



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

EMMILY OLIVEIRA JORGE

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS FUNCIONALIZADOS
COM ÁCIDO FÓLICO CONTENDO DOXORRUBICINA**

**CAMPINA GRANDE
2019**

EMMILY OLIVEIRA JORGE

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS FUNCIONALIZADOS
COM ÁCIDO FÓLICO CONTENDO DOXORRUBICINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Farmácia da Universidade Estadual Da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. João Augusto Oshiro Júnior.

**CAMPINA GRANDE
2019**

J826c Jorge, Emmily Oliveira.
Carreadores Lipídicos nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico contendo doxorrubicina [manuscrito] / Emmily Oliveira Jorge. - 2019.
42 p. : il. colorido. Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.
"Orientação : Prof. Dr. João Augusto Oshiro Júnior, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."
1. Carreador lipídico. 2. Antraciclina. 3. Carcinoma. 4. Doxorrubicina. I. Título
21. ed. CDD 615.1

EMMILY OLIVEIRA JORGE

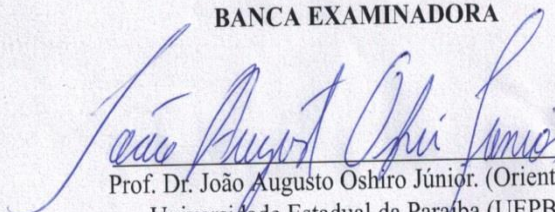
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS FUNCIONALIZADOS COM
ÁCIDO FÓLICO CONTENDO DOXORRUBICINA

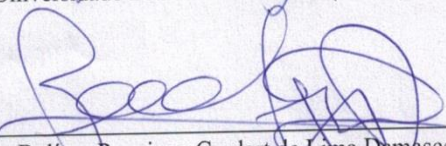
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Farmácia da
Universidade Estadual Da Paraíba, em
cumprimento à exigência para obtenção do grau
de Bacharel em Farmácia.

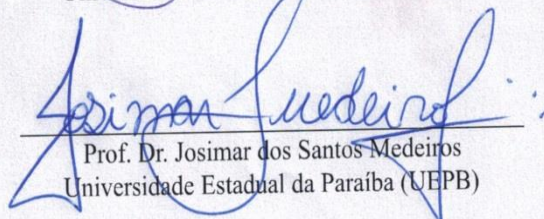
Área de concentração: Farmácia.

Aprovada em: 31 / 12 / 2019.

BANCA EXAMINADORA


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


Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Josimar dos Santos Medeiros
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

DEDICATÓRIA

A Deus e a toda a minha família, por todo o apoio que sempre me transmitiram durante este longo caminho

AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a Deus, por seu infinito amor, cuidado e misericórdia em minha vida. Como já dizia Santa Teresinha: “O bom Deus não poderia inspirar sonhos irrealizáveis”

Agradecimento especial aos meus pais, Josenberg e Rivaneide, por sempre me apoiarem desde o início, por sempre acreditarem e nunca desistirem de mim. Obrigado por todos os sacrifícios que fizeram durante todos estes anos, por toda compreensão, assim como por toda a força que me transmitiram e transmitem.

A toda família, que sonhou junto comigo, em especial a minha avó Rita e meu avô, Vanilson, por todo apoio a mim dedicado e por sempre acreditarem em mim.

Aos amigos e colegas de curso, Beatriz, Camila, Juliana, Lucas Resende, Matheus Vinicius e Milena por todo o companheirismo durante esses anos, por estarem sempre comigo juntos enfrentando as preocupações, cobranças, ensinamentos e conquistas. Sou grata por cada amizade, risadas e momentos que vivemos.

Agradeço em especial à Lucas Resende não só por sua amizade mas, também por todo seu amor, dedicação, companheirismo, proteção, força, por sempre acreditar em mim e tornar meus dias mais felizes.

Gostaria de agradecer em especial ao Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) por toda a oportunidade de aprendizado, crescimento e desenvolvimento de forma profissional e pessoal, levarei para toda vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Augusto Oshiro Júnior, obrigada pelo seu apoio, dedicação, comprometimento e principalmente por todos os ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 422231/2018-9, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela contribuição financeira por meio do programa PIBIC/CNPq-UEPB, a Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

A todos os professores que contribuíram para a minha formação profissional, meu sincero agradecimento por todo conhecimento compartilhado.

Por fim, a todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para que esse sonho se tornasse realidade, gratidão.

RESUMO

A doxorubicina (DOX), um antibiótico da classe das antraciclina, tem sido usada com êxito no tratamento de carcinoma de mama, pulmão, bexiga, tireóide e ovário. Contudo, em razão de sua inespecificidade, provoca efeitos colaterais severos tais como cardiotoxicidade, mielossupressão e atrofia. Visando contornar estas desvantagens, as pesquisas farmacêuticas estão sendo desenvolvidas a fim de melhorar as propriedades biofarmacêuticas do fármaco, mediante sua incorporação em sistemas nanoestruturados. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), podem ser promissores para administração de DOX, uma vez que aumentam sua estabilidade, capacidade de incorporação e promovem liberação sustentada do fármaco e são biocompatíveis. Além disso, os CLN podem ser preparados com sua superfície catiônica e funcionalizados com ácido fólico (AF). Desta forma, possibilitam aumentar a seletividade em tecidos específicos, diminuindo os efeitos colaterais nos tecidos saudáveis. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar CLN catiônicos funcionalizados ou não com AF contendo DOX para futura aplicação no tratamento do câncer de mama. A primeira etapa deste trabalho consistiu na síntese de uma nova molécula, partindo das moléculas de ácido fólico e o polímero PF-127. As técnicas de espectrometria de infravermelho (IV), Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizadas para caracterização dos CLN desenvolvidos. Os resultados de IV demonstraram que os grupos carboxílicos do AF e PF-127 reagiram, resultando em uma nova ligação éter, indicando a formação do complexo AF-PF127. Posteriormente, os CLN foram desenvolvidos utilizando essa molécula. O DLS revelou que os diâmetros dos CLN, CLN-DOX, CLN-AF e CLN-DOX-AF foram de 135, 127, 130 e 160 nm, respectivamente. Esses valores permaneceram-se estáveis ao longo de 90 dias. O potencial zeta apresentou valores positivos, devido ao brometo de cetrimônio, o tensoativo amônio quaternário catiônico utilizado para a obtenção dos CLN. Finalmente, as Fotomicrografias de MEV apresentaram partículas com morfologias esféricas e sem aglomerados. Os tamanhos corroboram com os encontrados no DLS. Os resultados demonstraram que foi possível desenvolver CLN catiônicos funcionalizados com estabilidade física, partículas esféricas e tamanhos nanométricos, características essas adequadas para administração endovenosa. Assim, futuros ensaios serão realizados, particularmente ensaios biológicos *in vitro* de citotoxicidade, avaliação da internalização celular dos CLN em modelo de câncer de mama, visando avaliar a eficácia desses sistemas.

Palavras-Chave: Carreador Lipídico. Antraciclina. Carcinoma. Seletividade

ABSTRACT

Doxorubicin (DOX), an anthracycline antibiotic, have been used successful treatment of breast, lung, bladder, thyroid and ovarian carcinoma. However, due to its non-specificity causes several side effects such as cardiotoxicity, myelosuppression and atrophy. Aiming to overcome these disadvantages, pharmaceutical research is being developed in order to improve the biopharmaceutical properties of the drug through its incorporation in nanosystems. Nanostructured lipid carriers (NLC) may be promising for DOX administration, due to increase stability and drug incorporation capacity, promote sustained release and are biocompatible. Besides that, NLC can be prepared with their cationic and functionalized (folic acid (FA)) surface, resulting in increasing selectivity in specific tissues, reducing side effects in healthy tissues. The objective of this work was to develop and characterize cationic NLC functionalized with FA containing DOX for future treatment of breast cancer. The first step of this work consisted in the synthesis of a new molecule, starting from FA and polymer (PF-127). Infrared (IR), Dynamic Light Scattering (DLS) and Scanning Electron Microscopy (SEM) techniques were used to characterize the developed NLC. The IR results demonstrated that the carboxylic groups present in AF and PF-127 reacted, resulting in a new ether bond indicating the formation of the AF-PF127 complex. Subsequently, NLC were developed using this molecule. The DLS revealed that NLC, NLC-DOX, NLC-FA and NLC-DOX-FA diameters were 135, 127, 130 and 160 nm, respectively. These values remained stable over 90 days. The zeta potential showed positive values due to cetrimonium bromide, the cationic quaternary ammonium surfactant used to obtain the NLC. Finally, SEM photomicrographs showed particles with spherical morphologies and no clusters. The sizes corroborate with those found in DLS. The results showed that it was possible to develop functionalized cationic NLC with physical stability, spherical particles and nanometric sizes, which are suitable for intravenous administration. Thus, future assays will be performed, particularly *in vitro* biological cytotoxicity assays, evaluation of cellular internalization in breast cancer model, aiming to evaluate the efficacy of these systems.

