



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
CURSO DE FARMÁCIA

BRUNO LUSTOSA RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO DE NANODISPERSÕES LÍQUIDO CRISTALINAS
CONTENDO DOXORRUBICINA E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM
LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE PRÓSTATA**

FORTALEZA

2021

BRUNO LUSTOSA RODRIGUES

DESENVOLVIMENTO DE NANODISPERSÕES LÍQUIDO CRISTALINAS CONTENDO
DOXORRUBICINA E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM LINHAGEM
CELULAR DE CÂNCER DE PRÓSTATA

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia
do Departamento de Farmácia da Universidade
Federal do Ceará como requisito parcial para a
obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R611d Rodrigues, Bruno Lustosa.

Desenvolvimento de nanodispersões líquido cristalinas contendo doxorrubicina e avaliação da citotoxicidade em linhagem celular de câncer de próstata / Bruno Lustosa Rodrigues. – 2021.
60 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy.

1. Nanotecnologia. 2. Nanodispersões. 3. Cristais líquidos. 4. Doxorrubicina. 5. Câncer de próstata. I. Título.
CDD 615

BRUNO LUSTOSA RODRIGUES

DESENVOLVIMENTO DE NANODISPERSÕES LÍQUIDO CRISTALINAS CONTENDO
DOXORRUBICINA E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM LINHAGEM CELULAR
DE CÂNCER DE PRÓSTATA

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia
do Departamento de Farmácia da Universidade
Federal do Ceará como requisito parcial para a
obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Raquel Petrilli Eloy
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora do Carmo, minha mãezinha do céu que esteve sempre intercedendo por mim e por toda a minha família.

A meus pais, que sempre foram minhas maiores inspirações, sempre incentivando a perseguir meus sonhos, com todo o suporte e amor incondicional.

A Camila, minha companheira e melhor amiga de curso e da vida, por dividir as dificuldades e alegrias comigo desde o começo desta caminhada, sendo meu porto seguro, e que sem ela não teria conseguido concluir esta etapa da minha vida.

A Universidade Federal do Ceará e todo seu corpo docente e de funcionários que cruzaram meu caminho, em especial aos professores Said, Juliana, Everaldo, Mirian e Ramon, por serem exemplos de pessoa e farmacêuticos que quero seguir. Ao senhor Ivomar *in memoriam*, ao Mauro e a Raquel por sempre estarem presentes nos meus dias, sendo pessoas que me faziam descontraír no meio da rotina cansativa de estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy, por aceitar me orientar em meio a tantas atribuições que ele possui, sendo uma pessoa extremamente disponível, paciente, sábia e compreensiva. Levo comigo um grande exemplo de pessoa e cientista que sempre vou me espelhar.

A banca examinadora formada pela Profa. Dra. Raquel Petrilli Eloy, Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca e Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy, à suas futuras observações e contribuições no trabalho, por suas vastas experiências no assunto, sinto-me imensamente honrado com a oportunidade.

Ao laboratório CEDEFAR e ao grupo de pesquisa GPNANO por me acolher durante o estágio diferencial e no meu trabalho, me dando todo o suporte necessário, bem como todos que fazem parte do laboratório, que foram essenciais para a execução deste trabalho.

A FIOCRUZ Ceará por me apresentar ao mundo da pesquisa, em especial meu primeiro orientador o Dr. João Hermínio Martins Silva e meus colegas de estágio, Disraeli, Lia, Arthur e Bia.

Aos meus amigos da faculdade e da vida, Catline, Letícia, Mirela, Lucas, Geílson, Bia, Aline, Tiago, Yuri, Bela, Jeny, Jade, Joana, Matheus, Lizandra, por estarem sempre presentes no meu dia a dia.

Aos meus amigos de 4 patas, Cookie, Granola e Bento por serem a alegria da minha vida.

RESUMO

A nanotecnologia está cada vez mais presente no âmbito farmacológico, sendo responsável por otimizar terapias, entre elas o tratamento do câncer. Muitos fármacos utilizados na terapia das neoplasias são bastante tóxicos, trazendo efeitos colaterais graves e diminuição da qualidade de vida do paciente durante seu tratamento. A nanotecnologia aplicada ao tratamento de câncer vem como alternativa para diminuir estes efeitos, fazendo com que o tratamento seja otimizado, ao mesmo tempo que potencializa os efeitos tóxicos dos antineoplásicos, diminuindo seus efeitos deletérios, por direcionar melhor o tratamento ao alvo da doença. Já que a maioria desses nanocarreadores são de origem lipídica, eles atravessam melhor as membranas biológicas, melhorando a biodisponibilidade do fármaco. Dentre estes fármacos, a doxorubicina (DOX) é um dos mais difundidos, sendo utilizado em tratamento de diversos tipos de câncer inibindo a síntese de RNA nas células cancerígenas. A doxorubicina, por outro lado, é muito citotóxica, causando cardiotoxicidade, mielosupressão, problemas renais e hepáticos. Buscando estratégias para se reduzir esses efeitos, causando uma melhor eficiência no tratamento, optou-se pela utilização da nanotecnologia para encapsulação da doxorubicina em cristais líquidos a base de monoleína (MO) e PHOSAL[®] (PHO), uma mistura de lipídeos contendo fosfatidilcolina. O desenvolvimento dos cristais se deu por meio de diagrama de fases para determinação da proporção dos componentes da formulação, observando-se cristais líquidos de fase hexagonal. Após a dispersão dos cristais líquidos em sonificador de haste obtiveram-se nanopartículas com tamanho médio de $344,9 \text{ nm} \pm 4,133$, índice de polidispersão de $0,396 \pm 0,015$, eficiência de encapsulação de 99,76% e potencial zeta de $-14,7 \text{ mV} \pm 0,321$. O método de quantificação da doxorubicina foi o espectrofotométrico, que foi validado e se mostrou adequado para o estudo. Na avaliação da citotoxicidade contra células da linhagem humana de câncer de próstata (PC3) foi obtido valor de $\text{IC}_{50} = 1,003 \pm 0,185 \text{ } \mu\text{M}$ para a solução de doxorubicina e $\text{IC}_{50} = 2,116 \pm 0,233 \text{ } \mu\text{M}$ para a nanodispersão de doxorubicina. Diante desse contexto, o presente estudo atingiu seu objetivo principal, de desenvolver e caracterizar os cristais líquidos contendo doxorubicina e demonstrar seu potencial para ser utilizado como nanocarreador do fármaco em terapia para células de câncer de próstata, estando assim em acordo com outros estudos publicados em literatura científica.

Palavras-chave: Câncer de próstata; Doxorubicina; Cristal líquido; Nanotecnologia.

ABSTRACT

Nanotechnology is increasingly present in the pharmacological field, being responsible for optimizing therapies, among them the treatment of cancer. Many drugs used in cancer therapy are very toxic, bringing serious side effects and decreasing the quality of life of the patient during treatment. The nanotechnology applied to cancer treatment comes as an alternative to reduce these effects, making the treatment optimized, while potentiating the toxic effects of antineoplastic drugs, reduces its deleterious effects, by better directing the treatment to the target of the disease. Since most of these nanocarriers are of lipid origin, they cross biological membranes better, improving the bioavailability of the drug. Among these drugs, doxorubicin (DOX) is one of the most widespread, being used in the treatment of several types of cancer by inhibiting RNA synthesis in cancer cells. Doxorubicin, on the other hand, is very cytotoxic, causing cardiotoxicity, myelosuppression, kidney, and liver problems. Seeking strategies to reduce these effects, causing a better efficiency in the treatment, it was decided to use nanotechnology to encapsulate doxorubicin in liquid crystals based on monolein (MO) and PHOSAL® (PHO), a lipid mixture containing phosphatidylcholine. The development of crystals was done by means of a phase diagram to determine the proportion of the formulation components, observing liquid crystals with a hexagonal phase. After dispersion of the liquid crystals in a probe sonicator, nanoparticles were obtained with an average size of $344.9 \text{ nm} \pm 4.133$, polydispersity index of 0.396 ± 0.015 , encapsulation efficiency of 99.76% and zeta potential of $-14.7 \text{ mV} \pm 0.321$. The method for quantification of doxorubicin was spectrophotometric, which was validated and proved suitable for the study. In the evaluation of cytotoxicity against human prostate cancer lineage cells (PC3), an IC_{50} value of $1.003 \pm 0.185 \text{ } \mu\text{M}$ was obtained for the doxorubicin solution and IC_{50} of $2.116 \pm 0.233 \text{ } \mu\text{M}$ for the doxorubicin nanodispersion. Given this context, the present study achieved its main objective, to develop and characterize liquid crystals containing doxorubicin and demonstrate its potential to be used as a nanocarrier of the drug in therapy for prostate cancer cells, thus agreeing with other studies published in scientific literature.

Keywords: Prostate Cancer; Doxorubicin; Liquid Crystal; Nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DA DOXORRUBICINA	18
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ENCAPSULAÇÃO DE DOX EM LIPOSSOMAS.	23
FIGURA 3 - ESTRUTURA DE DIVERSAS FASES LÍQUIDO-CRISTALINAS. A) FASE HEXAGONAL DIRETA; B) FASE HEXAGONAL REVERSA; C) FASE CÚBICA; D), FASE LAMELAR.....	24
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DA MONOLEÍNA.....	26
FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS LECITINAS.....	27
FIGURA 6 - DIAGRAMA DE FASES, RELACIONANDO AS VARIÁVEIS DE PROPORÇÃO DE MONOLEÍNA, PHOSAL E SOLUÇÃO AQUOSA CONTENDO POLOXAMER (1,5%).	29
FIGURA 7 - ESQUEMA DA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ PARA CARACTERIZAÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO.....	32
FIGURA 8 – FOTOMICROGRAFIAS DE FORMULAÇÕES POR MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA DO BULK GEL (LENTE DE 10 X).....	39
FIGURA 9 - FOTOMICROGRAFIAS DE FORMULAÇÕES CONTENDO DOX POR MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA DO BULK GEL (LENTE DE 10 X).....	40
FIGURA 10 – GRÁFICO DE TAMANHO DE PARTÍCULA. A) NANODISPERSÃO + DOX 1MG (FA); B) NANODISPERSÃO + DOX 2,5MG (FA); C) NANODISPERSÃO + DOX 5MG (FA); D), NANODISPERSÃO + DOX 1MG (FO); E) NANODISPERSÃO + DOX 2,5MG (FO); F) NANODISPERSÃO + DOX 5MG (FO); G) NANODISPERSÃO (BRANCO) COM TEMPO DE SONICAÇÃO DE 3 MIN.....	45
FIGURA 11 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DOXORRUBICINA.	46
FIGURA 12 - VIABILIDADE CELULAR COM TEMPO DE INCUBAÇÃO DE 72H; A) SOLUÇÃO DE DOX; B) NANODISPERSÃO + DOX; C) NANODISPERSÃO BRANCO.	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DOS CRISTAIS LÍQUIDOS.	30
TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES DE DOXORRUBICINA EMPREGADAS NA CURVA ANALÍTICA	33
TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA, PDI E POTENCIAL ZETA DAS NANOPARTÍCULAS (FORMULAÇÃO B) COM SEUS RESPECTIVOS VALORES DE DESVIO PADRÃO (DP).	42
TABELA 4 – CARACTERIZAÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA, PDI E POTENCIAL ZETA DAS NANOPARTÍCULAS COM DOXORRUBICINA DISPERSA NA FASE AQUOSA, COM SEUS RESPECTIVOS VALORES DE DESVIO PADRÃO (DP).	43
TABELA 5 – CARACTERIZAÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA, PDI E POTENCIAL ZETA DAS NANOPARTÍCULAS COM DOXORRUBICINA DISPERSA NA FASE OLEOSA, COM SEUS RESPECTIVOS VALORES DE DESVIO PADRÃO (DP).	43
TABELA 6 – PRECISÃO INTRADAY E INTERDAY.....	47
TABELA 7 – DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO.	48
TABELA 8 - DETERMINAÇÃO DE EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE%) DE DOX EM NANODISPERSÕES LÍQUIDO CRISTALINAS.....	49
TABELA 9 - VALORES DE IC ₅₀ DAS FORMULAÇÕES TESTADAS COM TEMPO DE INCUBAÇÃO DE 72HS.	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 CÂNCER DE PRÓSTATA	16
3.3 NANOTECNOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES	20
3.4 CRISTAIS LÍQUIDOS.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 MATERIAL.....	28
4.1.1. SOLVENTES, REAGENTES E MATÉRIAS-PRIMAS	28
4.1.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	28
4.2 MÉTODOS.....	29
4.3 PREPARO DAS NANODISPERSÕES DE DOXORRUBICINA	30
4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CRISTAIS LÍQUIDOS E NANODISPERSÕES	31
4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DOXORRUBICINA EM NANODISPERSÕES DE CRISTAIS LÍQUIDOS.....	32
4.6 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE DOXORRUBICINA.....	36
4.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 OBTENÇÃO DOS CRISTAIS LÍQUIDOS	38
5.3 VALIDAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE DOXORRUBICINA.....	46
5.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA DOXORRUBICINA EM NANODISPERSÕES DE CRISTAL LÍQUIDO	48
5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE PRÓSTATA.....	50
6 CONCLUSÃO	53
7 REFERÊNCIAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CP	Câncer de próstata
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DP	Desvio padrão
EE%	Eficiência de encapsulação
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aprimorada
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fase aquosa
FO	Fase oleosa
HPC1	<i>Hereditary Prostate Cancer 1</i>
IC	Inclinação da curva analítica
IC ₅₀	Concentração inibitória capaz de inibir 50% das células
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MO	Monoleína
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDI	Índice de polidispersão
PHO	PHOSAL®
POP	Procedimento Operacional Padrão
PSA	Antígeno prostático específico
RNA	Ácido ribonucleico
SMANCS	poli(estireno-co-anidrido maleico)-neocarzinostatina
TME	Microambiente tumoral

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, podendo chegar a 28,4 milhões de casos em 2040 segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). De acordo com a OMS, uma a cada cinco pessoas desenvolve a doença ao longo da vida. Dentre os cânceres mais comuns o de mama apresenta maior número de casos em todo mundo, cerca de 11,7%, seguido pelo de pulmão (11,4%). O câncer de próstata aparece em quarto lugar, com 7,3% de novos casos no mundo (OMS, 2020).

O tratamento do câncer vem apresentando avanços, com a descoberta de novas terapias, novas técnicas de cirurgia e novos fármacos antineoplásicos. Esses agentes terapêuticos apresentam, na sua grande maioria, pouca especificidade em relação a sua natureza citotóxica, provocando assim destruição de células saudáveis, gerando reações adversas e desconforto para o paciente em tratamento (PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015). Os quimioterápicos geralmente utilizados no tratamento do câncer incluem as antraciclinas, como doxorrubicina e epirrubicina. Os taxanos, como paclitaxel e docetaxel; 5-fluorouracil ou capecitabina, ciclofosfamida, carboplatina, cisplatina, dentre outros (SCHÜNEMANN, *et al.* 2006).

Uma alternativa para diminuir os efeitos tóxicos do tratamento quimioterápico é a utilização da nanotecnologia, para que o fármaco seja distribuído de maneira mais específica e eficiente no organismo, gerando menos efeitos tóxicos. Dentre essas alternativas se encontram as nanopartículas lipídicas, que são as mais estudadas para o carregamento de diversos tipos de fármacos, devido sua biocompatibilidade, com baixa toxicidade e imunogenicidade. Nanopartículas são importantes veículos de fármacos com baixa solubilidade aquosa. Atualmente existem várias nanopartículas aprovadas pelo US Food and Drug Administration (FDA), que se acumulam em tumores sólidos por conta do efeito EPR (efeito de retenção e permeabilidade aumentadas). Dentre essas, destaca-se a formulação lipossomal de doxorrubicina, o Doxil[®], que foi um dos primeiros medicamentos baseados em nanotecnologia aprovados pelo FDA em 2005. Outro exemplo de produto no mercado é o Abraxane[®], no qual o quimioterápico paclitaxel encontra-se eficientemente associado à nanopartícula de albumina. Esta formulação foi aprovada pelo FDA, em 2005, para o tratamento de câncer de mama e para câncer de pâncreas em 2013 (VIEIRA *et al.*, 2015). Um exemplo em fase pré-clínica é o esclareol, que é um diterpeno que mostrou potencial para induzir a interrupção do ciclo celular e a apoptose em células de câncer de mama, de cólon e leucêmicas. Contudo, sua hidrofobicidade prejudica sua administração *in vivo* por vias como a endovenosa (DIMAS *et al.*, 1998; DIMAS *et al.*, 2006; HATZIANTONIOU *et*

al., 2006; MAHAIRA *et al.*, 2011). Assim, sua incorporação em nanopartículas pode ser uma alternativa para permitir sua administração.

