

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Farmácia

Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Bruna Beatriz Politi Gimenes

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS
LIPÍDICAS POLIMÉRICAS CONTENDO DOXORRUBICINA E SUCCINATO DE
TOCOFERILA**

Belo Horizonte

2024

Bruna Beatriz Politi Gimenes

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS
LIPÍDICAS POLIMÉRICAS CONTENDO DOXORRUBICINA E SUCCINATO DE
TOCOFERILA**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Análises Clínicas
e Toxicológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestra
em Análises Clínicas e Toxicológicas.**

Orientador: Prof. Dr. André Luís Branco de
Barros – UFMG.

Coorientadora: Profa. Dr. Renata Salgado
Fernandes – UFMG.

Belo Horizonte

2024

G491a	Gimenes, Bruna Beatriz Politi. Avaliação da toxicidade aguda de nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas contendo doxorubicina e succinato de tocoferila [recurso eletrônico] / Bruna Beatriz Politi Gimenes. – 2024. 1 recurso eletrônico (91 f. : il.) : pdf Orientador: André Luís Branco de Barros. Coorientadora: Renata Salgado Fernandes. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas. Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader. 1. Nanopartículas – Teses. 2. Doxorubicina – Teses. 3. Alfa-tocoferol – Teses. 4. Câncer de mama – Teses. 5. Toxicidade – Teses. I. Barros, André Luís Branco de. II. Fernandes, Renata Salgado. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título. CDD: 615.4
-------	---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às 14:00 horas do dia sete de outubro de dois mil e vinte e quatro, na sala 3061 da Faculdade de Farmácia da UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Bruna Beatriz Politi Gimenes**. A presidência da sessão coube ao **André Luís Branco de Barros**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Sued Eustáquio Mendes Miranda**, CDTN; **Adriano de Paula Sabino**, UFMG; **Renata Salgado Fernandes**, UFMG, coorientadora; e **André Luís Branco de Barros**, UFMG, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "Avaliação da toxicidade aguda de nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas contendo doxorubicina e succinato de tocoferila.". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **aprovada a Dissertação de Mestrado**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 07 de outubro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Renata Salgado Fernandes**, Usuário Externo, em 08/10/2024, às 10:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Luís Branco de Barros**, Professor do Magistério Superior, em 08/10/2024, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sued Eustáquio Mendes Miranda**, Usuário Externo, em 08/10/2024, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriano de Paula Sabino**, Professor do Magistério Superior, em 08/10/2024, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

Ata de defesa de Dissertação/Tese 3573818 SEI 23072.254348/2024-52 / pg. 1



https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3573818 e o código CRC 65AA0167.

Dedico este trabalho à minha família, pelo constante encorajamento e compreensão nos momentos de ausência e dedicação intensa, vocês são meu alicerce.

À minha querida avó Venância, cujo amor, sabedoria continuam a iluminar meu caminho, mesmo na sua ausência física.

Aos meus amigos e colegas, pela troca de experiências, pelo apoio mútuo e por tornarem esta caminhada acadêmica mais leve e enriquecedora.

Ao meu orientador André, e minha coorientadora Renata, pela orientação e coorientação competente, pela paciência e confiança depositada em meu trabalho.

Agradeço também a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho é dedicado a vocês com todo o meu carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, por me permitir viver essa experiência incrível, iluminando todo meu caminho, juntamente com a minha querida Vó Venancinha.

Aos meus pais Sérgio e Marília, por todo amor e apoio incondicional. Aos meus irmãos Wesley, Neguinho e Larissa, que mesmo na distância se fizeram presente todos os dias dessa jornada. E a todos amigos e familiares, que participaram e torceram por minha conquista.

Ao meu orientador André Luís e minha coorientadora Renata, pela oportunidade única de me introduzir à área científica. Foram fundamentais, não apenas para realização deste trabalho, como também, para meu crescimento acadêmico e pessoal ao longo deste percurso.

A Juliana, Janaina, por compartilharem suas vastas experiências e conhecimentos ao longo da minha pesquisa, foram sem sombra de dúvidas essenciais para formação. A Thais, Nayara, Giovanna, e todos colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), professores e funcionários, por contribuírem com o desenvolvimento do meu projeto, e tornarem minha rotina agradável.

As minhas companheiras de todos os momentos, Ana e Carol, por estarem junto comigo nesses dois anos, no laboratório e na vida pessoal, tornaram meu dia a dia, feliz e motivador, obrigada pela irmandade.

Aos colaboradores, Geovanni, Marília, Raquel, Marthin, Lucas, Armando, que foram essenciais e indispensáveis para desenvolvimento do projeto.

As agências de fomento, FAPEMIG, CAPES, CNPq, pelo apoio financeiro e pela oportunidade de realizar este trabalho.

"O verdadeiro método da investigação é ter sempre em mente que a natureza nunca se deixa vencer pela força, mas que cede sempre aos perseverantes e tenazes esforços."

(LEONARDO DA VINCI)

RESUMO

O uso de nanopartículas híbridas tem se tornado cada vez mais atraente para o encapsulamento de fármacos, pois esses sistemas conseguem combinar vantagens tanto dos sistemas lipídicos quanto dos sistemas poliméricos. A doxorrubicina, é um potente agente antineoplásico que possui grandes efeitos terapêuticos, porém tem seu uso limitado devido aos efeitos adversos associados ao seu tratamento, especialmente a cardiotoxicidade. Nesse sentido, o encapsulamento da doxorrubicina em nanopartículas é uma abordagem interessante uma vez que potencializa sua ação terapêutica e proporciona a redução da toxicidade em células saudáveis. O α -succinato de tocoferila, um éster derivado da vitamina E, hidrofóbico e biodegradável, também apresenta características antitumorais, tornando-o um bom agente adjuvante para o tratamento. Além disso, suas características físico-químicas possibilitam a formação de um par-iônico com a doxorrubicina, o que é determinante para o sucesso da encapsulação. Nesse trabalho, a toxicidade aguda de nanopartículas híbridas lipídicas-poliméricas contendo doxorrubicina e α -succinato de tocoferila (LPNP-DOX-ST) foi avaliada em modelo experimental. As nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas foram preparadas pelo método de emulsificação/evaporação de solvente e caracterizadas quanto aos parâmetros físico-químicos e hemocompatibilidade. Para o estudo de toxicidade, camundongos saudáveis foram tratados com doxorrubicina ou LPNP-DOX-ST em dose única, por via intravenosa, e observados por 7 e 14 dias. Os animais foram eutanasiados e o sangue e órgãos coletados para exames hematológicos, bioquímicos e histopatológicos. Resultados mostraram partículas com diâmetro médio em torno de 140 nm, índice de polidispersividade menor que 0,3, potencial zeta em torno de -38,0 mV e eficiência de encapsulação próxima de 100% ($99,69 \pm 0,05$). A formulação se mostrou hemocompatível até dose equivalente a 20mg/kg de DOX. Observou-se uma redução significativa na mortalidade dos animais no grupo tratado com LPNP-DOX-ST em comparação ao grupo que recebeu a mesma dose de DOX livre. Além disso, observou-se diminuição significativa na toxicidade renal, hepática e cardíaca nos animais tratados com LPNP-DOX-ST. Esses resultados sugerem que o nanossistema apresenta um potencial promissor como alternativa terapêutica, uma vez que é capaz de reduzir a toxicidade sistêmica, proporcionando um tratamento mais seguro e eficaz.

Palavras-chaves: nanopartículas híbridas; doxorubicina; α -succinato de tocoferila; câncer de mama; toxicidade.

ABSTRACT

The use of hybrid nanoparticles has become increasingly attractive for drug encapsulation, as these systems combine the advantages of both lipid-based and polymer-based systems. Doxorubicin, a potent antineoplastic agent, has significant therapeutic effects but its use is limited due to the adverse effects associated with treatment, particularly cardiotoxicity. In this context, encapsulating doxorubicin in nanoparticles is an appealing approach as it enhances its therapeutic action while reduces toxicity in healthy cells. Alpha-tocopheryl succinate, a hydrophobic and biodegradable ester derived from vitamin E, also exhibits antitumor properties, making it a valuable adjuvant in treatment. Additionally, its physicochemical characteristics allows the formation of an ionic pair with doxorubicin, which is crucial for successful encapsulation. In this study, the acute toxicity of hybrid lipid-polymeric nanoparticles containing doxorubicin and alpha-tocopheryl succinate (LPNP-DOX-ST) was evaluated in an experimental model. The hybrid lipid-polymeric nanoparticles were prepared using the emulsification/solvent evaporation method and characterized in terms of physicochemical parameters and hemocompatibility. For the toxicity study, healthy mice were treated with either doxorubicin or LPNP-DOX-ST in a single intravenous dose and observed for 7 and 14 days. The animals were euthanized, and blood and organs were collected for hematological, biochemical, and histopathological analyses. Results showed particles with an average diameter of around 140 nm, a polydispersity index of less than 0.3, a zeta potential of approximately -38.0 mV, and an encapsulation efficiency near 100% (99.69 ± 0.05). The formulation was found to be hemocompatible at doses equivalent to 20 mg/kg of DOX. A significant reduction in animal mortality was observed in the group treated with LPNP-DOX-ST compared to the group that received the same dose of free DOX. Additionally, a significant decrease in renal, hepatic, and cardiac toxicity was observed in animals treated with LPNP-DOX-ST. These results suggest that the nanosystem holds promising potential as a therapeutic alternative, as it is capable of reducing systemic toxicity, providing a safer and more effective treatment.

Keywords: hybrid nanoparticles; Doxorubicin; α -tocopheryl succinate; breast cancer; toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estimativa de incidência e mortalidade de câncer globalmente, de 2022 a 2050.

Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.

Figura 3: Estrutura química da Doxorubicina.

Figura 4: Mecanismos de ação da doxorubicina.

Figura 5: Estrutura química de α -Succinato de tocoferila.

Figura 6: Efeito de permeabilidade e retenção aumentada.

Figura 7: Espectro de design e propriedades para desenvolvimento de nanossistema

Figura 8: Aplicações terapêuticas das Nanopartículas Híbrida Lipídica Polimérica.

Figura 9: Modelo esquemático de Nanopartículas Híbrida Lipídica Polimérica.

Figura 10: Representação esquemática do método de preparo LPNP-DOX-ST.

Figura 11: Caracterização físico-química das amostras liofilizadas.

Figura 12: Apresentação dos líofilos formados após liofilização das LPNP-DOX-ST com diferentes crioprotetores, em diferentes razões.

Figura 13: Estudo de hemólise realizado com LPNP-Branca em diferentes concentrações.

Figura 14: Porcentagem de variação do peso corporal de camundongos BALB/c fêmeas tratadas, com DOX-livre, Lipossoma contendo DOX, LPNP-Branca e LPNP-DOX-ST, em diferentes concentrações, por 7 dias.

Figura 15: Porcentagem de variação do peso corporal de camundongos BALB/c fêmeas tratadas, com DOX-livre, Lipossoma contendo DOX, LPNP-Branca e LPNP-DOX-ST, em diferentes concentrações, por 14 dias.

Figura 16: Cortes histológicos do fígado de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 14 dias.

Figura 17: Cortes histológicos do fígado de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 7 dias.

Figura 18: Cortes histológicos do rim de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 14 dias.

Figura 19: Cortes histológicos do rim de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 7 dias.

Figura 20: Cortes histológicos do coração de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 14 dias.

Figura 21: Cortes histológicos do coração de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 7 dias.

Figura 22: Cortes histológicos da medula de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 14 dias.

Figura 23: Cortes histológicos da medula de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 7 dias.

Figura 24: Intervalo QT (ms) de camundongos BALB/c fêmeas tratados com Salina, DOX, LPNP-Branca, LPNP-DOX-ST e Lip-DOX em determinadas concentrações.

Figura 25: Intervalo QTc (ms) de camundongos BALB/c fêmeas tratados com Salina, DOX, LPNP-Branca, LPNP-DOX-ST e Lip-DOX em determinadas concentrações.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos utilizados para fazer análises comparativas, com tratamento de duração de 7 dias e 14 dias.

Tabela 2: Caracterização físico-química e eficiência de encapsulação de LPNP-DOX-ST, LPNP-Branca e Lip-DOX.

Tabela 3: Estabilidade de armazenamento: LPNP-DOX-ST em dispersão aquosa acondicionada a 2-8°C.

Tabela 4: Estabilidade de armazenamento: LPNP-DOX-ST liofilizada acondicionada a 2-8°C.

Tabela 5: Estabilidade de armazenamento: LPNP-DOX-ST liofilizada acondicionada a -20°C.

Tabela 6: Mortalidade de camundongos BALB/c fêmea após os tratamentos de 14 dias. Cada tratamento foi administrado por via intravenosa, em diferentes concentrações, conforme indicado na tabela.

Tabela 7: Parâmetros hematológicos referentes a série branca de camundongos BALB/c tratados com Salina, DOX-livre, LPNP-Branca, LPNP-DOX-ST e Lip-DOX em determinadas concentrações, conforme indicado na tabela.

Tabela 8: Parâmetros hematológicos referentes a série vermelha de camundongos BALB/c tratados com Salina, DOX-livre, LPNP-Branca, LPNP-DOX-ST e Lip-DOX em determinadas concentrações, conforme indicado na tabela.

Tabela 9: Parâmetros bioquímicos avaliados em camundongos BALB/c tratados com Salina, DOX, LPNP-Branca, LPNP-DOX-ST e Lip-DOX em determinadas concentrações, conforme indicado na tabela.

Tabela 10: Parâmetros eletrocardiográficos de camundongos BALB/c fêmeas tratados com Salina, DOX, LPNP-Branca, LPNP-DOX-ST e Lip-DOX em determinadas concentrações, conforme indicado na tabela.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: porcentagem de eficiência de encapsulação.

Equação 2: porcentagem de eficiência de encapsulação.

Equação 3: porcentagem de hemólise.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT alanina amino transferase

AST aspartato amino transferase

CK-MB creatinoquinase total MB

DNA ácido desoxirribonucleico

DOX doxorubicina

ECG eletrocardiograma

EE% eficiência de encapsulação

EPR efeito de permeabilidade e retenção aumentada

GRAN granulócitos

HCT hematócrito

HGB hemoglobina

INCA instituto nacional de câncer

IP índice de polidispersão

Lip-DOX lipossoma contendo doxorubicina

LPNP nanopartícula híbrida lipídica polimérica

LPNP-Brancas nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas sem os ativos

LPNP-DOX-ST nanopartícula híbrida lipídica polimérica contendo doxorubicina e α -succinato de tocoferila

MEC matriz extracelular

PEG poli(etilenoglicol)

PKa farmacocinética

PLGA Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PLT plaqueta

PZ potencial zeta

RBC glóbulos vermelhos

RDW amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos

RNA ácido ribonucleico

SFM sistema fagocitário mononuclear

TEA trietanolamina

TME microambiente tumoral

TNBC câncer de mama triplo negativo

TOH tocoferóis

UV-VIS UV-Visible Espectrofotômetro

WBC global de leucócitos

α -TOS α -succinato de tocoferila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Câncer	19
2.2 Câncer de mama	22
2.3 Tratamento	24
2.4 Doxorubicina	26
2.5 α -Succinato de tocoferila	28
2.6 Nanossistemas	29
2.7 Nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas	32
2.8 Avaliação da toxicidade aguda	35
2.9 Considerações finais	36
3 OBJETIVO	36
3.1 Objetivos específicos	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Materiais	37
4.2. Métodos	37
4.2.1 Preparo da LPNP-DOX-ST	37
4.2.2 Preparo dos lipossomas contendo DOX	38
4.2.3 Caracterização físico-química	39
4.2.4 Teor de encapsulação	39
4.2.5 Liofilização	40
4.2.6 Estabilidade de armazenamento	40
4.2.7 Estudo de hemólise	40
4.2.8 Estudos de toxicidade aguda in vivo	41
4.2.9 Investigação do hemograma e análise bioquímica	43
4.2.10 Análises histopatológicas	43
4.2.11 Análise eletrocardiográfica	44
4.2.12 Análise estatística	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Caracterização físico-química	45
5.2 Liofilização	48
5.3 Estabilidade de armazenamento	50
5.4 Estudo de hemólise	53

5.5 Estudos de toxicidade aguda.....	55
5.5.1 Avaliação do peso corporal, sinais clínicos e mortalidade.....	55
5.6 Investigação do hemograma e análise bioquímica	58
5.6.1 Investigação do hemograma	58
5.6.2 Análise bioquímica	62
5.7 Análise histopatológica	65
5.8 Análise eletrocardiográfica	71
6 Conclusão	75
7 PERSPECTIVAS	76
8 REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um importante alvo de estudos visto que, sua incidência e mortalidade na população é extremamente alta, tornando-se um grave problema de saúde pública por todo o mundo (BRAY et al., 2018). O processo de carcinogênese é caracterizado pelo crescimento acelerado e descontrolado de células, resultando na formação de células anormais que se multiplicam sem diferenciação adequada, invadindo tecidos e órgãos adjacentes. O câncer de mama é um dos mais prevalentes e foi responsável por cerca de quase 3 milhões novos casos globalmente em 2020 (WHO, 2021a).

Devido à incidência e gravidade dessa doença, diversos tratamentos podem ser adotados, podendo ser divididos em tratamento local (cirurgia e radioterapia) e tratamento sistêmico (quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica), variando de acordo com o estadiamento da doença (extensão) e as características do tumor (VALLEJOS et al., 2010).

A terapia combinada vem ganhando espaço no tratamento de tumores sólidos, e também para cânceres hematológicos, como estratégia terapêutica para contornar a resistência aos fármacos (TORCHILIN, 2011), potencializar a eficácia e reduzir a toxicidade. A doxorrubicina (DOX) é um quimioterápico com grande poder terapêutico, utilizado na clínica atualmente, porém seu uso é limitado, devido aos seus efeitos adversos, principalmente, a cardiotoxicidade (McGOWAN et al., 2017). Nesse contexto, a combinação da DOX com α - succinato de tocoferila, um composto derivado da vitamina E, que também possui propriedades antineoplásicas, apresenta-se como uma abordagem interessante.