Keywords: Lipid Carriers. Anthracycline.Carcinoma. Selectivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Imagem macroscópica dos CLN prontos.....	30
Figura 2 –	Espectros de FTIR do Ácido fólico (AF), Pluronic F127 (PF-127) e da mistura de ácido fólico e Pluronic -127 (AF - PF127).....	31
Figura 3 –	Resultados de diâmetro médio (d.nm), IPD e de PZ de CLN -BRANCO, CLN - DOX, CLN – AF, e CLN – DOX – AF, determinados durante 90 dias de estocagem.....	33
Figura 4 –	Fotomicrografias de CLN- BRANCO (A), CLN - AF (B) e CLN - DOX - AF (C) verificados por MEV-FEG. Aumento 50,000 x.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Identificação, composição e concentração dos diferentes CLN catiônicos	28
	obtidos.....	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido fólico
ANT	Antraciclinas
BC	Brometo de cetrimônio
CB	Câncer de bexiga
CFL	Conjugado fármaco-lipídio
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
CLN-AF	Carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico
CLN-Branco	Carreadores lipídicos nanoestruturados branco
CLN-DOX-AF	Carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico contendo doxorrubicina
CLN-DOX	Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo doxorrubicina
CLN-F	Carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizado com folato
CLN-F-QT	Carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizado com folato contendo quercetina
CLN-QT	Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	deoxyribonucleic acid/ ácido desoxirribonucleico
d.nm	distribuição de tamanho de partícula como média Z em nanômetros (nm)
DOX	Doxorrubicina
EP	Estearato de polioxietileno 40
EPR	Enhanced Permeability and retention
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
IC50	Concentração do fármaco que induz 50% de inibição
IPD	Índice de polidispersão
KBr	Brometo de Potássio
MEV	Microscopia Eletrônica de varredura

mg	Miligramas
mL	Mililitros
mw	Megawatt
N2	Nitrogênio
nm	Nanômetros
NLS	Nanopartículas Lipídicas sólidas
OE	óleo de Rícino hidrogenado e etoxilado 40
PEO	Poli (óxido de etileno)
PF-127	Pluronic F127
PF-127-AF	Pluronic F127 funcionalizado com ácido fólico
PPO	Poli (óxido de propileno)
PTX	Paclitaxel
PZ	Potencial Zeta
QT	Quercetina
RCF	Transportador de folato reduzido
RES	Sistema retículo endotelial
RF	Receptor de folato mediado por processo de endocitose
RNA	Ribonucleic acid/ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
TFD	Terapia fotodinâmica
TGACC	Triglicérides do ácido cáprico/caprílico
TRH	Terapia de reposição hormonal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Câncer de mama	15
2.2	Tratamento tradicional do câncer de mama	17
2.3	Doxorrubicina	19
2.3.1	<i>Mecanismo de ação da DOX</i>	20
2.4	Avanços no Design de nanopartículas	21
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral	26
3.2	Objetivo específico	26
4	METODOLOGIA	27
4.1	Funcionalização do polímero sintético pluronic F127 com ácido fólico	27
4.2	Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados	27
4.3	Espectrometria de infravermelho	28
4.4	Caracterização físico- química	29
4.4.1	<i>Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e do potencial zeta</i>	29
4.4.2	<i>Microscopia eletrônica de varredura e de alta resolução</i>	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1	Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados	30
5.2	Espectrometria de infravermelho	31
5.3	Caracterização físico-química	32
5.3.1	<i>Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e do potencial zeta</i>	32
5.3.2	<i>Microscopia eletrônica de varredura e de alta resolução</i>	34
6	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Segundo a International Agency for Research on Cancer, o câncer de mama trata-se do segundo tipo de câncer mais comum no mundo, correspondendo a 12% de todas as causas de morte a nível mundial com seis milhões de óbitos por ano. É definido como um tumor maligno de células epiteliais que se desenvolve na mama, podendo ser *in situ* ou invasivo, a principal neoplasia maligna que acomete o sexo feminino. Pode ainda, acometer os homens, contudo é raro, representando apenas 1% do total de casos (MEDEIROS *et al.*, 2015)

O tratamento envolve mastectomia, quimioterapia e radioterapia. Enquanto que esquemas de quimioterápicos baseados em agentes alquilantes são utilizados em estágios avançados. Contudo, estes apresentam problemas com as características físico-químicas e farmacocinéticas, além de baixa seletividade, e como consequência, baixas concentrações do fármaco na massa tumoral e intensa atividade citotóxica sobre as células saudáveis, tornando a terapia medicamentosa ineficaz. Além de possuir um alto custo econômico (OSHIRO JUNIOR, 2018).

Dentre esses esquemas, diferentes fármacos podem ser utilizados, tais como, doxorrubicina (DOX), paclitaxel (PTX), docetaxel, gencitabina, trastuzumab e outros.

A DOX ou hidroxildaunorrubicina um antibiótico da classe das antraciclina (ANT) foi isolada de culturas de *Streptomyces peucetius*, variante *caesius*, e tem sido utilizada na prática oncológica desde a década de 1960. A identificação de seu alvo terapêutico, assim como das ANT, foi um marco importante na farmacologia das substâncias anticâncer. A regressão tumoral é expressiva no uso isolado da DOX e significativamente maior quando combinada a outros agentes antitumorais (LATORRE, 2001).

Atua inibindo tanto o DNA como o RNA nucleotidil transferases, por meio de intercalação entre os pares de bases dos ácidos nucléicos, bloqueando a síntese de RNA. No entanto, por apresentar inespecificidade, o fármaco também provoca efeitos colaterais (FORMARIZ, 2008). Desta forma, sua utilidade clínica é limitada devido a seu potencial cardiotoxíco e possibilidade de desenvolvimento de resistência à droga (MOURA *et al.*, 2015).

Devido a essas limitações apresentadas pelo fármaco desde a alta lipofilicidade e as consequências que busca-se uma alternativa para melhorar essas desvantagens. Sistemas carreadores coloidais, nanoemulsões, lipossomas, nanosuspensões e micelas são

extensivamente investigados por promoverem muitas vantagens em relação às formulações tradicionais como, por exemplo, a liberação sustentada de ativos, solubilizar ativos lipofílicos, aumentar a estabilidade física e química de moléculas lábeis, minimizar os efeitos colaterais entre outras (MARCATO, 2009).

Diferentes trabalhos na literatura abordam a utilização de nanopartículas lipídicas multifuncionais ou não, para tratamento de câncer. Os resultados revelam que esses sistemas aumentam significativamente a citotoxicidade de diferentes fármacos (DOX e PTX) em células tumorais e a internalização celular nas células cancerígenas (mama), quando comparado com sistemas sem a funcionalização e em relação ao fármaco livre, confirmando o potencial dessa abordagem no tratamento do câncer de mama (CHIRIO *et al.*, 2014; ZHANG, *et al.*, 2008).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) caracterizam-se por possuírem uma matriz composta pela mistura de lipídio líquido e lipídio sólido à temperatura ambiente, gerando a formação de estruturas desordenadas, que resulta em um cristal imperfeito, proporcionando espaços para a incorporação de substâncias ativas de origem hidrofóbica (KOLENYAK-SANTOS *et al.*, 2014), capacidade de liberar controladamente, proteger a substância ativa frente à degradação, baixa toxicidade e apresentam maior estabilidade (SARDI *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2014).

Os CLNs aproveitam as vantagens de permeabilidade e retenção aumentados, conhecido como efeito EPR (do inglês, Enhanced Permeability and Retention). Possível estratégia de vetorização que visa melhorar a eficácia terapêutica dos quimioterápicos e diminuir seus efeitos adversos com a utilização de sistemas nanoestruturados (ELOY *et al.*, 2014).

Além disso, os CLNs podem ser preparados com sua superfície catiônica e funcionalizados, resultando em um CLNs multifuncional, que atua de forma sinérgica, uma vez que proporcionará uma maior seletividade em tecidos específicos. Contudo, o planejamento da molécula utilizada para funcionalização deve levar em consideração os receptores superexpressos na superfície da célula alvo. Para o câncer de mama, um dos marcadores mais utilizados é o ácido fólico (AF), que se liga em receptores folato que são expressos em baixa quantidade por células normais e em grande quantidade em células tumorais de câncer de mama (MENG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010).

A superfície catiônica pode direcionar a DOX ao tecido tumoral. Este direcionamento está relacionado com a exposição de fosfatidilserina (carga negativa) na superfície das membranas celulares e será obtida nos CLNs com a utilização de compostos

de brometo de cetrimônio (BC), um sal alquilamônio que é um tensoativo catiônico (IWASAKI *et al.*, 2009.)

Portanto, tendo como base o panorama exposto, sugere-se que CLNs catiônicos funcionalizados por AF com a incorporação de DOX, possam oferecer uma promissora e inédita ferramenta nanobiotecnológica visando o tratamento do câncer de mama.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer de mama

Para o biênio 2018-2019 no Brasil a estimativa de ocorrência de novos casos de câncer é de 600 mil para cada ano, com a maior incidência dos cânceres de próstata em homens e de mama em mulheres. Estimam-se 59.700 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Bioquimicamente as alterações que geram as neoplasias podem ocorrer em genes especiais, que inicialmente são inativos em células normais, denominados protooncogenes. Quando ativados, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização das células normais são, então, denominadas cancerosas, ou melhor, tumorais. Essas células passam a se comportar de forma anormal, multiplicando-se de maneira descontrolada. Com a constante multiplicação celular, passa a ocorrer o processo de angiogênese, devido à necessidade de novos vasos sanguíneos para que haja a nutrição destas células (ALMEIDA, 2005).

