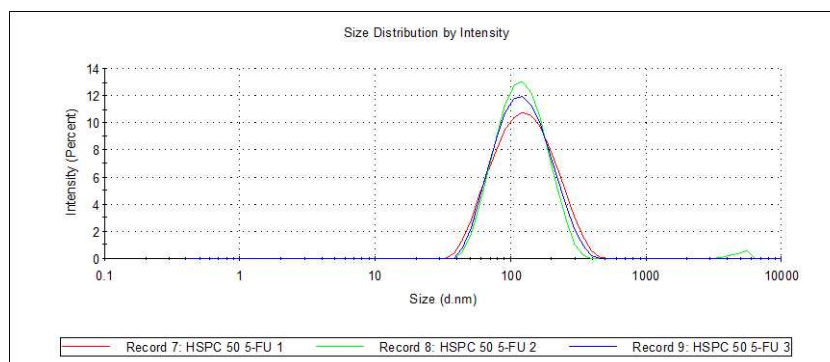
B)



C)



D)



Fonte: dados da pesquisa.

Por fim, da mesma forma que nos outros lipossomas, o PZ apresentou mesmo comportamento nessas proporções, com valor de $-13,1 \pm 1,5$ mV para HSPC25 e $-12,8 \pm 0,9$ mV para HSPC50. Uma característica comum a todos os lipídios estudados é a presença do grupo fosfato na cabeça da molécula, por essa parte do fosfolipídio estar mais exposto na fase aquosa ele induz uma carga superficial maior, o que justificaria os PZ encontrados (CHOTPHRUETHIPONG; BATTINO; BENJAKUL, 2020).

5.2.2. Eficiência de Encapsulação

A encapsulação de um fármaco em um lipossoma de forma passiva acontece quando as vesículas estão se formando. No caso de fármacos hidrofóbicos, a encapsulação acontece pela interação da molécula com as cadeias apolares do fosfolipídio, enquanto em fármacos hidrossolúveis, ocorre pela interação entre o fármaco e a fase aquosa intra lipossomal. Nesse método, a eficácia de encapsulamento é baixa, logo a razão de fármaco:lipídio normalmente é baixa, entre 10 e 50% (ABBASI et al., 2022). A encapsulação reportada de 5-FU em lipossomas é de 2 a 6%, sendo esse valor dependente da composição lipídica (PETRILLI et al., 2017). Os lipossomas desenvolvidos nessa pesquisa apresentaram EE% entre 12% e 46%, como pode ser observado na tabela 5.

Tabela 5: EE% dos Lipossomas Fosfolipídio: Colesterol: DSPE-PEG2000

EE (%)	
Fosfolipídio	5-FU
SPC25	28±0,01
SPC50	34±0,01
DSPC25	39±0,05
DSPC50	46±0,06

DPPC25	28±0,03
DPPC50	12±0,03
HSPC25	30±0,0
HSPC50	26±0,02

Fonte: dados da pesquisa, elaborado pelo autor.

Os lipossomas baseados em DSPC apresentaram as melhores EE% nesse trabalho., sendo 39% de EE% para DSPC25, e 46% de EE% para DSPC50. Os dados dessa pesquisa são corroborados pelos resultados descritos por Petrilli et al. (2017), que desenvolveu lipossomas de DSPC:Coolesterol na proporção de 55:45 com EE% de 49,9%. A diferença de EE% entre a formulação DSPC25 e DSPC50 pode ser justificada pelo diferente TP encontrado, visto que é sabido que moléculas hidrofílicas estão dissolvidas na fase aquosa e sua encapsulação depende do tamanho da partícula (AGHAEI; SOLAIMANY NAZAR; VARSHOSAZ, 2021).

Em contrapartida, ainda que com TP não muito menores, os lipossomas de DPPC não obtiveram os mesmos níveis de encapsulação, observamos uma EE% de 28% para DPPC25 e 12% para DPPC50. É necessário considerar que o DPPC possui uma temperatura de transição de fases (T_C), 41°C menor que a do DSPC (55°C), e isso indica que o DPPC atingirá uma fase líquida-cristalina antes do DSPC, e, portanto, terá uma permeabilidade maior. É descrito a temperatura na qual há liberação de compostos marcados de lipossomas de DPPC é menor que a própria T_C . Isso sugere que a liberação pode também estar relacionada a alguma mudança conformacional que ocorre antes da T_C . Como a temperatura usada na etapa de hidratação do filme e encapsulação de 5-FU é 37°C, é possível que a EE% desse lipídeo seja baixa por esse motivo (CHEN et al., 2012^a; CHEN et al., 2018).