Os sistemas de cristais líquidos estão atraindo cada vez mais a atenção por causa de suas microestruturas e propriedades físico-químicas interessantes. Várias moléculas bioativas, como fármacos, peptídeos e proteínas podem ser solubilizadas em fase aquosa ou oleosa e protegidas da hidrólise ou oxidação (GUO *et al.* 2010). Os cristais líquidos são um exemplo de formulações lipídicas que podem formar sistemas nanoestruturados para entrega de fármacos, sendo compostos de uma matriz lipídica que se organizam em um estado único de matéria, não podendo ser considerado nem líquido, nem sólido. O nome vem do fato de que, devido às interações moleculares, além da fluidez característica dos líquidos, possuem propriedades geralmente reservadas aos sólidos cristalinos, isto é, anisotropia (propriedades variam com a direção) em suas propriedades óticas, elétricas e magnéticas (KROIN *et al.* 1985).

Os cristais líquidos possuem importantes aplicações tecnológicas exatamente porque são anisotrópicos. A sua anisotropia permite a mudança de suas propriedades óticas pela aplicação de campos magnéticos ou elétricos. A mudança nas propriedades óticas pode ser usada para modular a luz e, portanto, revelar informação. Esse efeito é a base das aplicações tecnológicas dos cristais líquidos (KROIN *et al.* 1985).

Os cristais líquidos se organizam de diversas formas, sendo bem versáteis para carrear fármacos. Os cristais líquidos vêm sendo estudados demonstrando aplicações amplas, que vão desde a área farmacêutica, aplicações na indústria alimentícia, em cosméticos e até na indústria química. Nanodispersões de cristais líquidos de fase hexagonal à base de monoleína aumentaram a penetração cutânea *in vitro* de ftalocianina de zinco, melhorando a eficácia da terapia fotodinâmica no câncer de pele e doenças não neoplásicas (PRAÇA *et al.*, 2012). Cristais líquidos de fase hexagonal se mostraram eficientes no carregamento do fármaco antitumoral bufalina (BUF), que é um fármaco com solubilidade muito baixa, e apresenta uma cardiotoxicidade considerável na sua forma não encapsulada. Os experimentos de citotoxicidade, apoptose celular e farmacocinética realizados mostraram uma biodisponibilidade aumentada de BUF após encapsulação. Esses resultados sugerem potencial aplicação clínica para as formulações de liberação sustentada de transição de fase *in situ* seguras obtidas de BUF (LI *et al.*, 2019).

A doxorrubicina é um fármaco antitumoral, do grupo das antraciclinas que foi aprovada para uso em 1974 nos Estados Unidos, sendo muito utilizado em tratamento de pacientes com câncer de mama e câncer de próstata. O sucesso terapêutico da doxorrubicina é prejudicado pela sua toxicidade que leva a diversas reações adversas, em especial deve-se considerar a elevada cardiotoxicidade (OCTAVIA *et al.*, 2012). Contudo, a encapsulação da doxorrubicina em sistemas

nanoestruturados, vide lipossomas (Doxil®, Caelyx®), reduziu sua cardiotoxicidade (STYLIANOPULOS; JAIN, 2015). Neste sentido, Wang *et al.* demonstraram que o cloridrato de doxorubicina pode ser efetivamente encapsulado em cristais líquidos de DMSO, ácido oleico, β -caseína e água, e sua taxa de liberação pode ser regulada pelo pH, concluindo em seu estudo que cristais líquidos são potenciais nanocarreadores de DOX (WANG *et al.* 2009).

Dessa maneira, o presente trabalho buscou o desenvolvimento de nanodispersões de cristal líquido que permitissem a veiculação da doxorubicina, visando aumentar sua segurança sem prejudicar sua potência citotóxica, utilizando técnicas analíticas para determinar características como tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação (EE%), bem como determinar a citotoxicidade em linhagem celular de câncer de próstata.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar nanodispersões líquido cristalinas contendo doxorubicina para avaliação da citotoxicidade em linhagem de células de câncer de próstata.

2.2 Objetivos Específicos

- Validar método de quantificação de doxorubicina através da técnica de espectrofotometria UV-Vis;
- Desenvolver cristais líquidos a base de monoleína e Phosal®, utilizando diagrama de fases, para a encapsulação da doxorubicina;
- Caracterização dos cristais líquidos através de microscopia de luz polarizada;
- Obter nanodispersões de cristais líquidos;
- Caracterizar o tamanho de partícula, índice de polidispersividade e o potencial zeta por *dynamic light scattering*;
- Caracterizar a eficiência de encapsulação da doxorubicina através da técnica de espectrofotometria UV-Vis;
- Avaliar a citotoxicidade da nanodispersão em linhagem de células de câncer de próstata utilizando o método do MTT.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer de próstata

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2020) estima-se que no Brasil tenha tido a ocorrência de 616 mil novos casos de câncer, sendo os mais incidentes o câncer de próstata, pulmão, mama, cólon e reto. O câncer de próstata é o segundo mais comum entre os homens no Brasil (atrás apenas do câncer de pele não-melanoma). No Brasil, estimam-se 65.840 casos novos de câncer de próstata para cada ano do triênio 2020-2022. Esse valor corresponde a um risco estimado de 62,95 casos novos a cada 100 mil homens. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de próstata ocupa a primeira posição no país em todas as Regiões brasileiras, com um risco estimado de 72,35/100 mil na Região Nordeste; de 65,29/100 mil na Região Centro-Oeste; de 63,94/100 mil na Região Sudeste; de 62,00/100 mil na Região Sul; e de 29,39/100 mil na Região Norte (INCA, 2020). Alguns desses tumores podem crescer de forma rápida, espalhando-se para outros órgãos e podendo levar à morte. A identificação do estágio em que o câncer de próstata se encontra, conhecida como estadiamento, é fundamental para a escolha do melhor tratamento para o paciente.

A classificação do estágio do tumor é feita de acordo com a dosagem de antígeno prostático específico (PSA), avaliação das características microscópicas das células cancerosas durante a biópsia, o tamanho do tumor, a velocidade de crescimento e as regiões atingidas por ele. Com relação aos estágios, o estágio I corresponde a câncer assintomático que pode ser detectado ao acaso, como durante uma ultrassonografia transretal, ou pelo aumento do antígeno prostático específico. Apresenta tamanho pequeno, baixa agressividade e está restrito à próstata. O estágio II também está restrito à próstata, mas é um tumor maior, causa mais sintomas e tem mais chances de se disseminar. No estágio III o câncer de próstata atingiu tecidos vizinhos, como vesículas seminais, reto e bexiga, mas sem afetar linfonodos e áreas distantes. Apresenta maior chance de voltar depois do tratamento (recidiva). Já o estágio IV corresponde a tumores de próstata que se disseminaram para regiões próximas, como os linfonodos ou regiões distantes, originando metástase em ossos, pulmão e fígado. Em geral, o câncer de próstata de estágio IV não tem cura, mas pode ser tratado para oferecer maior qualidade de vida para o paciente (BRASIL, Ministério da Saúde, 2021). A maioria, porém, cresce de forma tão lenta (leva cerca de 15 anos para atingir 1 cm³) que não chega a dar sinais durante a vida e nem a ameaçar a saúde do homem.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença estão relacionados à presença de testosterona e a idade, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumentam significativamente após os 50 anos. Além disso, homens cujos parentes diretos são portadores de CP tem risco aumentando de desenvolver a doença. Outro fator de risco relacionado à hereditariedade é a presença de genes envolvidos no adenocarcinoma familiar, por exemplo, o HPC1 (Hereditary Prostate Cancer 1) proto-oncogene encontrado no braço longo do cromossomo 1 relacionado ao câncer de próstata familiar (ARAP M, COELHO R, 2010)

O toque retal e a dosagem do antígeno prostático específico (PSA) são os principais métodos de identificação de alteração na próstata; posteriormente a biópsia e o estudo histopatológico são indicados para a definição do diagnóstico do paciente. O tratamento deve ser individualizado para cada paciente de acordo com a sua idade, tamanho da próstata, grau histológico, estágio do tumor e os recursos técnicos disponíveis, portanto, podem ser realizadas cirurgias radicais, observação vigilante, radioterapia e terapias endócrinas (SROUGI M, *et al.*, 2008). O tratamento hormonal com privação androgênica (ADT) é hoje a principal terapêutica para o câncer metastático da próstata, com excelente resultado no controle da doença. No entanto, com o passar do tempo, a maioria dos pacientes evolui para uma fase de refratariedade hormonal, em que a doença progride independentemente da concentração sérica de testosterona (HOSSEINI *et al.*, 2016).

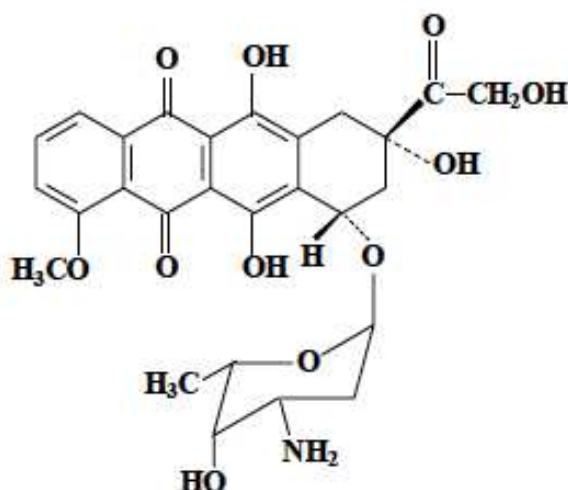
O câncer de próstata pode também ser tratado com a quimioterapia, a qual pode melhorar os resultados globais dos pacientes que apresentam a doença em fase de metástase. O fármaco docetaxel, da família dos taxanos, é considerado a primeira opção para o tratamento quimioterápico do câncer de próstata. O carbazitaxel e paclitaxel são fármacos da mesma família, utilizados no tratamento do câncer de próstata. São encontrados na literatura estudos que demonstraram um controle notável do crescimento do câncer de próstata utilizando docetaxel (DTX) (LIU *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2017).

3.2 Doxorrubicina

A doxorrubicina (DOX), apresentada na Figura 1, é um antibiótico antineoplásico do grupo dos antibióticos antraciclínicos, que são isolados a partir da bactéria *Streptomyces peucetius*. É usado para o tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo tumores sólidos e leucemias. É uma das drogas anticâncer mais utilizadas atualmente, exercendo sua atividade citotóxica através da inibição da síntese de RNA, através da intercalação entre os pares de bases

dos ácidos nucleicos (YOO *et al.*, 2000; MIGLIETTA *et al.*, 2000; CAMARA, 2017; SCHEEREN, 2015;).

Figura 1 - Estrutura química da doxorrubicina



Fonte: (TREVISAN, 2003)

Vários modelos foram propostos para explicar sua ação citotóxica: ação na Topoisomerase II, formação de adutos de DNA, estresse oxidativo e produção exacerbada de ceramidas (HANDE, 2008; TEWEY *et al.*, 1984; THORN *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014). A doxorubicina entra nas células através de difusão passiva e, no citoplasma, liga-se a subunidade 20S do proteassoma. Esse complexo migra para o núcleo e, pela maior afinidade da doxorubicina pelo DNA, ela se mantém lá. A concentração de doxorubicina mantém-se, então, cinquenta vezes maior no núcleo do que no citoplasma (CARVALHO *et al.*, 2009; TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012). No núcleo, a doxorubicina inibirá a ação da Topoisomerase II, mecanismo aceito como o mais relevante de sua ação citotóxica. Esse mecanismo se dá da seguinte forma: o DNA está naturalmente na forma tensionada, sendo necessário que haja um relaxamento na sua estrutura para que ele se duplique. Esse relaxamento se dá por cortes na dupla fita de DNA e posterior junção desses fragmentos em uma posição onde o DNA permaneça menos tensionado. Esses cortes e junções são mediados pela Topoisomerase II. A doxorubicina se liga ao DNA e forma um complexo estável com ele e a Topoisomerase II

(Doxorrubicina-DNA-Topoisomerase II). Com a formação desse complexo, as junções da dupla fita não ocorrem, levando a parada do ciclo celular (CHAMPOUX, 2001; HANDE, 2008).

No entanto, a DOX causa alguns efeitos colaterais graves, como cardiotoxicidade irreversível e mielossupressão. Esses efeitos colaterais são dose dependentes, o que acaba por limitar a dose máxima (SACCO *et al.*, 2001). Os efeitos agudos começam logo após sua administração e incluem arritmias, hipotensão e alterações eletrocardiográficas, podendo ocorrer pericardite. Esses efeitos agudos ocorrem em 11% dos pacientes e podem ser revertidos, desaparecendo geralmente após o fim do tratamento (CARVALHO *et al.*, 2009; OCTAVIA *et al.*, 2012).

Em relação aos efeitos crônicos, eles ocorrem em 1,7% dos pacientes tratados com doxorrubicina, promovendo uma taxa de mortalidade de 50% nestes pacientes. Eles ocorrem por acumulação de doses sucessivas de doxorrubicina (em especial quando atingem valores acumulados de 500 mg/m²) e levam à insuficiência cardíaca congestiva e cardiomiopatias que podem surgir até anos após o fim do tratamento. O mecanismo geralmente reconhecido para explicar a cardiotoxicidade da doxorrubicina é através da geração de radicais livres, em especial nas mitocôndrias (CARVALHO *et al.*, 2009; OCTAVIA *et al.*, 2012).

No que se refere ao sistema nervoso, a doxorrubicina não consegue atravessar a barreira hematoencefálica. No entanto, ela causa toxicidade indireta no cérebro. Isso se dá pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) mediada pela doxorrubicina. Essas EROs levam ao aumento da permeabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a liberação de citocromo c, da mesma maneira que se observa no coração, gerando apoptose de células neuronais. Desordens neurológicas e problemas cognitivos podem surgir como consequência dessa apoptose. A maioria desses problemas, contudo, desaparece um ano após a interrupção do tratamento (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012).

Ademais, cerca de 40% dos pacientes em tratamento com doxorrubicina apresentam problemas hepáticos. Isso se dá porque grande parte do fármaco é metabolizada no fígado. As EROs geradas pela doxorrubicina produzem danos ao tecido hepático, levando a sintomas como fraqueza e fadiga muscular e renal. As EROs também provocam danos nos rins, levando a lesões glomerulares, inflamação, dilatação tubular e permeabilidade capilar alterada. Isso gera nefropatia e proteinúria, sendo agravadas pelo fato de que a capacidade de regeneração dos rins é baixa (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012).

Uma das principais explicações para o alto número de efeitos adversos está relacionada à baixa seletividade da DOX aos tecidos neoplásicos, o que pode ocasionar uma maior absorção em outros tecidos que não o de interesse (CAMARA, 2017).

Os efeitos da combinação de docetaxel (DOC) e doxorrubicina (DOX) foram investigados em células de câncer de próstata (PC3 e DU145). Os tratamentos de combinação de fármacos equipotentes revelaram que a combinação DOC / DOX leva a alta sinergia e morte celular efetiva apenas em uma faixa estreita de concentração em DU145, fornecendo um método conveniente para prever vários efeitos de combinação de fármacos, bem como dados de viabilidade celular. As proporções de mistura DOC / DOX propostas podem ser usadas para projetar coquetéis de fármacos combinados isoladamente ou em sistemas de liberação para melhorar a quimioterapia para pacientes com câncer (TSAKALOUZOU *et al*, 2012).