Diversos fatores estão envolvidos na etiologia do câncer de mama, desde idade avançada, histórico familiar e pessoal, características reprodutivas, hábitos de vida e influências ambientais. As características reprodutivas de risco se dão porque a doença é estrogênio-dependente, ou seja, este hormônio induz o crescimento celular do tecido mamário, o que aumenta o potencial de alterações genéticas. As características reprodutivas em destaque compreendem a menarca precoce (aos 11 anos ou menos), a menopausa tardia (aos 55 anos ou mais), a primeira gestação após os 30 anos e a nuliparidade, uso de alguns anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal (TRH) na menopausa, principalmente por tempo prolongado (BARBOSA, 2017).

A principal influência ambiental é a exposição prévia às radiações ionizantes. Os hábitos de vida relacionados são dietas hipercalóricas; sedentarismo e obesidade, pelo aumento do nível de estrogênio produzido no tecido adiposo, principalmente no climatério; consumo de bebidas alcoólicas, pois o acetaldeído, primeiro metabólito do álcool, é carcinogênico, mutagênico, estimulador da produção de estrogênio e imunodepressor. Além da predisposição genética (pelas mutações em determinados genes transmitidos na herança

genética familiar – principalmente por dois genes de alto risco, BRCA1 e BRCA2) (SILVA; SILVA RIUL, 2011).

Mulheres com variantes patogênicas nos genes BRCA1 e BRCA2 apresentam risco aumentado em relação às outras mulheres de desenvolver câncer de mama e também câncer de ovário e que deve ser considerado o uso de triagem mais intensiva para rastreamento destas doenças. O risco de mulheres com mutações genéticas de ter câncer com mutação no gene BRCA1 é de 40% a 87% e 18% a 88% quando há mutação no gene BRCA2 (MAVADDAT *et al.*, 2013).

Os genes BRCA são estruturalmente complexos e encontram-se organizados ao longo de segmentos genômicos com aproximadamente 100 kb. O gene BRCA1 se localiza no braço longo do cromossomo 17, composto por 24 exons dos quais 22 codificam uma proteína com 1863 aminoácidos. Enquanto que o gene BRCA2 se localiza no braço longo do cromossomo 13q12, possuindo estrutura ainda mais complexa composta por 27 exons, dos quais 26 são codificantes da proteína BRCA2, que apresenta 3418 aminoácidos (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Os sinais e sintomas de câncer de mama mais frequentes são aumento da sensibilidade ou dor em uma ou ambas as mamas fora do período menstrual; presença de nódulo na mama e/ou axila, palpáveis e geralmente indolores; alterações da pele que recobre a mama, como abaulamentos ou retrações com aspecto semelhante à casca de laranja; retração do mamilo, descarga papilar espontânea, descamação e erosão do mamilo e aréolas, além de sinais de inflamação mamária. Os cânceres de mama localizam-se, principalmente, no quadrante superior externo e, em geral, as lesões são indolores, fixas e com bordas irregulares, acompanhadas de alterações da pele quando em estágio avançado (DA SILVA; DA SILVA RIUL, 2011; CASTRO, 2011).

O atraso tanto no diagnóstico quanto no tratamento do câncer de mama é uma das circunstâncias que podem interferir de forma direta no tratamento da doença, sendo evidente a ausência de políticas de saúde pública de forma, que a maioria dos casos não se encontra no estágio inicial, onde o tratamento é mais efetivo, com efeitos colaterais reduzidos (MILLER *et al.*, 2002)

2.2 Tratamento tradicional do câncer de mama

O tratamento do câncer de mama é um processo com etapas diversas, compreendendo a cirurgia, radioterapia, tratamento sistêmico (quimioterapia e hormonioterapia) e reabilitação. O tratamento visa promover a retirada local do tumor, interromper as suas vias de drenagem através de linfonodos da região, realizar a caracterização prognóstica e orientação do tratamento por meio de medicamentos quimioterápicos ou hormonais, os mesmo objetivam a terapia adjuvante ou seja, proteção contra o aparecimento de metástases ou terapia paliativa em caso de metástases já estabelecidas. A associação dos tratamentos cirúrgico, quimioterápico e radioterápico são mais eficazes na redução probabilística de reaparecimento da doença (ALEGRANCE, 2007).

Até os anos de 1950, as cirurgias de retiradas de tumor eram praticamente a única forma de terapia contra o câncer. As cirurgias, contudo, não conseguem tratar cânceres metastáticos. Para tratá-los, são necessários tratamentos que atinjam praticamente todos os órgãos do corpo. Assim, fármacos, terapias imunomediadas e a radioterapia se tornaram o foco das pesquisas destinadas ao câncer (BORGES, 2017).

Na década de 1940, durante os combates da segunda guerra mundial com a utilização do gás de mostarda e descoberta que o mesmo possuía ação contra linfomas, teve início a quimioterapia, um dos tratamentos sistêmicos mais utilizados para tratar câncer e tem sido realizado em terapia combinatória, com uma ou mais drogas. A partir da década de quarenta, vários fármacos foram obtidos através de extração de organismos naturais ou síntese química, e mostraram-se muito úteis para aumentar a sobrevida dos pacientes (MOREIRA, 2013).

Nos últimos 50 anos, a pesquisa de novos fármacos anticancerígenos introduziu na terapêutica cerca de 70 medicamentos. No entanto, a relativa semelhança entre as células cancerosas e as células normais, lança ao tratamento de câncer o grande desafio da distinção entre essas células. Na maioria dos casos, a prática do tratamento consiste na combinação de diferentes técnicas como, por exemplo, cirurgia e quimioterapia. A quimioterapia baseia-se na busca por destruição das células neoplásicas, que apresentam como característica rápida divisão celular quando comparado com células normais. Contudo, podem ocorrer efeitos secundários importantes em células normais que

apresentam rápida divisão também, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, causando diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade às infecções (BRANDÃO *et al.*, 2010).

As principais drogas antineoplásicas utilizadas no tratamento do câncer são: Alquilantes polifuncionais, antimetabólitos, antibióticos antitumorais, Inibidores mitóticos e outros agentes, drogas que não são agrupadas em uma determinada classe farmacológica (SCHULZE, 2007).

Alquilantes polifuncionais ligam-se ao DNA impedindo a separação dos dois filamentos do DNA, fenômeno indispensável para a replicação, afetando as células em todas as fases do ciclo celular; antimetabólicos atuam inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e RNA, impedindo a multiplicação e funções normais da célula; Antibióticos antitumorais possuem ação inibitória para a síntese de DNA e de proteínas, no entanto, não atuam especificamente sobre uma determinada fase do ciclo celular (SILVA, 2013).

Ademais, os antibiótico antitumorais possuem ainda, anéis insaturados que permitem a incorporação de excesso de elétrons e a consequente produção de radicais livres reativos. Podem apresentar outro grupo funcional que acrescente novos mecanismos de ação, como alquilação, inibição enzimática ou inibição da função do DNA por intercalação; Inibidores mitóticos, podem paralisar a mitose na metáfase, devido à sua ação sobre a proteína tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso espiralar, pelo qual migram os cromossomos. Assim os cromossomos, durante a metáfase, ficam impedidos de migrar, ocorrendo a interrupção da divisão celular; Outros agentes: algumas drogas não são agrupadas em uma determinada classe farmacológica como a procarbazina usada na doença de Hodgkin, a L-asparaginase usada no tratamento da leucemia linfocítica aguda e outras (SCHULZE, 2007).

Diversos são os efeitos colaterais causados pelos quimioterápicos devido a sua capacidade de toxicidade a qualquer tecido de rápida proliferação, seja de caráter normal ou canceroso que possuam por característica uma alta atividade mitótica e ciclo celular curto e, deste modo, tem como consequência o aparecimento de efeitos colaterais que podem variar de droga para droga. Os efeitos mais relatados pelos pacientes são: Náuseas, diarreia e vômitos que compreendem as principais reações decorrentes à toxicidade gastrintestinal que pode comprometer tanto o estado nutricional e o equilíbrio hidroeletrólítico do

paciente. A toxicidade hematológica que engloba a leucopenia que culmina no aumento de riscos a infecções, trombocitopenia que pode aumentar o risco de sangramento e também, anemia causada pela diminuição de glóbulos vermelhos. Complicações neurológicas como: confusão, depressão, sonolência, vertigem, parestesias principalmente nas extremidades como mãos e pés, ototoxicidade, perda do paladar e irritação meníngea. Alguns efeitos tóxicos são cumulativo como a cardiotoxicidade que pode ocasionar insuficiência cardíaca congestiva e subsequente falência cardíaca.(ANDRADE; SILVA, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2015)

2.3 Doxorubicina

Doxorubicina é caracterizado como sólido cristalino vermelho, quase inodoro e higroscópico, formado por um anel tetracíclico ligado a um açúcar, apresentando fórmula molecular C₂₇H₂₉NO₁₁ (FOWLER; SCHNALL, 2014). Foi descoberto no final dos anos 60, pela empresa farmacêutica "Farmitalia Research Laboratories" e inicialmente denominada Adriamicina, devido ao local da descoberta, o Mar Adriático. No entanto, mais tarde o seu nome foi mudado para doxorubicina para adequar-se com a sua estrutura química. Foi isolado de uma cultura variada de *Streptomyces peucetius* (*Streptomyces peucetius caesius*) por fermentação aeróbia após tratamento mutagênico. A estrutura química específica é responsável não apenas pela atividade antineoplásica, mas também por sua toxicidade (EWER; VON HOFF; BENJAMIN, 2011).