Uma estratégia promissora para a veiculação de múltiplos fármacos baseia-se no emprego de nanocarreadores capazes de incorporar diferentes moléculas e permitir a sua entrega simultânea em sítios específicos. Em particular, áreas afetadas por tumores apresentam vasos sanguíneos mais permeáveis e um sistema linfático deficitário em um fenômeno conhecido por efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR). Dessa forma, é possível o extravasamento e acúmulo de nanossistemas na região de interesse. Nesse contexto, previamente em nosso grupo, nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas contendo DOX e α - succinato de tocoferila foram preparadas e demonstraram resultados promissores de eficácia

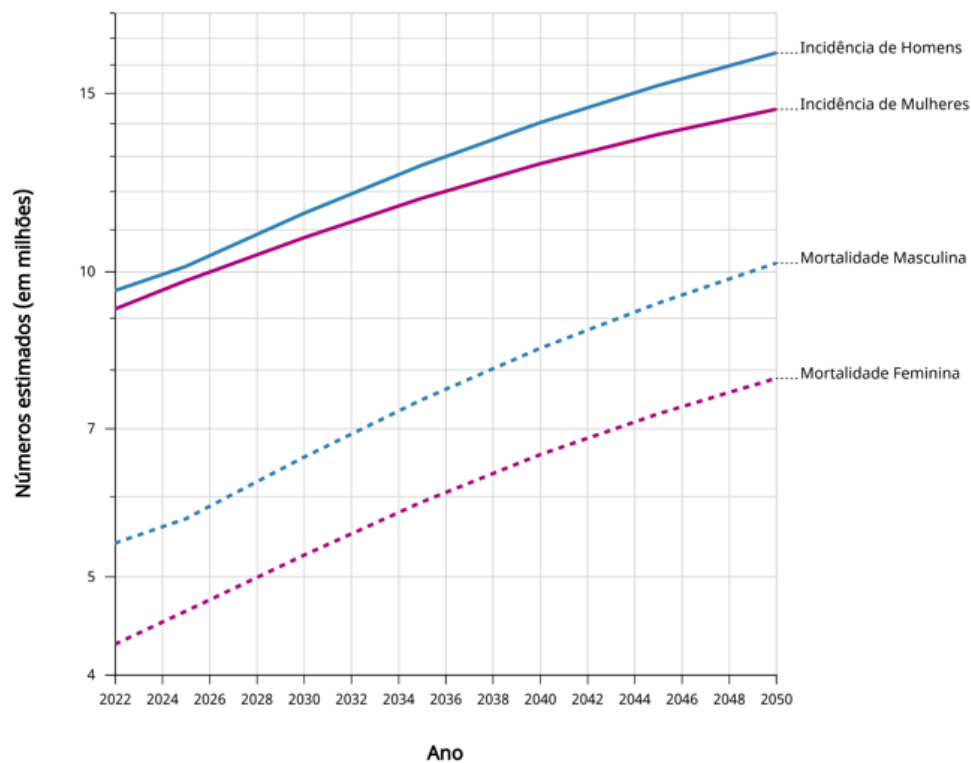
antitumoral indicando sua potencialidade com alternativa terapêutica para essa doença (FERNANDES et al., 2022). Diante do avanço terapêutico alcançado com o emprego da terapia combinada com nanopartículas híbridas, torna-se clara a necessidade em avaliar seus possíveis efeitos tóxicos para garantir que haja, além dos benefícios terapêuticos, a redução de riscos à saúde do paciente. Portanto, nesse trabalho são apresentados os estudos de toxicidade sistêmica da nova formulação com ênfase nas análises de órgãos alvo como, fígado, rins e coração para contribuir na elucidação do perfil de segurança do tratamento proposto.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

Em 2020, aproximadamente 10 milhões de mortes foram atribuídas ao câncer, representando cerca de uma em cada seis fatalidades registradas globalmente, tornando-se uma das principais causas de morte no mundo. Os tipos mais prevalentes em termos de novos casos incluem câncer de mama (2,26 milhões de casos), pulmão (2,21 milhões de casos), colo e reto (1,93 milhão de casos), próstata (1,41 milhão de casos), pele (1,20 milhão de casos) e gástrico (1,09 milhão de casos). Quanto ao número de óbitos, os cânceres que mais causaram mortes foram o câncer de pulmão (1,8 milhão de mortes), colo e reto (916 mil mortes), hepático (830 mil mortes), gástrico (769 mil mortes) e câncer de mama (685 mil mortes) (WHO, 2021a). Como indicado na Figura 1, tanto a incidência quanto a mortalidade tendem a aumentar continuamente ao longo dos anos.

Figura 1: Estimativa de Incidência e mortalidade de câncer globalmente, de 2022 a 2050.



Fonte: GLOBOCAN (2022)

Em 2023, o Brasil registrou 341.350 novos casos de câncer na população masculina e 362.730 novos casos na população feminina. Nos homens, os tipos mais comuns incluem câncer de próstata, com 71.730 novos casos (30,0%), seguido por câncer de cólon e reto, com 21.970 casos (9,2%), e câncer de traqueia, brônquio e pulmão, com 18.020 casos (7,5%). Entre as mulheres, o câncer de mama é o mais frequente, com 73.610 novos casos (30,1%), seguido pelo câncer de cólon e reto (23.660 casos, 9,7%), câncer do colo do útero (17.010 casos, 7,0%) e câncer de traqueia, brônquio e pulmão (14.540 casos, 6,0%), conforme demonstrado na figura 2 (INCA, 2022).

Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2022)

A compreensão do câncer foi enriquecida pela teoria da evolução de Charles Darwin, que oferece uma perspectiva sobre como células tumorais podem evoluir e se adaptar rapidamente em resposta ao ambiente e aos tratamentos, refletindo princípios da seleção natural. Essa abordagem evolutiva permitiu uma melhor compreensão das dinâmicas celulares no câncer, levando à definição contemporânea da doença como um processo altamente complexo, onde a interação entre células tumorais e o microambiente influencia sua progressão e resistência terapêutica (CAHILL et al., 1999). O câncer se inicia com um conjunto de mutações que ocorre em uma célula, perdendo a capacidade de se diferenciar e aumentando a multiplicação. Essa proliferação anormal, conhecida como neoplasia, pode ser classificada em benigna, com crescimento organizado, geralmente lento e expansivo com limites bem evidentes, e maligna, que apresenta maior autonomia, capacidade de invadir tecidos vizinhos e potencial para gerar metástases (INCA, 2019).

Além dos fatores genéticos que predisõem o desenvolvimento dos tumores, podemos citar os fatores externos, no qual, estão associados com padrões de vida adotados pelas pessoas, como alimentação inadequada, tabagismo, consumo de álcool, excesso de exposição ao sol e de modo geral, exposição dos indivíduos a agentes químicos, físicos e biológicos, em que frequentemente, estão interligados com o nível socioeconômico (CARMO; BARRETO; SILVA, 2003).

O microambiente tumoral (TME) é composto por células cancerosas e não cancerosas, com componentes celulares e não celulares que desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do tumor. Entre os componentes celulares estão as células estromais, células do sistema imune (inata e adaptativa), células endoteliais, fibroblastos, neurônios, adipócitos. Já os componentes não celulares, são compostos

pela matriz extracelular (MEC), quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e vesículas extracelulares. Além disso, estas células também influenciam significativamente a resposta aos tratamentos terapêuticos, modulando a eficácia e a resistência às terapias utilizadas. A interação complexa entre as células cancerosas e as células do microambiente tumoral cria um ambiente dinâmico que pode promover a progressão do câncer e influenciar diretamente o prognóstico dos pacientes (ANAND et al., 2008).

O microambiente tumoral é ácido pois possui um metabolismo alterado, no qual, as células cancerígenas tendem a ter um metabolismo anormalmente elevado, com uma taxa de crescimento rápido, resultando em um consumo acelerado de glicose e produção aumentada de ácido lático por meio da via metabólica, glicólise aeróbica. O acúmulo de ácido lático leva a uma diminuição do pH no ambiente ao redor das células cancerígenas.

Tumores com diâmetro inferior a 1-2 mm recebem nutrientes por difusão passiva, mas, à medida que crescem, precisam formar novos vasos sanguíneos para sua nutrição, um processo chamado angiogênese. Os vasos sanguíneos tumorais, porém, são desorganizados, tortuosos, dilatados e possuem ramificações irregulares, resultando em fluxo sanguíneo variável e hipóxia em algumas regiões. A alta pressão nos tumores sólidos colapsa os vasos linfáticos, dificultando a eliminação de macromoléculas. Estruturalmente, os vasos tumorais possuem "aberturas" (fenestrações endoteliais, vesículas e aberturas transcelulares) que variam de 100 a 800 nm, facilitando a penetração de macromoléculas, o que pode ser relevante para a quimioterapia (FREITAS et al., 2020; VIEIRA et al., 2016).

2.2 Câncer de mama

O câncer de mama é o tipo mais comum no mundo, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, com aproximadamente 2,3 milhões de novos casos em 2020. No Brasil, ocupa o segundo lugar em prevalência, sendo a principal causa de morte por câncer entre mulheres (INCA, 2019).

Além dos fatores ambientais e comportamentais que podem aumentar a suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores, no câncer de mama podemos destacar também a idade como fator de risco, já que cerca de quatro a cada cinco casos ocorrem após os 50 anos. O Ministério da Saúde recomenda o rastreamento

por meio da mamografia em mulheres de 50 à 69 anos, a cada dois anos, pela busca de um diagnóstico precoce, com a estratégia de reduzir a apresentação do estágio avançado do câncer de mama. Além disso, também é indicado a realização do autoexame frequentemente para análise das mamas e assim a busca por assistência médica quando possuir qualquer alteração suspeita (WHO, 2007; INCA, 2015).

Este tipo de câncer pode ser classificado em vários subtipos, que são definidos como: receptores hormonais positivos (HR+) ou receptores hormonais negativos (HR-), de acordo com a presença ou ausência de receptores (proteínas que se ligam ao estrogênio ou progesterona) e também pela extensão do tumor. Essa classificação é de extrema importância pois irá determinar a forma de tratamento adequada para cada paciente e seu prognóstico.

Os tumores de mama podem ser distinguidos de acordo com o tecido acometido e seus receptores. O carcinoma ductal in situ é o mais comum, não é invasivo, porém tem potencial para se transformar em invasor, pode afetar os ductos da mama, e possui a presença de um ou mais receptores hormonais na superfície das células. Já o carcinoma ductal invasivo causa o acometimento dos ductos da mama, e pode invadir os tecidos que os circundam por meio da circulação sanguínea e linfática, assim como o carcinoma lobular invasivo que tem capacidade de se estender em tecidos adjacentes, originando-se nos lobos mamários. O carcinoma lobular in situ é de mesma origem, porém não possui capacidade de se estender.

Em relação aos receptores hormonais, existem alguns subtipos raros na população, como o carcinoma inflamatório (raramente apresenta receptores hormonais, caracterizado pela forma mais agressiva de câncer de mama) e a doença de Paget (acomete a aréola ou mamilos, é caracterizado por alterações na pele do mamilo, como crostas e inflamações) (GOBBI, 2012).

Além destes, os tumores podem ser classificados como, câncer de mama HER2+ e câncer de mama triplo negativo (TNBC). HER2+ são células cancerígenas que apresentam receptor do tipo II para a proteína HER (human epidermal growth fator – fator de crescimento epidérmico humano), possuindo tendência maior de crescimento e disseminação acelerada, respondendo a imunoterapia que possui como alvo a proteína HER2 (MITRI; CONSTANTINE; O-REGAN, 2012). Os TNBC, responsável por aproximadamente 15 a 20% de todos carcinomas mamários (GARRIDO-

CASTRO; LIN; POLYAK, 2019) são, na sua grande maioria, carcinomas ductais invasivos de alto grau (PAREJA et al., 2016), definido pela ausência de receptores de estrogênio, progesterona e para proteína HER2 (SUBIK; LEE; BAXTER et al., 2010). Considerado um tumor agressivo, com rápida proliferação e disseminação, além de não possuir um bom prognóstico e sobrevida após o diagnóstico, devido à falta de alvos terapêuticos.

Embora o TNBC seja uma entidade clínica heterogênea, estudos utilizando sequenciamento completo do genoma têm revelado uma significativa diversidade molecular tanto entre diferentes tumores (intertumoral) quanto dentro de um mesmo tumor (intratumoral). Tais descobertas têm facilitado a classificação dos subtipos de TNBC, em que, os mais reconhecidos estão os seis clusters identificados por Lehmann em 2011, que incluem os subtipos basal-like (BL1 e BL2), imunomodulador (IM), receptor luminal de andrógeno (LAR), mesenquimal (M), e mesenquimal-stem-like (MSL) (LEHMANN et al., 2011). A partir dessa abrangente informação, considerando a malignidade da doença e sua resistência a drogas, se faz necessário abordagens terapêuticas promissoras e inovadoras para o tratamento.

2.3 Tratamento

Existem vários tratamentos para o câncer de mama, que incluem opções locais (cirurgia e radioterapia) e sistêmicas (quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica). A escolha depende do estágio da doença e das características do tumor (VALLEJOS et al., 2010).

O procedimento cirúrgico pode ser dividido em cirúrgica conservadora ou não conservadora. A técnica conservadora pode incluir o procedimento de tumorectomia, que faz a remoção do tumor sem margens, ou a setorectomia que faz a remoção do tumor com margens. Já as cirurgias não conservadoras incluem, adenomastectomia, que faz a retirada da glândula mamária; mastectomia simples ou total, que faz a retirada da mama, com preservação dos músculos peitorais ou com retirada total do músculo peitoral (SCHWARTZ et al., 2000).

A radioterapia é frequentemente utilizada após a cirurgia conservadora (mastectomia parcial) para eliminar quaisquer células cancerígenas remanescentes e reduzir o risco de recidiva local. Também pode ser indicada após a mastectomia em pacientes com maior risco de recorrência (FISHER et al., 1995). A radioterapia é uma técnica

terapêutica que utiliza radiações ionizantes para destruir ou inibir o crescimento de células anormais, sendo uma ferramenta essencial no tratamento do câncer de mama. Ela pode ser classificada em dois tipos principais, a radioterapia externa, que envolve a irradiação do tecido mamário com doses fracionadas ao longo de várias semanas, visando minimizar a exposição de tecidos saudáveis; e a radioterapia interna, ou braquiterapia, que consiste na inserção de fontes radioativas diretamente dentro ou próximo ao tumor, proporcionando uma alta dose de radiação em uma área localizada (HENRY et al., 2020; JAGSI et al., 2019).

Já a quimioterapia é o método de escolha para o tratamento sistêmico da doença e baseia-se no uso de fármacos administrados por via oral ou intravenosa, para o controle e combate do câncer, em especial a doença metastática. Pode ser empregada como quimioterapia adjuvante, realizada após a cirurgia para destruir as células tumorais remanescentes do procedimento cirúrgico, que não podem ser visualizadas pelos exames de imagem, diminuindo o risco da recidiva; quimioterapia neoadjuvante, administrada antes da cirurgia para tentar reduzir o tamanho do tumor de modo que ele possa ser retirado com um procedimento menos extenso; ou utilizado como tratamento principal para a doença disseminada (HENRY et al., 2020).

Vários fármacos têm sido utilizados na quimioterapia com base em seus mecanismos de ação, que incluem intervenção direcionada como inibição do ciclo celular, antiangiogênese, bloqueio das vias MAPK e PI3K, além da inibição da resposta a danos no DNA. Esses agentes são selecionados para o tratamento de acordo com suas capacidades de interferir em vias metabólicas e processos biológicos relacionados ao crescimento tumoral (ALMEIDA et al., 2005). O conhecimento sobre subtipos de TNBC e das alterações moleculares, possibilita uma melhor escolha terapêutica, baseada em alvos mais específicos.

Portanto, podemos classificar os principais alvos terapêuticos e fármacos apropriados para TNBC, como os alquilantes, que atuam impedindo a célula de se reproduzir, danificando o DNA; os antimetabólitos, que interferem no DNA e RNA; os inibidores mitóticos, que atuam interferindo na divisão celular; e as antraciclinas, que agem nas enzimas envolvidas na cópia do DNA durante o ciclo celular (FISHER et al., 1990).

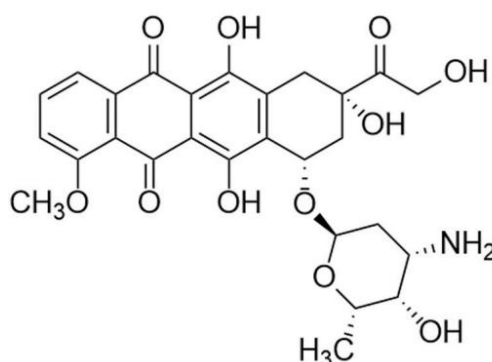
No entanto, o uso de quimioterápicos não apenas pode resultar em danos indiscriminados às células saudáveis, causando diversos efeitos adversos,

impactando significativamente a qualidade de vida dos pacientes tratados, como também pode levar ao desenvolvimento de resistência terapêutica (ELIAS et al., 2015).

2.4 Doxorrubicina

A doxorrubicina (DOX) é um quimioterápico pertencente à classe das antraciclinas, que foi isolada da espécie de fungo *Streptomyces peucetius*. (BIBB, 2005). A DOX é um policetídeo aromático do tipo II, consistindo de uma estrutura tetracíclica linear de 7,8,9,10-tetrahidro-5,12-naftacenoquinona, com uma estrutura de polihidroxiantraquinona (BROCKMANN, 1963). É uma molécula anfipática, com a estrutura formada por uma porção aglicona insolúvel em água (hidrofóbica) e uma porção aminoaçúcar básica solúvel em água (hidrofílica), conforme figura 3 (ABRAHAM, 2005).

Figura 3: Estrutura química da Doxorrubicina.