Por sua vez, lipossomas baseados em SPC obtiveram EE% entre 28% (SPC - 25) e 34% (SPC - 50). Crisóstomo et al (2022) obtiveram resultados de EE% de 5-FU maiores em lipossomas de composição baseada em 5-FU, chegando a ter até 61% de EE% em formulações com 70% de SPC e 30% de Coolesterol. A presença de DSPE-PEG2000 nas formulações desse trabalho pode ter diminuído a EE%, pois esse componente está atrelado a um empacotamento maior dos fosfolipídios, resultando em um TP menor que teria como consequência uma EE% mais baixa (GUIMARÃES, 2021; AGHAEI; SOLAIMANY NAZAR; VARSHOSAZ, 2021). Contudo, a presença da âncora de DSPE-PEG(Maleimida) é importante quando se considera o desenvolvimento de lipossomas funcionalizados.

Enquanto isso, os lipossomas baseados em HSPC obtiveram 26% de 5-FU encapsulado, para o HSPC50, e 30% para HSPC25. Uma quantidade menor que a EE%

encontrada por GUPTA et al. (2007), que conseguiu encapsular 36% de 5-FU em lipossomas peguados baseados em HSPC, no entanto, Gupta tem lipossomas maiores, de TP de 142 nm, o que pode ser efeito da diferença composição, que possui estearilamina-PEG2000, enquanto os lipossomas desse trabalho são formulados com DSPE-PEG2000. Outros autores têm descrito lipossomas baseados em HSPC com EE% entre 75% e 80%, no entanto o tamanho desses sistemas foram quatro vezes maiores que os obtidos neste trabalho, visto que a formulação foi finalizada com extrusão por membrana de porosidade entre 100 e 400 nm, o que justificaria a quantidade maior de fármaco no núcleo aquoso do lipossoma (LIANG et al., 2014).

Em suma, é possível observar que a composição e tamanho do lipossoma tem um efeito importante nas suas características e encapsulação de fármacos hidrofílicos. Cada tipo de fosfatidilcolina utilizada resultou em lipossomas diferentes e com diferentes perfis de EE%. Apesar de que todas as PC utilizadas têm grupamentos em comum na cabeça, essas diferenças podem ser justificadas visto que o comprimento e grau de insaturação podem influenciar diretamente a T_c . Como já discutido, as diferentes T_c podem levar a perfil de encapsulação diferentes (BELTRÁN-GRACIA et al., 2019; CHEN et al., 2018).

Nesse trabalho, os melhores lipossomas, considerando as características avaliadas até então, são os baseados nos lipídios DSPC, com tamanho maior que 100 nm e menor que 200 nm, e uma EE% entre 39 e 46%. Porém, para aprofundar os estudos nas formulações, nos orientamos pelos dados de uma pesquisa concomitante que ocorre no Centro de Desenvolvimento e Ensaios Farmacêuticos/Grupo de Pesquisa em Nanotecnologia – CEDEFAR/GPNANO. Nessa pesquisa, busca-se a encapsulação de dois fármacos em lipossoma, o 5-FU e uma proteína extraída de algas presentes no litoral cearense e posterior funcionalização dos lipossomas com anticorpos. Entre os resultados encontrados, observou-se que nos lipossomas baseados em HSPC, houve uma melhora na EE% de 5-FU na presença de proteína, enquanto nos lipossomas baseados em DSPC, observou-se uma diminuição na EE% de 5-FU. Diante disto, optou-se por seguir com estudos utilizando HSPC a fim de gerar maior esclarecimento sobre a formulação com este lipídio que será utilizada como grupo controle.

5.2.3. Infravermelho por transformada de Fourier – FTIR

O espectro infravermelho (IR) de uma molécula poliatômica é resultado das vibrações moleculares, dependente especificamente de cada massa atômica, força de ligação e interações intra e intermoleculares. Dessa forma, cada molécula possui um espectro de IR que é uma assinatura única e permite diferenciar essa molécula de outras, bem como avaliar

interações entre as moléculas analisadas (BUNACIU; ABOUL-ENEIN; FLESCHEIN, 2010).

Observando o espectro do 5-FU (a), podemos observar picos característicos de estiramento de ligação C=O em 1720 e 1650,76 cm^{-1} , estiramento de ligação C-F em 1180,22 cm^{-1} , estiramento de ligação C-N em 1244,82 cm^{-1} , estiramento de ligação C=C em 1504,20 cm^{-1} . As bandas em 3127,97, 3066,26 e 1651,73 cm^{-1} são características de ligação N-H. Além disso, a banda observada em 1347,99 cm^{-1} é atribuída a dobramento pirimidínico (ELKHATIB, et al., 2022; UGORJI et al., 2022).