DOX é um antibiótico pertencente à família das antraciclinas, que possui ação antineoplásica inespecífica para ciclo celular, amplamente utilizado no tratamento de vários tumores sólidos, Os compostos pertencentes à classe das antraciclinas, apresentam por propriedades gerais a interação com o DNA de várias formas diferentes, incluindo intercalação, quebra da fita do DNA e inibição com a enzima topoisomerase II. No entanto, eles não têm a especificidade dos antibióticos antimicrobianos e, portanto, produzem toxicidade significativa, estão entre as drogas antitumorais mais importantes disponíveis (WISHART *et al.*, 2017).

2.3.1 Mecanismo de ação da doxorubicina

Mecanismos para a atividade antineoplásica da DOX está relacionado a sua estrutura planar, a fração antraquinona da DOX permite a intercalação do fármaco na fita dupla do DNA, impedindo os processos de transcrição e replicação do DNA e, finalmente, inibindo a síntese de proteínas. Enquanto isso, a topoisomerase II também é inibida e os efeitos seguinte são desencadeados devido à quebra da dupla fita do DNA. Todos esses efeitos resultam na parada do ciclo celular que culmina na ativação do mecanismo de apoptose, levando à morte das células cancerígenas e à parada do crescimento do tumor. Está sendo amplamente aceito que a cardiotoxicidade induzida pela DOX é completamente independente de sua atividade anticâncer, ganhando força com a idéia de que os cardiomiócitos, como células terminais diferenciadas, não devem ser tão sensíveis à atividade antineoplásica primária, que está relacionada ao bloqueio do ciclo celular. No entanto, a inibição da transcrição de certas proteínas pode contribuir para a cardiomiopatia, embora ainda seja necessário abordar uma relação causal entre ambas (C PEREIRA *et al.*, 2011)

O efeito citotóxico da doxorubicina está também associado à inibição da topoisomerase II, à formação de radicais livres semiquinona e de radicais de oxigênio responsáveis por fenômenos de estresse oxidativo e peroxidação lipídica. Esta antraciclina pode ainda ligar-se às membranas celulares alterando a sua fluidez e capacidade de transporte de íons. Ademais, esse somatório de atividades inespecíficas contribuem para a toxicidade dos antibióticos antraciclina, nomeadamente os efeitos vasculares cardíacos e cutâneos (RAJ; FRANCO; LIPSHULTZ, 2014).

A administração repetida de antraciclina causa acúmulo de dano que torna-se irreversível. Alterações de início tardio mostram dois quadros morfológicos diferentes. O primeiro envolve alterações degenerativas nas células musculares e fibrilas, núcleos, membranas celulares, mitocôndrias, retículo sarcoplasmático e junções intercelulares. Essas alterações culminam na lise celular e na substituição das células por tecido fibrótico. O segundo quadro morfológico envolve edema intersticial seguido por fibrose, que parece representar o ponto final da cardiotoxicidade induzida pela antraciclina (GOEBEL; KAPLAN, 1992).

A cardiotoxicidade crônica reflete uma lesão contínua, progressiva que ocorre a partir do primeiro mês do encerramento da quimioterapia, caracterizada pela perda de

miócitos cardíacos devido às doses cumulativas e crescentes de antraciclina, gerando um afinamento nas paredes dos ventrículos e redução do desempenho sistólico. Inicialmente, ocorre a compensação funcional pelos miócitos restantes, permitindo que a função cardíaca geral pareça normal, apesar dos danos histológicos. Segundo ZHENG *et al.* (2011) & MINOTTI *et al.* (2004) a falha na homeostase dos níveis de cálcio é um fator importante da cardiotoxicidade mediada pela DOX. Sendo o mecanismo de homeostase dos níveis de cálcio fundamental para os processos de excitação/contração da fibra muscular e a DOX pode interferir nas funções destes canais (MOURA, 2011).

No entanto, conforme o aumento das doses cumulativas de antraciclina, ocorre a diminuição no desempenho sistólico, sendo averiguado por uma diminuição ou encurtamento no encurtamento fracionário (FS) e na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) com eventual progressão para insuficiência cardíaca congestiva sintomática, se reserva cardíaca está exausta e com descompensação cardiorrespiratória. Os sintomas da síndrome de progressão rápida descrita podem incluir taquicardia, taquipnéia, dilatação do coração, intolerância ao exercício, congestão pulmonar e venosa, má perfusão e derrame pleural; essas manifestações podem responder à terapia de suporte cardíaco e podem ser autolimitadas ou, alternativamente, irreversíveis e sem resposta à terapia e fatais (CRUZ, 2016; KALIL FILHO, 2011; ROMANO, 2009;)

2.4. Avanços no design de nanopartículas

A nanotecnologia vem avançando ao longo dos anos nas mais diversas áreas, sendo uma ciência multidisciplinar. Na área farmacêutica, um dos setores que apresenta maior potencial é o sistema de liberação e carreamento de fármacos, que com a chegada da nanotecnologia houve forte impacto sobre as técnicas de desenvolvimento e liberação, tornando os sistemas nanoestruturados de liberação um dos campos mais promissores da indústria farmacêutica, devido a possibilidade de resgatar drogas que anteriormente foram descartadas por apresentarem características negativas como baixa biodisponibilidade, efeitos colaterais, alta toxicidade (ROSSI-BERGMANN, 2008).

Um dos alvos de pesquisa que utilizam a nanotecnologia é no tratamento do câncer, por ser uma doença que vem aumentando progressivamente ao decorrer dos anos e por apresentar uma terapêutica limitada com grandes efeitos colaterais. Com o intuito de contornar essas desvantagens, utiliza-se da estratégia de direcionamento específico do

fármaco até as células tumorais, sem que o mesmo atue em células saudáveis. Desta forma, sendo possível reduzir os efeitos colaterais usando a nanotecnologia (ROSSI-BERGMANN, 2008; MOREIRA, 2013).

Em 1979 ocorreu um dos primeiros relatos da utilização de nanopartículas poliméricas para o tratamento de câncer quando Couvreur et al. desenvolveram um método simples para a produção de nanopartículas de poli (alquilcianoacrilato). A partir disso, as nanopartículas poliméricas vêm sendo amplamente estudadas para o carreamento e a liberação de diversas drogas anticancerígenas.

Em 1994 foi lançado no mercado CaelyxTM/Doxil, o primeiro sistema de lipossomas contendo DOX que tem por objetivo veicular doses terapêuticas diretamente para as células tumorais, apresentando toxicidade bastante reduzida. Porém, por apresentar limitações intrínsecas ao sistema como custo elevado e algumas desvantagens na administração, como reconstituição na hora da administração por possuir baixa estabilidade. Sendo estável apenas por 24 horas depois de reconstituição (FORMARIZ, 2008).

Os sistemas lipossomais por apresentarem diversas desvantagens. Logo surgiram os nanocarreadores poliméricos que são sistemas carreadores de fármaco que possuem diâmetro inferior a 1000 nm, que é subdividido em outras duas nanoestruturas: nanoesferas e nanocápsulas. Diferem-se na sua composição e organização estrutural. Enquanto as nanoesferas são sistemas matriciais poliméricos, em que o fármaco encontra-se homogeneamente adsorvido ou retido na matriz polimérica, não sendo possível observar um núcleo específico. Em contrapartida, nanocápsulas também são invólucros poliméricos com a presença de um núcleo oleoso, em que o fármaco pode estar dissolvido no núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (PIRES, 2011).

As nanopartículas lipídicas podem ser classificadas em três diferentes estruturas: nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e conjugado fármaco-lipídio (CFL).

O termo nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foi introduzido por Müller e Lucks em 1996, quando patentearam um método de produção de NLS por homogeneização à alta pressão (MÜLLER E LUCKS, 1996). Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas coloidais transportadores que foram desenvolvidos para encapsular, proteger e distribuir componentes lipofílicos funcionais, tais como lipídios bioativos e fármaco. Possuem uma estrutura semelhante à nanoemulsões, com um tamanho que varia normalmente de 50 a 1000 nm. O núcleo lipídico em nanoemulsões é líquido mas, em

nanopartículas, o núcleo lipídico está no estado sólido, que tem por vantagem o aumento do controle sobre a cinética de liberação de compostos encapsulados e a melhoria da estabilidade de ingredientes lipofílicos sensíveis quimicamente (ASSIS *et al.*, 2012).

A desvantagem dos NLS é a sua baixa capacidade de encapsulamento, pois a utilização de lipídios muito semelhantes gera cristais perfeitos. Como o fármaco se localiza entre as cadeias lipídicas e nas imperfeições dos cristais, a alta organização dos cristais diminui a eficiência de encapsulamento. Com o intuito em melhorar a eficiência de encapsulamento e minimizar a expulsão do ativo das partículas durante a estocagem, no final dos anos 90, surgiram os CLN (MARCATO, 2008.)