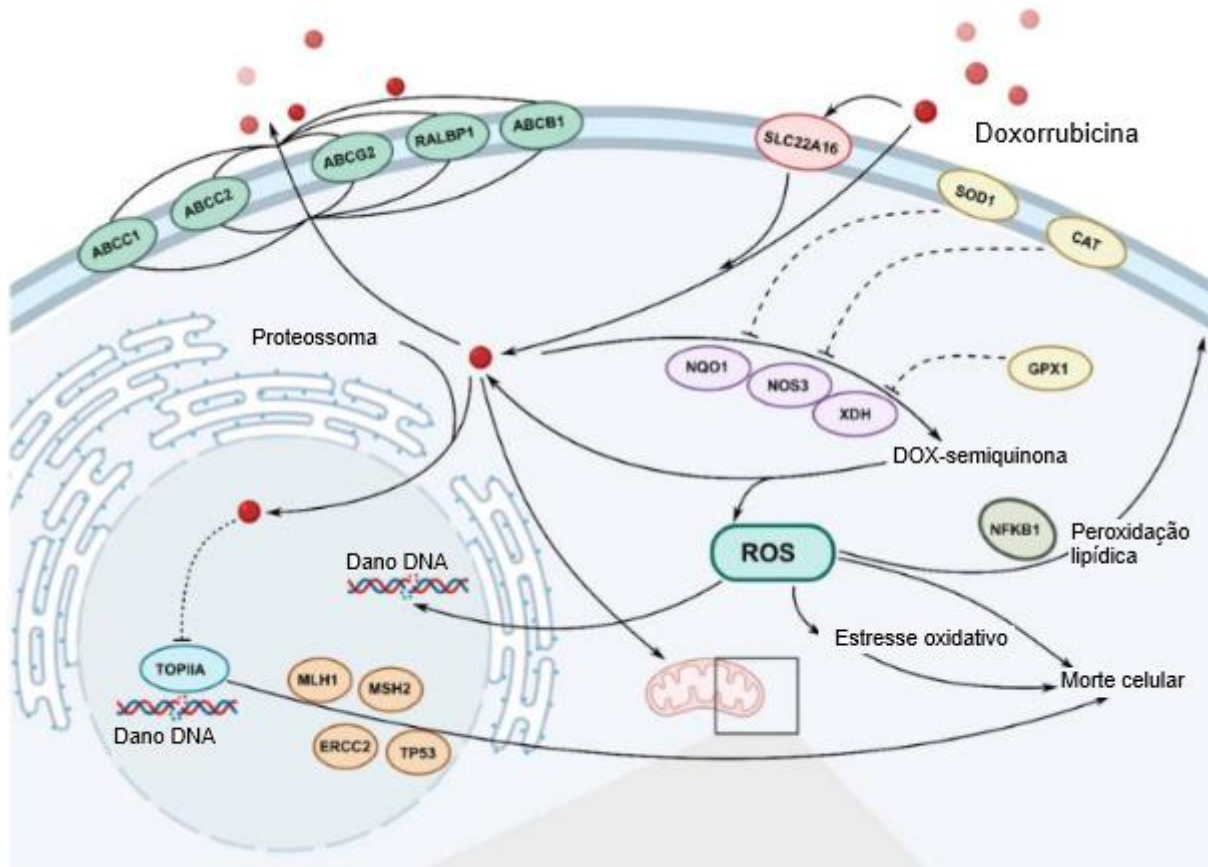
Fonte: Brockmann et al., (1963)

A doxorrubicina é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diversas formas de câncer, sendo um componente essencial em muitos regimes de terapia combinada (LADISLAU, 2022). Seus principais usos incluem o tratamento do câncer de mama, leucemias (como LLA e LMA), linfomas (de Hodgkin e não Hodgkin), sarcomas de tecidos moles, osteossarcoma, câncer de ovário, pulmão de pequenas células, e bexiga. Também é usada no tratamento de neuroblastoma em crianças.

O mecanismo de ação da DOX nas células tumorais é complexo e multifatorial, conforme exemplificado na figura 4. Está envolvido com a inibição da topoisomerase

II, intercalação e dano ao DNA, que ocasiona quebras na dupla hélice, danos epigenéticos e transcricionais à cromatina, além de aumento na geração de radicais livres, que vão danificar a replicação e transcrição do DNA e RNA (PANG et al., 1908; McGOWAN et al., 2017).

Figura 4: Mecanismos de ação da doxorubicina.



Fonte: Butowska et al., (2021)

Apesar do seu grande efeito antineoplásico, seu uso pode ser limitado devido a ocorrência dos graves efeitos adversos como mielossupressão, alopecia, mucosite, e, principalmente a cardiotoxicidade (McGOWAN et al., 2017).

Essa reação cardiotóxica, denominada de cardiomiopatia, muitas vezes se torna irreversível, sendo um efeito dose-dependente, ocorrendo constantemente quando as doses cumulativas excedem 500mg/m^2 . A cardiomiopatia pode se apresentar de forma aguda, crônica ou tardia. A forma aguda é caracterizada por alterações eletrocardiográficas e arritmias, diminuição da fração de ejeção e chegar até lesões miocárdicas ou insuficiência cardíaca congestiva, já a forma crônica é caracterizada pelo uso contínuo da DOX, que ocasiona uma insuficiência cardíaca congestiva, não

responsiva a digitálicos, provocando mortalidade superior a 50% dos pacientes acometidos (WOJTACKI; LEWICK-NOWAK; LESNIEWSKI-KMAK, 2000). A cardiomiopatia tardia ocorre quando a manifestação tóxica cardíaca surge anos depois do tratamento feito com baixas doses do fármaco, assim pode-se observar deficiência na condução elétrica cardíaca, aumento de níveis séricos de Peptídeo Natriurético Cerebral e também, redução da fração de ejeção (MURTAGH et al., 2016).

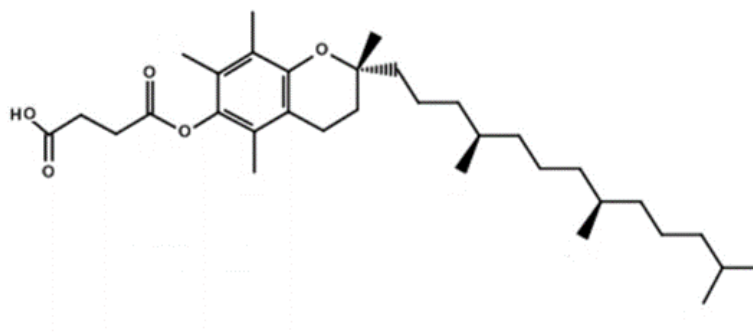
Entre as abordagens para melhorar a eficácia e reduzir a toxicidade da doxorrubicina estão a terapia combinada e o uso de nanocarreadores. A combinação da doxorrubicina com outros quimioterápicos tem mostrado uma eficácia superior no tratamento de tumores malignos em comparação ao uso isolado dos agentes. No câncer de mama, a doxorrubicina é frequentemente combinada com agentes alquilantes, antimetabólicos e taxanos, o que potencializa os resultados do tratamento.

2.5 α -Succinato de tocoferila

Os tocoferóis (TOH) são compostos pertencentes à família da vitamina E, conhecidos por suas propriedades antioxidantes. Existem quatro tipos principais que diferem sua estrutura no número e posição dos grupos metila ($-\text{CH}_3$) no anel cromanol. (SHEPPARD; PENNINGTON; WEIHRAUCH, 1992).

O grupo hidroxila presente no anel cromanol dos TOH, pode ser facilmente modificado, para formação de ésteres e amidas (MAZZINI, NETSHCER, SALVADORI 2009). Como o α -Succinato de tocoferila (α -TOS), um composto semissintético derivado da vitamina E, que é produto da substituição do grupo hidroxila do α -tocoferol, por um grupo succínico (GRUBER et al., 2014), conforme exemplificado na figura 5.

Figura 5: Estrutura química de α -Succinato de tocoferila.



Fonte: Própria autora (2024)

Diferentemente das propriedades antioxidantes do α -tocoferol, o α -TOS possui propriedades antineoplásicas (GRUBER et al., 2014). O α -TOS causa morte celular principalmente através da via apoptótica, induzindo resposta citotóxica em uma grande variedade de células tumorais *in vitro* e *in vivo* (OLIVEIRA et al., 2001), inibindo seu crescimento, com a vantagem de não interferir no crescimento celular da maioria das células normais (WEBER et al., 2002). Apesar desse mecanismo não estar bem estabelecido, a maioria já descritos envolve desestabilização mitocondrial, devido à produção de espécies reativas de oxigênio, o que ativa a apoptose celular (ANGULO-MOLINA et al., 2013).

O micro-ambiente tumoral ácido favorece ação de α -TOS, um ácido fraco com baixo valor de pKa, tornando-o mais eficiente em baixos valores de pH. Isso confere uma seletividade inerente à sua ação, direcionando sua atividade principalmente para células tumorais. Dessa forma α -TOS revela ser grande promissor para terapia combinada, porque além da baixa toxicidade e biocompatibilidade, apresenta possibilidade de efeito sinérgico com o agente quimioterápico podendo levar ao aumento da eficácia antitumoral (ANGULO-MOLINA et al., 2013).

Para garantir a entrega na região tumoral, a veiculação das substâncias livres combinados em nanocarreadores é uma alternativa promissora. Esses sistemas permitem uma co-entrega temporal e local dos fármacos, são capazes de aumentar a estabilidade desses compostos na corrente sanguínea, e além disso, podem ampliar a segurança dos fármacos, devido a mudanças significativas na farmacocinética em comparação com o fármaco livre (GRUBER et al., 2014).

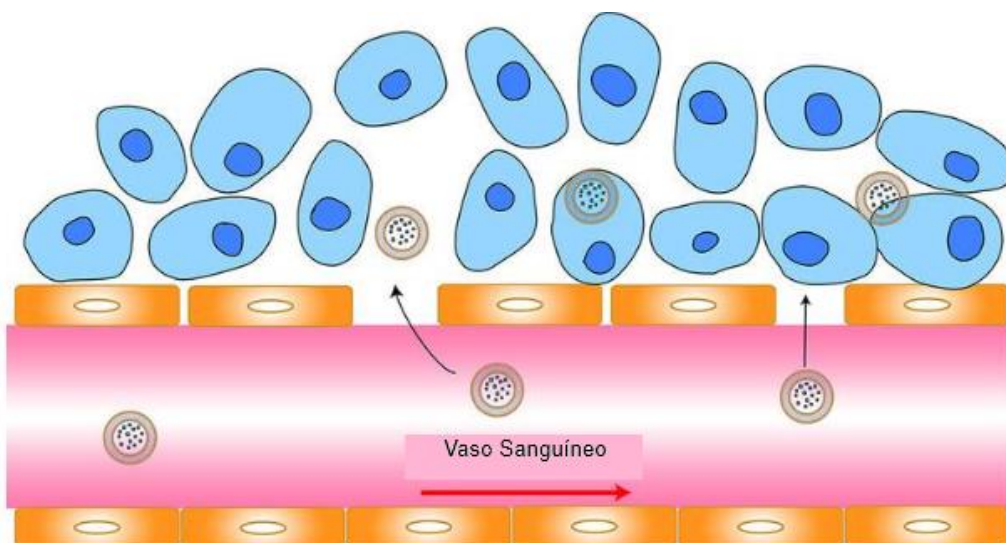
2.6 Nanossistemas

Nanocarreadores, propositalmente planejados e produzidos com tamanho em escala nanométrica, constituem uma alternativa promissora para aumento da especificidade ao tecido tumoral, proporcionando maior concentração do fármaco no sítio alvo e redução da toxicidade (OBRIEN et al., 2004; MAMOT et al., 2003).

Os tumores sólidos possuem características patofisiológicas únicas que favorecem o uso de partículas em escala nanométrica para o seu tratamento. Os vasos tumorais apresentam inúmeras “aberturas” (fenestrações endoteliais, aberturas transcelulares e membrana basal descontínua ou ausente) que levam a formação de poros que variam de 100 a 800nm, permitindo a penetração de macromoléculas, como as nanopartículas, no interstício do tumor (YUAN et al., 1995; CARMELIET, JAIN, 2000; MAEDA et al., 2000).

Esse acúmulo espontâneo ou *targeting* passivo, que funciona especialmente bem no ambiente tumoral devido, adicionalmente, ao sistema linfático deficiente, é conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR), conforme demonstrado na figura 6. Ou seja, a permeabilidade aumentada da vasculatura permite o acúmulo de macromoléculas e nanopartículas no interstício tumoral, enquanto a falta de drenagem linfática permite a retenção dessas partículas no ambiente tumoral (TORCHILIN, 2001).

Figura 6: Efeito de permeabilidade e retenção aumentada.

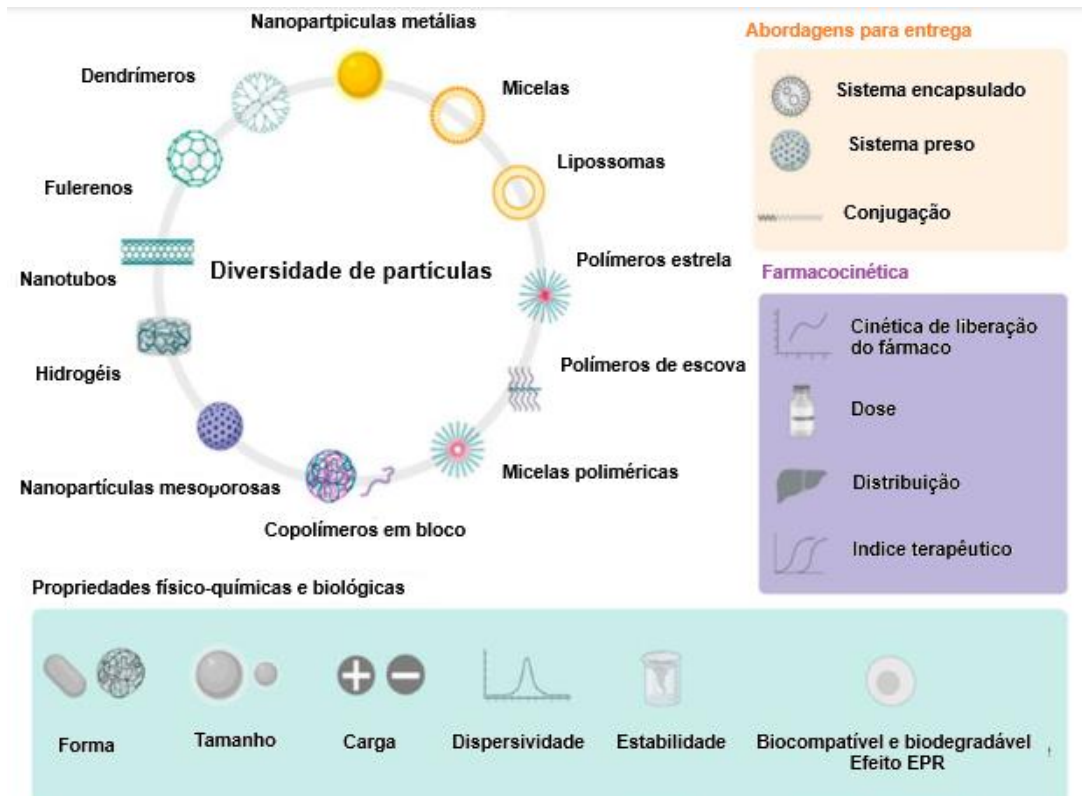


Fonte: Adaptado de CHENG et al., (2021)

Alguns nanocarreadores já são aprovados para o uso clínico, o desenvolvimento de lipossomas de circulação prolongada (revestidos com polietilenoglicol - PEG) carreando doxorrubicina possibilitou a obtenção de um produto comercial, denominado Doxil® (Janssen Biotech, Inc; Johnson & Johnson, EUA), utilizado para o sarcoma de Kaposi relacionado à SIDA (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida), câncer ovariano recorrente, câncer de mama metastático e mieloma múltiplo. Embora haja grandes vantagens clínicas observadas para esses nanossistemas, o elevado custo de produção e os problemas tecnológicos, como o uso de solventes orgânicos, por exemplo, tem motivado a busca por sistemas carreadores alternativos (MEHNERT; MADER et al., 2001; MULLER; MADER; GOHLA et al., 2000).

A escolha do nanocarreador em um estudo deve considerar fatores importantes que determina sua cinética para atender às necessidades específicas. É crucial selecionar a estrutura adequada e definir a abordagem de entrega, que pode envolver a encapsulação do fármaco dentro do nanocarreador ou sua ligação à superfície. Isso permite a liberação direcionada e controlada do ativo, com base em estímulos externos como pH ou temperatura. Além disso, é necessário considerar a farmacocinética, que pode melhorar a biodisponibilidade e distribuição do fármaco, prolongar sua meia-vida e reduzir efeitos adversos ao direcionar a entrega para tecidos ou células específicas. As propriedades físico-químicas e biológicas do nanocarreador, como tamanho, carga superficial e hidrofobicidade, também são essenciais para otimizar a interação com o ambiente biológico e a eficácia terapêutica. Esses aspectos ajudam a superar limitações das formas tradicionais de administração de medicamentos, como baixa solubilidade, rápida degradação, efeitos colaterais e falta de especificidade, resultando em tratamentos mais eficazes e personalizados (figura 7) (BUTOWSKA et al., 2021).

Figura 7: Espectro de design e propriedades para desenvolvimento de nanossistema.



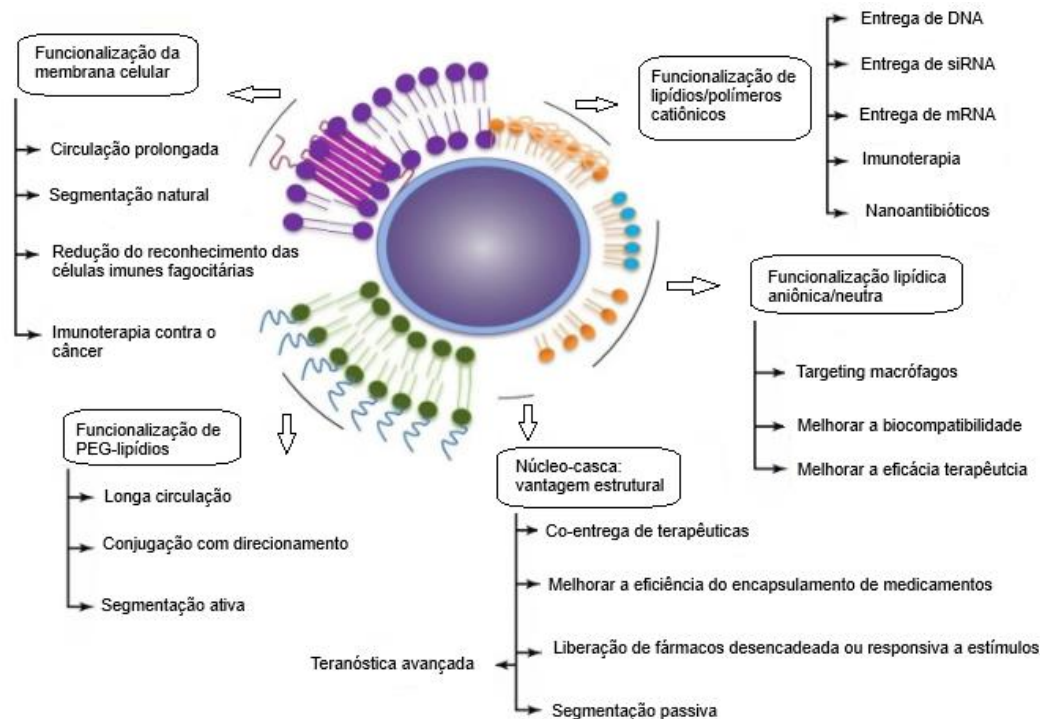
Fonte: Adaptado de BUTOWSKA., et al (2021)

Sabe-se que dentre os diversos tipos de nanossistemas, polímeros e lipídeos são as matrizes mais frequentemente utilizadas. Nanocarreadores lipídicos tem como vantagens a biocompatibilidade, melhor eficiência de encapsulamento de moléculas, porém sofre de limitações relacionadas à estabilidade, liberação rápida do fármaco e alta polidispersividade. Por outro lado, sistemas poliméricos podem ser facilmente modificados quimicamente, além de apresentarem menor diâmetro de partícula, com estreita distribuição de tamanho, e inúmeros procedimentos de síntese (BUTOWSKA., et al (2021)).