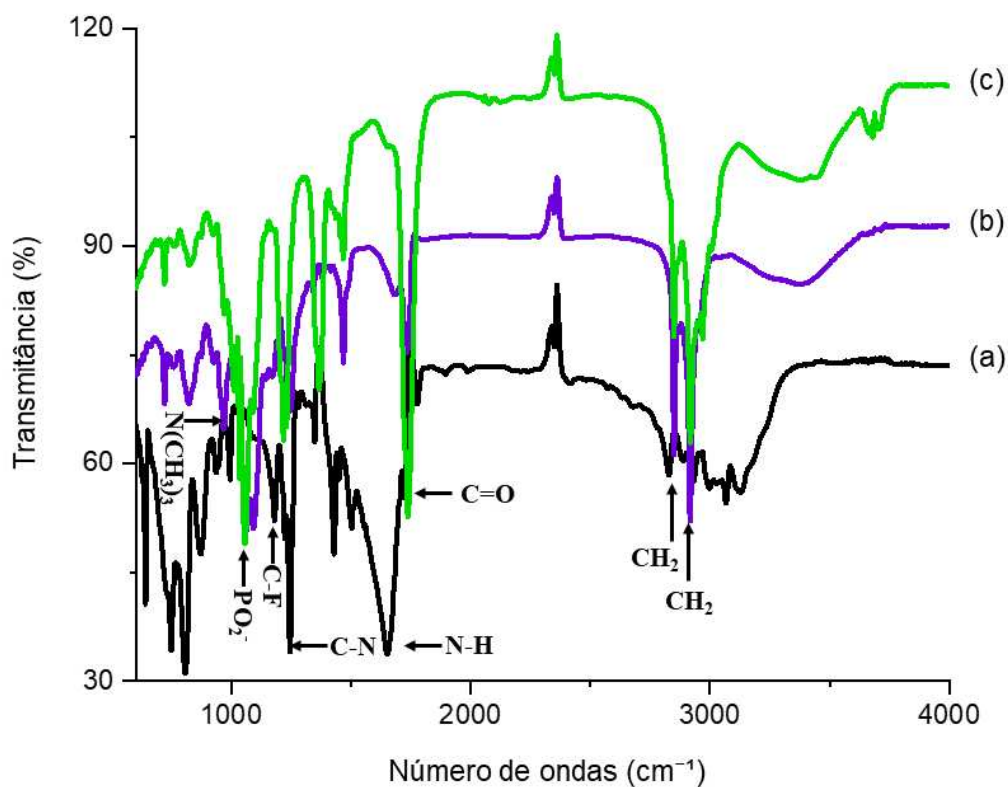
Ao analisar o espectro do lipossoma branco (c), podemos observar as bandas características do estiramento assimétrico de CH_2 em 2849,31 cm^{-1} e 2917,77 cm^{-1} . A banda em 977,12 cm^{-1} é característica do estiramento da vibração de $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ da cabeça dos fosfolipídios. A banda em 1737,55 cm^{-1} é característica do estiramento simétrico do grupo carbonila. Ainda pode ser observado as bandas em 1090,54 e 1231,32 cm^{-1} relacionadas ao estiramento assimétrico de PO_2^- (SONG et al., 2022).

Por fim, avaliando o último espectro, de lipossoma com 5-FU (b), iremos encontrar as bandas características do estiramento assimétrico de CH_2 ainda em 2849,30 e 2917,77 cm^{-1} . A banda de $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ que estava em 977,12 cm^{-1} se deslocou para 968,09 cm^{-1} . A banda de C=O deslocou de 1737,55 para 1732,73 cm^{-1} , e uma das bandas de PO_2^- deslocou de 1231,32 para 1242,89 cm^{-1} , enquanto a banda 1090,54 cm^{-1} não se alterou. No entanto, não é possível observar as bandas características do espectro do 5-FU, como a de C-F em 1180 cm^{-1} . Ainda assim, há uma diferença em algumas bandas de ligações presentes tanto no lipossoma como no 5-FU que pode sugerir a encapsulação do fármaco, como por exemplo, a banda de C=O do 5-FU estava em 1720 cm^{-1} e foi deslocada para 1737,55 no lipossoma com fármaco, além de ter uma intensidade muito menor no lipossoma com 5-FU. Já a banda em 1648 cm^{-1} , para o mesmo grupo funcional, não está presente no lipossoma com 5-FU.

É possível que o 5-FU não esteja demonstrando outras bandas específicas no espectro do lipossoma devido à baixa quantidade de fármaco em relação aos lipídios da formulação, e a predominância dos excipientes acabe mascarando os sinais do 5-FU. Ao mesmo tempo, Liu e Webster (2007) discutem que a metodologia do ATR possui limitações para análise de superfície de nanoestruturas, pois a profundidade de penetração da técnica tem a mesma ordem de magnitude que o comprimento de onda IR incidente.