3.3 Nanotecnologia e suas aplicações

A nanotecnologia surgiu como uma alternativa para a administração de fármacos e obtenção de ação prolongada. É utilizada para controlar a liberação de fármacos, modificando a velocidade com que atravessam barreiras, para direcionar o fármaco ao alvo farmacológico, evitando que haja acúmulo em tecidos que não os de interesse, o que além de aumentar o efeito farmacológico, diminui a toxicidade (FORMARIZ, 2008).

Não existe um consenso de tamanho ideal para possibilitar endocitose eficiente de nanopartículas, pois isso depende de vários fatores como as propriedades físico-químicas das nanopartículas e o tipo de célula alvo. Nanopartículas pequenas, entre 50 e 100 nm têm uma maior probabilidade de ser internalizado por absorção passiva, mas são mais propensas a causar toxicidade celular (SHANG *et al*, 2014). Além disso, partículas com tamanho maior que 200 nanômetros podem rapidamente ser retiradas da circulação sanguínea pelo retículo endotelial, não alcançando quantidades suficientes no tecido tumoral (TAURIN; NEHOFF; GREISH, 2012). Assim, de uma maneira geral, acredita-se que o tamanho ideal de um nanocarreador deve se situar entre 50 e 200 nanômetros, apesar de que não há um consenso sobre a questão.

A nanotecnologia passou a ser uma possibilidade de uma terapia mais direcionada para o tratamento de tumores sólidos. Aprisionando-se um fármaco ou outra molécula bioativa dentro de uma estrutura nanométrica, possibilita-se uma maior acumulação no sítio tumoral e aumenta-se a meia-vida plasmática frente a da molécula livre, com o longo tempo de circulação de nanopartículas peguiladas (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011).

Os nanocarreadores lipídicos são sistemas biocompatíveis, biodegradáveis e com baixa toxicidade, portanto, com enorme potencial para carrear fármacos citotóxicos. Além da possibilidade de vetorização, é possível realizar o controle da liberação do fármaco no sítio de ação pelo emprego de nanopartículas. Outras vantagens associadas ao uso de nanossistemas consiste no aumento da solubilidade do fármaco, importante, por exemplo, para sua administração endovenosa de fármacos lipofílicos (WONG *et al*, 2007).

O desenvolvimento de fármacos contra o câncer perpassou por centenas de fármacos quimioterápicos, mas seus resultados terapêuticos ainda não são completamente satisfatórios. Uma das principais razões para essa situação é a falta de seletividade do tumor, ou seja, os medicamentos anticâncer são distribuídos indiscriminadamente tanto nos tecidos normais quanto nos tecidos tumorais. A nanotecnologia utiliza dois aspectos biológicos centrais na formação de tumores para desenvolver e direcionar seus nanocarreadores: o efeito de permeabilidade e retenção aprimorada (EPR) e o longo tempo de circulação.

O câncer não é apenas uma massa de células tumorais malignas, são como um órgão complexo no qual constroem um ambiente de tal forma que as células não malignas, como as células do sistema imunológico, suportam o crescimento do tumor. Essa interação entre células malignas e células não malignas gera microambiente tumoral (TME, da sigla em inglês). Quando os tecidos tumorais se tornam limitados pela difusão, eles criam uma nova vasculatura para obtenção de nutrientes, excreção de resíduos e fornecimento de oxigênio. Este processo é denominado angiogênese e esses vasos formados são completamente diferentes dos vasos sanguíneos do tecido normal, sendo heterogêneos, possuindo dinâmica aberrante e características como tortuosidade, ausência de membrana basal e hiperpermeável por natureza possuindo poros através das lacunas endoteliais com diâmetro entre 100 nm a 2 µm. Além disso, a vasculatura tumoral é caracterizada por um sistema linfático deficiente que impossibilita a drenagem, levando ao seu acúmulo nos tecidos tumorais. Esse efeito é conhecido como permeabilidade e retenção aprimorada (EPR, da sigla em inglês). Devido ao efeito EPR, as nanopartículas apresentam maior acúmulo no ambiente tumoral do que outros tecidos (KALYANE *et al.*, 2019).

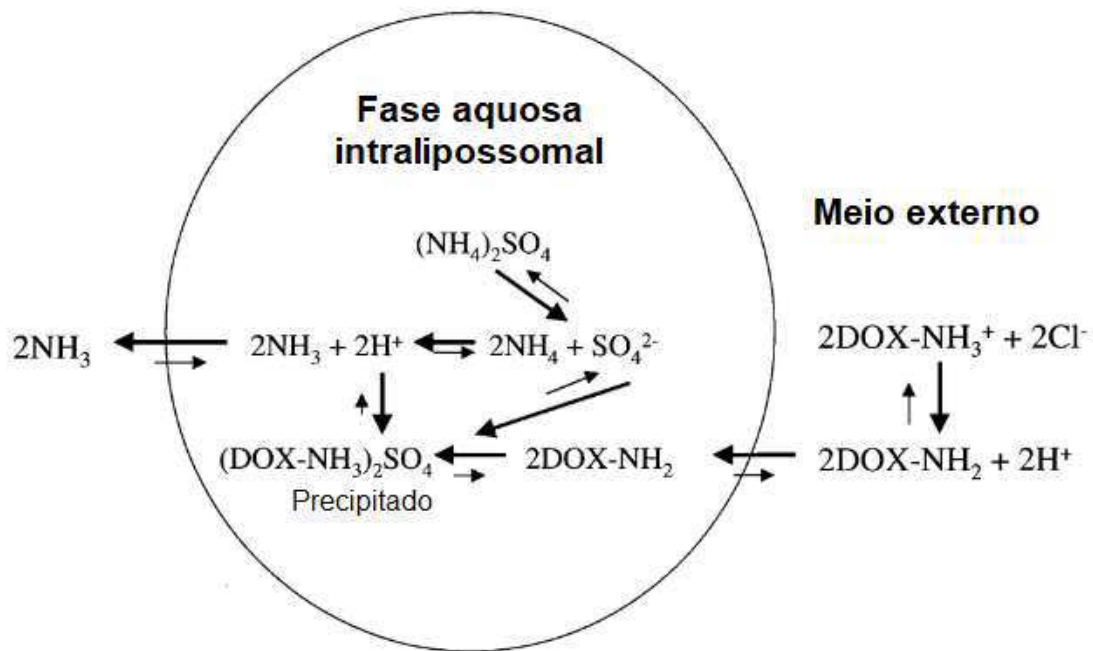
Outro exemplo de vantagem com o uso de nanopartículas utilizadas no tratamento do câncer é dado pela peguilação, que consiste na ligação covalente de cadeias de polietilenoglicol na superfície de proteínas, peptídeos, fosfolipídeos e fármacos (PASUT; SERGI; VERONESE, 2007). Este processo de conjugação apresenta várias vantagens entre elas o aumento de solubilidade, aumento da meia-vida do fármaco no organismo, a diminuição da

degradação por enzimas metabólicas e a redução da imunogenicidade (VERONESE; PASUT, 2005). Desta maneira, a peguilação tornou-se uma tecnologia bem estabelecida e é usada para melhorar a estabilidade, a solubilidade e biodisponibilidade de fármacos (PASUT; SERGI; VERONESE, 2008).

Em 1993, foi aprovado o primeiro medicamento para o câncer baseado na nanotecnologia, por um grande órgão regulador. O SMANCS (poli(estireno-co-anidrido maleico)-neocarzinostatina) é um conjugado de uma proteína que apresenta ação antitumoral. Esse conjugado mostrou promover maior circulação e acumulação no tecido tumoral que a proteína livre, tendo sido aprovado para tratamento de carcinoma hepatocelular pelo Ministério da Saúde do Japão (MAEDA, 2012).

Em 1995, nos Estados Unidos, uma formulação lipossomal de doxorubicina foi aprovada para tratamento de Sarcoma de Kaposi associado à infecção por HIV e câncer de ovário em estado avançado, o Doxil[®]. A nanoencapsulação da doxorubicina em lipossomas diminuiu seus efeitos adversos, aumentou seu tempo de circulação e a entrega do fármaco no tumor foi melhorada (BARENHOLZ, 2012; SEYNHAEVE *et al.*, 2013). O Doxil[®] é um nanofármaco que apresenta a doxorubicina encapsulada em lipossomas, por meio da técnica de gradiente de sulfato de amônio. A DOX é capaz de atravessar a membrana lipossomal por difusão passiva e atingir o seu interior aquoso, onde interage com os íons sulfato, formando sulfato de doxorubicina, que é um sal insolúvel. Com isso, há geração de um gradiente que permite a encapsulação de praticamente toda a quantidade de moléculas de DOX (BARENHOLZ, 2001). A figura 2 representa a encapsulação da doxorubicina pela técnica descrita.

Figura 2 - Representação esquemática da encapsulação de DOX em lipossomas.



Fonte: adaptado (BARENHOLZ, 2001)

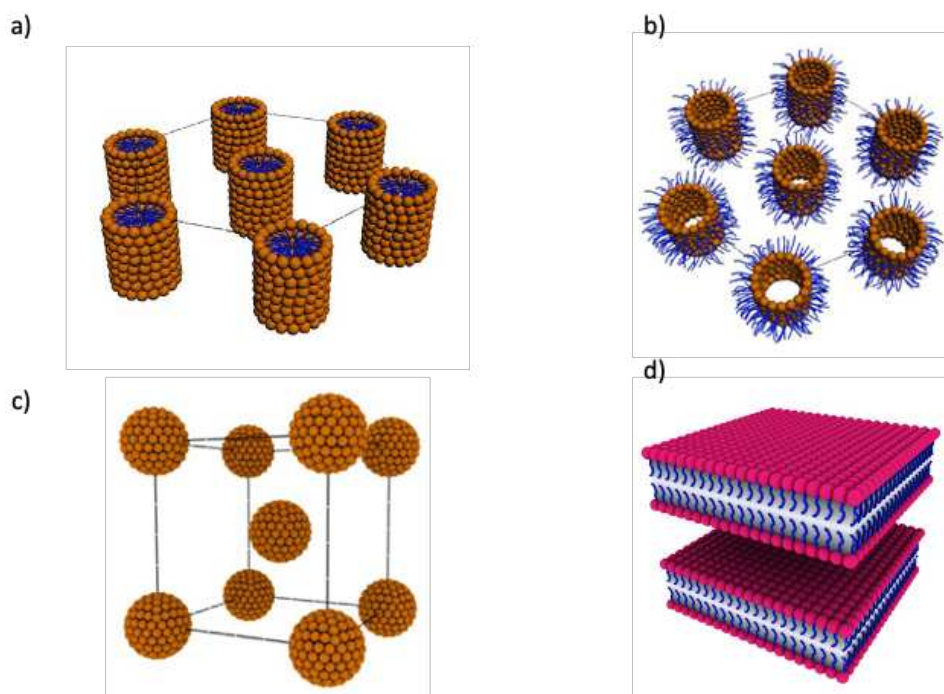
Com relação a estudos de encapsulação de DOX, Mitra *et al*, 2001, observou que nanopartículas de 100nm contendo DOX favoreceram a permeabilidade e o efeito de retenção, conforme observado na maioria dos tumores sólidos. Esse efeito foi associado a farmacodinâmica da DOX conjugada a nanopartícula que, atuou aumentando o tempo de circulação e sua concentração no sítio tumoral. Para um encapsulamento eficiente em micelas, a DOX é geralmente desprotonada, o que remove a carga positiva e aumenta a hidrofobicidade da molécula de DOX. Verificou-se que nanopartículas contendo DOX tiveram seu acúmulo no citoplasma da célula, mas não penetraram no núcleo (MOHAN *et al*, 2010).

3.4 Cristais líquidos

Cristais líquidos são os estado da matéria entre o estado sólido cristalino e o líquido, são estruturas ordenadas, com moléculas em uma direção específica, sendo liotrópicos e termotrópicos. Combinam a organização do estado sólido com a fluidez do estado líquido (PETRILLI, *et al*. 2013.). São divididos em três formas líquido-cristalinas: lamelares, hexagonais e cúbicas, a forma que o cristal líquido vai ter depende da composição do sistema

(Figura 3). Por serem altamente viscosos, os cristais líquidos podem atuar na liberação dos fármacos prologando a liberação. Além disso, por ter diferentes características internas e externas, podem formar ligações com fármacos hidro e lipossolúveis (BOYD *et al.*, 2006).

Figura 3 - Estrutura de diversas fases líquido-cristalinas. a) Fase hexagonal direta; b) Fase hexagonal reversa; c) Fase cúbica; d), Fase lamelar.



Fonte: (NETO, 2008)

A diferença básica entre líquidos e cristais sólidos é o estado de ordem; os cristais apresentam ordem posicional e orientacional, enquanto nos líquidos as moléculas se difundem livremente. Os cristais líquidos, por sua vez, caracterizam-se por manter ordem orientacional, com suas moléculas alinhando-se ao longo de uma direção específica, combinado a organização do estado sólido com a fluidez e mobilidade molecular do estado líquido (SINGH, 2000).

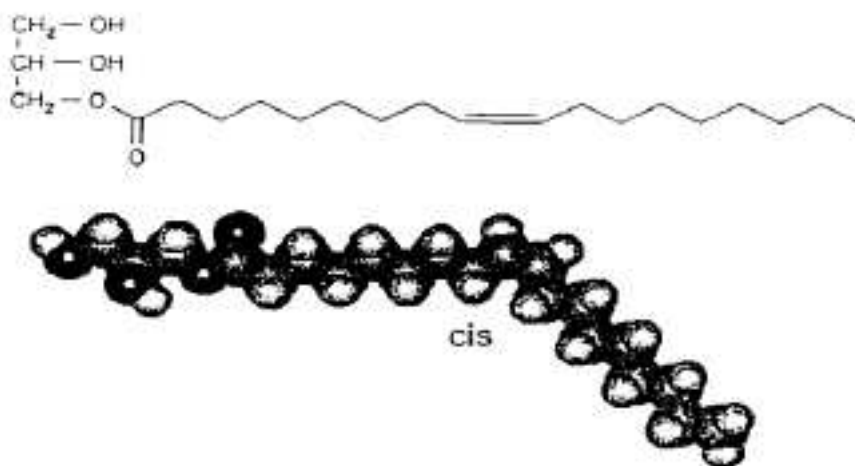
Vários trabalhos reportam a capacidade destes sistemas de sustentar a liberação de fármacos incorporados, apresentando muitas vezes, cinética de liberação controlada por difusão. Além disso, estes sistemas são capazes de incorporar fármacos hidrofílicos e lipofílicos, que podem ser formados em temperatura corporal e apresentam propriedades mucoadesivas, o que prolonga o tempo de permanência do sistema no sítio de ação. Estas propriedades sugerem o uso destes sistemas como veículos interessantes para administração de fármacos em várias vias de administração (BURROWS *et al.*, 1994; GERAGHTY *et al.*, 1996; NIELSEN *et al.*, 1998; GANEN-QUINTANAR *et al.*, 2000; SHAH *et al.*, 2001;

TURCHIELLO *et al.*, 2003; BOYD *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2010; PHAN *et al.*, 2011).

Os cristais de fase hexagonal são compostos por micelas cilíndricas organizadas em um padrão hexagonal. Os canais de água na fase hexagonal são fechados, e nesse tipo de cristal é possível carrear fármacos lipofílicos, hidrofílicos ou anfifílicos. Fármacos hidrofílicos serão localizadas perto da cabeça polar do lipídio ou nos canais de água, enquanto fármacos lipofílicos serão carregados na camada lipídica, e fármacos anfifílicos na interface. Nos últimos anos, a fase hexagonal recebeu atenção considerável devido ao seu potencial como nanocarreador, fornecendo uma liberação controlada do fármaco, bem como forma de proteção para peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos de degradação química e física (CHEN *et al.*, 2014).