2.7 Nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas

No intuito de combinar as vantagens desses dois sistemas, uma nova classe de nanopartículas foi desenvolvida, nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas (LPNP) (MUKHERJEE et al., 2019; DATE et al., 2018). Com diversas aplicações terapêuticas (figura 8), e alternativas promissoras tanto no diagnóstico por imagem quanto no tratamento de diversos carcinomas, esses sistemas têm sido amplamente investigados em estudos pré-clínicos devido às suas propriedades multifuncionais (HADINOTO et al., 2013).

Figura 8: Aplicações terapêuticas das Nanopartículas Híbrida Lipídica Polimérica.

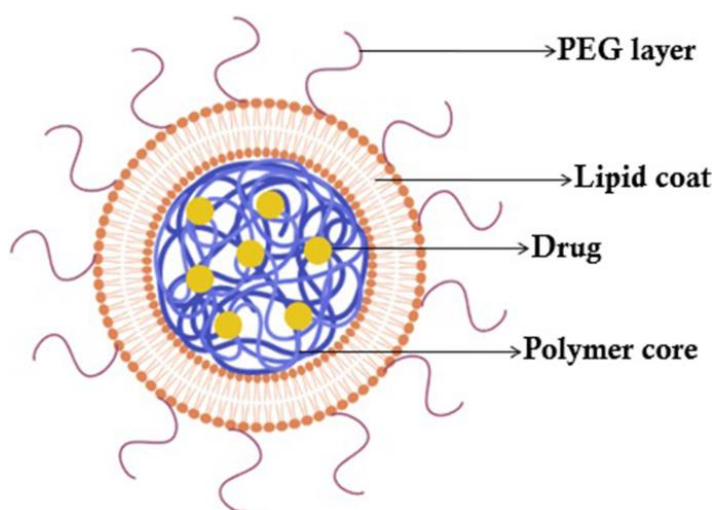


Fonte: Adaptado de TAHIR et al., (2019)

Em comparação com outros transportadores, esses sistemas destacam-se pela variedade de componentes estruturais, maior capacidade de encapsulamento de fármaco, liberação controlada de fármacos, biocompatibilidade, estabilidade aprimorada, além da capacidade de encapsular ativos hidrofílicos e hidrofóbicos (Bose et al., 2016; Liu et al., 2017).

LPNP do tipo *core* polimérico/*shell* lipídico possuem 3 componentes básicos (figura 9): o polímero, que irá encapsular o fármaco; uma monocamada lipídica ao redor do núcleo polimérico, que minimiza a perda de fármaco e o protege contra degradação; e uma camada externa de lipídeo-PEG, que age como um estabilizador estérico, prolongando a circulação sistêmica das partículas. A camada externa também pode ser funcionalizada com agentes para *targeting* ativo, como anticorpos e peptídeos. Os principais polímeros utilizados são PLGA, PCL, PLA, PEG enquanto os lipídios podem ser fosfolípides como DOPE, DSPE, DOTAP, DOPC e lecitina (MUKHERJEE et al., 2019; DATE et al., 2018).

Figura 9: Modelo esquemático de Nanopartículas Híbridas Lipídicas Poliméricas.



Fonte: Própria autora (2024)

Uma nanopartícula híbrida lipídica polimérica contendo DOX e α -TOS foi desenvolvida por nosso grupo (FERNANDES et al., 2022). A LPNP é composta por um núcleo polimérico hidrofóbico de PLGA, que além de ser biodegradável, confere estabilidade física para o sistema e liberação controlada. Esta estrutura é envolvida por uma monocamada lipídica de lecitina de soja, envolto por um estabilizador estérico, o TPGS (um derivado da vitamina E, peguillado) que contribui para o aumento da circulação sanguínea, por meio da diminuição do reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear. O uso do α -TOS como um par iônico da doxorubicina foi estratégico devido à sua natureza hidrofóbica, o que favorece sua retenção no núcleo. Essa interação pode modificar as propriedades de solubilidade e biodistribuição dos fármacos, tornando-os mais estáveis (FERNANDES et al., 2022). Estudos de atividade antitumoral realizados em camundongos com tumor de mama implantado (4T1), compararam LPNP-DOX-ST, DOX livre e Lip-DOX, para avaliar qual das formulações seria mais eficaz no controle de volume tumoral. Os resultados mostraram diferenças significativas no volume tumoral entre o grupo controle e os grupos tratados com DOX ($p < 0,05$). Em termos de eficácia antitumoral, o LPNP-DOX-ST demonstrou superioridade em comparação com os outros grupos de tratamento ($p < 0,01$), e apresentou uma capacidade de inibir o crescimento tumoral com maior eficiência do que os demais tratamentos ($p < 0,05$). Esses dados indicam que a terapia com LPNP-DOX-ST foi mais bem-sucedida do que a administração de

DOX livre. O índice de redução do tumor (IR) foi de 47% para DOX livre, 64% para Lipossoma-DOX e 86% para LPNP-DOX-ST, reforçando a eficácia do tratamento com as nanopartículas híbridas.

2.8 Avaliação da toxicidade aguda

A avaliação toxicológica compreende a determinação e análise de dados toxicológicos no estudo de uma substância, objetivando fornecer informações para seu uso correto e seguro (OECD, 2001).

Embora as agências de bioética busquem alternativas ao uso de modelos animais por meio de modelos *in vitro*, a investigação *in vivo* ainda é necessária. Esses estudos fornecem dados valiosos sobre a farmacocinética e farmacodinâmica em organismos vivos, que são essenciais para uma avaliação precisa do perfil terapêutico e tóxico de um novo sistema (LIU et al., 2010; LIU et al., 2014).

Portanto, diante das regulamentações disponíveis, seguindo as diretrizes da OECD 423 de 2001, utilizada para testes de produtos químicos e adaptada para formulações de uso parental, indica-se o uso de animais saudáveis, de origem conhecida, com peso e idade adequados por períodos pré-determinados, com acompanhamento de, no mínimo, quatorze dias após o tratamento, verificando sempre os parâmetros referente aos sinais clínicos, peso corporal, exames bioquímicos, hematológicos, e que todos animais sejam necropsiados (OECD, 2001).

O ensaio permite conhecer a forma de morte produzida pelo excesso dos produtos em órgãos alvo, as alterações comportamentais, fornece também, informações para avaliação dos riscos de exposição aguda ao produto e determina os valores de dose para estudos prolongados. Além disso, pode prever o mecanismo de toxicidade, indicando as lesões dos órgãos afetados, e verificar os efeitos tardios do tratamento e se há reversibilidade da resposta tóxica (MUKHERJEE et al., 2019). Assim, tornou-se necessário o estudo pré-clínico de toxicidade de novos nanossistema com o intuito de garantir a segurança do novo tratamento proposto. Dados referentes a toxicidade de um produto são necessários para cumprir regulamentações e obter aprovação para ensaios clínicos. Além disso, esses dados permitem identificar e compreender os efeitos tóxicos potenciais, permitindo ajustes no design do nanossistema e a otimização dos protocolos de administração, garantindo a conformidade com padrões específicos de segurança.

2.9 Considerações finais

Dada a alta incidência e taxa de mortalidade do câncer de mama, a busca por novas abordagens terapêuticas é de extrema importância. Nesse contexto, o avanço da nanotecnologia tem oferecido perspectivas promissoras. A combinação terapêutica da doxorubicina com α -succinato de tocoferila, encapsulados em uma nanopartícula híbrida, exemplifica os benefícios desse avanço. Essa estratégia permite uma entrega mais eficaz dos fármacos na região tumoral, mediado pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentada das nanopartículas. As nanopartículas híbridas oferecem uma plataforma versátil para a administração de múltiplos agentes terapêuticos, facilitando a combinação de diferentes mecanismos de ação e contribuindo para um tratamento mais eficaz e direcionado.

No entanto, apesar dos notáveis avanços na eficácia terapêutica, é crucial a realização da avaliação da toxicidade aguda da LPNP-DOX-ST. Essa análise é fundamental para determinar o potencial da formulação em mitigar os efeitos adversos limitantes da doxorubicina, especialmente a cardiotoxicidade. Além disso, é essencial para garantir a segurança do uso do nanossistema, assegurando que os benefícios terapêuticos sejam alcançados sem comprometer a saúde dos pacientes.

3 OBJETIVO

Avaliar a toxicidade aguda in vivo de nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas contendo DOX e α -TOS (LPNP-DOX-ST).

3.1 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar as LPNP-DOX-ST.
- Preparar e caracterizar lipossomas contendo doxorubicina.
- Estabelecer o melhor crioprotetor para a liofilização da LPNP-DOX-ST e avaliar estabilidade de armazenamento.
- Realizar teste de hemólise em diferentes concentrações da nanopartícula híbrida lipídica polimérica branca.
- Avaliar comparativamente os parâmetros comportamentais, variação de peso corporal dos animais tratados com a formulação em análise, lipossomas contendo doxorubicina e doxorubicina livre.

- Avaliar comparativamente os parâmetros bioquímicos (AST, ALT, Ureia, Creatinina e CK-MB) e hematológicos dos animais tratados com a formulação em análise, lipossomas contendo doxorubicina e doxorubicina livre.
- Avaliar comparativamente os parâmetros eletrocardiográficos dos camundongos tratados, nos dias 0, 7 e 14.
- Avaliar comparativamente os parâmetros histopatológicos dos órgãos de animais tratados com a formulação em análise, dos lipossomas contendo doxorubicina e da doxorubicina livre.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Cloridrato de doxorubicina (DOX) foi gentilmente doado pela Eurofarma (São Paulo, Brasil). α -succinato de tocoferila (ST), α -succinato de tocoferila polietileno glicol 1000 (TPGS) e colesterol foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) 50:50 (PLGA) foi obtido da Evonik Health Care (Essen, Germany). Lecitina de soja, fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) e Distearoil-fosfoetanolamina-polietilenoglicol2000 (DSPE-PEG2000) foram fornecidos pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Trietanolamina (TEA) foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). A solução de xilazina (Dopaser® 2%) foi adquirida da Hertape Calier (Juatuba, Brasil) e a solução de cloridrato de ketamina (Dopalen® 10%) foi fornecida pela Vetbrands Agroline (Campo Grande, Brasil). Os camundongos BALB/c fêmeas, com 8 semanas de idade e massa corporal entre 20 e 25g, utilizados no estudo foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG - Belo Horizonte, Brasil). Os kits para análises bioquímicas foram obtidos da empresa Labtest (Lagoa Santa, Brasil).

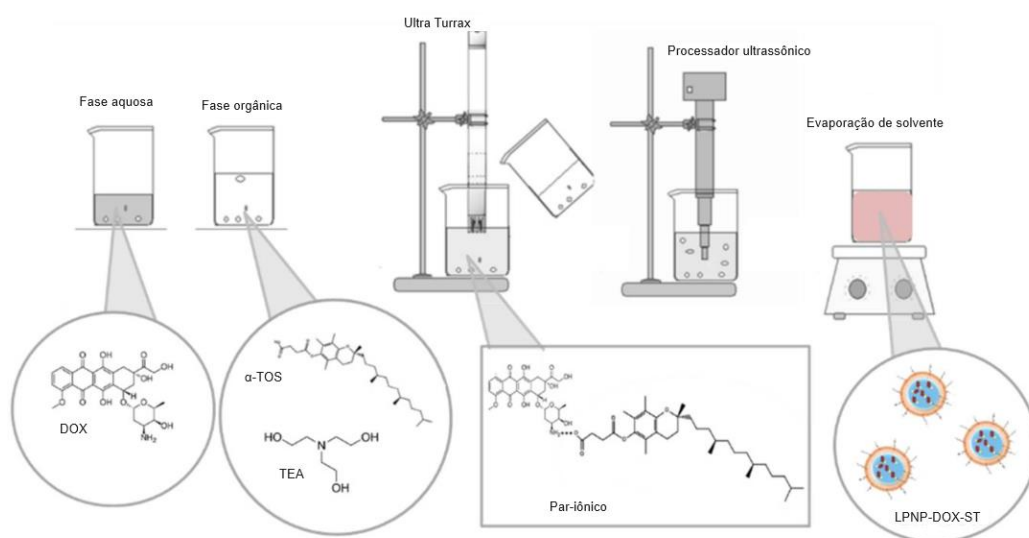
4.2. Métodos

4.2.1 Preparo da LPNP-DOX-ST

LPNP-DOX-ST foram produzidas pelo método de emulsificação-evaporação do solvente (ESE) (FERNANDES et al., 2022). A fase orgânica foi composta por 23 mg de PLGA 50:50, 10 mg de lecitina de soja, 20 mg de succinato de tocoferila e 0,6 mg de trietanolamina, solubilizados em 2,5ml de diclorometano e a fase aquosa composta por 30 mg de TPGS, 5 mg de DOX em 25ml de água purificada. A fase orgânica foi gotejada na fase aquosa, sob constante agitação, a 9500 rpm, por 5 minutos em

homogeneizador Ultra Turrax T-25 (Ika Labortechnik, Germany), seguido por sonicação em sonda de alta intensidade, a 21% de amplitude por 2 min, usando um processador ultrassônico de alta intensidade (modelo CPX 500, Cole-Palmer Instruments, EUA). A suspensão foi mantida sob agitação magnética, a temperatura ambiente, por 5 horas, para completa evaporação do solvente orgânico (diclorometano). LPNP-DOX-ST foi purificada por ultrafiltração, utilizando filtros do tipo Amicon® Ultra 100 kDa (Millipore, USA), a 3500rpm, por 15 minutos e o volume foi recuperado para 3ml com água purificada). As nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas brancas (LPNP-Branca), foram produzidas com os mesmos componentes, seguindo o mesmo processo, com exceção da presença dos ativos (DOX e ST) (FERNANDES et al., 2022).

Figura 10: Representação esquemática do método de preparo LPNP-DOX-ST.



Fonte: Fernandes et al., (2022)

4.2.2 Preparo dos lipossomas contendo DOX

Lipossomas contendo DOX (LIP-DOX) foram preparados pelo método da hidratação do filme lipídico, seguida da calibração de tamanho (BANGHAN, 1965), similar ao método de preparo de Doxil®. Alíquotas clorofórmicas de HSPC, colesterol e DSPE-PEG2000 (razão molar 5.8: 3.7: 0.5, concentração lipídica de 20 mM) foram transferidas a um balão de fundo redondo, e o solvente foi removido em rotaevaporador, a baixa pressão. Em seguida, o filme lipídico formado foi hidratado, por 30 minutos, com uma solução de sulfato de amônio 300 mM, pH 7,4, a temperatura ambiente, sob agitação vigorosa. Os lipossomas obtidos, seguiram então para

extrusão, utilizando membranas de policarbonato de 0,4, 0,2, e 0,1 μm . O sulfato de amônio presente no meio externo foi removido por ultracentrifugação (Optima® L-80XP, Beckman Coulter, USA), a 150000xg, 4°C por 2 horas e o pellet ressuspensão com tampão HEPES pH 7,4. DOX foi encapsulada nos lipossomas por via remota, pela incubação de DOX (2 mg/ml) na forma de pó com os lipossomas, por 2 horas a 4°C. A fração de DOX não encapsulada foi removida por ultracentrifugação (SILVA et al., 2019).

4.2.3 Caracterização físico-química

As análises de diâmetro médio, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ), foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra). O diâmetro médio e o índice de polidispersão dos LIP-DOX, LPNP-DOX-ST e LPNP-Branca, foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS), a 25°C, utilizando um ângulo de 90°, com amostras diluídas em água purificada na proporção de 1:10 (v/v), realizadas em triplicata.

O potencial zeta foi determinado por DLS, associado à mobilidade eletroforética das partículas, a um ângulo de 90°, na temperatura de 25°C, com amostras diluídas em solução salina 1mM na proporção de 1:10 (v/v), realizadas em triplicata.

4.2.4 Teor de encapsulação

A quantificação de DOX foi realizada pela técnica de espectrofotometria UV-VIS (Evolution 201 UV-Visible Espectrofotômetro Thermo Scientific), no comprimento de onda de 480nm. As LPNP-DOX-ST foram ultrafiltradas em membrana Amicon® 100k (Milipore, EUA), por 3500 rpm, 15 minutos. Os dispositivos Amicon® foram passivados com solução aquosa de Tween 20 a 5% (p/v) 24 horas antes do uso, para evitar a adsorção da DOX (OLIVEIRA et al., 2016). Nesse método a DOX não encapsulada é livremente filtrada através da membrana, enquanto LPNP permanece retida no filtro. A DOX não encapsulada foi quantificada no filtrado, e a LPNP-TS-DOX foi ressuspensa em volume suficiente de água purificada para utilização nos testes seguintes. A porcentagem de eficiência de encapsulação (EE%) foi calculada usando a seguinte equação:

Equação 1: porcentagem de eficiência de encapsulação.

$$\%EE = (CT - CF / CT) \times 100$$

Onde: CT = concentração total de doxorubicina: LPNP purificada + filtrado (não encapsulada), CF = concentração de doxorubicina no filtrado (não-encapsulada).

Para a quantificação da DOX nas formulações lipossomais, a membrana lipídica foi aberta com álcool isopropílico na proporção 1:10 (v/v) e, em seguida, analisada por espectrofotometria UV-VIS. A quantidade de DOX foi determinada antes e após a ultracentrifugação e a %EE foi calculada de acordo com a equação 2.

Equação 2: porcentagem de eficiência de encapsulação.

$$\%EE = (CF / CI) \times 100$$

Onde: CF = concentração de doxorubicina após centrifugação. CI = concentração de doxorubicina antes de centrifugar.