Figura 11: Espectros de infravermelho de (a) 5-FU; (b) Lipossoma com 5-FU; (c)

Lipossoma branco



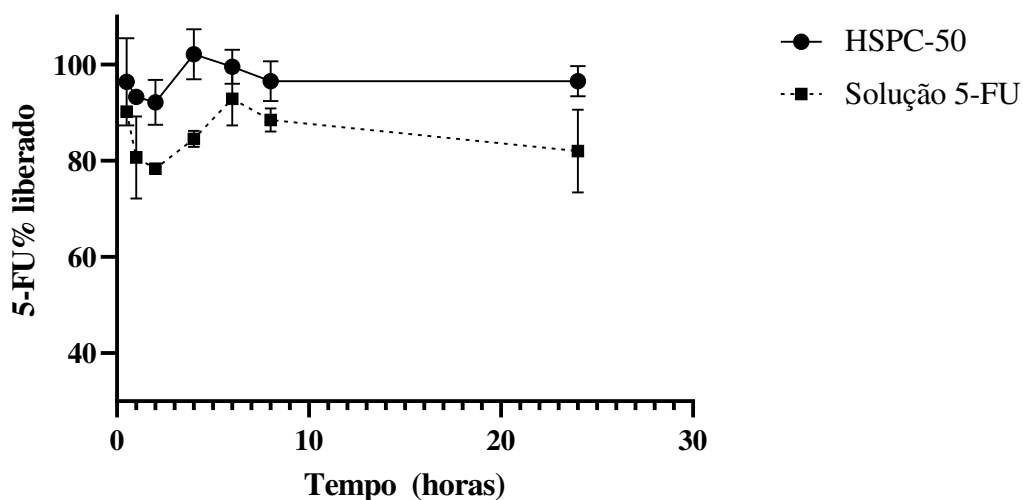
Fonte: dados da pesquisa, elaborado pelo autor.

5.2.4. Perfil de liberação de 5-FU *in vitro*

De acordo com NOUNOU et al. (2006), um ponto essencial da avaliação de um lipossoma é a taxa de liberação de fármaco da formulação. Para isso, geralmente ensaios *in vitro* são usados tanto como forma de controle de qualidade das formulações, mas também como forma de prever seu comportamento *in vivo*. Considerando que uma das características que tornam o lipossoma vantajoso no tratamento ao câncer é a não liberação imediata do fármaco, é essencial conhecer o perfil de liberação da formulação (KATHAROTIYA, 2021).

Nesse trabalho, buscamos avaliar o perfil de liberação passivo de 5-FU em pH 7,4, mas não foi possível observar o comportamento de liberação que ocorreu na formulação. Como pode ser observado na figura 12, no primeiro tempo de coleta da amostra de lipossoma, foi observado que o 5-FU% liberado já havia alcançado quase 100%, o que se manteve ao longo do experimento.

Figura 12: Perfil de liberação passivo do lipossoma HSPC-50



Fonte: dados da pesquisa, elaborado pelo autor.

Petrilli et al, (2018) descreveu em seu ensaio de liberação com lipossomas baseados em DSPC, com a mesma metodologia, que a maior parte de 5-FU livre foi recuperada nos primeiros minutos de ensaio, e que nas próximas horas, foi observado um aumento de 10% de 5-FU no meio. O esperado seria encontrarmos na primeira apenas a fração livre de 5-FU, que no caso do lipossoma HSPC – 50, seria 70% de fármaco, considerando que observamos 30% de EE%.

Esse não é o perfil de liberação encontrado por outros pesquisadores com formulações de lipossoma baseado em HSPC contendo 5-FU. Katharotiya et al (2021), descreveram uma formulação com liberação de 63% de 5-FU em 24 horas. Lee e Na (2019) descreveram lipossomas baseados em HSPC carregados com antocianina, composto hidrofílico, e foi observado um perfil de liberação de até 80% em até 6 horas de experimento.

Uma possível justificativa para tal achado seria a quebra do equilíbrio osmótico do sistema quando a formulação é diluída para o ensaio. No início do experimento, temos uma condição de equilíbrio, mas com a diluição da formulação para o ensaio, a solução onde o lipossoma está disperso se torna hipotônica em relação a solução no núcleo aquoso do lipossoma. Portanto, ocorre um movimento da água do meio hipotônico em direção ao meio hipertônico, isso faz com que o lipossoma receba um volume muito maior de água do que poderia comportar, e isso pode levar o rompimento da membrana (OHNO et al., 2009). No estudo de WU et al. (2019) foi observado que em meio hipotônico, vesículas unilamelares

tendem a liberar mais fármaco. Isso foi atribuído ao alongamento das bicamadas lipídicas causadas como consequência do aumento do TP, que leva a membrana se tornar mais permeável e assim liberar mais fármaco. Também foi sugerido que nas condições hipotônicas, há formação de poros que levam a liberação do fármaco (WU et al., 2019).