A monoleína (MO), ou monoleato de glicerina, apresentada na Figura 4, é um monoglicerídio insaturado de cadeia longa formado pela mistura de glicerídeos do ácido oleico e outros ácidos graxos. É um lipídeo polar, natural, atóxico e biodegradável, com capacidade de formar diferentes tipos de cristais líquidos na presença de água, que tem sido estudado como carreadores de fármacos para diferentes vias de administração, demonstrando capacidade de sustentar a liberação dos fármacos incorporados (ENGSTROM, 1990; LARA *et al.*, 2005). É uma molécula atóxica, biodegradável pelo fato de estar sujeita à lipólise por esterases e biocompatível e, por isso, uma candidata potencial a sistema de liberação de fármacos, útil para várias rotas de administração (TURCHIELLO *et al.*, 2003). Murgia *et al.*, 2009, caracterizaram cristais líquidos de fase lamelar em formulações com monoleína e água, capazes de encapsular moléculas hidrofílicas ou anfifílicas, apresentando estabilidade de dois anos (MURGIA *et al.*, 2009).

Figura 4 - Estrutura química da monoleína.



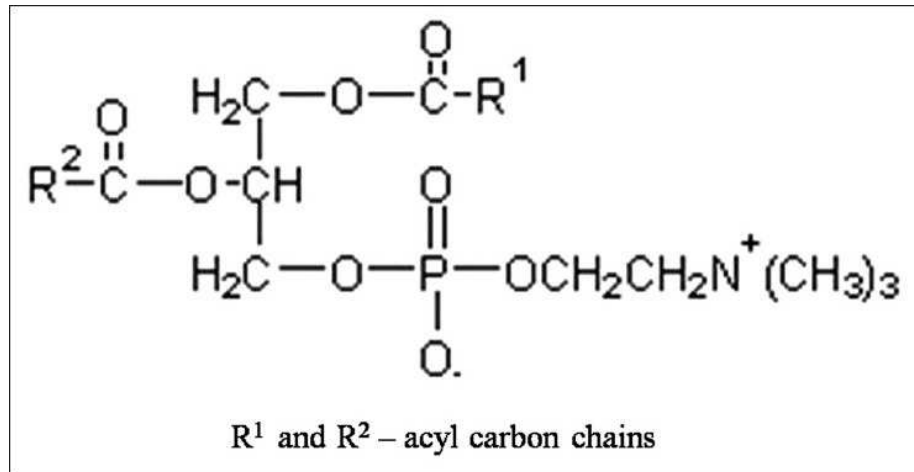
Fonte: (CZELSIK, 1995)

Várias fases líquido-cristalinas podem ser formadas por monoleína em contato com água (fase lamelar, cúbica ou hexagonal) dependendo do teor de água do sistema e da temperatura (Fong *et al.*, 2012). No entanto, a presença de fármacos na formulação pode afetar a formação destes cristais, provocando transições de fases.

PHOSAL[®] é o nome comercial de um composto líquidos baseado em fosfatidilcolina, podendo atuar como solubilizante para componentes que são insolúveis ou pouco solúveis em soluções aquosas ou funcionar como uma fonte de fosfatidilcolina com ácidos graxos essenciais. A fosfatidilcolina (ou lecitina), Figura 5, é um fosfolípídeo muito abundante em plantas e animais, a qual representa o principal constituinte estrutural da maioria das membranas biológicas. Esta pode ser extraída da gema de ovo ou do óleo de soja, se diferenciando pela proporção relativa dos ácidos graxos esterificantes, o que vai determinar um maior número de insaturações nas cadeias carbônicas da lecitina.

Os concentrados de fosfolípídeos não aquosos, (do inglês NAPC) como o PHOSAL[®] representam um conceito de formulação versátil para solubilizar fármacos e suplementos alimentares pouco solúveis em água e aumentar sua biodisponibilidade. Esses compostos são, em princípio, apropriados para uso clínico e para a pesquisa de formulações, possibilitando o desenvolvimento de formas farmacêuticas de forma direta e de baixo custo. Após administração intramuscular ou subcutânea, podem ser úteis como formulações de depósito (HOOGEVEST, 2020).

Figura 5 - Estrutura química das lecitinas.



Muitos esforços têm sido empreendidos para aumentar passiva ou ativamente o encapsulamento de drogas hidrofílicas, como a distribuição direcionada, na qual ligantes são acoplados à superfície do lipossoma para reconhecimento por receptores superexpressos no sítio patológico e liberação desencadeada, em que os lipossomas são especialmente concebidos para responderem a um sinal, como diminuição do pH, aumento da temperatura, campo magnético alternativo externo, ultrassom ou luz, para liberar seu conteúdo aquoso, com consequente aumento da eficácia terapêutica. O medicamento mais estudado para liberação a partir de lipossomas é a doxorrubicina, e nesse sentido uma formulação termossensível promissora, ThermoDox®, está atualmente em testes clínicos. Embora vários fármacos hidrofílicos de pequenas moléculas carregados em lipossomas estejam disponíveis no mercado com alta eficiência de encapsulação, formulações direcionadas ou lipossomas responsivos a estímulos ainda estão sob investigação (ELOY *et al*, 2014).

Nanodispersões de cristal líquido compostas pela combinação de monoleína e Phosal® são escassas ou inexistentes na literatura. Portanto o presente trabalho possui característica inovadora de explorar essa formulação para a entrega da DOX a células humanas de câncer de próstata.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas

- Água obtida por osmose reversa - Marte;
- Água ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q;
- [Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) – *Sigma Aldrich Co.*;
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Neon Comercial;
- Doxorrubicina
- Metanol HPLC 99,9% - J.T. Baker;
- Monoleína – *Sigma Aldrich Co.*;
- Phosal 50 SA+ - Lipoid;
- Poloxamer 407 – Croda;
- RPMI 1640 MEDIUM – *Sigma Aldrich Co.*;
- Solução antibiótica e antimicótica composta por 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL – *Sigma Aldrich Co.*;
- Soro bovino fetal – *Sigma Aldrich Co.*;
- Tripsina-EDTA – *Sigma Aldrich Co.*;

4.1.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos – Phoenix;
- Agitador magnético – Nova Ética;
- Balança Analítica – CPA225D – Sartorius;
- Balança Analítica – XT220A – Precisa;
- Banho ultrassônico – Ultronique;
- Cabine de fluxo laminar – Filterflux;
- Centrífuga – DCS-16-RV – Presvac;
- Centrífuga – Z 206 A – Hermle;
- Espectrofotômetro – U-2910 – Hitachi;

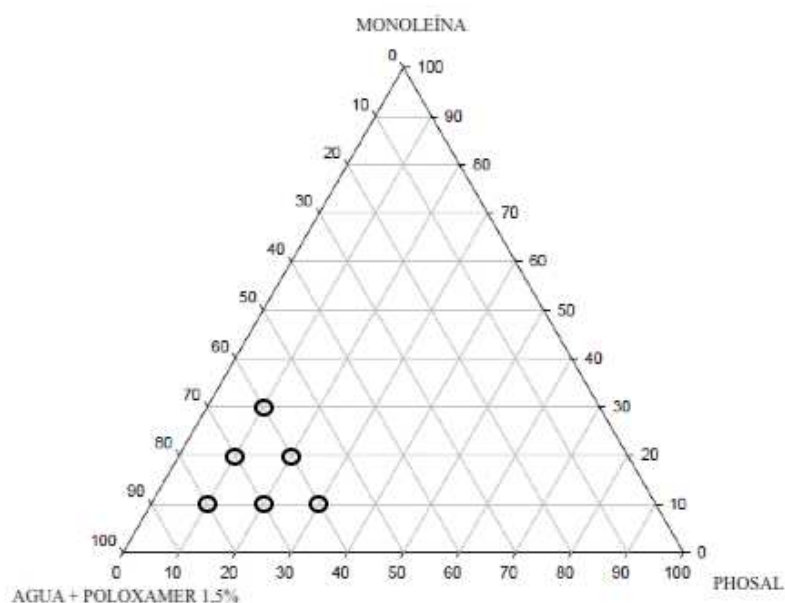
- Incubadora de CO₂ – Panasonic;
- Leitor de microplacas – Elx800 – Biotek;
- Microscópio invertido – AE2000 – Motic;
- Microscópio óptico (modelo BA-200, Motic) equipado com filtro polarizador;
- Sonicador de haste – Q500 – Q-Sonica;
- Zetasize nano ZS – Malvern Instruments.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção dos cristais líquidos

Para o presente trabalho foi escolhido a fase oleosa composta por monoleína (MO) e Phosal[®] (PHO) e na fase aquosa utilizamos solução aquosa de poloxamer 407, 1,5%. As proporções foram definidas de acordo com o diagrama de fases (Figura 6).

Figura 6 - Diagrama de fases, relacionando as variáveis de proporção de monoleína, Phosal e solução aquosa contendo poloxamer (1,5%).



Fonte: elaborado pelo autor

4.2.2 Obtenção da solução aquosa de poloxamer (1,5%)

Primeiramente preparou-se uma solução de água contendo poloxamer (1,5%) como fase aquosa dos cristais líquidos, adicionando-se 0,75g de poloxamer 407 em 49,25ml de água destilada em um béquer. Essa solução foi levada a agitador magnético em banho de gelo por 1 hora, a fim de solubilizar o poloxamer.

4.1.2 Preparo dos cristais líquidos

As formulações dos cristais líquidos preparados são compostas por:

Tabela 1 - Composição dos cristais líquidos.

FORMULAÇÃO	MO (%)	PHO (%)	FASE AQUOSA (%)
A	30	10	60
B	20	10	70
C	20	20	60
D	10	10	80
E	10	20	70
F	10	30	60

Como a fase oleosa escolhida é líquida a temperatura ambiente não foi necessária a etapa de fusão. Primeiramente foi adicionado em um recipiente de vidro a fase oleosa da formulação, obedecendo sempre a ordem da maior proporção para a menor proporção e por último a fase aquosa. As formulações foram produzidas com massa final de 3g. Os sistemas permaneceram em repouso por 24 horas para equilíbrio entre fase aquosa e oleosa (PETRILLI, *et al.* 2013).

4.3 Preparo das nanodispersões de doxorrubicina

Para a obtenção das nanodispersões de doxorrubicina foram escolhidas três concentrações do fármaco, 1; 2,5 e 5 mg, cujas quantidades foram dispersas tanto na fase aquosa (FA), como na fase oleosa (FO) dos cristais líquidos.

Para as dispersões de doxorubicina na fase aquosa pesou-se a quantidade de doxorubicina determinada, adicionou-se a um falcon de 15 ml contendo a solução de água + poloxamer 1,5%. Essas soluções foram agitadas em vórtex e levadas a banho ultrassônico por 10 minutos, a fim de dissolver todo o fármaco. Após essa etapa a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa contendo monoleína + Phosal[®] em recipiente de vidro e o sistema foi mantido em repouso por 24h (PETRILLI, *et al.* 2013).

Para as dispersões de doxorubicina na fase oleosa pesou-se a quantidade de doxorubicina determinada, adicionou-se a um recipiente de vidro contendo a fase oleosa composta por monoleína + Phosal[®]. Essas soluções foram agitadas em vórtex e levadas a banho ultrassônico por 10 minutos, a fim de dissolver todo o fármaco. Após essa etapa a fase aquosa composta por água + poloxamer 1,5%, foi vertida sobre a fase oleosa e o sistema foi mantido em repouso por 24 h. Após esse período os cristais líquidos com DOX, tanto na fase aquosa como na fase oleosa, passaram por um processo de sonicação para nanodispersão sob amplitude de 20% por 3, 6 ou 9 minutos, para determinação do tempo mais adequado, em sonicador de haste (Q500 SONICATOR) (PETRILLI, *et al.* 2013).

4.4 Caracterização físico-química dos cristais líquidos e nanodispersões

4.4.1 Avaliação da morfologia dos cristais líquidos por microscopia de luz polarizada

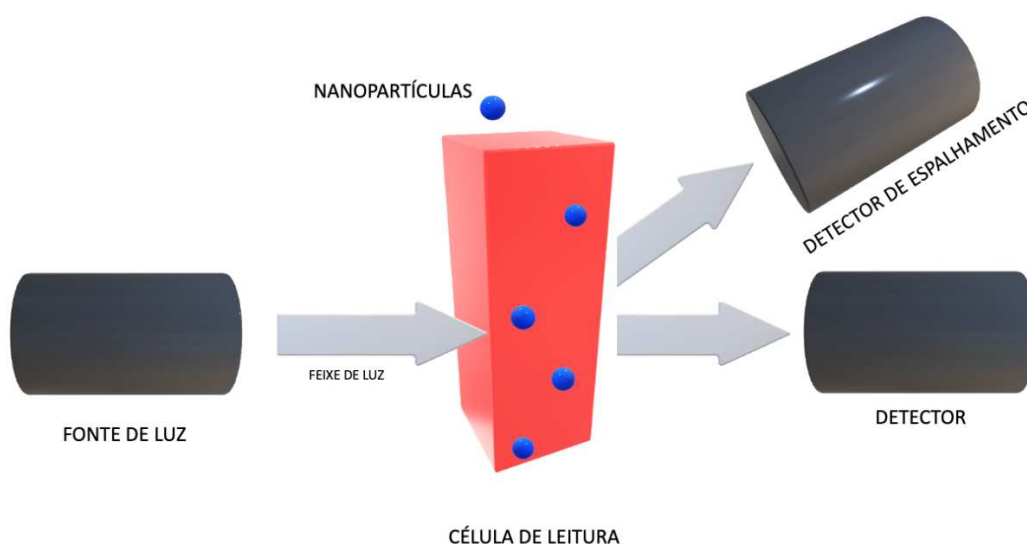
Após o período de 24 horas de repouso as formulações foram retiradas pequenas alíquotas dessas formulações e colocadas em lâminas de vidro e observadas em microscópio óptico com objetiva de 10x, equipado com filtro polarizador e acoplado a uma câmera para obtenção de imagens de alta qualidade das amostras.

4.4.2 Tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI)

O princípio da metodologia utilizada para a determinação do tamanho das nanopartículas e seu índice de polidispersão é o espalhamento dinâmico de luz (DLS, *dynamic light scattering*), representado na Figura 7, no qual partículas suspensas em meio líquido são iluminadas por um laser monocromático em um detector de fótons. Em razão do movimento browniano das nanopartículas, a intensidade da luz espalhada detectada ao longo do tempo é

correlacionada ao tamanho das partículas e suas populações. Foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) (CRUCHO e BARROS, 2017).

Figura 7 - Esquema da técnica de espalhamento dinâmico de luz para caracterização de tamanho de partícula e índice de polidispersão.



Fonte: elaborado pelo autor

4.4.3 Análise da carga superficial

Para a análise de superfície das partículas dada pelo potencial zeta foi utilizada a técnica de microeletroforese, como equipamento *Zetasizer Nano*. Para a medição das amostras torna-se necessário realizar a diluição de proporção 1:100 em KCl 1 mM e logo após inserir na cubeta própria do equipamento.

4.5 Validação do método analítico por espectrofotometria para quantificação de doxorubicina em nanodispersões de cristais líquidos

O método analítico empregado para quantificação da doxorubicina em nanodispersões líquido cristalinas foi o espectrofotométrico. Os parâmetros avaliados foram; linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação conforme preconizado na RDC 166 de 24 de julho de 2017 da ANVISA (BRASIL, 2017). Para diluição da amostra foi utilizado metanol, e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 495nm (The International Pharmacopoeia, 2008).

4.5.1 Preparo da solução mãe

Utilizando luz amarela, pois a doxorubicina é fotossensível, foi pesado em papel filtro 5mg de doxorubicina pura e transferida para balão volumétrico de 5ml, onde foi adicionado metanol, em capela, sem completar o menisco. Essa solução foi levada a banho ultrassônico por 10 minutos, depois o menisco foi aferido e a solução foi filtrada em filtro de politetrafluoretileno (PTFE), 0,45 μm . Esta solução mãe tem a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

4.5.2 Preparo da solução de trabalho de 50 $\mu\text{g/mL}$

A partir da solução mãe, retirou-se uma alíquota de 500 μL utilizando micropipeta monocanal e transferiu-se para balão volumétrico de 10 ml completando o volume com metanol. Esta solução foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos e transferida para tubo falcon de 15 ml. Obteve-se então uma solução de trabalho na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$.