Considerados a segunda geração de partículas lipídicas sólidas, surgiu como aprimoramento das NLS, devido à substituição parcial do lipídio sólido por um lipídio líquido em temperatura ambiente, promovendo através dessa modificação um maior desorganização em sua estrutura interna, favorecendo a formação espaços para acomodação e encapsulamento do fármaco, aumentando assim a sua capacidade de carga em comparação às NLS. Desta forma, os CLN conseguem aumentar a estabilidade físico-química por imobilizar o fármaco devido ao lipídeo sólido e permitem o aumento da capacidade de carga e impedem a expulsão do fármaco devido ao lipídio líquido (ARAUJO, 2019).

Com base no método de preparação e composição de CLNs, três tipos diferentes são propostos para CLNs. O tipo imperfeito apresenta matriz lipídica com lacunas para acomodação de fármacos na forma molecular ou em aglomerados amorfos. Isso culmina no aumento da eficiência da armadilha e maior capacidade de acomodação para os fármacos. No tipo amorfo, tem por característica a formação de nanopartículas sólidas que não sofrem cristalização, processo responsável pela expulsão do medicamento e sempre é indesejável para os sistemas transportadores de medicamentos. Tipo múltiplo tem a capacidade de incorporar maior quantidade de fármacos e controle da liberação do mesmo, devido ao encapsulamento da matriz de partículas lipídicas sólidas. Atribuído ao uso de lipídios líquidos em altas concentrações bem acima da sua solubilidade no lipídio sólido à temperatura ambiente, resultando no desenvolvimento de nanocompartimentos (SHAH; IMRAN; ULLAH, 2017).

Existe a possibilidade de alterar-se algumas propriedades das nanopartículas modificando a sua superfície que podem ser revestidas por polímeros que conferem propriedades como a capacidade de escapar do sistema retículo-endotelial (RES), atrasando assim a eliminação pelo fígado e prolongando a sua circulação na corrente

sanguínea, que podem ser designadas como nanopartículas stealth, através de nanocarreadores peguados. A utilização de polímeros como o polietilenoglicol, pode ainda minimizar a opsonização durante a circulação sanguínea, contribuem para a biocompatibilidade e redução da imunogenicidade das nanopartículas que revestem e, sendo hidrofílicos, permitem maior solubilização e estabilidade das nanopartículas poliméricas em soluções aquosas (HORTA, 2016).

Outro polímero que vem sendo utilizado nesse intuito é o Pluronic F127 que é um copolímeros que possui uma estrutura em tribloco, PEO-PPO-PEO, feito de duas cadeias de PEO: poli (óxido de etileno); e uma cadeia de PPO: poli (óxido de propileno). Atualmente é muito utilizado pela indústria farmacêutica no desenvolvimento formas farmacêuticas devido a sua capacidade aumentar tanto a solubilidade de substâncias ativas hidrofóbicas quanto melhorar a biocompatibilidade de biomateriais (CHIAPPETTA, SOSNIK, 2007; GONZALES, KRISHNAN, 2007; BASAK, BANDYOPADHYAY, 2013).

Nesse sentido, diferentes estudos estão sendo conduzidos com esses conceitos. Li *et al* (2013), desenvolveram nanocarreadores utilizando pluronic F127 funcionalizados com um peptídeo de sete aminoácidos PV7, desenvolvidas para administração intracelular do fármaco anticanceroso hidrofóbico doxorubicina (DOX). Apresentando resultado de eficiência de encapsulação de 72,68% os nanocarreadores funcionalizados mostraram-se mais potentes na liberação de DOX e com maior absorção celular.

Outra técnica utilizada para melhoria dos CLNs é a estratégia de funcionalização dos nanocarreadores com ligante específico ao alvo desejado, vertente de grande interesse dos pesquisadores, que tem por objetivo aumentar a seletividade do sistema. Quando o alvo dos CLNs são as células tumorais, utiliza-se de forma mais frequente como molécula sinalizadora o ácido fólico (AF) na superfície desses sistemas, devido a superexpressão dos receptores de folato nas células tumorais (ovário, próstata e mama) e ausência na maioria dos tecidos normais (NAKAMURA et al., 2014).

Silva (2015) desenvolveu CLN funcionalizados com folato para a veiculação de quercetina (QT) em células de câncer de bexiga (CB), sendo avaliada o potencial de encapsulamento do fármaco, citotoxicidade de QT livre e encapsulada em CLN e CLN-F em células de CB. Os resultados mostraram que o encapsulamento da QT não alterou significativamente os parâmetro de encapsulamento para ambos os carreadores, visto que, os dois apresentaram alta eficiência (98%) de encapsulamento e tanto CLN-QT e CLN-F-QT desenvolveram atividade antioxidante. Ademais, mostraram-se estáveis por 330 dias, forma esférica, tamanho menor que 200 nm, baixo pdi e como resultado do perfil de liberação

com metade do seu potencial inibitório máximo (IC50) maior para CLN-F-QT podendo ser explicado devido a funcionalização com folato que proporcionou uma maior internalização nas células. Sugerindo que, a funcionalização do CLN contendo quercetina é um sistema em potencial para futura aplicação no tratamento de câncer de bexiga e também um importante passo para o desenvolvimento de sistemas carreadores funcionalizados com folato para o tratamento de câncer.

Oshiro-júnior *et al.*, (2019) desenvolveram um transportador lipídico nanoestruturado (CLN) contendo ftalocianina funcionalizada com ácido fólico (AF), com o intuito de contornar as desvantagem dessa terapia no tratamento do câncer de mama. Os ensaios de citotoxicidade mostraram que o NLC nas concentrações de 09,1 μ M de fotossensibilizador apresenta-se não tóxico com $> 80 \pm 6,8\%$ viável e após 90s da exposição à luz os resultados demonstraram uma diminuição significativa na viabilidade celular ($57 \pm 4\%$). Os resultados obtidos demonstram que o carreador funcionalizado incorporado ao fotossensibilizador associado à técnica TFD possui características que os tornam um tratamento alternativo em potencial para o câncer de mama.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Geral

O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento e a caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados catiônicos funcionalizados com ácido fólico contendo DOX para futura aplicação no tratamento do câncer de mama

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos a serem alcançados são:

- Obtenção de uma nova molécula (PF-127-AF);
- Comprovar a funcionalização do PF-127 através de Espectrometria de Infravermelho;
- Preparar CLNs catiônicos funcionalizados com AF;
- Incorporação da DOX nos CLNs catiônicos funcionalizados;
- Caracterização dos CLNs utilizando DLS e MEV;

4 METODOLOGIA

4.1 Funcionalização do polímero sintético pluronic f127[®] com ácido fólico

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

4.2 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados

A preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foi realizada a partir da mistura da fase aquosa composta por 3,5% de PF-127-AF, 0,50% de brometo de cetrimônio (BC) e água Mili-Q; e da fase oleosa constituída por 2,07% de estearato de polioxietileno 40 (EP), 2,05% de triglicérides do ácido cáprico/caprílico (TGACC), e 0,88% de óleo de rícino hidrogenado e etoxilado 40 (OE) (SATO et al., 2017). A Tabela 1 identifica as abreviações dos CLN catiônicos funcionalizados ou não com AF, com ou sem DOX, conforme componentes e concentrações utilizadas em suas obtenções.

Tabela 1: Identificação, composição e concentração dos diferentes CLN catiônicos obtidos.

Identificação dos CLN	Concentração (%)						
	PF-127-AF	BC	EP	TGACC	OE	DOX	Água
CLN - BRANCO	-----	0,50	2,07	2,05	0,88	-----	qsp
CLN - AF	3,5	0,50	2,07	2,05	0,88	-----	qsp
CLN - DOX	-----	0,50	2,07	2,05	0,88	3	qsp
CLN-DOX - AF	3,5	0,50	2,07	2,05	0,88	3	qsp

PF-127-AF: Polímero PF-127 funcionalizado com ácido fólico; BC: Brometo de cetrimônio; EP: Estearato de polioxietileno; TGACC: Triglicérides do ácido cáprico/caprílico; OE: Óleo de rícino; DOX: Doxorrubicina; qsp: quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de sistema.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os componentes de cada fase foram pesados em béqueres separados e aquecidos a 70 °C (fase aquosa) e a 5 – 10 °C acima do ponto de fusão do lipídio (fase lipídica). A fase aquosa foi vertida sobre a fase lipídica fundida em constante agitação, originando uma pré-emulsão. A dispersão da pré-emulsão foi realizada por um desruptor de células ultrassônica em 5 ciclos de 60 segundos com intervalos de 30 segundos cada, a uma amplitude de 35%. Os sistemas foram acondicionados em frascos âmbar e mantidos em geladeira. Os CLN branco, acrescidos de DOX, funcionalizados ou não foram submetidos à centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos para visualizar se houve ou não precipitação dos componentes utilizados no preparo.

A preparação dos CLN acrescidos de DOX utilizou a mesma metodologia, de modo que a DOX foi dispersa na fase lipídica fundida na concentração de 3% em relação à massa lipídica.