Devido a limitação encontrada, para definir o perfil de liberação seria necessário adaptar a metodologia ou alterar ela para que o equilíbrio osmótico do sistema não fosse perturbado. Para isso poderia ser utilizado o aparelho dissolutor com pás, usando uma membrana de diálise, assim como performado por Katharotiya et al., 2021, e Mansoori et al., 2017.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho foi capaz de desenvolver e caracterizar lipossomas baseados em diferentes tipos fosfolipídios, com colesterol e DSPE-PEG2000 contendo 5-FU, avaliando o efeito dos fosfolipídios no TP, PDI, PZ e EE%. Com todos os fosfolipídios usados foram obtidos lipossomas contendo 5-FU de tamanho nanométrico inferior a 133 nm, capazes de se beneficiar do efeito EPR. Além disso, apresentaram índice de Polidispersão inferior à 0,3, sendo considerados homogêneos dentro do critério de aceitação. Com os resultados de PZ encontrados é possível concluir que a carga superficial é resultado da porção hidrofílica dos fosfolipídios, e não de suas cadeias alquílicas. Os resultados de EE% demonstram que os lipossomas de DSPC são mais eficientes para encapsulação de 5-FU, e os lipossomas DPPC os menos eficientes. Com o estudo do lipossoma baseado em HSPC por FTIR foi observado que a banda de C=O do 5-FU estava em 1720 cm^{-1} e foi deslocada para $1737,55\text{ cm}^{-1}$ no lipossoma com fármaco e não é possível observar as bandas características de C-F em 1180 cm^{-1} do espectro de 5-FU no espectro de lipossoma com 5-FU, sugerindo que ele foi encapsulado ou que a concentração está baixa. A metodologia utilizada para realização do ensaio de liberação mostrou-se limitada, sendo necessário a adaptação do método ou troca por um que seja mais adequado.

Por fim, são necessários mais estudos para avaliar plenamente o efeito da composição nas características dos lipossomas, sugere-se a realização de microscopia de força atômica como forma de avaliar a morfologia dos lipossomas, uso de calorimetria exploratória diferencial para determinação T_C como forma de prever o comportamento da membrana com relação a difusão do material do núcleo para o meio externo, e difração de raio-X para estudos mais aprofundados sobre a estrutura do nanossistema formado. Por fim, acredita-se que estudos *in vitro* e *in vivo* poderão contribuir na elucidação do efeito do uso de lipossomas no tratamento do câncer colorretal.

REFERÊNCIAS

ABBASI, H. et al. What We Need to Know about Liposomes as Drug Nanocarriers: An Updated Review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, 4 abr. 2022.

AGHAEI, H.; SOLAIMANY NAZAR, A. R.; VARSHOSAZ, J. Double flow focusing microfluidic-assisted based preparation of methotrexate-loaded liposomal nanoparticles: Encapsulation efficacy, drug release and stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 614, p. 126166, abr. 2021.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Colorectal Cancer Statistics | How Common Is Colorectal Cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/about/key-statistics.html>>. Acesso em: 18 jun. 2023.

ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S. Nanoparticles in the clinic: An update. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 4, n. 3, 5 set. 2019.

AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. **Chapter 2 - Antimetabolites**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780444528247000020>>. Acesso em: 28 maio. 2023.

BANGHAM, A. D.; HORNE, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. **Journal of Molecular Biology**, v. 8, n. 5, p. 660-IN10, jan. 1964.

BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 5, p. 497–508, 22 mar. 2012.

BAYDA, S. et al. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 112, 27 dez. 2019.

BEGINES, B. et al. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. **Nanomaterials**, v. 10, n. 7, p. 1403, 19 jul. 2020.

BELTRÁN-GRACIA, E. et al. Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications. **Cancer Nanotechnology**, v. 10, n. 1, dez. 2019.

BERTOLINI, D. **Coencapsulação em lipossomas de compostos bioativos provenientes de cultivo de *Chryseobacterium sp. kr6***. Dissertação (Mestrado)—Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2019: [s.n.].

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975, fev. 2015.

BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2 maio 2020.

BUNACIU, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; FLESCHEIN, S. Application of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Pharmaceutical Drugs Analysis. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, n. 3, p. 206–219, 17 maio 2010.

CAO, J.; HUANG, D.; PEPPAS, N. A. Advanced engineered nanoparticulate platforms to address key biological barriers for delivering chemotherapeutic agents to target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 167, p. 170–188, 1 dez. 2020.

CHEN, J. et al. Influence of lipid composition on the phase transition temperature of liposomes composed of both DPPC and HSPC. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 2, p. 197–204, 26 mar. 2012a.

CHEN, L. et al. Molecular Biomarker of Drug Resistance Developed From Patient-Derived Organoids Predicts Survival of Colorectal Cancer Patients. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 29 mar. 2022.

CHEN, W. et al. Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 4 out. 2018.

CHEN, Y. et al. Preparation of Curcumin-Loaded Liposomes and Evaluation of Their Skin Permeation and Pharmacodynamics. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5972–5987, 18 maio 2012b.

CHIOREAN, E. G. et al. Treatment of Patients With Late-Stage Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. **JCO Global Oncology**, n. 6, p. 414–438, set. 2020.