4.2.5 Liofilização

Glicose, sacarose e trealose, em diferentes razões, foram avaliados como crioprotectores. Alíquotas (1,0 ml) da formulação LPNP-DOX-ST foram transferidas para frascos criorresistentes em presença dos diferentes açúcares. A proporção açúcar:polímero foi definida em %p/p. Os frascos foram congelados em nitrogênio líquido por 5 minutos e liofilizados em um ciclo de 24 horas usando Modulyolyophilizer (Thermo Electron Corporation, EUA). Após o ciclo de liofilização, os frascos foram selados sob atmosfera de nitrogênio, armazenados protegidos da luz e mantidos em geladeira (2 a 8°C) e congelador (-20°C).

4.2.6 Estabilidade de armazenamento

Para avaliar a estabilidade de armazenamento da formulação, LPNP-DOX-ST recém preparadas em solução ou liofilizadas (contendo sacarose como crioprotetor em uma proporção açúcar:polímero de 10:1 (%p/p)), foram acondicionadas em recipientes de vidro tampados, sob atmosfera de N₂, e armazenadas a 2-8°C ou -20°C, por 120 dias, protegidas da luz. Nos dias 0, 30, 60, 90 e 120, o tamanho das partículas, o índice de polidispersidade e o potencial zeta foram avaliados por DLS, e a eficiência de encapsulação foi avaliada por espectrofotometria UV-VIS.

4.2.7 Estudo de hemólise

O estudo de hemólise foi realizado de acordo com procedimentos previamente publicados (Stubbs, et al.; 1999). Em resumo, camundongos BALB/c do sexo feminino

(8 semanas, $20,0 \pm 2,0$ g) foram anestesiados com uma mistura de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg). Após a anestesia o sangue fresco foi coletado por punção do plexo braquial e colocado em tubos contendo uma solução de EDTA 10% p/v. Os glóbulos vermelhos (RBC) foram separados por centrifugação a 3000 rpm durante 10 min à temperatura ambiente (Centrífuga Heraeus Multifuge X1R, Alemanha). As hemácias foram coletadas do pellet foram lavados com solução de NaCl 0,9% (p/v) até a obtenção de um sobrenadante incolor acima da massa celular. O pellet final foi diluído com solução de NaCl 0,9% (p/v) para obter uma suspensão de hemácias a 4% (p/v) (Monteiro, et al., 2019).

Amostras de LPNP-branca, nas concentrações de nanopartículas correspondentes as doses de 5mg/Kg, 10mg/kg, 20mg/kg, 30mg/kg e 40mg/kg de DOX, foram incubadas com um volume igual de suspensão de hemácias a 4% (n = 5) por 1 h a 37 °C sob agitação a 500 bpm (Agitador IKA). Devido à similaridade dos valores de absorvância para DOX (480nm) e hemoglobina (540nm), somente foi possível avaliar a hemocompatibilidade de amostras de LPNP-Brancas. Depois da incubação, as suspensões celulares foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min e os sobrenadantes foram coletados para a determinação da absorbância. Água ultrapura e solução salina 0,9% (p/v) foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Evolution 201 UV-Visible Espectrofotômetro Thermo Scientific, EUA) a 540 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada usando a seguinte equação:

Equação 3: porcentagem de hemólise.

$$\% \text{ de hemólise} = (AA - ANC) / (APC - ANC) \times 100$$

Onde: AA = absorvância da amostra. ANC = absorvância controle negativo. APC = absorvância controle positivo.

4.2.8 Estudos de toxicidade aguda in vivo

A avaliação da toxicidade aguda in vivo foi conduzida conforme as recomendações da OECD 423 de 2001, adaptadas para formulações de uso parenteral. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG sob o número **185/2021**.

Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG - Belo Horizonte, Brasil). O estudo foi conduzido em camundongos fêmeas saudáveis da linhagem BALB/c, com idade entre 6 e 8 semanas e peso variando de 18 a 22 g.

O objetivo foi comparar os resultados entre os grupos para avaliar os efeitos tóxicos dos diferentes tratamentos. Os animais foram submetidos a uma administração intravenosa única, em diferentes concentrações conforme descritos na tabela 1, onde, LPNP-DOX-ST representa a nanopartícula híbrida lipídica polimérica, contendo doxorubicina e α -succinato de tocoferila, LPNP-Branca, representa o nanossistema sem os ativos (DOX e α -TOS), DOX é uma solução de doxorubicina em água purificada, Lip-DOX é um lipossoma contendo doxorubicina, semelhante ao disponível comercialmente. Solução salina 0,9% (p/v) foi utilizada como controle negativo. Seguindo as recomendações da OECD 432, que tem por objetivo a redução do uso de roedores, inicialmente os grupos foram formados por 3 animais cada, seguindo do acréscimo de mais 3 nos grupos selecionados para dar continuidade ao estudo, totalizando 6 animais por grupo. Além das avaliações da toxicidade realizadas por 14 dias, também foi conduzido uma avaliação de apenas 7 dias. A análise em dois períodos distintos busca identificar possíveis danos agudos e reversíveis que podem ocorrer logo após administração, e que poderiam não ser detectados com uma análise de 14 dias. Isso permite a detecção de efeitos adversos que podem não ser avaliados em uma análise mais prolongada. Ao final dos períodos de avaliação os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado em tubos com anticoagulante (EDTA) para análises hematológicas e, posteriormente, submetido a centrifugação para obter o plasma. O plasma foi utilizado em testes bioquímicos para avaliar a função renal, hepática e cardíaca. Por fim, os órgãos foram removidos para análise histopatológica.

Tabela 1: Grupos utilizados para fazer análises comparativas, com tratamento de duração de 7 dias e 14 dias.

7 dias	14 dias
DOX 15mg	DOX 15mg
LPNP-DOX-ST 15 mg	LPNP-DOX-ST 15 mg
DOX 17,5mg	LPNP-DOX-ST 17,5 mg
LPNP-DOX-ST 17,5 mg	LPNP-DOX-ST 20 mg
LPNP-DOX-ST 20 mg	LPNP-Branca
LPNP-Branca	Lip-DOX 20mg

Salina 0,9% (p/v)

Legenda: DOX= doxorubicina livre em solução. LPNP-Branca= nanopartícula híbrida lipídica polimérica sem os ativos doxorubicina e α -succinato de tocoferila. LPNP-DOX-ST= nanopartícula híbrida lipídica polimérica contendo doxorubicina e α -succinato de tocoferila. Lip-DOX= lipossoma contendo doxorubicina. Os números revelam a concentração das doses administradas em mg/kg.

Os parâmetros avaliados para determinação da toxicidade *in vivo* incluíram observação comportamental, peso corporal, consumo de água e ração, análises bioquímicas, hematológicas e histopatológicas. A variação de peso foi calculada a partir do peso inicial dos animais.

4.2.9 Investigação do hemograma e análise bioquímica

Os parâmetros hematológicos foram quantificados em um aparelho hematológico automatizado. Foram avaliados: hemoglobina, contagem de hemácias, hematócrito, índices hematimétricos, RDW (amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos), contagem global e diferencial de leucócitos, e número de plaquetas. (HEMOVET 2300- Brasmed, Paulínia, Brasil).

O sangue total coletado, foi centrifugado (3000 rpm, 15 min) para a obtenção do plasma e quantificação dos parâmetros bioquímicos. Os testes foram realizados em analisador bioquímico semiautomático (BIO-2000, Bioplus, São Paulo, Brasil) utilizando-se kits comerciais. A avaliação da função renal foi realizada por meio das dosagens de ureia e creatinina, da função hepática por meio das dosagens de alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST) e a função cardíaca por meio da dosagem de creatinoquinase total MB (CKMB).

4.2.10 Análises histopatológicas

Foram coletados para análise histopatológica o fígado, rins, baço, coração e osso (medula óssea) de todos os animais. Os materiais foram fixados em formol tamponado a 10% por um período de 24 a 48 horas e incluídos em blocos de parafina. Destes blocos, foram obtidas secções de 4 μ m e estas coradas por hematoxilina e eosina (HE). As lâminas então foram avaliadas por equipe de patologistas treinados e as imagens capturadas por câmera digital Spot Insight Color acoplada a microscópio óptico Olympus BX-40.

4.2.11 Análise eletrocardiográfica

O eletrocardiograma (ECG) foi realizado in vivo, de forma não invasiva, utilizando o eletrocardiógrafo InCardio (Impulse Animal Health). As mensurações foram realizadas no software próprio do aparelho. Os animais foram submetidos à administração de uma mistura anestésica composta por ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) para garantir a contenção dos movimentos e em seguida o ECG e a frequência cardíaca (FC) foram monitorados durante um período contínuo de 05 minutos por um amplificador de ECG, mediante posicionamento subcutâneo dos eletrodos nos membros. Dessa forma foi possível estudar o ECG em seis derivações: aVF, aVL, aVR, D1, D2 e D3.

Os ECGs foram realizados e analisados pelo médico veterinário de acordo com métodos padrões. Os traçados foram registrados em seis derivações do plano frontal, com velocidade de 50mm/s e sensibilidade de 1cm=2mV (2N). Em cada traçado, três segmentos, contendo cinco batimentos (derivação DII) selecionados para qualidade (linha de base limpa sem artefatos). Foram determinados os valores médios da frequência cardíaca (FC) e do comprimento das deflexões P-QRS-T. Os parâmetros avaliados foram: intervalo QT (medido do início do complexo QRS ao final da onda T), intervalo PR (intervalo entre o início da onda P e o final da onda R), complexo QRS (medido do início da onda Q ao final da onda S) e o intervalo RR (intervalo entre duas ondas R sucessivas). Os valores corrigidos de QT (QTc) foram obtidos a partir das fórmulas de Fridericia ($QTc = QT/(RR)^{1/3}$). Os padrões morfológicos foram avaliados em cada derivação e as medidas P-QRS-T foram realizadas no shunt DII (BATISTA, C. et al., 2007).

4.2.12 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão da média. Verificou-se a normalidade e homocedasticidade pelos testes de Shapiro Wilk, D'agostino e Pearson e BrownForsythe. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas pela equação: $y = \log \text{ variável}$. A diferença entre os grupos experimentais foi testada por análise de hipótese através do teste t-Student no caso de dados paramétricos. A diferença entre grupos experimentais foi testada por meio de análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey utilizando o software

PRISM GRAPHPAD 6.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química

Os valores de diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão (IP), potencial zeta e eficiência de encapsulação para a LPNP-DOX-ST e lipossoma contendo DOX estão representados na tabela 2.

Tabela 2: Caracterização físico-química e eficiência de encapsulação de LPNP-DOX-ST, LPNP-Branca e Lip-DOX.

Formulação	Diâmetro médio (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de encapsulação (%)
LPNP-Branca	159,53±0,15	0,184±0,01	-42,6±2,30	-
LPNP-DOX-ST	135,6±2,91	0,248±0,01	-38,2±0,21	99,69±0,05
Lip-DOX	138,7	0,039	-19,0	95,00

Legenda: LPNP-Branca= nanopartícula híbrida lipídica polimérica sem os ativos doxorrubicina e α -succinato de tocoferila. LPNP-DOX-ST= nanopartícula híbrida lipídica polimérica contendo doxorrubicina e α -succinato de tocoferila. Lip-DOX= lipossoma contendo doxorrubicina. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

O lipossoma contendo doxorrubicina, uma formulação similar à disponível comercialmente, foi utilizado como grupo comparador no estudo de toxicidade aguda e por esse motivo foi preparado apenas um lote dessa formulação de acordo com protocolos preestabelecidos em nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2016). A doxorrubicina lipossomal é utilizada na clínica desde 1995 e foi projetada para melhorar a biodistribuição do fármaco, reduzir a toxicidade cardíaca e prolongar seu tempo de circulação no organismo. (BARENHOL, 2012). A avaliação comparativa utilizando esse grupo de lipossomas permite uma análise minuciosa de LPNP-DOX-ST com duas apresentações da doxorrubicina disponíveis no mercado (livre em solução ou em dispersão lipossomal).

A caracterização físico-química das nanopartículas é fundamental para garantir seu comportamento e eficácia após a administração. Pode-se observar que todas as formulações demonstraram diâmetro médio em torno de 140nm. O diâmetro médio recomendado para tratamentos por via endovenosa é de 50 a 200nm, nesse contexto

os valores obtidos foram adequados (BERTRAND; LEROUX, 2012; CHENTHAMARA et al., 2019; DANAEI et al., 2018).

O tamanho das nanopartículas afeta diretamente sua circulação no organismo e sua capacidade de alcançar regiões específicas, como tecidos tumorais, principalmente mediados pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentada. Partículas com tamanhos inferiores a 300 nm têm maior probabilidade de penetrar em áreas alvo devido à capacidade de atravessar barreiras biológicas e fenestrações vasculares associadas aos tumores, por meio do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (YUAN et al., 1995; LI et al., 2012; MAEDA et al., 2000; SINDHWANI et al., 2020). Além disso, o diâmetro médio baixo e as modificações de sua superfície, como o uso de TGPS, frequentemente garante que seu reconhecimento seja reduzido pelo SFM e o sistema complemento, que são componentes essenciais do sistema imunológico atuando juntos para reconhecer e eliminar agentes estranhos, incluindo nanopartículas (TORCHILIN; TRUBETSKOY, 1995).

O índice de polidispersividade (IP) reflete a distribuição do tamanho das vesículas na dispersão coloidal e pode variar de 0,0 (para sistemas totalmente monodispersos) a 1,0 (para sistemas totalmente polidispersos). Valores inferiores a 0,300 são desejáveis, indicando que as partículas têm tamanhos semelhantes, e uma boa homogeneidade, sendo assim compatível para administração endovenosa (BORATTO et al., 2016; CARMO et al., 2008; CARVALHO, 2008; MALHEIROS, et al., 2011; OLIVEIRA, 1993; OLIVEIRA, 2013). Como observado, LPNP-DOX-ST apresentaram valores de IP abaixo de 0,3, indicando uma distribuição homogênea das partículas.

O potencial zeta (PZ) mede a carga superficial das nanopartículas, que influencia sua estabilidade em solução, cinética de liberação e o destino biológico dos nanocarreadores. Valores de potencial zeta em torno de ± 30 mV são geralmente desejáveis para garantir que as nanopartículas não se aglomerem durante o armazenamento, preservando suas propriedades e eficácia. PZ negativos e elevados, como observados, podem conferir maior estabilidade a formulação, pois a repulsão eletrostática entre as partículas evita a agregação entre elas, além de serem considerados menos tóxicas após administração endovenosa, quando se comparado as partículas carregadas positivamente (LEE, et al., 2020).

Porém, alguns nanocarreadores são modificados com utilização de polímeros como o PEG (polietilenoglicol), para garantir sua estabilidade física, mesmo com um potencial zeta próximo da neutralidade, uma vez que essa adição de PEG, cria uma camada hidrofílica ao redor dos nanossistemas, que pode impedir a agregação entre eles, e também, minimiza ação do SFM e o sistema complemento (KLIBANOV et al., 1990). Essa estabilidade é essencial para a funcionalidade prolongada das nanopartículas em aplicações terapêuticas, tornando a caracterização cuidadosa desses parâmetros crucial para a otimização e sucesso das LPNP (TAMJIDI et al., 2013).

Para alcançar as características desejadas das LPNP, utilizou-se a metodologia baseada em evaporação/emulsificação de solvente. Nesse processo, a fase orgânica contendo o material a ser encapsulado é gotejada na fase aquosa sob constante agitação em um homogeneizador Ultra Turrax T-25. O Ultra Turrax T-25 é um equipamento que fornece alta energia mecânica por meio de uma lâmina rotativa, promovendo a emulsificação da fase orgânica e a formação inicial das nanopartículas. No entanto, a emulsificação por si só pode resultar em uma distribuição de tamanhos e dispersão das partículas de forma heterogênea. Então, para melhorar a uniformidade das nanopartículas e alcançar uma dispersão monodispersa, o processo é complementado pela sonicação. A sonicação é realizada com uma sonda de alta intensidade ajustada para operar a 21% de potência. Esse método utiliza ondas ultrassônicas para fornecer energia adicional que destrói as partículas e promove a formação de novas partículas menores e mais uniformes. O princípio de funcionamento da sonicação baseia-se na geração de ondas acústicas que criam cavitação no líquido, resultando na formação e colapso de bolhas que causam forças de cisalhamento. A combinação desses métodos assegura a produção de nanopartículas com as características físico-químicas desejadas para aplicações específicas (JAIN, 2000; McCALL; SIRIANNI, 2013).

A eficiência de encapsulação foi próxima de 100% para LPNP-DOX-ST, o que sugere que a utilização do polímero hidrofóbico PLGA foi eficaz na retenção do complexo iônico formado entre a doxorrubicina e o α -tocoferol succinato. O α -TOS, sendo uma substância com características não polares, interage com a doxorrubicina para formar uma combinação mais hidrofóbica, ou seja, esse emparelhamento iônico fica retido no núcleo das nanopartículas devido à natureza apolar do PLGA. Adicionalmente, o par iônico formado confere pH responsividade ao sistema, uma vez que um pH mais

ácido, como em microambientes tumorais, favorece a dissociação do par iônico e, consequente, a liberação de DOX no meio. Esse perfil de pH sensibilidade foi confirmado em estudos prévios de nosso grupo onde observou-se uma liberação de DOX 60% maior quando as LPNP-DOX-ST foram expostas a um ambiente ácido (pH 5) (FERNANDES et al., 2022).

5.2 Liofilização

A liofilização é um dos métodos mais comumente utilizados para preservação a longo prazo de produtos farmacêuticos, incluindo nanopartículas, lipossomas, vacinas e proteínas (Chen; Han; Cai; Tang; 2010). Essa técnica tem se mostrado eficaz na superação da instabilidade de diversos sistemas, onde a falta de durabilidade a longo prazo, tem limitado seu potencial clínico (Fonte; Araújo; Seabra; Reis; Weert; Sarmiento., 2015).