4.5.3 Preparo das soluções da curva de calibração

A partir da solução mãe e da solução de trabalho, realizaram-se cálculos para determinar os volumes necessários para a obtenção das concentrações de doxorubicina utilizada na curva, que foram 50, 40, 30, 20, 10, 5,0, 1,0 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 2 - Concentrações de doxorubicina empregadas na curva analítica

Concentração	Alíquota Solução Estoque (1000 $\mu\text{g/mL}$)	Alíquota Solução Trabalho (50 $\mu\text{g/mL}$)
1,0 $\mu\text{g/mL}$	-	100 μL

5,0µg/mL	-	500µL
10µg/mL	-	1000µL
20µg/mL	100µL	-
30µg/mL	150µL	-
40µg/mL	200µL	-
50µg/mL	250µL	-

Fonte: elaborado pelo autor

As diluições foram feitas em capela, utilizando metanol como solvente e balão volumétrico de 5mL. Todas as diluições foram submetidas a agitação em vórtex por 30 segundos, transferidas para tubos falcon de 15 mL e levadas a banho ultrassônico por 10 minutos. As diluições foram feitas em triplicata, sendo também realizadas por mais de um operador.

4.5.4 Linearidade

As soluções preparadas em triplicata foram submetidas a leitura em espectrofotômetro, utilizando metanol como branco e comprimento de onda de 495 nm, de acordo à farmacopeia internacional. Após a leitura do branco (metanol) as soluções foram homogeneizadas e levadas a cubeta para leitura do espectrofotômetro. As leituras foram feitas em triplicata e foram obtidos os valores de absorbância de cada solução para confecção da curva analítica. Destas absorbâncias se pode obter o coeficiente angular e linear da curva. Foram também calculados o desvio padrão de cada análise (DP), desvio padrão do intercepto e a inclinação da curva analítica.

4.5.5 Limite de detecção (LD)

O Limite de detecção do método é definido como a menor quantidade ou concentração de analito em uma amostra que pode ser detectada, com 99% de confiança, mas não necessariamente quantificada. O limite de detecção foi calculado com base na obtenção de três curvas analíticas do fármaco, fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. A fórmula usada para o cálculo está representada na equação:

Equação 1 – Limite de detecção (LD)

$$LD = \frac{3,3 * \delta}{IC}$$

Onde: δ = desvio padrão do intercepto; IC = inclinação da curva analítica.

4.5.6 Limite de quantificação (LQ)

O Limite de Quantificação é a menor quantidade ou concentração de analito que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão. O limite de quantificação foi calculado com base na obtenção de três curvas analíticas do fármaco, fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. A fórmula usada para o cálculo está representada na equação:

Equação 2 – Limite de quantificação (LQ)

$$LQ = \frac{10 * \delta}{IC}$$

Onde: δ = desvio padrão do intercepto; IC = inclinação da curva analítica.

4.5.7 Precisão intra e interday

Para se obter a precisão da curva, foram lidas as concentrações definidas em triplicata, se obtendo desvio padrão da concentração real. A precisão é expressa através do desvio padrão relativo (DPR), obtido pela equação:

Equação 3 – Precisão.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde: DP = desvio padrão; CMD = concentração média determinada.

Essas leituras foram realizadas tanto no mesmo dia como em dias diferentes, empregando diferentes analistas.

4.5.8 Exatidão

Soluções contendo a nanodispersão branco foram contaminadas com DOX em três níveis de concentração, (5,0; 25,0; 50,0 µg/mL), para avaliação da exatidão. Todas as soluções foram feitas em triplicata, utilizando metanol como solvente, e foram levadas a banho ultrassônico por 10 minutos para se romperem as nanopartículas e filtradas em filtro PTFE 0,45 µm. As amostras foram lidas em triplicata, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 495 nm, sendo metanol usado como branco. Para determinar exatidão foi avaliado o grau de concordância entre os resultados obtidos em relação ao valor teórico que é estimado a partir da equação da reta, essa concordância é expressa conforme o cálculo de recuperação, descrito na equação a seguir:

Equação 4– Exatidão

$$Recuperação = \frac{Concentração\ média\ real}{Concentração\ teórica} * 100$$

4.6 Determinação da eficiência de encapsulação de doxorubicina

Para a obtenção das amostras para determinar a concentração de doxorubicina livre, pipetou-se 1mL da nanodispersão em tubo Amicon 50kDa (método indireto de avaliação de eficiência de encapsulação, baseado na ultrafiltração) previamente lavado com água MilliQ e centrifugou-se a 3000rpm por 30 min. Depois pipetou-se 300µL do centrifugado e diluiu-se com 2700µL com metanol, em tubo falcon. Para obter a concentração de doxorubicina total experimental se realizou um cálculo para determinar a diluição necessária para se ter uma concentração teórica de 30µg/mL, diluindo a nanodispersão em balão volumétrico de 10ml com metanol e submetendo a banho ultrassônico por 15 minutos para romper a nanodispersão e filtradas em filtro PTFE. Em seguida, as absorbâncias das amostras foram mensuradas em comprimento de onda 495 nm. Os resultados foram plotados na equação da reta obtida a partir

da curva de calibração do fármaco. O cálculo da porcentagem de encapsulação é então representado por fórmula matemática:

Equação 5- Eficiência de encapsulação (EE%)

$$= \frac{\text{concentração de doxorubicina total experimental} - \text{concentração de doxorubicina livre}}{\text{concentração de doxorubicina total experimental}} \times 100$$

4.7 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* em células de câncer de próstata

Para avaliar a citotoxicidade da formulação da nanodispersão de doxorubicina foi utilizado um modelo de linhagem celular humana (câncer de próstata), PC3. As células foram cultivadas em meio RPMI suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1% de solução de antibiótico/antimicótico, a 37°C com 5% de CO₂, de acordo a recomendações da *American Type Culture Collection* (ATCC). Atingindo a confluência desejada de 90% as células seguiram para o protocolo de tripsinização e foram semeadas em placas de 96 poços (25.000 células por poço). Após um período de 24h de incubação a 37°C, as placas foram retiradas da estufa para a aplicação dos grupos experimentais. Neste processo o meio completo foi removido, os poços lavados com solução salina e os tratamentos (solução de doxorubicina, nanodispersão de doxorubicina e nanodispersão branco) foram aplicados. Para o tratamento com doxorubicina utilizou-se as concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; e 100 µM que foram obtidas através da diluição do grupo em meio RPMI completo. Para os tratamentos com a nanodispersão de doxorubicina foram utilizadas as concentrações de 0,01; 0,1; 1; 5; 10; 20 e 100 µM, também diluídas com meio RPMI completo. As placas foram incubadas por 72h a 37°C. Passadas 72 h as placas tiveram os tratamentos descartados e foram lavadas com salina. Foi aplicado 170µL de meio RPMI com 30µL de brometo de 3- [4,5-42 dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio (MTT) 2,5mg/ml, e foram incubadas por 4h a 37°C. Após esse tempo, descartou-se a solução do meio de cultura com MTT e o dimetil sulfoxido (DMSO) foi aplicado nos poços para dissolver os cristais de formazan, um cristal de cor púrpura que é insolúvel em água. A absorbância foi lida em 570 nm e a concentração capaz de matar 50% das células (IC₅₀) foi obtida através das curvas de concentração - efeito, considerando a densidade óptica do controle negativo (células não tratadas) como 100% (GONTIJO *et al.*, 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos cristais líquidos

Neste trabalho, foram estudadas formulações baseadas em MO:PHO:FA para formação de géis em excesso de água, anisotrópicos ao campo de luz polarizada. A adição de excesso de fase aquosa contendo o tensoativo poloxamer 407 é necessária para promover a estabilização estérica das partículas após a etapa de nanodispersão dos sistemas (GUSTAFSSON *et al.*, 1997; LARSSON, 2000).

Apesar de todas as formulações apresentarem cristais líquidos de fase hexagonal, caracterizados por estriações em microscopia de luz polarizada, optamos por seguir com a Formulação B, composta por MO:PHO:FA, na proporção de 20:10:70, para a continuidade das caracterizações, pois foi a formulação que apresentou cristais bem definidos e em maior quantidade, podendo observá-los por toda a lâmina, em acordo a trabalhos prévios que utilizaram monoleína, obtendo cristais de fase hexagonal (CHEN *et al.*, 2014; PETRILLI, *et al.* 2013) como mostram a figura 8.

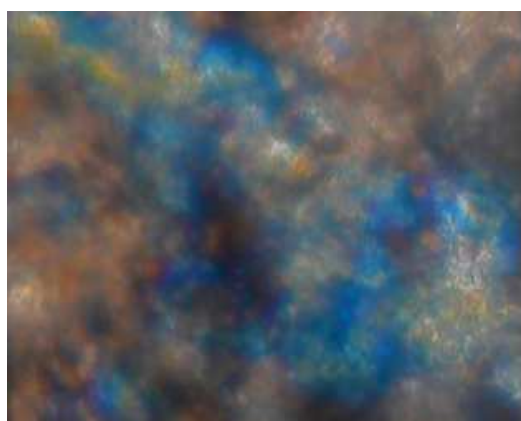
Quando formulações com PHOSAL são diluídas em água, dependendo das composições em relação à proporção de óleo para fosfolípido, formam-se emulsões O/A, misturas de emulsões e lipossomas ou lipossomas. Já foi reportado que as principais características do sistema água, vitamina E, lecitina de ovo (purificada para ser aceitável para injeção intravenosa) e PHOSAL foram determinadas por microscopia óptica e difração de raios X de baixo ângulo. Os resultados mostraram que o cristal líquido lamelar de lecitina de ovo / água foi retido quando a lecitina foi gradualmente substituída por PHOSAL. A vitamina E foi solubilizada nos cristais líquidos lamelares a um nível máximo na faixa de 15-20% por peso. A vitamina E se dispersou no cristal líquido, causando apenas pequenas mudanças estruturais (HOOGEVEST, 2020).

Ativos podem exercer importante influência na formação de cristais líquidos. Por exemplo, em estudo prévio, diferentes mesofases foram obtidas dependendo da concentração de ciclosporina (CysA). CysA a 4% permitiu a formação de fases cúbicas e hexagonais reversas em uma faixa de temperatura de 25–40°C. As aplicações desses cristais de fase hexagonal aumentaram a absorção de CysA em ensaio de absorção em pele. Estes resultados demonstram que os sistemas cristalinos líquidos de monoleína são eficazes na otimização da entrega de peptídeos à pele (LOPES *et al.*, 2006). Cristais líquidos de fase hexagonal, baseados em MO estabilizados por Pluronic F127 foram obtidos a fim de agir como carreador para o formononetina, um agente anticâncer, e tetrafeniletano, um marcador óptico. O estudo

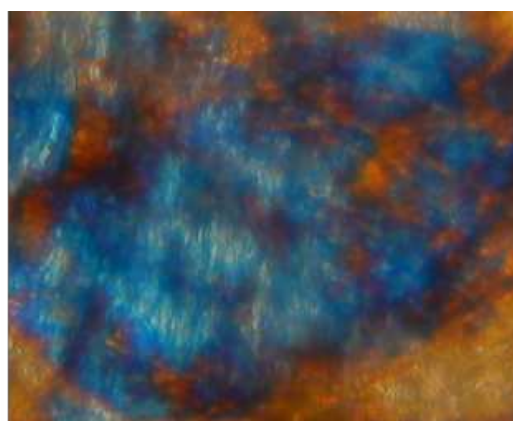
demonstrou que este carreador baseado em cristal líquido inibiu significativamente o crescimento do tumor em um modelo celular de câncer de mama (célula 4T1).

A figura 9 demonstra os cristais líquidos com doxorubicina incorporada, tanto na fase aquosa quanto na fase oleosa, nas concentrações de 1, 2,5 e 5mg. Podemos observar que a incorporação da DOX na fase aquosa favoreceu a formação de cristais líquidos de fase hexagonal, sendo a concentração de 1mg a que ficou menos alterada em relação ao cristal líquido sem fármaco. Com a incorporação da DOX na fase oleosa se observa características de cristais diferentes em relação a formulação sem fármaco.

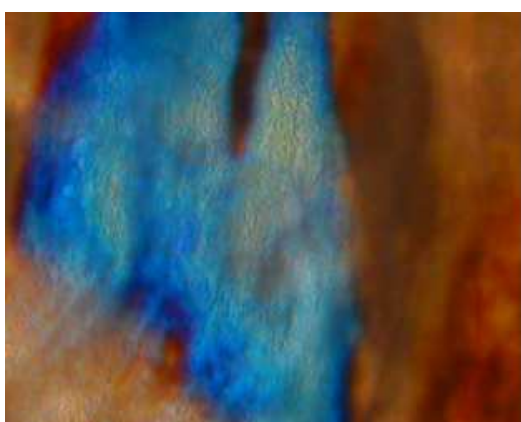
Figura 8 – Fotomicrografias de formulações por microscopia óptica de luz polarizada do bulk gel (lente de 10 X).



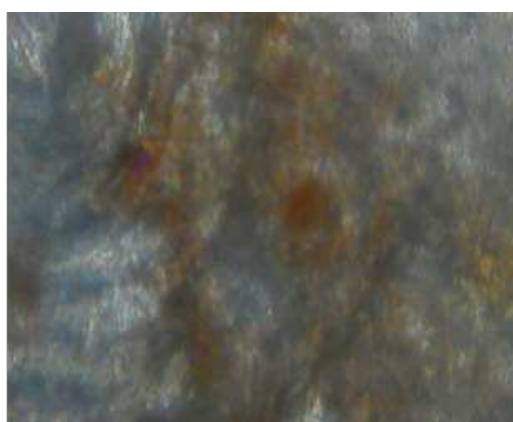
Formulação A



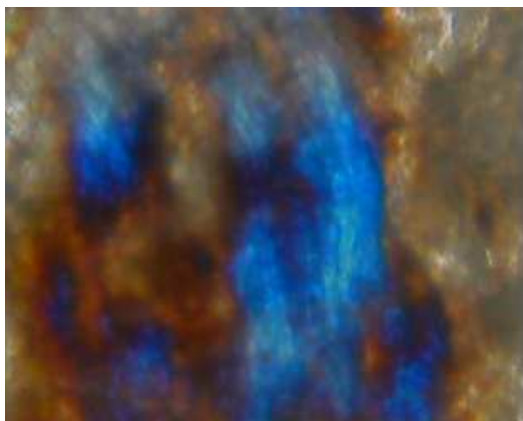
Formulação B



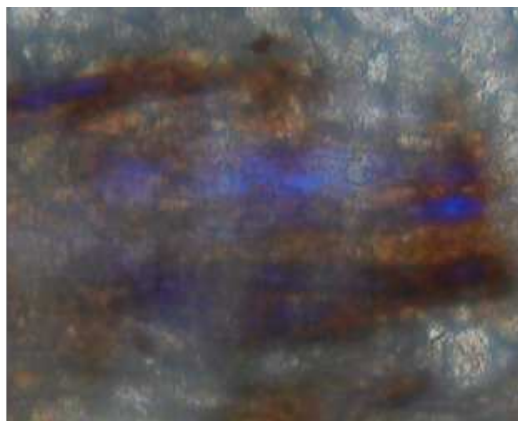
Formulação C



Formulação D

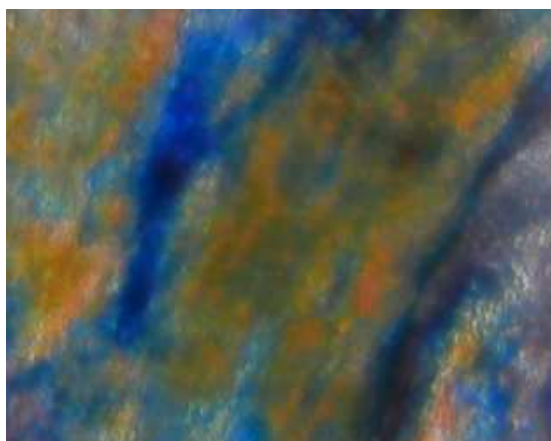


Formulção E

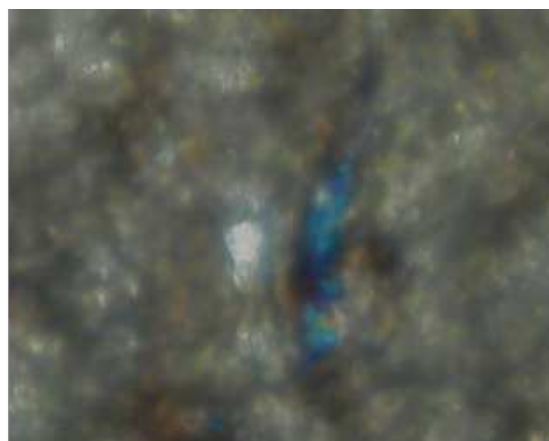


Formulção F

Figura 9 - Fotomicrografias de formulações contendo DOX por microscopia óptica de luz polarizada do bulk gel (lente de 10 X).