CHOTPHRUETHIPONG, L.; BATTINO, M.; BENJAKUL, S. Effect of stabilizing agents on characteristics, antioxidant activities and stability of liposome loaded with hydrolyzed collagen from defatted Asian sea bass skin. **Food Chemistry**, v. 328, p. 127127, out. 2020.

CHU, E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do Câncer. In: **Farmacologia básica e clínica**. 14. ed. Porto Alegre: Mcgraw Hill, Cop, 2017. p. 918–945.

CHU, I-MING.; TSENG, S.-H.; CHOU, M.-Y. Cetuximab-conjugated iron oxide nanoparticles for cancer imaging and therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 3663, maio 2015.

CORDIER, P.-Y. et al. 5-FU-induced neurotoxicity in cancer patients with profound DPD deficiency syndrome: a report of two cases. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 68, n. 3, p. 823–826, 8 maio 2011.

DAI, X.-L. et al. Improving the Membrane Permeability of 5-Fluorouracil via Cocrystallization. **Crystal Growth & Design**, v. 16, n. 8, p. 4430–4438, 6 jul. 2016.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018.

DUPERTUIS, Y. M. et al. Antitumor Effect of 5-Fluorouracil-Loaded Liposomes Containing n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Two Different Colorectal Cancer Cell Lines. **AAPS PharmSciTech**, v. 22, n. 1, 6 jan. 2021.

ELOY, J. O. et al. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345–363, nov. 2014.

ENTEZAR-ALMAHDI, E. et al. Recent Advances in Designing 5-Fluorouracil Delivery Systems: A Stepping Stone in the Safe Treatment of Colorectal Cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 15, p. 5445–5458, jul. 2020.

FARRAN, B. et al. Folate-conjugated nanovehicles: Strategies for cancer therapy. **Materials Science and Engineering: C**, v. 107, p. 110341, fev. 2020.

GAO, X. et al. Cancer cell dormancy: mechanisms and implications of cancer recurrence and metastasis. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 10, p. 5219–5228, out. 2017.

GBOLAHAN, O.; O'NEIL, B. Update on systemic therapy for colorectal cancer: biologics take sides. **Translational Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, p. 9–9, fev. 2019.

GERALDO, V. P. N. **Filmes nanoestruturados contendo lipossomos para liberação controlada do ibuprofeno**. Dissertação (Mestrado)—Universidade de São Paulo: [s.n.].

GRANADOS-ROMERO, J. J. et al. Colorectal cancer: a review. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 5, n. 11, p. 4667, 27 out. 2017.

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

GUIMARÃES, M. S. **Desenvolvimento e caracterização de lipossomas peguilados para veiculação de L-asparaginase**. Dissertação (Mestrado)—Universidade de São Paulo, 2021.

GUPTA, Y. et al. Design and development of folate appended liposomes for enhanced delivery of 5-FU to tumor cells. **Journal of Drug Targeting**, v. 15, n. 3, p. 231–240, jan. 2007.

GUSTAVSSON, B. et al. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 1 mar. 2015.

HÄFNER, M. F.; DEBUS, J. Radiotherapy for Colorectal Cancer: Current Standards and Future Perspectives. **Visceral Medicine**, v. 32, n. 3, p. 172–177, 2016.

HAMMOND, W. A.; SWAIKA, A.; MODY, K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 8, n. 1, p. 57–84, 18 dez. 2015.

HANI, U. et al. Colorectal cancer: A comprehensive review based on the novel drug delivery systems approach and its management. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, p. 102532, jun. 2021.

HOOGEVEST, P. VAN; FAHR, A. Phospholipids in Cosmetic Carriers. In: CORNIER, J.; KECK, C.; VAN DE VOORDE, M. (Eds.). **Nanocosmetics.**: Springer, Cham, 2019. p. 95–140.

HOSTA-RIGAU, L. et al. Cholesterol – a biological compound as a building block in bionanotechnology. **Nanoscale**, v. 5, n. 1, p. 89–109, 2013.

HUANG, H. et al. Inorganic nanoparticles in clinical trials and translations. **Nano Today**, v. 35, p. 100972, 1 dez. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Câncer de cólon e reto**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios/cancer-de-colon-e-reto>>. Acesso em: 18 jun. 2023.

IQBAL, H. et al. Serum protein-based nanoparticles for cancer diagnosis and treatment. **Journal of Controlled Release**, v. 329, p. 997–1022, 10 jan. 2021.

IYER, A. K. et al. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 17-18, p. 812–818, set. 2006.

JAFERIAN, S.; NEGAHDARI, B.; EATEMADI, A. Colon cancer targeting using conjugates biomaterial 5-fluorouracil. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 780–788, dez. 2016.

JUNTILA, M. R.; DE SAUVAGE, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 346–354, set. 2013.

KALYANE, D. et al. Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. **Materials Science and Engineering: C**, v. 98, p. 1252–1276, maio 2019.