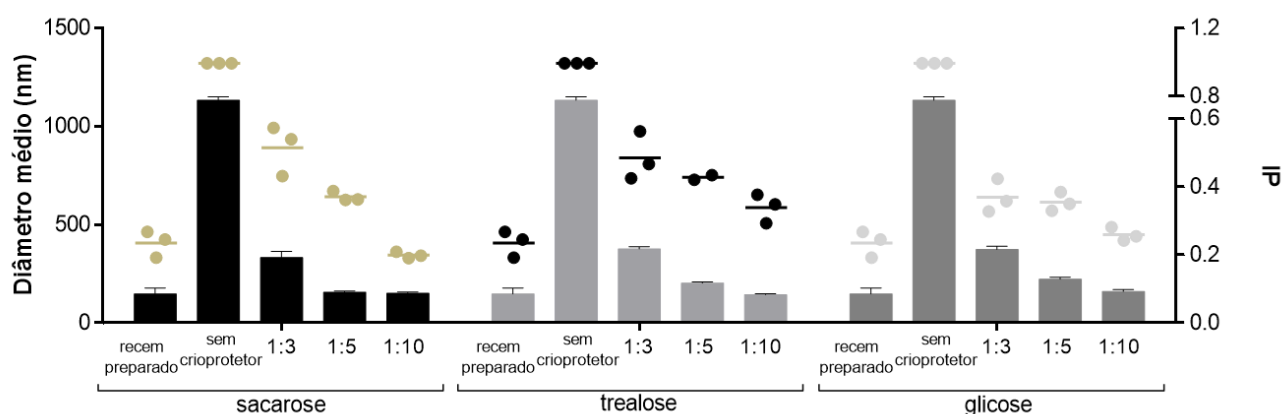
O processo de liofilização é baseado na remoção da água de uma solução contendo partículas através da sublimação, sem passar pelo estado líquido. Com isso, há preservação da estrutura e da funcionalidade dos componentes, permitindo o armazenamento por um período de tempo maior e o fácil transporte dos produtos (CARPINTEIRO et al., 2002).

Portanto, para garantir adequação do método, é necessário monitorar os parâmetros físico-químicos da amostra, como o tamanho das partículas, o IP, PZ e a eficácia do encapsulamento, que são cruciais para o desempenho biológico dos sistemas e sua estabilidade (HASSETT et al., 2021).

Para garantir que esses parâmetros sejam preservados e que não haja agregação entre as partículas, é fundamental selecionar cuidadosamente não só o crioprotetor utilizado, como também, a concentração ideal, pois é um aspecto crítico, que deve minimizar os danos causados pelo congelamento e pela desidratação. Os crioprotetores tem a função de incorporar nanocarreadores em uma matriz amorfa, desse modo, além de prevenir agregação das nanopartículas, também facilita a redispersão do pó liofilizado (ABDELWAHED et al., 2006; TRENKENSCHUH et al., 2021). Crioprotetores como glicose, sacarose e trealose são frequentemente utilizados, mas a seleção deve ser baseada nas características específicas do sistema em questão (HASSETT et al., 2021).

Sacarose, trealose e glicose, nas proporções (LPNP-DOX-ST:açúcar) (%p/p) de 1:3, 1:5 e 1:10, foram avaliados como crioprotetores. Os resultados de diâmetro médio e índice de polidispersão (IP) estão apresentados na Figura 11. Conforme esperado, a amostra liofilizada sem crioprotetor perdeu completamente sua estabilidade, formando grandes partículas e apresentando uma distribuição heterogênea, com IP igual a 1,0. Observa-se que, para os três açúcares testados, à medida que a proporção de crioprotetor aumenta, os parâmetros avaliados se aproximam dos valores observados na amostra recém-preparada, sendo a proporção 1:10 a que apresentou o melhor desempenho. Não houve variação significativa no potencial zeta, independentemente da razão ou do açúcar utilizado, mantendo-se em torno de -35 mV, valor semelhante ao da amostra recém-preparada.

Figura 11: Diâmetro médio e IP de LPNP-DOX-ST liofilizadas com diferentes crioprotetores, em diferentes razões.



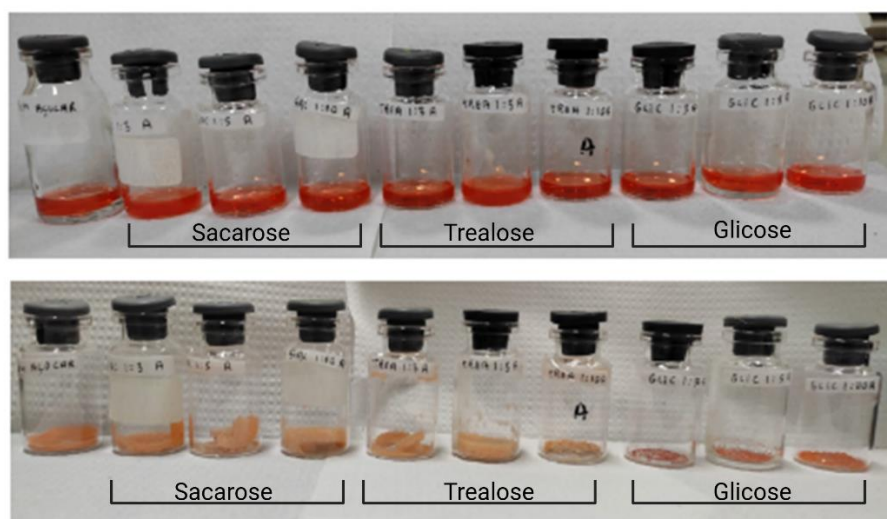
Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Barras representam diâmetro médio (eixo da esquerda) e pontos representam IP (eixo da direita).

Em relação ao IP, observou-se um aumento nos valores para as razões menores, com resultados mais próximos do ideal na razão de 1:10. A sacarose apresentou um IP inferior aos demais açúcares, destacando-se como o crioprotetor mais eficaz nesse parâmetro. A eficiência de encapsulação foi avaliada para as amostras liofilizadas com crioprotetores na razão de 1:10, sem apresentar alterações significativas. A eficiência de encapsulação manteve-se estável e próxima de 100% para os três crioprotetores testados.

Habitualmente, a quantidade de crioprotetor é significativamente superior a quantidade de nanopartícula, como relatado entre outros estudos (ABDELWAHED et

al., 2006). Um parâmetro importante a ser destacado é a apresentação do líófilo após o processo de liofilização. Nesse contexto, pode-se observar na figura 12 que a sacarose se mostrou superior em relação aos outros crioprotetores testados, apresentando um líófilo bem formado e com características mais favoráveis. A qualidade do líófilo é um indicativo crucial da eficiência do crioprotetor utilizado, uma vez que a estrutura formada durante a liofilização pode impactar diretamente na viabilidade e preservação das amostras. Comparativamente, outros crioprotetores testados não apresentaram a mesma consistência, o que reforça a eficácia da sacarose nesse parâmetro.

Figura 12: Apresentação dos líófilos formados após liofilização das LPNP-DOX-ST com diferentes crioprotetores, em diferentes razões.



Fonte: Própria autora (2024)

Nesse contexto, a sacarose foi selecionada como o crioprotetor de escolha para continuar os estudos de estabilidade de armazenamento a longo prazo. Entre os crioprotetores testados na proporção de 1:10, a sacarose mostrou-se a mais adequada devido à preservação das características físico-químicas da formulação, como diâmetro médio, IP, potencial zeta e eficiência de encapsulação (%EE), fatores que podem contribuir para uma maior estabilidade durante o armazenamento prolongado.

5.3 Estabilidade de armazenamento

A estabilidade da formulação LPNP-DOX-ST foi avaliada em diferentes condições de armazenamento, como geladeira (2-8°C) para dispersão aquosa (tabela 3) e produto liofilizado (Tabela 4) e freezer (-20° C) somente para a preparação liofilizada (tabela 5). Todas as amostras foram acondicionadas em recipientes fechados, protegidos da luz. A avaliação foi conduzida durante 120 dias, e as características físico-químicas das amostras foram avaliadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.

Tabela 3: Estabilidade de armazenamento: LPNP-DOX-ST em dispersão aquosa acondicionada a 2-8°C.

Dia	Diâmetro médio (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulação (%)
0	135,6±2,91	0,248±0,01	-38,2±0,21	99,69±0,05
30	115,0±4,34	0,278±0,01	-30,8±1,58	99,39±0,56
60	124,2±3,66	0,278±0,01	-31,3±2,61	99,88±0,03
90	142,6±33,07	0,418±0,22	-33,27±1,06	99,01±0,10
120	260,9±93,63	0,679±0,37	-30,70±3,03	99,28±0,27

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3)

Tabela 4: Estabilidade de armazenamento: LPNP-DOX-ST liofilizada acondicionada a 2-8°C.

Dia	Diâmetro médio (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulação (%)
0 antes de liofilizar	123,3±5,06	0,262±0,01	-35,0±1,27	99,37±0,54
0 após liofilizar	145,1±1,56	0,282±0,01	-36,3±1,61	99,17±0,46
30	133,6±4,76	0,288±0,01	-38,4±3,86	99,46±0,27
60	148,0±11,06	0,274±0,03	-37,6±0,96	99,66±0,12
90	135,7±4,80	0,332±0,04	-37,7±2,34	99,20±0,07
120	253,2±203,93	0,314±0,07	-37,20±3,72	99,38±0,11

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3)

Tabela 5: Estabilidade de armazenamento: LPNP-DOX-ST liofilizada acondicionada a -20°C.

Dia	Diâmetro médio (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulação (%)
0 antes de liofilizar	108,7±2,55	0,250±0,01	-30,2±0,46	99,55±0,06
0 após liofilizar	152,6±11,20	0,279±0,01	-37,4±0,85	99,65±0,14
30	168,4±10,26	0,275±0,01	-37,4±1,10	99,76±0,05
60	166,7±7,93	0,265±0,01	-37,4±1,99	99,84±0,07
90	165,2±22,05	0,257±0,01	-35,8±0,75	99,20±0,14
120	180,0±2,83	0,216±0,006	-33,20±0,82	99,75±0,04

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3)

A estabilidade de armazenamento refere-se à capacidade das nanopartículas de preservar suas propriedades físicas, químicas e funcionais durante o armazenamento. Para nanossistemas empregados em tratamentos médicos, garantir essa estabilidade é vital para assegurar a eficácia e segurança do medicamento até o momento da administração. Entre os principais desafios associados à estabilidade de armazenamento das nanopartículas, destacam-se a agregação, a instabilidade química e as condições ambientais. A agregação pode ocorrer devido às forças de Van der Waals (interações coloidais atrativas), interações eletrostáticas (repulsivas) ou à grande superfície específica das nanopartículas, resultando na formação de aglomerados que podem alterar as propriedades de liberação e caracterização físico-química do fármaco (ASWATHANARAYAN; VITTAL, 2019; TADROS et al., 2004; WOOSTER et al., 2008). A liofilização é uma das principais abordagens utilizadas para prolongar a vida útil de sistemas à base de lipídios, proteínas e outros produtos biofarmacêuticos (KASPER et al., 2013).

Ao avaliar a Tabela 3, observamos que a formulação em dispersão aquosa e armazenada em geladeira se manteve estável nos primeiros 60 dias de análises. Contudo, a partir do dia 90, notou-se um aumento significativo no IP indicando um aumento na polidispersidade da formulação.

Os grupos liofilizados (Tabelas 4 e 5) tiveram seus parâmetros avaliados antes e após da secagem da formulação com o intuito de verificar os impactos do processo de liofilização nos produtos finais. Observou-se um pequeno aumento no tamanho das partículas. Esse fenômeno é esperado, dado que, embora o uso de crioprotetores ajude a preservar a formulação, o processo de liofilização é intrinsecamente brusco. No entanto, o aumento foi mínimo e não comprometeu de maneira significativa as características da LPNP-DOX-ST, possibilitando a continuidade do estudo. Portanto, a estabilidade das amostras foi monitorada a partir do dia 0, após a liofilização.

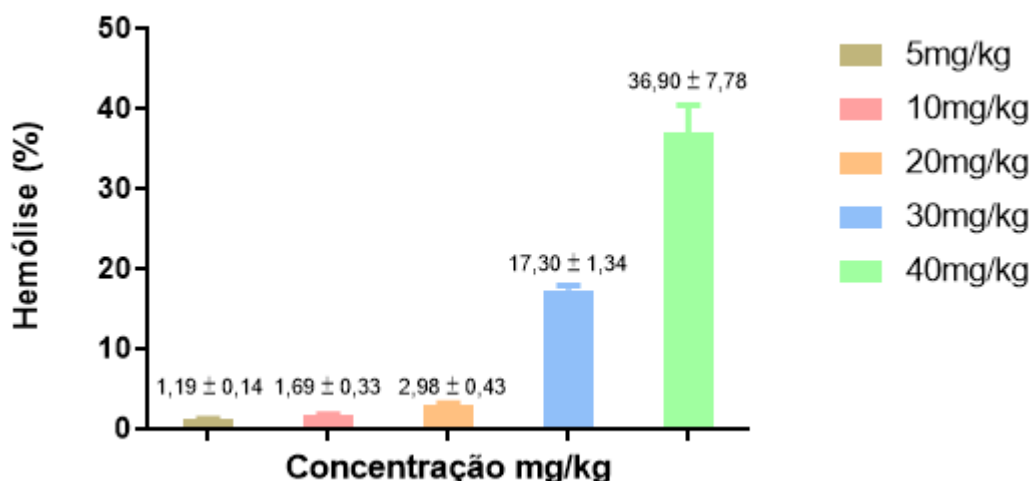
Após liofilização o grupo armazenado em geladeira se mostrou estável até 90 dias, porém com valores de IP limítrofes ($\sim 0,3$) sugerindo instabilidade que foi confirmada na análise de 120 dias de armazenamento com aumentos substanciais no tamanho e IP.

Por outro lado, a Tabela 5 revela que, no grupo liofilizado e armazenado em freezer, as amostras permaneceram estáveis até 120 dias. Assim a liofilização seguida de armazenamento a -20°C demonstrou ser uma abordagem mais eficaz para prolongar a conservação do sistema LPNP-DOX-ST, mantendo a estabilidade por pelo menos 120 dias, com diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação com maior taxa de preservação, em comparação com os outros grupos avaliados. Em concordância com estudos de DATA e colaboradores (2010), POZO-RODRÍGUES e colaboradores (2009), HINRICHS e colaboradores (2006), que obtiveram estabilidades semelhantes com o uso de crioprotetores durante a liofilização e para preservação a longo prazo.

5.4 Estudo de hemólise

Amostras de LPNP-branca, nos volumes equivalentes para as doses de 5, 10, 20, 30 e 40 mg/kg de DOX foram incubadas com um volume igual de suspensão de hemácias a 4% para avaliação do efeito de hemólise e os resultados estão demonstrados na figura 13.

Figura 13: Estudo de hemólise realizado com LPNP-Branca em diferentes concentrações.



Legenda: os números revelam a concentração equivalente das doses administradas em mg/kg. Todos os dados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão da média (n=3).

Um dos principais componentes do sangue são os glóbulos vermelhos, que tem um papel essencial no transporte de oxigênio, para respiração celular e na manutenção do equilíbrio ácido-base do sangue. A hemólise é caracterizada pela ruptura dos glóbulos vermelhos, liberando a hemoglobina na corrente sanguínea, sendo assim capaz de levar a complicações severas para o organismo. Por isso, a avaliação da toxicidade hemolítica de nanocarreadores é um estudo importante que deve ser realizado antes dos tratamentos em animais. A partir dele, consegue-se determinar a concentração segura de trabalho, evitando reações adversas inesperadas.

No entanto, diversos pesquisadores, como LI e colaboradores (2019) e MARTINS (2021), evidenciaram que a hemoglobina absorve em comprimentos de onda que variam de 415 a 570nm, enquanto que a DOX possui absorção em comprimento de onda de 488 a 590nm. Dessa maneira, com a sobreposição de pico entre os dois, não se torna possível avaliação do efeito da doxorubicina, ou da LPNP-DOX-ST, uma vez que não seria possível distinguir se o valor obtido pelo espectrofotômetro UV-VIS seria referente à DOX no sistema ou da hemoglobina liberada. Por isso, a fim de contornar essa limitação, foi utilizada a LPNP-Branca em volumes equivalentes as doses de DOX, que tem a mesma composição e método de preparo da LPNP-DOX-ST,

diferenciando-se apenas na ausência dos ativos. Vale ressaltar, que LPNP-Branca também apresenta características físico-químicas equivalentes a LPNP-DOX-ST.

Devido seu tamanho em escala nanométrica, nanopartículas tendem a possuir baixa hemocompatibilidade, em razão da maior relação superfície/volume e do maior número de grupos reativos na superfície (CENNI et al., 2008). Para minimizar esses efeitos, a utilização de materiais biocompatíveis e biodegradáveis, como o PLGA, tem sido recomendado (Nafee et al., 2009), além do revestimento de superfície com polímeros hidrofílicos como poli(etilenoglicol) (PEG) e metoxipoli(etilenoglicol), para reduzir a adsorção das proteínas plasmáticas, como opsoninas e apolipoproteínas (LETCFORD et al., 2009; BRYNE et al., 2008).

De acordo com *American Society for Testing and Materials* (2324-08), uma taxa de hemólise inferior a 5,0% classifica as nanopartículas como não tóxicas e seguras para dar seguimento aos estudos *in vivo* (BENDER et al., 2012; DASH et al., 2010; DOBROVOLSKAIA et al., 2008; DOBROVOLSKAIA, MCNEIL, 2013; JAIN et al., 2012). Portanto, conforme demonstrado na Figura 10, o perfil de segurança a ser trabalhado em sistemas biológico foi delimitado entre os volumes de nanopartículas correspondentes as concentrações de 5 a 20mg/kg de DOX, com porcentagem de hemólise entre $1,19 \pm 0,14$ e $2,98 \pm 0,43$ respectivamente.

5.5 Estudos de toxicidade aguda

5.5.1 Avaliação do peso corporal, sinais clínicos e mortalidade

Com o objetivo de reduzir a quantidade do uso de animais, é recomendado pela OECD a realização do experimento primeiramente com apenas 3 animais e de acordo com os resultados obtidos, ocorre continuação ou interrupção do experimento. Os grupos tratados com DOX, tanto nas doses de 17,5 mg/kg quanto 20 mg/kg, tiveram 100% de mortalidade (tabela 6), impedindo a continuidade do estudo. Ao contrário, nos grupos tratados com LPNP-DOX-ST, não houve mortes no grupo que recebeu 17,5 mg/kg e a maioria dos animais sobreviveram ao tratamento com 20 mg/kg por 14 dias (mortalidade de 20%).