1mg FA



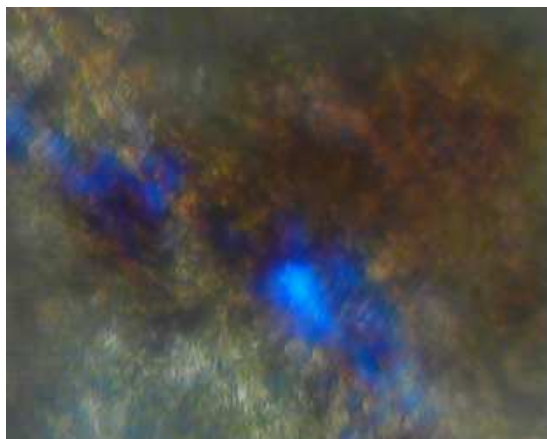
1mg FO



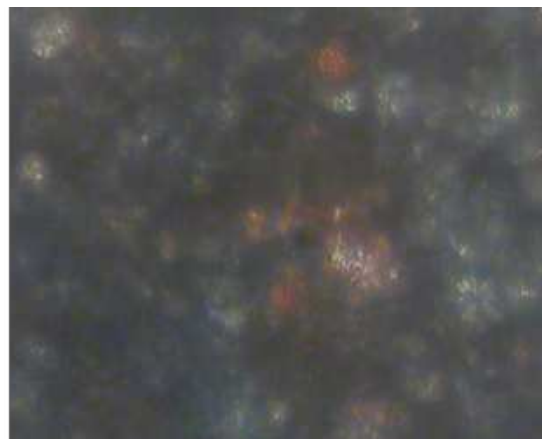
2,5mg FA



2,5mg FO



5mg FA



5mg FO

5.2 Análise de tamanho de partículas, carga superficial e índice de polidispersividade

As tabelas 3, 4 e 5 apresentam os dados experimentais e seus respectivos desvios padrão de tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta. Essas características são importantes quando se diz respeito ao desenvolvimento de nanocarreadores. O tamanho da partícula e sua distribuição estão entre os fatores mais críticos que influenciam as interações célula-nanomaterial, pois quanto menor o tamanho de partícula, maior a penetração celular, como observado em estudo com nanopartículas de prata em células humanas de fígado, onde nanopartículas de 10 nm liberaram 24% mais prata que as nanopartículas maiores (GLIGA *et al*, 2014).

Ao empregar o método de espalhamento dinâmico de luz é possível obter também o índice de polidispersão (PDI), que indica a homogeneidade dos grupos de tamanhos das nanopartículas. Um valor de PDI próximo a 0 significa que o sistema tem grupos que indicam uma distribuição de tamanho estreita, já próximo a 1 uma distribuição ampla de tamanho (WU *et al.*, 2011).

Outro parâmetro importante que está expresso na mesma tabela é o potencial zeta. O uso desse método objetiva determinar a carga superficial e estabilidade da suspensão coloidal. O princípio básico envolve a medição da mobilidade eletroforética de partículas carregadas sob um potencial elétrico aplicado, isso faz com que as partículas migrem para carga oposta de acordo com a magnitude de sua carga. Essa migração faz com que a frequência do

espalhamento de luz seja alterada, sendo identificada pelo feixe de luz que passa concomitantemente na cubeta. Além disso possibilita estudar a interação partícula-partícula e a possibilidade de agregação causando instabilidade na formulação (BRAR *et al.*, 2011). Em outras palavras, o que está sendo avaliado são as cargas superficiais de cada nanopartícula e como isso afeta a formulação como um todo. É descrito que valores de potencial zeta com módulo maior que 30 são ideais para a estabilização eletroestática de nanopartículas (BENITA; LEVY, 1993).

Tabela 3 - Caracterização de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta das nanopartículas (formulação B) com seus respectivos valores de desvio padrão (DP).

Tempo de sonicação (min)	Tamanho \pm DP (nm)	PDI \pm DP	Potencial Zeta \pm DP (mV)
3	300,6 \pm 1,415	0,395 \pm 0,013	-13,2 \pm 0,252
6	315,7 \pm 2,193	0,410 \pm 0,030	-16,6 \pm 0,557
9	318,2 \pm 5,811	0,421 \pm 0,031	-15,6 \pm 0,971

Fonte: elaborada pelo autor

Na tabela acima temos os valores referentes a formulação B, sem fármaco, em diferentes tempos de sonicação. Os valores são semelhantes entre si, tanto em tamanho, PDI e potencial zeta. Escolhemos prosseguir com um tempo de sonicação de 3min, por apresentar valores mais baixos dentre os parâmetros avaliados do que os demais tempos. Como evidenciado nas tabelas 4 e 5, estudamos a encapsulação de DOX na fase aquosa e fase oleosa, para otimização da eficiência de encapsulação, tendo em vista a natureza anfifílica do fármaco.

Cristais líquidos compostos de ácido oleico e fosfatidilcolina de soja como fase oleosa e Procetyl® como tensoativo, em excesso da fase aquosa contendo poloxamer, já foram reportados. O pH da fase aquosa em 7,4 levou a uma redução das regiões de transição de fase dentro do diagrama ternário. As formulações preparadas com a fase aquosa a 85% foram selecionadas e após sonicação as formulações apresentaram tamanho nanométrico em torno de 100 nm, baixo índice de polidispersividade e potencial zeta levemente negativo (TREVIZAN, *et al* 2021).

Ademais, outro estudo mostrou que soluções concentradas de moléculas de colágeno tipo I resultaram em nanopartículas com tamanho de 300 nm, com valor de PDI elevado, em acordo aos achados do presente estudo. Enquanto as soluções não sonicadas permanecem isotrópicas, as soluções sonicadas se transformam após algumas horas em uma

fase cristalina líquida, bem reconhecível na microscopia de polarização (GIRAUD-GUILLE *et al*, 1989).

Com relação à fase de incorporação de DOX, Wang *et al*, 2019, estudaram cristais líquidos de ácido oleico, DMSO e β -caseína, com a incorporação de DOX em fase aquosa. O tamanho de partículas observado variou de 10 a 100 nm (WANG *et al*, 2019). Na mesma linha de raciocínio, DOX foi adicionada na fase aquosa de formulação de cristais líquidos a base de derivado do perileno (PERC11). O tamanho de partícula obtido foi de 60~70 nm (SPILLMANN *et al*, 2014).

Ressalta-se que estudos com formulações parecidas com a abordada aqui são limitados na literatura, demonstrando a inovação buscada com o presente trabalho.

Tabela 4 – Caracterização de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta das nanopartículas com doxorubicina dispersa na fase aquosa, com seus respectivos valores de desvio padrão (DP).

Concentração DOX (mg)	Tamanho \pm DP (nm)	PDI \pm DP	Potencial Zeta \pm DP (mV)
1	344,9 \pm 4,133	0,396 \pm 0,015	-14,7 \pm 0,321
2,5	313,5 \pm 4,454	0,388 \pm 0,018	-9,03 \pm 0,614
5	320,9 \pm 4,922	0,423 \pm 0,002	-8,42 \pm 0,080

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 5 – Caracterização de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta das nanopartículas com doxorubicina dispersa na fase oleosa, com seus respectivos valores de desvio padrão (DP).

Concentração DOX (mg)	Tamanho \pm DP (nm)	PDI \pm DP	Potencial Zeta \pm DP (mV)
1	345,3 \pm 4,400	0,427 \pm 0,015	-14,3 \pm 0,493
2,5	306,6 \pm 1,457	0,427 \pm 0,007	-11,3 \pm 0,361
5	323,5 \pm 3,478	0,423 \pm 0,023	-7,6 \pm 0,195

Fonte: elaborada pelo autor

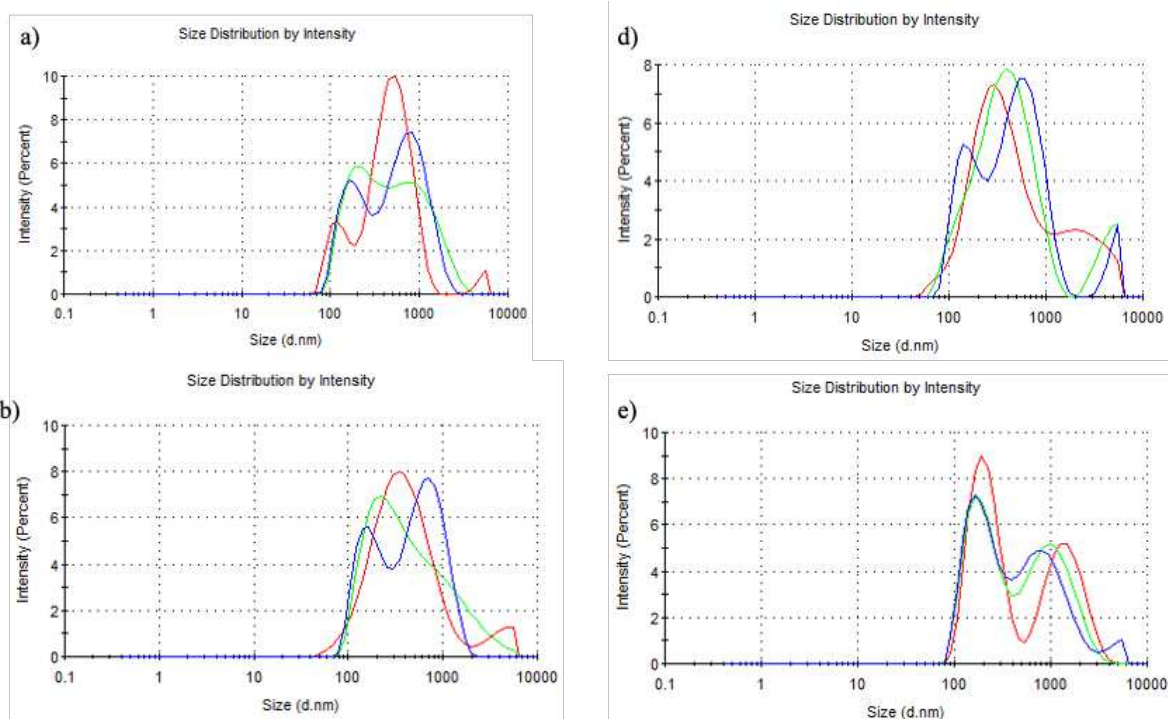
O tamanho de partículas das nanodispersões com DOX se manteve próximo aos valores da nanodispersão sem o fármaco. O intervalo de tamanho de partícula após a

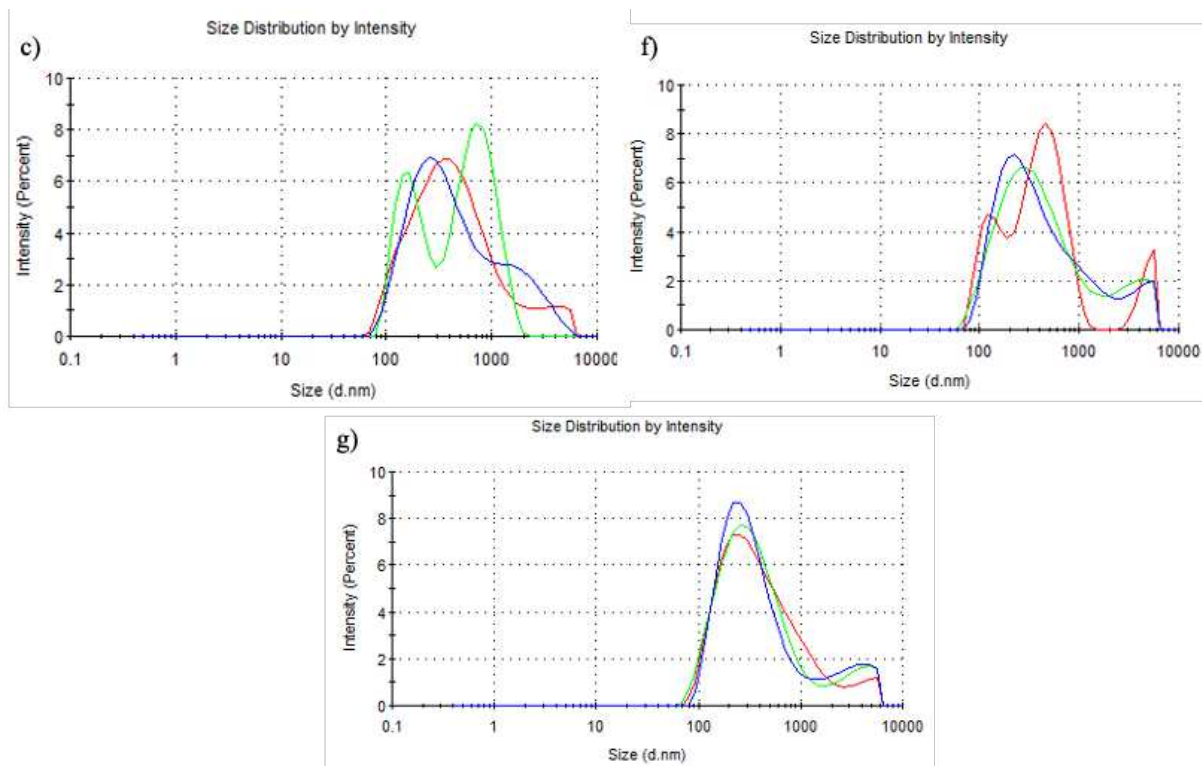
encapsulação do fármaco variou entre $306,6 \pm 1,457$ e $345,3 \pm 4,400$ nm, ao passo que para a nanodispersão branco foi obtida com o tamanho de $300,6 \pm 1,415$ nm.

Ao analisar os valores de PDI das tabelas nota-se que em todos os tempos de sonicação as formulações apresentaram valores mais próximos do 0.4, sendo o tempo de 3 minutos o valor mais baixo. Na análise da nanodispersão com fármaco, em ambas as fases os valores de PDI também se apresentaram dentro dessa faixa, sendo as formulações com a doxorrubicina introduzida na fase aquosa apresentaram menor valor médio de PDI em relação as formulações com o fármaco introduzido na fase oleosa. Na Figura 10 pode-se observar a distribuição de tamanho das nanodispersões, e fica claro a natureza polidispersa. Nesse sentido, a inclusão de lipídeo disteóilfosfatidiletanolamina peguilado (DSPE-PEG) em etapas futuras, poderia ser útil para reduzir a polidispersividade dos sistemas, além de melhorar a farmacocinética considerando uso injetável da formulação. Ademais, outro aspecto relevante seria o estudo de formulação contendo menos lipídios para reduzir tamanho e polidispersão, o que será investigado futuramente.