KHUSHBOO KATHAROTIYA et al. Development, evaluation and biodistribution of stealth liposomes of 5-fluorouracil for effective treatment of breast cancer. **Journal of Liposome Research**, v. 32, n. 2, p. 146–158, 13 abr. 2021.

KUIPERS, E. J. et al. Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 15065, p. 15065, 5 nov. 2015.

LATCHMAN, J.; GUASTELLA, A.; TOFTHAGEN, C. 5-Fluorouracil Toxicity and Dihydropyrimidine Dehydrogenase Enzyme: Implications for Practice. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 18, n. 5, p. 581–585, 24 set. 2014.

LEE, C.; NA, K. Anthocyanin-Loaded Liposomes Prepared by the pH-Gradient Loading Method to Enhance the Anthocyanin Stability, Antioxidation Effect and Skin Permeability. **Macromolecular Research**, 4 nov. 2019.

LEWANDOWSKA, A. et al. Quality of Life of Cancer Patients Treated with Chemotherapy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 19, p. E6938, 23 set. 2020.

LIANG, B. et al. Integrin 6-Targeted Immunoliposomes Mediate Tumor-Specific Drug Delivery and Enhance Therapeutic Efficacy in Colon Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 5, p. 1183–1195, 30 dez. 2014.

LIU, H.; WEBSTER, T. J. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. **Biomaterials**, v. 28, n. 2, p. 354–369, jan. 2007.

LOMBARDO, D. et al. Soft Interaction in Liposome Nanocarriers for Therapeutic Drug Delivery. **Nanomaterials**, v. 6, n. 7, p. 125, 25 jun. 2016.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–8, 2003.

LOPEZ-MENDEZ, T. B. et al. Clinical Trials Involving Chemotherapy-Based Nanocarriers in Cancer Therapy: State of the Art and Future Directions. In: **Cancer Nanotechnology**. [s.l.] Springer Nature, 2022. p. 325–383.

LUCAS, A. S.; O'NEIL, B. H.; GOLDBERG, R. M. A Decade of Advances in Cytotoxic Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 10, n. 4, p. 238–244, dez. 2011.

LUIZ, M. T. et al. Functionalization of Nanosystems in Cancer Treatment. In: PIENNA SOARES, C.; CHORILLI, M. (Eds.). **Cancer Nanotechnology**. [s.l.] Springer, Cham, 2022. p. 71–101.

MADER, R. M.; MÜLLER, M.; STEGER, G. G. Resistance to 5-Fluorouracil. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 31, n. 5, p. 661–666, nov. 1998.

MANSOORI, B. et al. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: a Brief Review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 3, p. 339–348, 25 set. 2017.

MARSON, B. et al. VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS IN A PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM: AN OVERVIEW FOCUSED ON HPLC METHODS. **Química Nova**, v. 43, n. 8, 2020.

MARUYAMA, K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 161–169, mar. 2011.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs1. **Cancer Research**, v. 46, n. 12_Part_1, p. 6387–6392, 1 dez. 1986.

MITCHELL, M. J. et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, p. 1–24, 4 dez. 2020.

MONTEIRO, N. et al. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 11, n. 101, p. 20140459, 6 dez. 2014.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What Is Cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 6 jun. 2023.

NIZA, E. et al. Polyester Polymeric Nanoparticles as Platforms in the Development of Novel Nanomedicines for Cancer Treatment. **Cancers**, v. 13, n. 14, p. 3387, 6 jul. 2021.

NOUNOU, M. M. et al. In vitro drug release of hydrophilic and hydrophobic drug entities from liposomal dispersions and gels. **Acta Pharmaceutica**, v. 56, n. 3, p. 311–324, 1 set. 2006.

OHNO, M. et al. Dynamic Behavior of Giant Liposomes at Desired Osmotic Pressures. **Langmuir**, v. 25, n. 19, p. 11680–11685, 2 set. 2009.

PACAL, I. et al. A comprehensive review of deep learning in colon cancer. **Computers in Biology and Medicine**, v. 126, p. 104003, 1 nov. 2020.

PATSALIAS, A.; KOZOVSKA, Z. Personalized medicine: Stem cells in colorectal cancer treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 141, p. 111821, 1 set. 2021.

PETRILLI, R. et al. Cetuximab Immunoliposomes Enhance Delivery of 5-FU to Skin Squamous Carcinoma Cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 301–308, 2017.

PETRILLI, R. et al. Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection. **Journal of Controlled Release**, v. 283, p. 151–162, ago. 2018.

QUIRKE, P.; WEST, N. P.; NAGTEGAAL, I. D. EURECCA consensus conference highlights about colorectal cancer clinical management: the pathologists expert review. **Virchows Archiv**, v. 464, n. 2, p. 129–134, 24 jan. 2014.

RIAZ, M. K. et al. Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 9 jan. 2018.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, out. 2004.