4.3 Espectrometria de infravermelho

As análises de espectrometria de infravermelho foram realizadas no laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara. Para isto, foi utilizado o espectrômetro Bruker Vertex 70 ATR, com resolução de 4 cm⁻¹, tempo de escaneamento de 64 segundos, de 4000 a 400 cm⁻¹. As amostras PF-127, AF and PF 127-AF foram diluídas com KBr e preparadas na forma de pastilha (148 mg de KBr e 2 mg de amostra).

4.4 Caracterização físico-química

4.4.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e do potencial zeta

Para a caracterização dos parâmetros de distribuição média de tamanho (d.nm) e índice de polidispersão (IPD) e de potencial zeta (PZ), foi utilizado o equipamento de dispersão de luz - Nanotracs Wave ® (modelo W3192, USA) do Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) da UEPB - Campina Grande. A solução preparada de cada uma das amostras CLN - BRANCO, CLN - AF, CLN - DOX e CLN - DOX - AF foi diluída (1:100) com água milliQ e vertidas em uma cubeta que foi colocada no compartimento analisador (laser de diodo a 780 nm, 3 mW nominal, 25 °C, ângulo de espalhamento de 180°). O PZ dos CLN foi determinado por mobilidade eletroforética utilizando o mesmo equipamento e condições metodológicas. Os CLN foram analisados durante 1, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de estocagem.

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução

As morfologias e as imagens das nanopartículas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura utilizando o microscópio MEV; Topcon, modelo SM300 do Instituto de Química da UNESP. Para análise utilizou-se 10 uL de cada amostra CLN - BRANCO, CLN - AF, CLN - DOX, e CLN - DOX - AF foi disposto sobre o suporte metálico, e seco em um dessecador a temperatura ambiente por 2 dias. Logo após a secagem, o suporte foi revestido com o material condutor (Carbono).

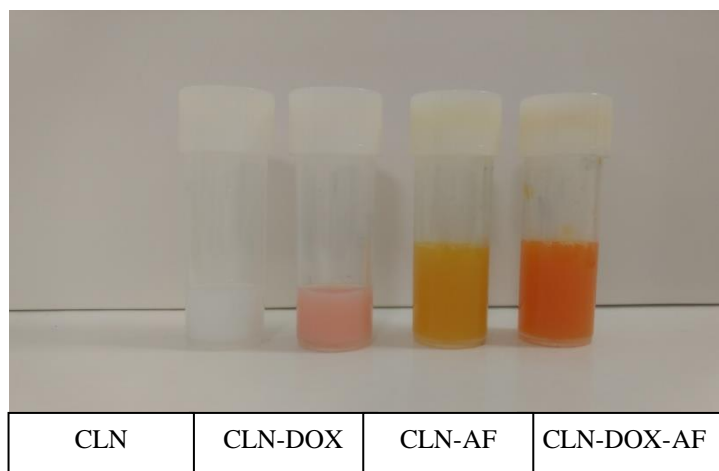
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Os componentes e as concentrações utilizadas na fase aquosa e na fase lipídica para a obtenção dos CLN catiônicos funcionalizados ou não com AF, com ou sem DOX seguiram a metodologia de Sato et al. (2017) com modificações.

Depois de prontos os sistemas CLN - BRANCO, CLN - AF, CLN - DOX e CLN - DOX - AF foram observados visualmente para verificar presença ou ausência de precipitados dos componentes, como mostra a Figura 1.

Figura 1: Imagem macroscópica dos CLN prontos.



Fonte: Dados da pesquisa.

Como observado na Figura 1 os CLN apresentaram aparências macroscópicas homogêneas de aspectos leitosos. CLN-BRANCO coloração branca. Os demais CLN catiônicos apresentaram colorações específicas decorrentes a sua composição, de modo que CLN-DOX apresentou uma coloração rosada, uma vez que a DOX incorporada no sistema possui uma pigmentação avermelhada. CLN-AF apresentou uma coloração amarelada característica da presença do AF. Enquanto que, CLN-DOX-AF apresentou uma coloração alaranjada característica do AF e da DOX incorporada no sistema.

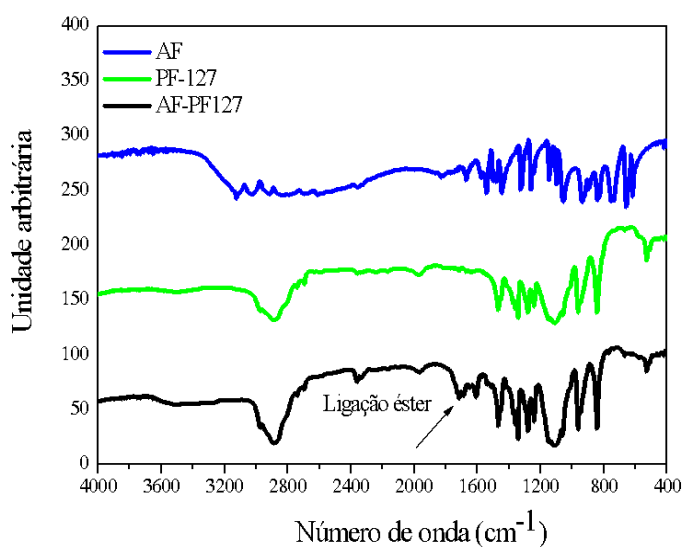
Logo após a obtenção, os CLN foram submetidos à centrifugação por 5000 rpm durante dez minutos, tendo ausência de precipitados dos componentes e de separação de fase, demonstrando assim, o aspecto homogêneo dos CLN (CLN-BRANCO, CLN-DOX, CLN-AF e CLN-DOX-AF).

5.2 Espectroscopia FTIR

O ácido fólico tem sido utilizado no direcionamento de fármacos antineoplásicos por seu baixo custo e elevada especificidade aos receptores de folato expresso na membrana celular, principalmente de células tumorais. Ademais, é um componente essencial para a formação de moléculas que compõem o DNA (purinas e pirimidinas) e portanto, apresenta dois tipos de receptores responsáveis por realizar seu transporte para o interior das células: Transportador de folato reduzido (RCF) ou receptor de folato mediado por processo de endocitose (RF). Este último favorece a captação dos nanocarreadores através do processo de endocitose, que após passar por este processo, o folato se desliga do seu receptor e o fármaco é liberado no citoplasma celular (LUIZ, 2018).

A espectroscopia de FTIR é uma técnica apropriada para entender a interação intermolecular e específicas dos componentes utilizados para a funcionalização dos CLN. Os espectros de FTIR da interação entre PF-127 e AF separados e da mistura dos dois componentes, estão apresentados na Figura 2.

Figura 2: Espectros de FTIR do Ácido fólico (AF), Pluronic F127 (PF-127) e da mistura de ácido fólico e Pluronic -127 (AF - PF127).



Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme mostra a Figura 2, o resultado de FTIR do AF puro apresentou bandas em 1620 cm^{-1} referente ao grupo C=O. As bandas do AF ácido fólico entre 3600 e 3400 cm^{-1} são correspondentes às bandas de alongamento de hidroxila (OH) da porção de ácido glutâmico e do grupo NH- do anel de pteridínico, respectivamente. O pico de vibração de

estiramento do CO aparece em 1696 cm^{-1} , enquanto a banda em 1607 cm^{-1} se relaciona com o modo de flexão da vibração NH-. As bandas entre 1513 e 1485 cm^{-1} são atribuídas à banda de absorção característica do anel de fenila e pteridínico, respectivamente. Não há absorção entre 2600 e 2000 cm^{-1} . Quando o AF coexiste com o antraceno, pequenos desvios na posição do pico em relação AF puro ocorrem em 3411 , 1507 e 1487 cm^{-1} .

O espectro de FTIR de PF-127 (Figura 2) é caracterizado por picos de absorção principais em 2884 cm^{-1} (C-H, trecho, alifático), 1342 cm^{-1} (no plano O-H) e 1111 cm^{-1} (trecho C-O).