A incorporação do fármaco, tanto na fase aquosa como na fase oleosa influenciaram no aumento do potencial zeta, sendo esse aumento proporcional a concentração de fármaco. Podemos atribuir isso a molécula de DOX ser positiva. Mussi *et al*, 2013, obtiveram valores de potencial zeta negativos ao analisar nanopartículas lipídicas sólidas compostas por behenato de glicerila, Tween 80, hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante, ácido docosa-hexaenóico (DHA) stearamina (STE), e DOX na fase oleosa e EDTA e água ultrapura na fase aquosa. O valor obtido de potencial zeta foi de -13 ± 4 mV. Esse valor negativo pode ser atribuído a cargas opostas de STE e DHA. Na verdade, STE é catiônico e o DHA é aniônico. Na concentração com DHA a 0,4%, foi observado esse valor negativo. Para o presente estudo, podemos atribuir essa carga superficial negativa aos componentes da fase oleosa, monoleína e Phosal®, visto que a adição de DOX causou uma diminuição nesse potencial negativo. Os valores do potencial zeta se mostraram negativos, e longe do valor ideal para estabilidade da formulação, que é acima de 30 (BENITA; LEVY, 1993). Logo, tendemos a considerar que as formulações podem ser instáveis, entretanto seriam necessários estudos para determinar a estabilidade coloidal, bem como a investigação do efeito da liofilização.

Figura 10 – Gráficos de tamanho de partícula. A) Nanodispersão + DOX 1mg (FA); b) Nanodispersão + DOX 2,5mg (FA); c) Nanodispersão + DOX 5mg (FA); d), Nanodispersão + DOX 1mg (FO); e) Nanodispersão + DOX 2,5mg (FO); f) Nanodispersão + DOX 5mg (FO); g) Nanodispersão (branco) com tempo de sonicação de 3 min.



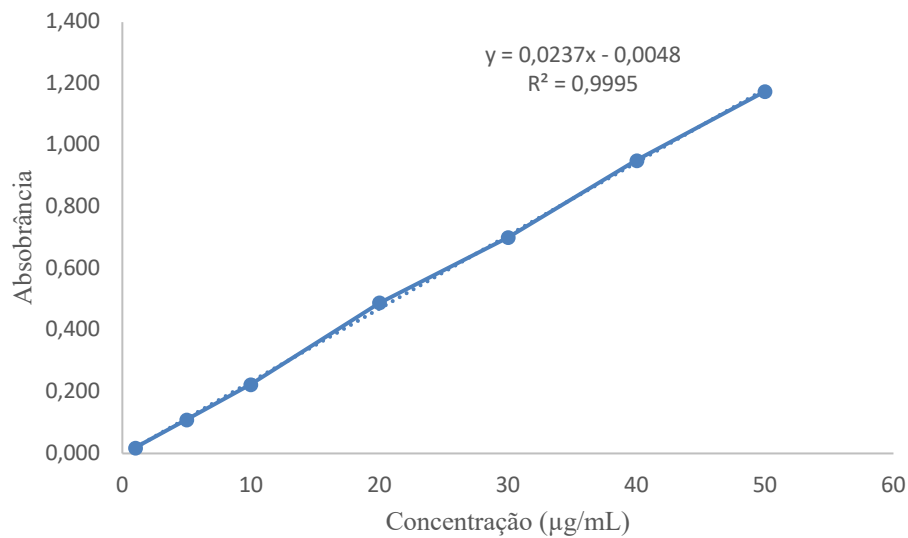


Fonte: elaborada pelo autor

5.3 Validação da curva de calibração de doxorrubicina

Foram preparadas 3 curvas analíticas contendo as sete concentrações estabelecidas. O resultado da figura 11 denota o gráfico de DOX ($\mu\text{g/mL}$) versus absorbância, construção da curva analítica e avaliação da linearidade.

Figura 11 – Curva de calibração da doxorrubicina.



Fonte: elaborada pelo autor

Os valores de absorbância obtidos mostram um comportamento linear da concentração, o que era o esperado. A equação da reta obtida com a análise de regressão linear foi $y = 0,0237x - 0,0048$. O coeficiente de correlação linear mostrou-se satisfatório ($r^2 = 0,9995$).

O valor de limite de detecção obtido mostra que a quantidade mínima de DOX que pode ser detectada de maneira confiável pelo método é de 1,267 µg/mL. Já o valor de limite de quantificação obtido mostra que a quantidade mínima de DOX que pode ser quantificada de maneira confiável pelo método é de 3,824 µg/mL.

A precisão da curva foi analisada intra e interday, com valores de desvio padrão relativo (DPR) e concentração como mostra a tabela a seguir:

Tabela 6 – Precisão intraday e interday.

CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (µg/mL)	DPR INTRADAY (%)	DPR INTERDAY (%)
5	4,24	4,00
10	1,75	1,75
20	2,99	5,71
30	0,08	7,32
40	0,67	9,18
50	1,13	1,90

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores revelam que o método não tem precisão aceitável no ponto mais baixo da curva, por ser um valor muito próximo do limite de detecção do método, mas a partir da concentração de 5 µg/mL a precisão melhora, com valores de DPR sempre abaixo de 5%. Em relação ao estudo da curva interday a variação foi maior. Isso se deve devido ao ensaio ter sido conduzido em dias diferentes, com operadores diferentes, mas com valores de DPR sempre abaixo de 10%, exceto pelo ponto de concentração mais baixa, que assim como observado na curva de intraday, sofreu muita variação por estar próxima ao limite de detecção do método.

A exatidão mostra que o método é capaz de ser seletivo para o fármaco, não sofrendo interferência dos outros componentes da formulação e permitindo sua recuperação para a quantificação principalmente em concentrações mais elevadas, como mostra a tabela 7.

Tabela 7 – Determinação da exatidão.

[] TEÓRICA (µg/mL)	EXATIDÃO
5	119,66
25	109,16
50	111,63

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Eficiência de encapsulação da doxorrubicina em nanodispersões de cristal líquido

A partir da curva de calibração da doxorrubicina obtida anteriormente foi possível quantificar a porcentagem de fármaco encapsulado na nanodispersão, através da quantificação de DOX na formulação total, e na alíquota livre ultrafiltrada obtida com centrifugação em tubo Amicon 50kDa (método indireto de avaliação de eficiência de encapsulação) (BLATT *et al*, 1968). Aplicando os valores obtidos no experimento na fórmula citada no item 4.5 deste trabalho, podemos obter os valores em porcentagem (%) referentes a eficiência de encapsulação da doxorrubicina em cada uma das formulações analisadas, como mostra a tabela a seguir:

Tabela 8 - Determinação de eficiência de encapsulação (EE%) de DOX em nanodispersões líquido cristalinas.

CONCENTRAÇÃO	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO FA (%)	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO FO (%)
1mg	99,76	95,61
2,5 mg	58,37	34,14
5 mg	6,44	6,45

Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo YE e CHI (2018, v. 83, p. 233-246) “muitos medicamentos têm mostrado biodisponibilidade melhorada, entrega controlada e bioatividade após o encapsulamento bem-sucedido”. Além disso, o transporte para o alvo terapêutico se torna mais eficiente permitindo o uso de moléculas altamente tóxicas, relativamente instáveis e pouco solúveis. A formulação de 1mg apresentou maior EE se comparada com as outras concentrações, mostrando que a quantidade de fármaco interfere diretamente na EE, pois quanto maior a quantidade de doxorrubicina, menor foi a EE.

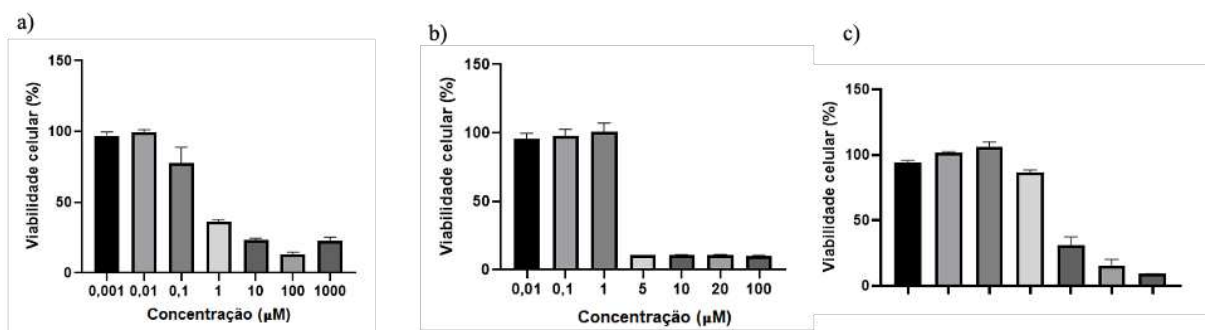
Com relação ao efeito da proporção fármaco/carreador, já foi demonstrado que lipossomas de 1,2-distearoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (DSPC) e colesterol preparados em concentrações de 50, 150 e 160 mg/g de itoprida encapsulada tiveram eficiências de 1,2, 40,2 e 45,1%, respectivamente, enquanto os mesmos lipossomas preparados nas concentrações de 100 e 250 mg/g de ácido gabapentênico teve eficiências de 37,9 e 63,2%, respectivamente. Vale ressaltar que um efeito oposto foi observado quando maiores cargas de fármaco foram empregadas, fazendo com que a eficiência de encapsulação do fármaco diminuísse consideravelmente (ELOY *et al*, 2014).

Outro ponto a ser analisado é a fase de incorporação no fármaco. As análises mostraram que o fármaco incorporado na fase aquosa se mostrou mais eficiente na encapsulação, visto que a doxorrubicina é solúvel em água com o valor de solubilidade de 10mg/ml. Por outro lado, carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de amendoim, Tween 80, trietanolamina, ácido oleico e DOX na fase oleosa e água ultrapura como fase aquosa obtiveram eficiência de encapsulação de 99% (BORGES *et al*, 2017). Os valores de EE% obtidos no presente estudo se mostram em concordância com valores obtidos em estudos similares. Mais uma variável a ser estudada no futuro do projeto é a interferência do pH da

solução na EE% de DOX na fase oleosa, pois uma alteração no pH pode forçar o fármaco a se incorporar melhor na fase oleosa. O cloridrato de doxorubicina se ioniza com facilidade em água. Um ajuste no pH das formulações, de forma a modificar o coeficiente de partição poderia aumentar efetivamente a eficiência de encapsulação na fase oleosa. Para a continuidade do trabalho foi estabelecida a nanodispersão de 1mg incorporada na fase aquosa como formulação ideal para a avaliação da citotoxicidade *in vitro* em linhagem de células de câncer de próstata.

5.5 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* em linhagem celular de câncer de próstata.

Figura 12 - Viabilidade celular com tempo de incubação de 72h; a) Solução de DOX; b) Nanodispersão + DOX; c) Nanodispersão Branco.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 12 apresenta as respectivas viabilidades celulares de cada formulação em diferentes concentrações de DOX ou equivalente, no caso da formulação branco. A solução de doxorubicina se mostrou citotóxica a partir da concentração de 0,1 μM, de forma proporcional à concentração, formando uma curva decrescente da viabilidade celular até a concentração de 100 μM. Nota-se que nas concentrações 0,001 e 0,01 μM inibiram pouco a sobrevivência da célula PC3. A exposição de células PC3 a doxorubicina livre já foi demonstrada provocar um evento oxidativo específico, resultando em um aumento no peróxido de hidrogênio intracelular, causando cototoxicidade nessa linhagem celular (WAGNER *et al*, 2005).

Já no grupo nanodispersão + DOX houve uma morte celular acentuada entre a concentração de 1 e 5 μM, mostrando que esta é uma faixa de concentração a ser explorada, pois a morte celular ocorre neste intervalo. Em comparação a DOX livre houve uma diminuição

mais acentuada na viabilidade celular a partir da concentração de 5 μM , com um nível de morte celular igual em todas as concentrações subsequentes.

O grupo nanodispersão branco foi usado como controle para avaliação da citotoxicidade da nanodispersão sem a presença do fármaco. Nas concentrações de 5 e 10 μM foram encontradas diferenças significativas entre a nanodispersão branco e a nanodispersão contendo doxorrubicina, onde a viabilidade foi de 86,9 e 30,82% para as respectivas concentrações de nanodispersão branco e 11,2 e 11,07% para as respectivas concentrações de Nano + DOX, mostrando o papel citotóxico da doxorrubicina nesse processo. Por outro lado, notou-se atividade citotóxica da nanodispersão sem o fármaco, onde a partir da concentração de 10 μM , a viabilidade celular diminuiu 30,82%, chegando a 15,1% na concentração de 20 de μM .

Do ponto de vista de citotoxicidade da própria formulação, cristais líquidos nanodispersos de fase hexagonal foram consideradas menos tóxicos do que as nanopartículas de fase cúbica. Os ensaios de hemólise seguiram a mesma tendência com dispersões de fase cúbica causando o maior nível de liberação de hemoglobina. O estudo mostrou que a estrutura da mesofase de cristal líquido liotrópico interno de nanopartículas é relevante para a citotoxicidade (TRAN *et al*, 2015).

Essa atividade citotóxica não foi totalmente elucidada até este momento, sendo necessária uma investigação maior sobre este achado, mas deve estar relacionada à própria toxicidade do sistema nanocarreador para a célula PC3. Adicionalmente, o estudo poderá ser realizado futuramente em célula não cancerígena, para avaliação da seletividade de toxicidade. Estudos de captação celular por citometria de fluxo e microscopia confocal poderiam ser interessantes para melhor elucidar o comportamento observado.

Tabela 9 - Valores de IC_{50} das formulações testadas com tempo de incubação de 72hs.

TRATAMENTO	IC_{50} (μM)	DP
Solução de doxorrubicina	1,003	0,185
Nanodispersão de doxorrubicina	2,116	0,233

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 9 mostra os IC_{50} das formulações testadas, sendo os valores próximos para doxorrubicina em solução e encapsulado. Todavia, apesar do ajuste de linearidade para cálculo de IC_{50} ter sido adequado para a solução, o comportamento dose/resposta não mostrou

linearidade adequada para o a nanodispersão, apesar de repetição do ensaio de forma independente. Sendo assim, a avaliação da citotoxicidade na linhagem PC3 de doxorubicina encapsulada em nanodispersões baseadas em monoleína, phosal e solução aquosa de poloxamer 407 é complexa e uma ampla faixa de concentrações e condições de teste deverão ser incluídas no estudo em etapas futuras.

Neste sentido, um estudo prévio mostrou que a encapsulação de doxorubicina em lipossomas compostos de fosfatidilcolina e colesterol resultaram em aumento de IC_{50} , de 23 mg/kg do fármaco livre para 57 mg/kg do encapsulado (TARDI *et al*, 1996). Ademais, micelas formuladas com polietilenoglicol e derivado de ácido oleico + DOX apresentaram maior valores de IC_{50} do que DOX livre, provavelmente devido à menor internalização dos agregados micelares carregados com DOX. A formulação de nanopartículas de ácido oleico + DOX não mostrou um IC_{50} na faixa de concentração medida e teve menor internalização celular do que as outras duas formulações (CUNNINGHAM *et al*, 2018).

6 CONCLUSÃO

Obteve-se sucesso na obtenção de cristais líquidos de fase hexagonal a partir de monoleína, Phosal® e fase aquosa, contendo tensoativo poloxamer 407. Foi possível nanodispersar a formulação, com obtenção de tamanho de partícula de aproximadamente 300nm e PDI de aproximadamente 0,4. Além disso, foi possível validar método analítico de quantificação de doxorubicina por espectrofotometria Uv-Vis, se mostrando adequado para quantificar o fármaco com precisão e exatidão. Os resultados obtidos na eficiência de encapsulação da doxorubicina mostraram que menor quantidade de fármaco (1mg) pode ser encapsulado com sucesso na fase aquosa da formulação, possuindo uma eficiência de encapsulação acima de 99% na formulação otimizada. Com relação a avaliação da citotoxicidade, os resultados alcançados se mostraram promissores, visto que a nanodispersão de cristal líquido contendo DOX teve IC₅₀ próximo ao da DOX livre em linhagem de câncer de próstata (PC3). Contudo, estudos adicionais são necessários para melhor elucidar a citotoxicidade da formulação branca, bem como investigar a internalização celular.