ROZO, A. J. et al. Biophysical analysis of lipidic nanoparticles. **Methods**, v. 180, p. 45–55, ago. 2020.

SAHU, T. et al. Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, p. 102487, 1 jun. 2021.

SAIF, M. W. et al. DIHYDROPYRIMIDINE DEHYDROGENASE DEFICIENCY (DPD) IN GI MALIGNANCIES: EXPERIENCE OF 4-YEARS. **Pakistan journal of medical sciences quarterly**, v. 23, n. 6, p. 832–839, 2007.

SANTOS, M. N. **Fisiopatologia e Tratamento do Câncer Colorretal**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Bacharelado em Farmácia) - Faculdade Regional de Alagoinhas. Alagoinhas, p.38. 2022.

SANTOS, P. I. R. DOS S. **Nanomedicina na terapêutica do cancro colo-retal: a aplicação de lipossomas**. Dissertação (Mestrado)—Universidade de Algarve, 2015.

SARFRAZ, M. et al. Development of Dual Drug Loaded Nanosized Liposomal Formulation by A Reengineered Ethanolic Injection Method and Its Pre-Clinical Pharmacokinetic Studies. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, p. 151, 6 set. 2018.

SAWICKI, T. et al. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2025, 22 abr. 2021.

SETHY, C.; KUNDU, C. N. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111285, 1 maio 2021.

SHAFFER, K. Radiographic Evaluation of Cancer. In: **Atlas of Diagnostic Oncology 4th edition**. Mosby: Elsevier Health Sciences, 2015. p. 6–29.

SHARMA, S. H.; THULASINGAM, S.; NAGARAJAN, S. Terpenoids as anti-colon cancer agents – A comprehensive review on its mechanistic perspectives. **European Journal of Pharmacology**, v. 795, p. 169–178, jan. 2017.

SHI, Z. et al. Inorganic nano-carriers based smart drug delivery systems for tumor therapy. **Smart Materials in Medicine**, v. 1, p. 32–47, 1 jan. 2020.

SMITH, M. C. et al. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 24, p. 5779–5787, 31 jul. 2017.

SONG, F. et al. Effect of phospholipids on membrane characteristics and storage stability of liposomes. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 81, p. 103155, 1 out. 2022.

STAPASSON, G. B. **Síntese e caracterização de lipossomas termossensíveis com potencial para atuar como drug delivery systems**. TCC (Graduação) Curso de Química Industrial—Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019: [s.n.].

STRAATHOF, A. J. J. et al. Grand Research Challenges for Sustainable Industrial Biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1042–1050, out. 2019.

TENCHOV, R. et al. Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. **ACS Nano**, v. 15, n. 11, 28 jun. 2021.

THOMAS, A. M. et al. Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-Fluorouracil for parenteral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 2, p. 212–219, 10 mar. 2011.

TSUJI, T. et al. Enzymatic fluorometric assays for quantifying all major phospholipid classes in cells and intracellular organelles. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 13 jun. 2019.

UGORJI, O. L. et al. The effect of noisome preparation methods in encapsulating 5-fluorouracil and real time cell assay against HCT-116 colon cancer cell line. **Heliyon**, v. 8, n. 12, p. e12369, dez. 2022.

VAN KUILENBURG, A. B. P. et al. Evaluation of 5-Fluorouracil Pharmacokinetics in Cancer Patients with a C.1905+1G>A Mutation in DPYD by Means of a Bayesian Limited Sampling Strategy. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 51, n. 3, p. 163–174, mar. 2012.

VELDE, C. J. H. VAN DE et al. Experts reviews of the multidisciplinary consensus conference colon and rectal cancer 2012: Science, opinions and experiences from the experts of surgery. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 40, n. 4, p. 454–468, 1 abr. 2014.

VODENKOVA, S. et al. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 206, p. 107447, fev. 2020.

WATTAMWAR, K.; WAKE, N. **Chapter 11 - 3D Printing in Interventional Radiology**. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323775731000014>>. Acesso em: 23 maio. 2023.

WELLS, K.; WISE, P. E. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. **Surgical Clinics of North America**, v. 97, n. 3, p. 605–625, jun. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em:
<https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 5 ago. 2023.

WU, I. Y. et al. The Hypotonic Environmental Changes Affect Liposomal Formulations for Nose-to-Brain Targeted Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 8, p. 2570–2579, ago. 2019.

YOO, J. et al. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. **Cancers**, v. 11, n. 5, p. 640, 8 maio 2019.

ZALBA, S. et al. Cetuximab-oxaliplatin-liposomes for epidermal growth factor receptor targeted chemotherapy of colorectal cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 210, p. 26–38, jul. 2015.

ZHANG, D.; ZHANG, J. Surface engineering of nanomaterials with phospholipid-polyethylene glycol-derived functional conjugates for molecular imaging and targeted therapy. **Biomaterials**, v. 230, p. 119646, fev. 2020.