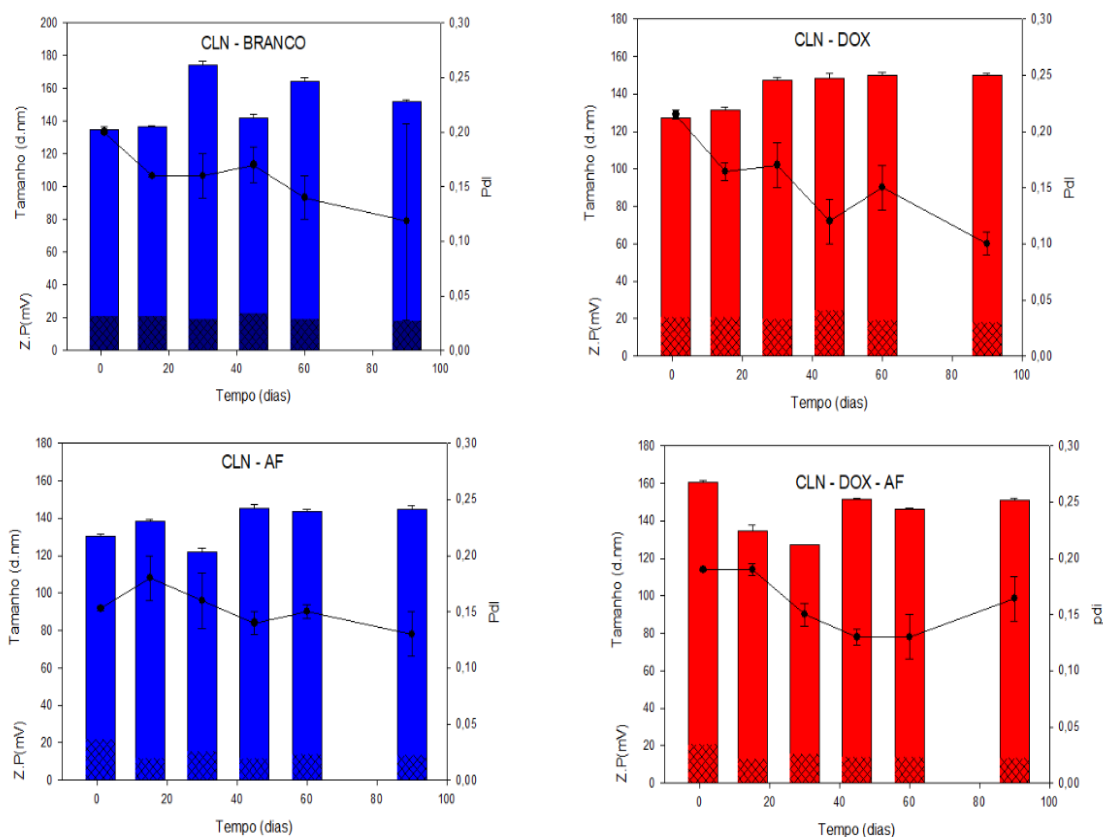
O FTIR da mistura entre AF e PF-127 (AF-PF127) resultou em um pico característico do grupamento éster em 1703 cm^{-1} destacado na figura 2, que indica a interação entre os dois componentes, indicando a funcionalização do polímero.

5.3 Caracterização físico-química

5.3.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e do Potencial zeta

Visando analisar variáveis no diâmetro médio das partículas e assim, a estabilidade dos CLN, determinou-se o diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm), IPD e o PZ (mV) dos CLN catiônicos funcionalizados ou não com AF, com ou sem DOX, durante 90 dias de estocagem, conforme a Figura 3.

Figura 3: Resultados de diâmetro médio (d.nm), IPD e de PZ de CLN -BRANCO, CLN - DOX, CLN - AF, e CLN - DOX - AF, determinados durante 90 dias de estocagem.



Fonte: Dados da pesquisa.

O estudo de diâmetro médio das partículas permite determinar a estabilidade dos sistemas nanoestruturados, de modo que alterações do diâmetro médio das partículas durante os 90 dias de estocagem possivelmente indicam a instabilidade do sistema. O aumento do diâmetro das partículas também está relacionado ao índice de recristalização do lipídio.

Além disso, o diâmetro médio das partículas pode informar se a formulação desenvolvida em sua forma farmacêutica encontra-se adequada e conveniente para a via de administração desejável. Sendo o valor máximo permitido de tamanho para essa via de 5 μm .

Neste contexto, partículas de CLN para administração intravenosa devem medir diâmetros entre 100 e 200 nm para que atravessem mais facilmente as fenestras presentes entre os vasos da região tumoral que apresenta inflamação. Desta forma, possam concentrar-se na massa tumoral aproveitando o efeito EPR. Ademais, partículas que possuem tamanho acima de 250 nm sofrem rápida depuração porque ativam o sistema complemento.

Conforme observado na Figura 3, os resultados de diâmetros médios dos CLN-BRANCO, CLN-DOX, CLN-AF, e CLN-DOX – AF do dia 1 até 90 dias de estocagem foram de 135 a 152, 127 a 150, 130 a 144 e 160 a 151 nm, respectivamente; demonstrando que as partículas dos CLN permaneceram-se estáveis ao longo do tempo, e dentro da faixa de tamanho desejado para a via de administração endovenosa.

Os valores de IPD fornecem informações sobre a homogeneidade da distribuição de tamanho dos CLN. Conforme mostra a Figura 3, CLN-BRANCO, CLN-DOX, CLN-AF, e CLN-DOX-AF permaneceram menores ou iguais a 0,2 (dia 1 a 90 dias de estocagem), indicando partículas monodispersas na dispersão dos CLN que refletem na homogeneidade dos sistemas nanoestruturados.

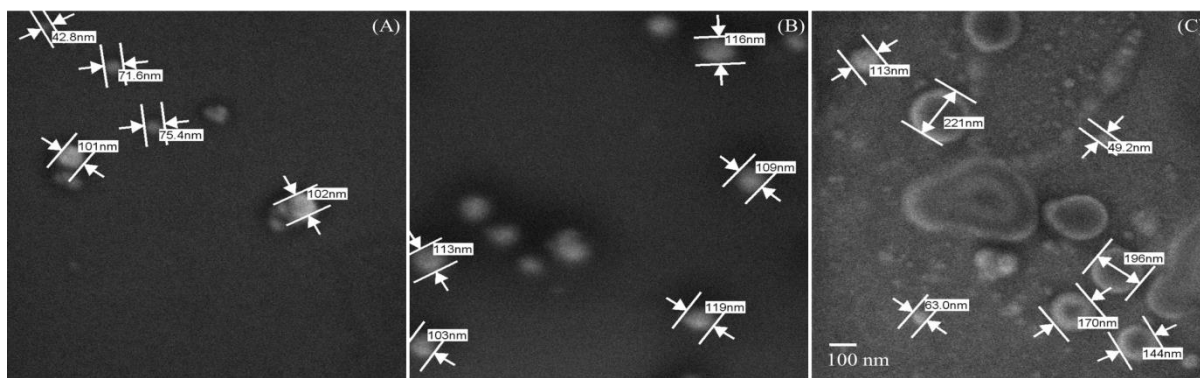
A análise de PZ indica a estabilidade física dos sistemas nanoestruturados. Em geral, devido à repulsão eletrostática, partículas de carga têm menos chances de agregação durante o período de estocagem.

Na Figura 3 podemos destacar que CLN-BRANCO, CLN-DOX, CLN-AF, e CLN-DOX-AF apresentaram partículas carregadas positivamente com valores que foram de 20,8 a 17,8; 20,8 a 18,2; 22 a 13,5 e 21 a 13,2 mV, respectivamente, do dia 1 até 90 dias, características do brometo de cetrimônio, o tensoativo amônio quaternário catiônico utilizado para a obtenção dos CLN.

5.3.2 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução

A morfologia e o tamanho da superfície das partículas foram verificados por microscopia eletrônica de varredura MEV; Topcon, modelo SM300. As fotomicrografias de CLN- BRANCO, CLN-AF e CLN-DOX-AF, se encontram na Figura 4.

Figura 4: Fotomicrografias de CLN- BRANCO (A), CLN - AF (B) e CLN - DOX - AF (C) verificados por MEV-FEG. Aumento 50.000 x.



Fonte: Dados da pesquisa.

As fotomicrografias apresentadas na Figura 4 apresentaram partículas de morfologias esféricas, sem aglomerados nas dispersões dos CLN. Possivelmente estas características foram atribuídas às cargas devido à utilização do tensoativo catiônicas BC, que favoreceram a repulsão eletrostática entre as partículas e assim, evitaram a formação de aglomerados.

6. CONCLUSÃO

A funcionalização do Pluronic com o AF foi constatada pela técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho através do surgimento da ligação éster. Os CLN catiônicos, funcionalizados ou não, com ou sem DOX desenvolvidos, apresentaram diâmetros médios dentro da faixa aceitável para a via de administração endovenosa (100 - 200 nm), IPD inferior ou igual a 0,2 que revelou sistemas nanoestruturados são monodispersos, e valores de PZ positivos, confirmando a obtenção de CLN catiônicos. A Microscopia eletrônica de varredura demonstrou que os CLN apresentaram morfologias esféricas e confirmaram o tamanho nanométrico. Assim, os resultados revelam que possivelmente o CLN desenvolvido irá possuir vetorização ativa e passiva para o câncer de mama com expressão de folato, tornando-o mais eficaz em relação ao fármaco livre contra o tecido tumoral. Desta forma, os CLN obtidos mostram-se promissores para uma possível futura aplicação endovenosa para o tratamento do câncer de mama e trabalhos futuros serão desenvolvidos visando avaliar a liberação do fármaco incorporado e a citotoxicidade desses sistemas frente a células de câncer de mama da linhagem MCF-7.