7 REFERÊNCIAS

- BARENHOLZ, Y. Doxil®- the First FDA-approved Nano-drug: Lessons Learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, p. 117-134, 2012.
- BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron Emulsions as Colloidal Drug Carriers for Intravenous Administration: Comprehensive Physicochemical Characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, p. 1069-1079, 1993.
- BLATT, W.F; ROBINSON, S.M; BIXLER, H.J; Membrane ultrafiltration: The diafiltration technique and its application to microsolute exchange and binding phenomena, **Analytical Biochemistry**, Volume 26, Issue 1, 1968.
- BORGES, G, S, M. Encapsulação do diterpeno esclareol em carreadores lipídicos nanoestruturados e seu efeito sinérgico com a doxorubicina. **Universidade Federal de Minas Gerais**. Faculdade de Farmácia. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas. 2015.
- BOYD BJ, WHITTAKER DV, KHOO SM, DAVEY G. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. **Int J Pharm**. 2006.
- BRAR, Satinder K.; VERMA, M. Medição de nanopartículas por técnicas de espalhamento de luz. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, pág. 4–17, 2011.
- BURROWS R, COLLETT JH, ATTWOOD D. The release of drugs from monoglyceride-water liquid crystalline phases. **Int J Pharm**. 1994.
- CÂMARA, Ana Lygia dos Santos. Nanoemulsão contendo doxorubicina ph-sensível: obtenção, caracterização e avaliação antitumoral. 2017. 92 f., il. Tese (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia) **Universidade de Brasília**, Brasília, 2017.
- CARVALHO, C. *et al.* Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 3267-3285, 2009.

CHAMPOUX, J. J. DNA TOPOISOMERASES: Structure, Function and Mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 369-413, 2001.

CHARROIS, G.J.R.; ALLEN, T.M. Drug release rate influences the pharmacology kinetics biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer. **Bioph. Act.**, v.1663, p.167-177, 2004.

CHEN, Y.; MA, P.; GUI, S. Cubic and Hexagonal Liquid Crystals as Drug Delivery Systems, **BioMed Research International**, vol. 2014, Article ID 815981, 12 pages, 2014.

CUNNINGHAM, A.J; ROBINSON, M; BANQUY, X; LEBLOND, J; ZHU, X. X. Bile Acid-Based Drug Delivery Systems for Enhanced Doxorubicin Encapsulation: Comparing Hydrophobic and Ionic Interactions in Drug Loading and Release. **Mol. Pharmaceutics**, 15, 3, 1266–1276, 2018.

DONG, Y.; BOYD, B.J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **Int. J. Pharm.**, v. 417, p. 101-111, 2011.

ELOY, J. O; SOUZA, M. C; PETRILLI, R; BARCELLOS J. P. A; LEE, R. J; MARCHETTIA, J. M. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 123, 345–363. 2014.

ENGSTROM, S. Drug delivery from cubic and other lipid-ater phases. **Lipid Technol.** V. 2, p 42-45, 1990.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR Effect: Unique Features of Tumor Blood Vessels for Drug Delivery, Factors Involved and Limitations and Augmentation of the Effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 136-151, 2011.

FONG C, LE T, DRUMMOND CJ. Lyotropic liquid crystal engineering-ordered nanostructured small molecule amphiphile self-assembly materials by design. **Chem Soc Rev.** 2012.

FORMARIZ, Thalita Pedroni. Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorubicina. 2008. 202 f. Tese (doutorado) - **Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, 2008.

GABIZON, A., SHMEEDA, H. & BARENHOLZ, Y. Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin. **Clin Pharmacokinet**, 419–436 (2003).

GANEN-QUINTANAR A, QUINTANAR-GUERREIRO D, BURI P. Monoolein: a review of the pharmaceutical applications. **Drug Dev Ind Pharm**. 2000.

GERAGHTY PB, ATTWOOD D. COLLETT JH, DANDIKER Y. The in vitro release of some antimuscarinic drugs from monoolein/water lyotropic liquid crystalline gels. **Pharm Res**. 1996.

MARIE-MADELEINE GIRAUD-GUILLE. Liquid crystalline phases of sonicated type I collagen, **Biology of the Cell**, Volume 67, Issue 1, 1989.

GLIGA, A.R., SKOGLUND, S., ODNEVALL WALLINDER, I. *et al*. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. **Part Fibre Toxicol** 11, 11 (2014).

GUO C, WANG J, CAO F, LEE RJ, ZHAI G. Lyotropic liquid crystals systems in drug delivery. **Drug Discov Today**. 2010.

GUSTAFSSON, J., LJUSBERG-WAHREN, H., ALMGREN, M., LARSSON, K. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by nonionic amphiphilic polymer. **Langmuir**, v. 13, p. 6964-6971, 1997.

HANDE, K. R. Topoisomerase II Inhibitors. **Update on Cancer Therapeutics**, v. 3, p. 13-26, 2008.

HOOGEVEST, P.V. Non-Aqueous Phospholipid Concentrates for Increasing the Bioavailability of Poorly Soluble Compounds. **European Journal of Lipid Science**. 2020.

HOSSEINI, S.A. *et al.* Degarelix for the treatment of advanced prostate cancer compared with GnRh-Agonists: a systematic review and meta-analysis. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**, v.30, n. 317, 2016.

LARA, M. G.; DENTLEY, M. V. L.; COLLETT, J. H.. In vitro drug release mechanism and drug loading studies of cubic phases gels. **Int. Jour. Pharm.**, ed. 293, pg. 241-250, 2005.

LARSSON, K. Aqueous dispersion of cubic lipid-water phases. **Curr Opinion Colloid Interf Sci**, v. 5, p. 64-69, 2000.

LI, Y; ANGELOVA, A; LIU, J; GARAMUS, V. M; LI, N; DRECHSLER, M; GONG, Y; ZOU, A. In situ phase transition of microemulsions for parenteral injection yielding lyotropic liquid crystalline carriers of the antitumor drug bufalin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Volume 173, Pages 217-225, 2019.

LIU, J.; KOPECKOVA, P.; PAN, H.; SIMA, M.; BUHLER, P.; WOLF, P.; ELSA BEILE, U.; KOPECEK.J. Prostate-Cancer-Targeted N-(2 Hydroxypropyl) methacrylamide Copolymer/Docetaxel Conjugates. **Macromolecular Bioscience**.v. 12, p. 412-422, 2012.

LOPES LB, LOPES JLC, OLIVEIRA DCR, THOMAZINI JA, GARCIA MTJ, FANTINI MCA, COLLETT JH, BENTLEY MVLB. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporine A: characterization and study of in vitro and in vivo delivery. **Eur J Pharm Biopharm.** 2006.

MADHESWARAN, T; KANDASAMY, M; BOSE, R. JC; KARUPPAGOUNDER, V. Current potential and challenges in the advances of liquid crystalline nanoparticles as drug delivery systems. **Drug Discovery Today**, V. 24, 2019.

MIGLIETTA, A.; CAVALLI, R.; BOCCA, C.; GABRIEL, L.; GASCO, M.R. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. **Int. J. Pharm.**, v.210, p.61-67, 2000.

MITRA, S.; GAUR, U; GHOSH, P.C.; MAITRA, A.N. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran–doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. **Journal of Controlled Release**. 74 (2001) 317–323.

MOHAN, P; RAPOPORT, N. Doxorubicin as a Molecular Nanotheranostic Agent: Effect of Doxorubicin Encapsulation in Micelles or Nanoemulsions on the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery and Nuclear Trafficking. **Mol. Pharmaceutics**, 7, 6, 1959–1973, 2010.

MURGIA, S; LAMPIS, S; ANGIUS, R; BERTI, D; MONDUZZI, M. Orientation and Specific Interactions of Nucleotides and Nucleolipids Inside Monoolein-Based Liquid Crystals. **J. Phys. Chem. B**, 113, 9205–9215, 2009.

NETO, Antônio Martins Figueiredo. Os cristais líquidos, 2008. **Universidade de São Paulo, Instituto de Física**, São Paulo, SP.

NIELSEN LS, SCHUBERT L, HANSEN J. Bioadhesive drug delivery systems. I. Characterization of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. **Eur J Pharm Sci**. 1998.

OCTAVIA, Y.; TOCCHETTI, C. G.; GABRIELSON, K. L.; CRIJNS, H. J.; MOENS, A. L. Doxorubicin-induced Cardiomyopathy: from Molecular Mechanisms to Therapeutic Strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, p. 1213-1225, 2012.

ONISZCZUK *et al.* The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 912–929, 2016.

OTHMAN, R. *et al.* Formation of size-tuneable biodegradable polymeric nanoparticles by solvent displacement method using micro-engineered membranes fabricated by laser drilling and electroforming. **Chemical Engineering Journal**, v. 304, p. 703–713, 15 nov. 2016.

PASUT, G; SERGI, M; VERONESE, F.M. Anti-cancer PEG-enzymes: 30 years old, but still a current approach. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p.69-78, 2008.

PETRILLI R. *et al.* Nanoparticles of Lyotropic Liquid Crystals: A Novel Strategy for the Topical Delivery of a Chlorin Derivative for Photodynamic Therapy of Skin Cancer. **Current Nanoscience**; 9: p.434-441. 2013.

PETRILLI, R. Nanopartículas de fase líquido cristalina hexagonal funcionalizadas com peptídeos de transdução para veiculação de siRNA na terapia de doenças tópicas. 2013. 99f. Dissertação (Mestrado). **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2013.

PETRIOLI, R.; FIASCHI, A.I.; FRANCINI, E.; PASCUCI, A.; FRANCINI, G. The role of doxorubicin and epirubicin in the treatment of patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. **Cancer Treat. Rev.** 34, p.710–718. 2008.

PHAN S, FONG WK, KIRBY N, HANLEY T, BOYD BJ. Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release. **Int J Pharm.** 2011.

PRAÇA, F.S.G.; GARCIA, W.S.; PETRILLI, R.; BENTLEY, M.V.L.B. Liquid crystal nanodispersions enable the cutaneous delivery of photosensitizer for topical PDT: fluorescence microscopy study of skin penetration. **Curr. Nanosci.**, v. 8, p. 535-540, 2012.

SCHEEREN, L. E. Nanopartículas de quitosana pH-sensíveis contendo doxorubicina: Desenvolvimento e estudo da atividade antitumoral in vitro, (Dissertação de mestrado - programa de pós graduação em ciências farmacêuticas), **UFSM**, Santa Maria, RS, Brasil, 2015

SCHNEIDER, T; SACHSE, A; ROBLING, G; BRANDL, M. Generation of contrast-carrying liposomes of defined size with a new continuous high pressure extrusion method. **Int. J. Pharm.** 117, 1–12, 1995.

SCHÜNEMANN, JR. E; URBAN, C. A; LIMA, R. S; RABINOVICH, I; SPAUTZ, C. Radioterapia e quimioterapia no tratamento do câncer durante a gestação - revisão de literatura. **Rev. Bras. Cancerol.** 30º de março de 2007.

SEYNHAEVE, A. L. B.; DICHEVA, B. M.; HOVING, S.; KONING, G. A.; HAGEN, T. L. M. Intact Doxil is Taken up Intracellularly and Released Doxorubicin Sequesters in the Lysosome: Evaluated by in vitro/in vivo Live Cell Imaging. **Journal of Controlled Release**, v. 172, p. 330-340, 2013.

SHAH JC, SADHALE Y, CHILUKURI DM. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Adv Drug Deliv**. 2001.

SHANG *et al.* Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **Journal of Nanobiotechnology**. 2014.

SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A.A. Alterações ecocardiográficas em c.es sob tratamento prolongado com doxorubicina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, p.300-306, 2005.

SINGH, S. Phase transitions in liquid crystals. **Phys Rep.**, v. 324, p. 107-269, 2000.

SPILLMANN, C. M; NACIRI, J; ALGAR, W. R; MEDINTZ, I. L; DELEHANTY, J. B. Multifunctional Liquid Crystal Nanoparticles for Intracellular Fluorescent Imaging and Drug Delivery. **ACS Nano**, 8, 7, 6986–6997, 2014.

SROUGI M, *et al.* **Doenças da próstata**. **Rev Med**, São Paulo.2008. Disponível em: www.revistas.usp.br/revistadc/article/download/59075/62060. Acesso em: 30 Jul. 2021.

TACAR, O.; SRIAMORNSAKB, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an Update on Anticancer Molecular Action, Toxicity and Novel Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 157-170, 2012.

TARDI, P.G; BOMAN, N.L; CULLIS, P.R. Liposomal Doxorubicin, **Journal of Drug Targeting**, Vol. 4. No. 3, pp. 129-140, 1996.

TAURIN, S.; NEHOFF, H.; GREISH, K. Anticancer Nanomedicine and Tumor Vascular Permeability: Where is the Missing link? **Journal of Controlled Release**, v. 164, p. 265-275, 2012.

TEWEY, K. M.; ROWE, T. C.; YANG, L.; HALLIGAN, B. D.; LIU, L. F. Adriamycin-Induced DNA Damage Mediated by Mammalian DNA Topoisomerase II. **Science**, v. 226, p. 466-468, 1984.

THORN, C. F. *et al.* Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 21(7), p. 440-446, 2011.

TRAN, N; MULET, X; HAWLEY, A. M; HINTON, T. M; MUDIE, T. S; MUIR, B. W; GIAKOUMATOS, E. C; WADDINGTON, L. J; KIRBY, N. M; DRUMMOND, C. J. Nanostructure and Cytotoxicity of Self-Assembled Monoolein-Capric Acid Lyotropic Liquid Crystalline Nanoparticles. **The Royal Society of Chemistry**, 2015.

TREVISAN, Marcello Garcia. Aplicação de métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência molecular na análise em matrizes biológicas. 2003. 81f. Dissertação (mestrado) - **Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química**, Campinas, SP.

TREVIZAN, L.N.F; ELOY, J.O; LUIZ, M.T; PETRILLI, R; JUNIOR, S.L.R; BORGES, J.C; MARCHETTI, J.M; CHORILLI, M. Anti-EGFR liquid crystalline nanodispersions for docetaxel delivery: Formulation, characterization and cytotoxicity in cancer cells, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Volume 613, 2021.

TSAKALOZOU, E; ECKMAN, A. M; BAE, Y. Combination Effects of Docetaxel and Doxorubicin in Hormone-Refractory Prostate Cancer Cells. **Biochemistry Research International**. 2012.

TURCHIELLO RF, VENA FC, MAILLARD P, SOUZA CS, BENTLEY MV, TEDESCO AC. Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and m-THPC in photodynamic therapy (PDT). **J Photochem Photobiol B**. 2003.

VERONESE, F. M; PASUT, G. State of the art in PEGylation: successful approach to drug delivery. **Drug Discovery Today**, v.10, n.21, p. 1451-8, 2005.

World Health Organization. The International Pharmacopoeia. Geneva: **World Health Organization, Dept. of Essential Medicines and Pharmaceutical Policies**, 2008.

VIEIRA, D. B; CONTRERAS, L. F. G. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment, 2015.

WAGNER, B. A; EVIG, C. B; RESZKA, K. J; BUETTNER, G. R; BURNS, C. P. Doxorubicin increases intracellular hydrogen peroxide in PC3 prostate cancer cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v 440, Pages 181-190, 2005.

WANG, Q.; ALSHAKER, H.; BOHLER, T.; SRIVATS, S.; CHAO, Y.; COOPER, C.; PCHEJETSKI, D. Core shell lipid-polymer hybrid nanoparticles with combined docetaxel and molecular targeted therapy for the treatment of metastatic prostate cancer. *Nature*. v.7 p.1-8, 2017.

WANG, D; MA, B; WANG, Z; ZHAO, Y; SUN, Y; LUAN, Y; WANG, J. Preparation and characterization of β -Casein stabilized lipopeptide lyotropic liquid crystal nanoparticles for delivery of doxorubicin. **Soft Matter**, 2019.

WONG, H.L; BENDAYON, R; RAUTH, A.M; LI, Y; WU, X.Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Adv Drug Deliv Rev**; v. 59: p.491-504, 2007.

YANG, F.; TEVES, S. S.; KEMP, C. J.; HENIKOFF, S. Doxorubicin, DNA Torsion and Chromatin Dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Reviews on Cancer**, v. 1845, p. 84-89, 2014.

YOO H.S., LEE KH, OH JE, PARK TG. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. **J Control Release**. 2000.