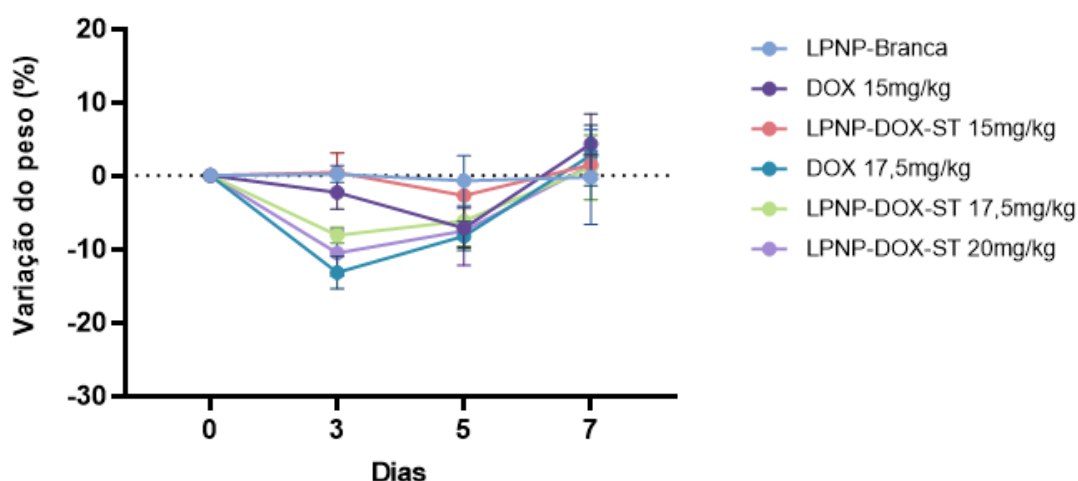
Tabela 6: Mortalidade de camundongos BALB/c fêmea após os tratamentos de 14 dias. Cada tratamento foi administrado por via intravenosa, em diferentes concentrações, conforme indicado na tabela.

Grupo (n=6)	Mortalidade (%)	Dia da morte
Salina 0,9% (p/v)	0	-
LPNP-Branca	0	-
DOX 15mg/kg	20	D5(1)
LPNP-DOX-ST 15mg/kg	0	-
DOX 17,5mg/kg ^a	100	D9(1), D11(1), D14(1)
LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg	0	-
DOX 20mg/kg ^a	100	D9(2), D11(1)
LPNP-DOX-ST 20mg/kg	20	D9 (1)
Lip-DOX 20mg/kg	20	D7 (1)

Legenda: DOX= doxorubicina livre em solução. LPNP-Branca= nanopartícula híbrida lipídica polimérica sem os ativos doxorubicina e α -succinato de tocoferila. LPNP-DOX-ST= nanopartícula híbrida lipídica polimérica contendo doxorubicina e α -succinato de tocoferila. Lip-DOX= lipossoma contendo doxorubicina. Os números revelam a concentração das doses administradas em mg/kg. D= dia da morte. a= 3 animais.

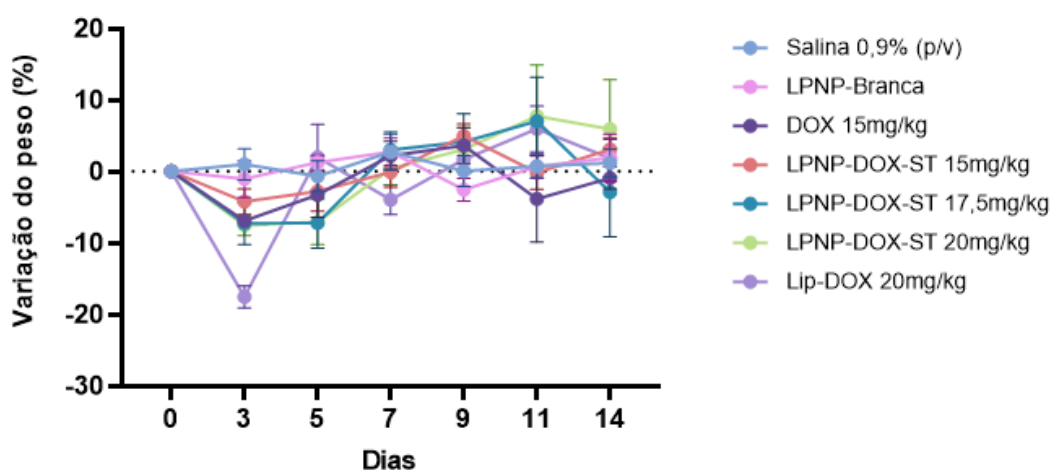
A avaliação dos parâmetros comportamentais e clínicos revela sinais precoces ou externos de toxicidade, os quais podem ser demonstrados a partir da perda de peso, prostração e piloereção (AKHILA et al., 2007; CRETON et al., 2010). As Figuras 14 e 15 demonstram a variação do peso corporal dos animais tratados e observados por 7 e 14 dias, respectivamente. Embora ambos os grupos tenham sofrido perda de peso e danos devido ao tratamento, a recuperação foi de modo geral satisfatória, sem diferenças significativas entre os grupos. Os grupos tratados com solução salina 0,9% (p/v) e LPNP-Branca mantiveram-se sem perda de peso significativa ou sinais clínicos aparentes, um dado relevante, demonstrando que os componentes utilizados para produção da nanopartícula não apresentaram toxicidade para o organismo, garantindo sua biocompatibilidade. O lip-DOX demonstrou os valores esperados ao longo do estudo, e mortalidade de 16,66% de animais.

Figura 14: Porcentagem de variação do peso corporal de camundongos BALB/c fêmeas tratadas, com DOX-livre, Lipossoma contendo DOX, LPNP-Branca e LPNP-DOX-ST, em diferentes concentrações, por 7 dias.



Legenda: DOX= doxorubicina livre em solução. LPNP-Branca= nanopartícula híbrida lipídica polimérica sem os ativos doxorubicina e α -succinato de tocoferila. LPNP-DOX-ST= nanopartícula híbrida lipídica polimérica contendo doxorubicina e α -succinato de tocoferila. Os números revelam a concentração das doses administradas em mg/kg. Todos os dados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão da média (n=6).

Figura 15: Porcentagem de variação do peso corporal de camundongos BALB/c fêmeas tratadas, com DOX-livre, Lipossoma contendo DOX, LPNP-Branca e LPNP-DOX-ST, em diferentes concentrações, por 14 dias.



Legenda: DOX= doxorubicina livre em solução. LPNP-Branca= nanopartícula híbrida lipídica polimérica sem os ativos doxorubicina e α -succinato de tocoferila. LPNP-DOX-ST= nanopartícula híbrida lipídica polimérica contendo doxorubicina e α -succinato de tocoferila. Lip-DOX= lipossoma contendo doxorubicina. Os números

revelam a concentração das doses administradas em mg/kg. Todos os dados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão da média (n=6).

Com relação aos sinais clínicos observados devido à toxicidade, foram identificados episódios de prostração, piloereção e ascite, através da observação diária dos grupos. Os animais pertencentes ao grupo DOX apresentaram prostração e piloereção acentuada em todas as concentrações avaliadas (15, 17,5 e 20mg/kg) o que é consistente com os efeitos observados em estudos que utilizam doses elevadas de doxorrubicina (STORM et al., 1989). Já para LPNP-DOX-ST houve apresentação de ambos os sinais, porém com a intensidade dose dependente, onde na concentração de 15mg/kg foi observado de maneira parcial e leve piloereção até o sétimo dia, com recuperação total nos dias seguintes. Nas concentrações de 17,5 e 20mg/kg os sinais de piloereção e prostração foram mais intensos e gradativos com o aumento da dose, até o sétimo dia, seguida por uma recuperação geral. Além disso, observou-se presença de ascite em apenas um animal do grupo tratado com 17,5mg/kg e em três animais do grupo tratado com 20mg/kg. A ascite é caracterizada pelo acúmulo de líquido na cavidade abdominal, pode estar associada à doxorrubicina devido a possíveis efeitos hepatotóxicos. Para identificar essa possível associação se faz necessário observação do tecido hepático e averiguar os danos causados. Esse resultado está em consonância com estudos que investigam o encapsulamento da DOX em nanossistemas (OLIVEIRA et al., 2023).

5.6 Investigação do hemograma e análise bioquímica

5.6.1 Investigação do hemograma

A hematopoiese é o processo complexo de formação e maturação das células sanguíneas a partir de células-tronco na medula óssea. Este processo é crucial para a manutenção de um número adequado de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas no sangue (SALLMAN et al., 2016). No entanto, a doxorrubicina pode induzir toxicidade hematológica significativa. Ela afeta a medula óssea, levando à diminuição da produção de células sanguíneas e resultando em condições como leucopenia e trombocitopenia (GABIZON et al, 2003; TIEN et al, 2016). Desse modo, a avaliação hematológica dos diferentes grupos de animais tratados está descrita na tabela 7.

Na análise dos dados globais de leucócitos (WBC), observou-se uma diferença estatística significativa em todos os grupos quando comparados ao grupo controle,

após 7 e 14 dias de tratamento, indicando uma hipocelularidade da medula óssea. Esse efeito mostrou um perfil dose-dependente, ou seja, com o aumento da dose de DOX, a hipocelularidade observada era mais acentuada. No entanto, é importante notar que, ao longo do tempo, todos os grupos apresentaram sinais de recuperação, observando melhora nesse parâmetro no decimo quarto dia em comparação ao sétimo dia pós-tratamento. Todavia, a leucopenia é uma alteração comum e amplamente documentada, por estudos do grupo e de outros autores (GABIZON et al, 2003; TIEN et al, 2016; SILVA et al., 2016).

Tabela 7: Parâmetros hematológicos referentes a série branca de camundongos BALB/c tratados com Salina, DOX-livre, LPNP-Branca, LPNP-DOX-ST e Lip-DOX em determinadas concentrações, conforme indicado na tabela.

	Global leucócitos (10 ³ /uL)	Não granulócitos (%)	Não granulócitos (10 ³ /uL)	Granulócitos (%)	Granulócitos (10 ³ /uL)
Grupo: Tratamento por 14 dias					
Salina 0,9% (p/v)	8,28±1,71	72,11±11,42	4,65±2,88	27,14±4,56	2,05±0,44
LPNP-Branca	6,4±1,32	70,13±8,58	4,01±1,83	28,53±3,73	1,44±0,68
DOX 15mg/kg	6,45±2,47 ^A	59,25±5,02	3,20±1,76	38,13±5,35	2,03±1,05
LPNP-DOX-ST 15mg/kg	6,25±1,38 ^A	72,75±6,79	4,49±1,35	28,18±5,35	1,78±0,44
LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg	6,33±1,08 ^A	57,69±6,25	2,57±1,19	40,25±4,17	2,56±0,92
LPNP-DOX-ST 20mg/kg	4,88±0,88 ^A	49,62±12,17	2,06±1,51	58,24±10,74	2,25±0,86
Lip-DOX 20mg/kg	3,8±0,91 ^A	53,04±4,65	2,02±0,53	46,96±2,51	1,78±0,41
Grupo: Tratamentos por 7 dias					
LPNP-Branca	7,47±0,77 ^B	67,91±11,42	4,98±1,29	32,09±9,28	2,01±0,32
DOX 15mg/kg	3,54±0,69 ^B	56,46±4,30	1,94±0,31	43,54±3,33	1,60±0,42
LPNP-DOX-ST 15mg/kg	3,7±0,75 ^B	43,68±4,50	2,37±0,67	36,63±3,68	1,33±0,12
DOX 17,5mg/kg	2,68±0,98 ^B	54,34±9,38	1,20±0,57	56,32±8,3	1,48±0,53
LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg	2,33±0,85 ^B	60,05±5,61	1,40±0,60	38,28±6,40	0,93±0,31
LPNP-DOX-ST 20mg/kg	1,87±0,64 ^B	51,55±8,84	0,98±0,41	48,45±8,24	0,90±0,29

Legenda: DOX= doxorubicina livre em solução. LPNP-Branca= nanopartícula híbrida lipídica polimérica sem os ativos doxorubicina e α -succinato de tocoferila. LPNP-

DOX-ST= nanopartícula híbrida lipídica polimérica contendo doxorubicina e α -succinato de tocoferila. Lip-DOX= lipossoma contendo doxorubicina. Os números revelam a concentração das doses administradas em mg/kg. (^A representa diferença significativa em relação ao grupo Salina 0,9% (p/v) e os outros grupos tratados no tratamento por 14 dias; ^B representa diferença significativa em relação ao grupo LPNP-Branca e os outros grupos tratados no tratamento por 7 dias). Os dados foram analisados pelo teste de variância ANOVA e os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$).

Os parâmetros referentes a série vermelha e as plaquetas do hemograma realizado nos camundongos, estão expressos na tabela 8. A trombocitopenia e anemia, apesar de menos pronunciados, também são condições clínicas associadas aos tratamentos realizados com doxorubicina (CHABNER et al., 2005). A anemia é uma doença marcada pela redução dos níveis de hemoglobina, pela diminuição da contagem de eritrócitos e do hematócrito no sangue. Por outro lado, a trombocitopenia é uma condição caracterizada pela diminuição anormal na contagem de plaquetas. Ambos podem estar associados com mielotoxicidade induzida pela doxorubicina, devido à captação pelos órgãos do sistema fagocítico, como baço e fígado, afetando negativamente a medula óssea (SILVA et al., 2016).

Os dados da avaliação da toxicidade hematológica (tratamento de 14 dias) mostram que o grupo tratado com DOX 15mg/kg apresentou diminuição significativa nos níveis de RBC (eritrócitos), HGB (hemoglobina) e HCT (hematócrito) em comparação com o grupo controle. Por outro lado, LPNP-DOX-ST na mesma dose de 15mg/kg, houve a redução apenas de HGB. Ao analisar os níveis de RBC, pode-se perceber que houve diferença significativa em comparação com grupo controle, apenas para DOX 15mg/kg e LPNP-DOX-ST 20mg/kg, ainda que para DOX a redução foi mais pronunciada. A hemoglobina apresentou diferenças significativas em todos grupos comparados com o controle, exceto o grupo de LPNP-Branca. Foi observada uma diferença significativa no hematócrito entre o grupo controle e os grupos tratados com DOX 15 mg/kg e Lip-DOX 20 mg/kg, o que representa um resultado relevante para todas as concentrações da formulação que não obtiveram diferença. Já para RDW (Red Cell Distribution Width) e contagem de plaquetas, não observamos diferenças significativas entre nenhum dos grupos tratados. Todavia, alterações numéricas significativas, nem sempre trazem relevância quando comparados com organismos biológicos e ainda assim podem permanecer dentro dos valores de referência (SILVA et al., 2016). Contudo, os resultados obtidos estão alinhados com a literatura, que

aponta que a doxorubicina pode levar à redução dos parâmetros da série vermelha. No entanto, o uso da LPNP-DOX-ST apresentou resultados menos críticos em comparação com a doxorubicina em solução e a LIP-dox. (CHABNER et al., 2005).

Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo tratado com salina e o grupo tratado com LPNP-Branca, de modo que, no tratamento de 7 dias, LPNP-Branca foi considerada como controle negativo. Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas significativas em comparação com grupo controle para nenhum dos parâmetros da série vermelha analisados. O que pode estar relacionado ao ciclo de vida mais longo das hemácias uma vez que, mesmo diante de danos na medula óssea, as hemácias já em circulação não apresentam alterações imediatas.

Tabela 8: Parâmetros hematológicos referentes a série vermelha de camundongos BALB/c tratados com Salina, DOX-livre, LPNP-Branca, LPNP-DOX-ST e Lip-DOX em determinadas concentrações, conforme indicado na tabela.

	RBC (10 ⁶ /uL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RDW CV (%)	PLT (10 ³ /uL)
Grupo: Tratamento por 14 dias					
Salina 0,9% (p/v)	6,16±0,14	15,38±1,24	27,21±1,54	13,96±0,70	588,83±113,30
LPNP-Branca	5,94±0,45	14,27±1,48	26,50±2,33	14,07±0,54	559,1±78,73
DOX 15mg/kg	3,83±1,06*	11,57±1,21*	20,30±2,92*	14,33±0,94	454,0±122,4
LPNP-DOX-ST 15mg/kg	5,29±0,22	13,14±0,48*	24,47±2,26	13,60±0,70	707,0±131,1
LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg	5,63±0,69	13,10±1,25*	23,96±2,62	14,37±1,14	661,6±49,70
LPNP-DOX-ST 20mg/kg	5,19±0,37*	12,59±1,03*	23,46±4,18	14,43±1,20	566,7±91,55
Lip-DOX 20mg/kg	5,31±0,16	11,98±0,66*	22,62±2,06*	14,23±0,61	564,2±75,80
Grupo: Tratamentos por 7 dias					
LPNP-Branca	6,14±0,34	13,52±0,86	28,81±2,35	13,91±0,50	501,6±58,51
DOX 15mg/kg	5,83±0,16	12,52±0,90	26,68±0,84	14,52±0,89	404,8±15,17
DOX 17,5mg/kg	6,41±0,38	13,99±0,97	31,53±1,86	14,35±0,62	520,3±81,28
LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg	6,48±0,34	14,27±1,29	30,75±1,81	14,18±0,45	421,50±158,06
LPNP-DOX-ST 20mg/kg	6,14±0,25	14,63±1,63	30,23±2,36	14,35±0,53	626,5±81,84

Legenda: RBC= eritrócitos. HGB= hemoglobina. HCT= hematócrito. RDW= red cell distribution width (amplitude da distribuição dos glóbulos vermelhos). PLT= plaqueta. DOX= doxorubicina livre em solução. LPNP-Branca= nanopartícula híbrida lipídica polimérica sem os ativos doxorubicina e α -succinato de tocoferila. LPNP-DOX-ST= nanopartícula híbrida lipídica polimérica contendo doxorubicina e α -succinato de tocoferila. Lip-DOX= lipossoma contendo doxorubicina. Os números revelam a concentração das doses administradas em mg/kg. (* representa diferença significativa em relação ao grupo controle e os outros grupos tratados). Os dados foram analisados pelo teste de variância ANOVA e os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$).

5.6.2 Análise bioquímica

Os dados referentes avaliação dos marcadores renais, hepáticos e cardíacos estão expressos na tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros bioquímicos avaliados em camundongos BALB/c tratados com Salina, DOX, LPNP-Branca, LPNP-DOX-ST e Lip-DOX em determinadas concentrações, conforme indicado na tabela.