REFERÊNCIAS

- ALEGRANCE, Fábica Cristina. **Qualidade de vida e estratégias de enfrentamento de mulheres com e sem linfedema após câncer de mama**. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Psicologia da saúde) - Universidade Metodista de São Paulo, São Bernardo do Campo, 2007.
- ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118-129. 2005.
- ANDRADE, M.; SILVA, S. R. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. **Revista Brasileira de enfermagem**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 3, p. 331-335, 2007.
- ARAÚJO, V. H. S. **Desenvolvimento e caracterização de carreador lipídico nanoestruturado contendo curcumina**. 2019. 66 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2019.
- ASSIS, L. M. *et al.* Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.
- BARBOSA, S. E. M. **Achados mamográficos e fatores associados em mulheres submetidas a mamografia no município de São Luís-MA**. 2017. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em enfermagem) - Universidade Federal do Maranhão, Bacanga, 2017.
- BASAK, R.; BANDYOPADHYAY, R. Encapsulation of hydrophobic drugs in Pluronic F127 micelles: effects of drug hydrophobicity, solution temperature, and pH. **Langmuir**, Washington, v. 29, n. 13, p. 4350-4356, 2013.
- BORGES, G. S. M. **Encapsulação do diterpeno esclareol em carreadores lipídicos nanoestruturados e seu efeito sinérgico com a doxorubicina**. 2017. 101 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.
- BRANDÃO, H. N. *et al.* Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- CASTRO, R. X. **Adesão das usuárias das unidades básicas de saúde do município de Rubelita-Minas Gerais aos métodos de detecção precoce do câncer de mama**. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialista em Atenção Básica em Saúde da Família) - Universidade Federal de Minas, Araújo, 2011.

CHIAPPETTA, D. A.; SOSNIK, A. Poly (ethylene oxide)–poly (propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Nova York, v. 66, n. 3, p. 303-317, 2007.

CHIRIO, D. *et al.* Positive-charged solid lipid nanoparticles as paclitaxel drug delivery system in glioblastoma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Nova York, v. 88, n. 3, p. 746-758, novembro, 2014.

CRUZ, M.; DUARTE- RODRIGUES, J.; CAMPELO, M.. Cardiotoxicidade na terapêutica com antraciclinas: estratégias de prevenção. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, Barcelona, v. 35, n. 6, p. 359-371, 2016.

ELOY, J. O. *et al.* Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, Ribeirão Preto - SP, v. 123, p. 345-363, 2014.

EWER, M. S.; VON HOFF, D. D.; BENJAMIN, R. S. A historical perspective of anthracycline cardiotoxicity. **Heart failure clinics**, London, v. 7, n. 3, p. 363-372, 2011.

FORMARIZ, T. P. Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo Doxorubicina. 2008. 203 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

FOWLER, Susan; SCHNALL, Janet G. TOXNET: information on toxicology and environmental health. **AJN The American Journal of Nursing**, New York, v. 114, n. 2, p. 61-63, 2014.

GARCIA, G. M. **Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para direcionamento de fármacos: estudo físico-químico e aplicações no encapsulamento de fármacos anti-T. cruzi e anti-aterogênico.** 2011. 159 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

GOEBEL, M.; KAPLAN, E. Anthracycline-induced cardiotoxicity—a review. **Oncology Research and Treatment**, Basel, v. 15, n. 3, p. 198-204, 1992.

GONZALES, M.; KRISHNAN, K. M. Phase transfer of highly monodisperse iron oxide nanocrystals with Pluronic F127 for biomedical applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, Amsterdam, v. 311, n. 1, p. 59-62, 2007.

GUIMARÃES, R. C. R. *et al.* Ações de enfermagem frente às reações a quimioterápicos em pacientes oncológicos. **Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 2, p. 2440-2452, 2015.

HORTA, H. I. V. **Aplicação de nanossistemas na terapêutica do cancro do pulmão**. 2016. 69 f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Portugal, 2016.

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

KALIL FILHO, Roberto *et al.* I Diretriz Brasileira de cardio-oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 96, n. 2, p. 01-52, 2011.

KOLENYAK-SANTOS, F. *et al.* Nanostructured lipid carriers as a strategy to improve the in vitro schistosomiasis activity of praziquantel. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, New York, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2014.

LATORRE, L. R. **Purificação e caracterização de antraciclina antibiótica de uma linhagem mutante de *Streptomyces olindensis* DAUFPe 5622**. 2001. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

LI, Y. *et al.* Pluronic F127 nanomicelles engineered with nuclear localized functionality for targeted drug delivery. **Materials Science and Engineering: C**, New York, v. 33, n. 5, p. 2698-2707, 2013.

LIN, J. *et al.* Folic acid–Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. **Biomaterials**, Oxford, v. 30, n. 28, p. 5114-5124, 2009.

LUIZ, M. T. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de PLGA funcionalizadas com folato contendo paclitaxel para a otimização da terapia do câncer de ovário**. 2018. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

MARCATO, P. D. Preparation, characterization and application in drugs and cosmetics of solid lipid nanoparticles. **Revista Eletrônica de farmácia**, Goiânia, v. 6, p. 1-37, 2008.

MARCATO, P. D. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de farmácia**, Goiânia, v. 6, n. 2, 2009.

MAVADDAT, N. *et al.* Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 105, n. 11, p. 812-822, 2013.

MEDEIROS, G. C. *et al.* Análise dos determinantes que influenciam o tempo para o início do tratamento de mulheres com câncer de mama no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 1269-1282, 2015.

MENG, H. *et al.* Conjugates of folic acids with BSA-coated quantum dots for cancer cell targeting and imaging by single-photon and two-photon excitation. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, Berlin, v. 16, n. 1, p. 117-123, 2011.

MILLER, Anthony B. *et al.* The Canadian National Breast Screening Study-1: breast cancer mortality after 11 to 16 years of follow-up: a randomized screening trial of mammography in women age 40 to 49 years. **Annals of internal medicine**, Philadelphia, v. 137, n. 5 _part_1, p. 305-312, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2017.

MINOTTI, G. *et al.* Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological reviews**, Bethesda, v. 56, n. 2, p. 185-229, 2004.

MOREIRA, J. R. L.. A nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no tratamento do câncer de mama. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MOURA, L. R. Cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina: mecanismos de lesão e terapias antioxidantes. Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa (Pós Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011

MOURA, L. R. *et al.* Cardiotoxicidade induzida pela Doxorrubicina: patogenia, diagnóstico e terapias antioxidantes. 2015. f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

MÜLLER, R. H.; LUCKS, J. S. Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres—SLN). **Eur. Patent**, Austria, v. 605497, 1996.

NAKAMURA, T. *et al.* Folate-targeted gadolinium-lipid-based nanoparticles as a bimodal contrast agent for tumor fluorescent and magnetic resonance imaging. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 37, n. 4, p. 521-527, 2014.

OSHIRO JUNIOR, J. A. *et al.* Stimuli-responsive drug delivery nanocarriers in the treatment of breast cancer. **CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY**, v. 25, p. 1, 2018

OSHIRO-JÚNIOR, J. A. *et al.* Phthalocyanine-loaded nanostructured lipid carriers functionalized with folic acid for photodynamic therapy. **Materials Science and Engineering: C**, New York, v. 108. p. 110462, 2020.

PEREIRA, G. C. *et al.* Drug-induced cardiac mitochondrial toxicity and protection: from doxorubicin to carvedilol. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 17, n. 20, p. 2113-2129, 2011.

PIRES, R. O. **Modelagem matemática de perfis de liberação de fármacos a partir de nanocarreadores**. 2011. f. Dissertação (Mestrado em Nanociência) - Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2011.

RAJ, S.; FRANCO, V. I.; LIPSHULTZ, S. E. Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Current treatment options in cardiovascular medicine**, Philadelphia, v. 16, n. 6, p. 315, 2014.

ROMANO, M. M. D.; MACIEL, B. C. **Caracterização ultra-sônica tecidual miocárdica na cardiopatia induzida pela Doxorrubicina: estudo experimental animal**. 2009. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

SARDI, J. C. O. *et al.* Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, Dhaka, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SCHULZE, Marília Martins. Tratamento Quimioterápico em Pacientes Oncológicos. **Rev. Bras. Oncologia Clínica**, Belo Horizonte, v. 4, n. 12, p. 17-23, 2007.

SHAH, M. R.; IMRAN, M.; ULLAH, S. **Lipid-Based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis**. 1 ed. Oxford: William Andrew, 2017.

SILVA, A. C. *et al.* **Uma atualização sobre a influência das plantas medicinais em tratamentos de quimioterapia**. 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia aplicada) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

SILVA, L. B. **Preparação, caracterização e avaliação do potencial citotóxico in vitro de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato encapsulando quercetina em células de câncer de bexiga**. 2016. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

SILVA, P. A.; RIUL, S. S. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Uberaba- MG, v. 64, n. 6, p. 1016-1021, 2011.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 99-103, 2016.

WISHART, D. S. *et al.* DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. **Nucleic acids research**, London, v. 46, n. D1, p. D1074-D1082, 2017.

YANG, Y. *et al.* The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. **Journal of colloid and interface science**, Orlando, v. 418, p. 261-272, 2014.

ZHANG, XG. *et al.* Reversal activity of nanostructured lipid carriers loading cytotoxic drug in multi-drug resistant cancer cells. **International journal of pharmaceuticals**, New York, v. 361, n. 1-2, p. 239-244, 2008.

ZHENG, J. *et al.* Cardioprotective effects of epigallocatechin-3-gallate against doxorubicin-induced cardiomyocyte injury. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam v. 652, n. 1-3, p. 82-88, 2011

ZHOU, C. *et al.* A versatile method for the preparation of water-soluble amphiphilic oligomer-coated semiconductor quantum dots with high fluorescence and stability. **Journal of colloid and interface science**, Orlando, v. 344, n. 2, p. 279-285, 2010.