	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	AST (unidades/mL)	ALT (Unidades/mL)	CKMB (U/L)
Grupo: Tratamento por 14 dias					
Salina 0,9% (p/v)	55,01±12,42	0,399±0,040	82,45±23,90	32,30±6,63	46,90±4,13
LPNP-Branca	53,66±7,40	0,398±0,070	101,46±11,03	36,58±6,20	41,83±5,00
DOX 15mg/kg	50,77±6,80	0,580±0,169 ^A	120,95±28,27 ^A	48,70±17,77 ^A	52,65±8,83
LPNP-DOX-ST 15mg/kg	50,66±6,21	0,396±0,035	102,70±13,43	57,76±8,12 ^A	37,46±9,59
LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg	66,89±11,58	0,356±0,020	84,70±22,65	51,94±10,73 ^A	39,20±4,81
LPNP-DOX-ST 20mg/kg	63,20±15,10	0,358±0,081	84,38±29,97	47,14±11,63 ^A	50,48±12,64
Lip-DOX 20mg/kg	42,91±6,33	0,373±0,023	107,91±10,27	52,03±7,67 ^A	37,73±5,11
Grupo: Tratamentos por 7 dias					
LPNP-Branca	51,29±15,62	0,386±0,030	94,03±17,98	39,68±9,96	34,08±2,81
DOX 15mg/kg	78,06±13,09 ^B	0,391±0,030	104,77±12,40	36,31±7,21	28,48±6,73
LPNP-DOX-ST 15mg/kg	65,94±13,00	0,420±0,025	118,17±14,15	42,19±3,93	39,16±4,00
DOX 17,5mg/kg	76,43±11,27 ^B	0,410±0,042	116,0±22,0	57,47±25,85	43,95±12,34
LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg	75,54±16,22 ^B	0,392±0,018	109,29±15,75	44,87±7,08	33,85±7,85
LPNP-DOX-ST 20mg/kg	62,08±1,98	0,410±0,096	111,31±9,08	41,03±7,61	34,05±1,28

Legenda: DOX= doxorubicina livre em solução. LPNP-Branca= nanopartícula híbrida lipídica polimérica sem os ativos doxorubicina e α -succinato de tocoferila. LPNP-DOX-ST= nanopartícula híbrida lipídica polimérica contendo doxorubicina e α -succinato de tocoferila. Lip-DOX= lipossoma contendo doxorubicina. Os números revelam a concentração das doses administradas em mg/kg. AST= Aspartato amino-transferase. ALT= Aspartato alanina-transferase. (^A representa diferença significativa em relação ao grupo salina 0,9% (p/v) e os grupos tratados por 14 dias; ^B representa diferença significativa entre grupo LPNP-Branca tratada por 7 dias e os demais grupos do mesmo período de tratamento). Os dados foram analisados pelo teste de variância ANOVA e os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$).

Para avaliar a função renal dos camundongos tratados, foram analisadas as concentrações séricas de ureia e creatinina. Esses biomarcadores são amplamente utilizados para fornecer informações essenciais sobre o desempenho renal, uma vez que os rins têm por função equilíbrio homeostático e garantir a excreção de resíduos metabólicos, regulando o volume extracelular, balanço eletrolítico e ácido-base (COSTA et al., 2012). Sendo a ureia um produto final do metabolismo proteico de compostos nitrogenados e a creatinina um subproduto do metabolismo muscular, são excretas filtradas livremente pelos glomérulos e eliminadas pela urina. Contudo, a elevação sérica dos níveis desses compostos pode indicar comprometimento na capacidade de filtração renal, decorrente da toxicidade possivelmente ocasionada associadas ao tratamento (FONSECA, 2014; MOTTA, 2009; RAMOS, 2015; SODRÉ, et al., 2007).

Os resultados referentes aos níveis de ureia mostraram que, após 14 dias de tratamento, não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle. Porém, ao observar o tratamento de 7 dias, levando em consideração a LPNP-Branca como grupo controle, podemos observar uma diferença significava com o grupo de DOX nas concentrações de 15 e 17,5mg/kg e a LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg. Com base nesses dados, podemos inferir que o dano renal causado pela LPNP-DOX-ST é reversível, com uma boa recuperação no decorrer dos dias. Enquanto que com a DOX, especialmente para o grupo tratado com 17,5mg/kg, não podemos chegar a essa conclusão pois observamos a morte de 100% dos animais tratados.

Com relação aos resultados obtidos pela análise da creatinina, durante o tratamento de 14 dias, observou-se uma diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com DOX 15mg/kg. Já os animais tratados com LPNP-DOX-ST mantiveram níveis de creatinina semelhantes ao controle para todas as concentrações testadas (tabela 9). Além disso, ao comparar os tratamentos de 7 e 14 dias da DOX (15mg/kg),

notou-se um desenvolvimento progressivo dos danos, com agravamento dos resultados e sem evidências de recuperação. Tais observações refletem o mecanismo de biodistribuição do fármaco. A doxorubicina em solução é predominantemente eliminada pelos rins, no entanto, quando encapsulada a eliminação renal é retardada, o que pode oferecer nefroproteção, reduzindo a toxicidade renal (FERNANDES et al., 2016; SILVA et al., 2016).

É comumente observado alterações nas atividades séricas das enzimas hepáticas durante a prática clínica de pequenos animais. Considerados indicadores sensíveis, a dosagem de Aspartato amino-transferase (AST) e Aspartato alanina-transferase (ALT), podem ter seus níveis elevados diante de muitos processos patológicos (SHARON Et al., 1995). A análise desses marcadores pode revelar possíveis danos hepatocelulares e possibilitar uma avaliação quantitativa do grau de lesão sofrida pelos hepatócitos. Em conjunto com os dados histológicos, essa análise mede o impacto tóxico causado no fígado (MILLER et al., 1999; ALHABORI et al., 2002). A predominância de AST se encontra no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, enquanto que, ALT é encontrada no fígado, e em menor proporção em rim e coração.

Ao avaliar os diferentes grupos observados por 14 dias, nota-se que os níveis de AST não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle, com exceção ao grupo tratado com DOX 15mg/kg. Corroborando dados da literatura, o AST não é considerada uma enzima hepato-específica, ela é frequentemente utilizada para diagnosticar doenças musculares e outras condições sistêmicas (BUSH, 2004; THRALL, 2007). Na toxicidade aguda, a atividade de ALT geralmente apresenta um aumento mais pronunciado em comparação com AST (MOTTA, 2009; FONSECA, 2014).

No nosso estudo, houve aumento significativo nos níveis de ALT para todos os grupos tratados, em comparação com o grupo controle, com exceção da LPNP-Branca. Tal fator pode estar associado com lesões transitórias, perda de massa muscular e a utilização de doxorubicina, visto que, ao ser administrados, podem ser captados pelo sistema fagocitário mononuclear que estão presentes no fígado e baço (DUARTE, 2017; GOZANNO, et al., 2024; FRANCA, 2017; FRÉZARD, et al., 2005). Além disso, a doxorubicina é parcialmente eliminada por via hepato-biliar, o que posiciona o fígado como um alvo crítico para possíveis injúrias, o aumento significativo nos níveis

de ALT reflete a elevação da atividade hepatocelular em resposta ao estresse e dano hepático (SU et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Um dos principais fatores que limitam o uso da doxorubicina, apesar de sua eficácia terapêutica comprovada, é a sua cardiotoxicidade. Estudos, como o de Mordente (2012), destacam que a cardiotoxicidade da doxorubicina é associada a um dano miocárdico que é dose-dependente, progressivo e potencialmente fatal. Este efeito adverso é uma preocupação alarmante, pois pode levar a complicações graves, incluindo disfunção ventricular e insuficiência cardíaca congestiva. Para mitigar esses riscos e avaliar o impacto da doxorubicina no tecido cardíaco, é essencial o acompanhamento regular de biomarcadores cardíacos específicos. Entre os biomarcadores mais utilizados estão a Creatina Quinase (CK), a CK-MB e a Troponina. Os resultados obtidos nesse estudo foram promissores, mediante análise do marcador cardíaco CK-MB. Após 14 dias de observação, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quando comparados com o grupo controle. Contudo, ao comparar os grupos nas mesmas concentrações após 7 e 14 dias, observa-se uma diferença significava entre a concentração de 15mg/kg de DOX e 20mg/kg de LPNP-DOX-ST. Especificamente, o parâmetro CK-MB aumentou 84,86% no grupo tratado com DOX (15 mg/kg) e 48,25% no grupo tratado com LPNP-DOX-ST (20 mg/kg) de 7 para 14 dias. Esses resultados indicam que, apesar do aumento na dose, a formulação LPNP-DOX-ST demonstrou ser menos tóxica e compatível, apresentando um perfil de segurança relativamente melhor em comparação com a doxorubicina convencional.

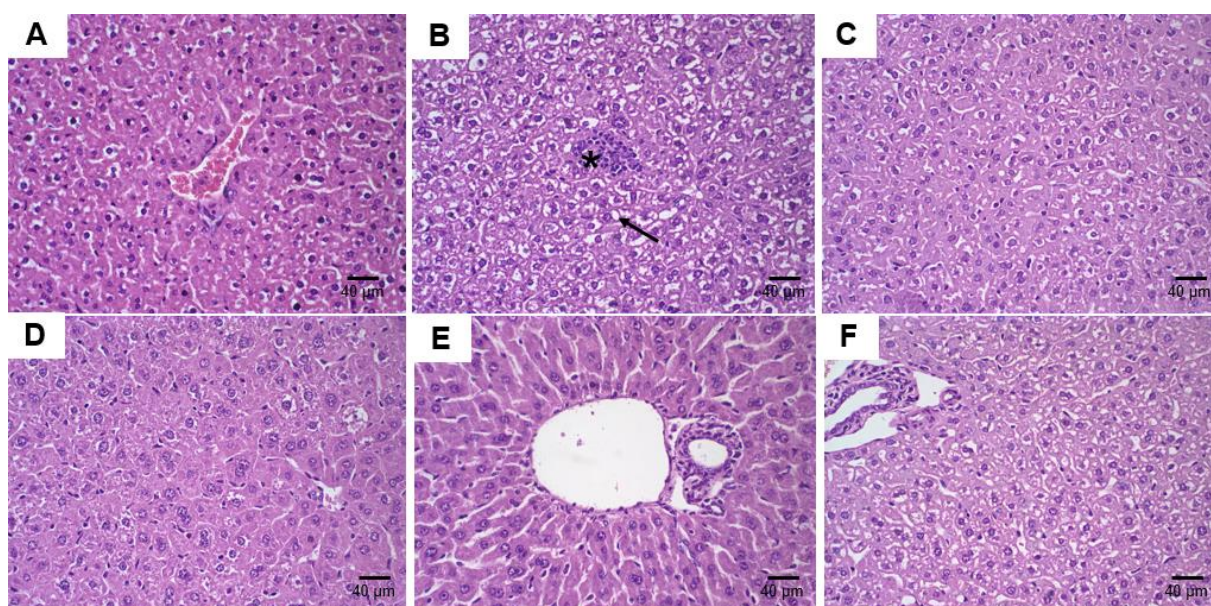
5.7 Análise histopatológica

A avaliação histológica foi realizada para investigar possíveis danos e correlacioná-los com os achados hematológicos e bioquímicos. Os tecidos analisados incluíram baço, fígado, rim, coração e medula óssea, proporcionando uma visão abrangente da toxicidade potencial em cada grupo. Todas as análises foram comparadas com o grupo LPNP-Branca, e envolveram um total de quatro animais por grupo. É importante destacar que as análises histológicas foram conduzidas por um profissional especializado na área, garantindo a precisão e a relevância dos resultados obtidos. Este processo detalhado permite uma compreensão mais completa dos efeitos adversos dos tratamentos estudados e contribui para a avaliação da segurança e da toxicidade dos diferentes nanossistemas e formulações testadas.

O baço permaneceu preservado e sem alterações celulares independente do tratamento realizado. No entanto, ao examinar o tecido hepático, observou-se degeneração hepática multifocal, variando de moderada a difusa, em 50% das lâminas analisadas do grupo tratado com DOX a 15 mg/kg por 14 dias. Em contraste, essa degeneração não foi observada nos grupos tratados em diferentes concentrações de LPNP-DOX-ST, sugerindo a redução da toxicidade hepática, tal observação também foi encontrada em outros estudos do grupo (SILVA et al., 2016). Houve alteração em apenas um animal do grupo de LPNP-DOX-ST 20mg/kg (7 dias), o que pode indicar um dano reversível, sem encontrar alterações no animal de mesma dose em 14 dias de tratamento, conforme demonstrado nas figuras 16 e 17.

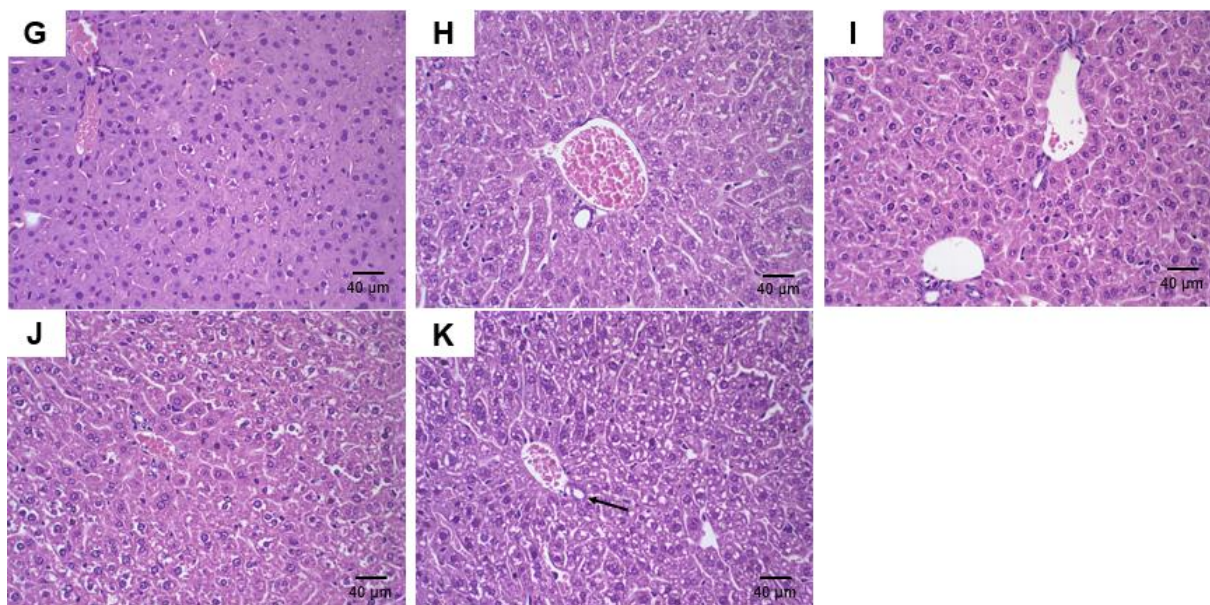
Os demais grupos apresentaram tecidos hepáticos preservados. Indicando que, embora as análises bioquímicas tenham mostrado elevações nos níveis de ALT, as alterações histológicas não foram generalizadas, com ausência na maior parte dos grupos. A elevação de ALT é associada a lesões renais precoces, podendo ou não estar associada a danos teciduais, o que corrobora com a hipótese de reversibilidade do dano. Além disso, pode estar associada a vários distúrbios não hepáticos, como necrose e lesão muscular cardíaca (NATHWANI et al., 2005; KREFETZ & McMILLIN, 2010), sugerindo que apesar da elevação dos níveis de ALT, não há alterações no fígado.

Figura 16: Cortes histológicos do fígado de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 14 dias.



Legenda: A= Salina 0,9%. B= DOX 15mg/kg. C= LPNP-DOX-ST 15mg/kg. D= LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg. E= LPNP-DOX-ST 20mg/kg. F= Lip-DOX. As setas pretas indicam regiões com degeneração hidrópica. Os asteriscos indicam área com infiltrado inflamatório. Coloração HE, ampliação de 40x.

Figura 17: Cortes histológicos do fígado de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 7 dias.

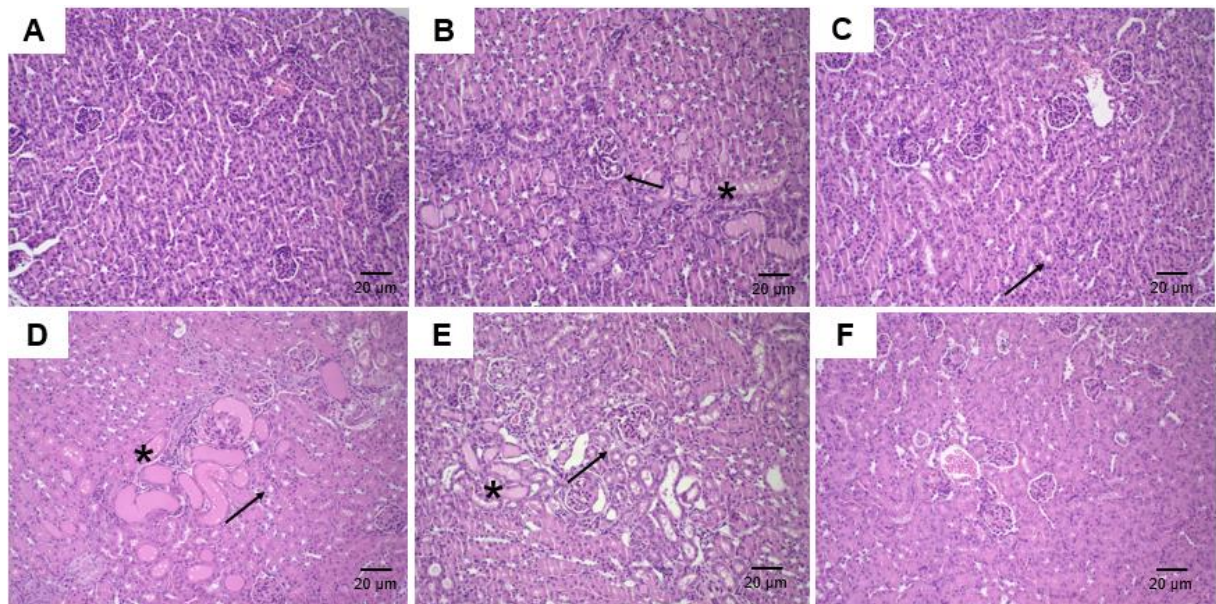


Legenda: G= DOX 15mg/kg. H= DOX 17,5mg/kg. I= LPNP-DOX-ST 15mg/kg. J= LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg. K= LPNP-DOX-ST 20mg/kg. As setas pretas indicam regiões com degeneração hidrópica. Coloração HE, ampliação de 40x.

Com relação as análises dos tecidos renais, foram observadas alterações em todos os grupos tratados com DOX e LPNP-DOX-ST (figura 18 e 19), exceto na concentração de LPNP-DOX-ST 15mg/kg com 7 dias de tratamento. Essas alterações incluem lesões escleróticas glomerulares e deposição de material hialino tubular (cilindros hialinos), uma reação adversa esperada para tratamentos com doxorubicina (REFAIE et al., 2016; SU et al., 2015; SILVA et al., 2016). No entanto, notou-se uma redução na intensidade das lesões renais nos grupos tratados com LPNP-DOX-ST.

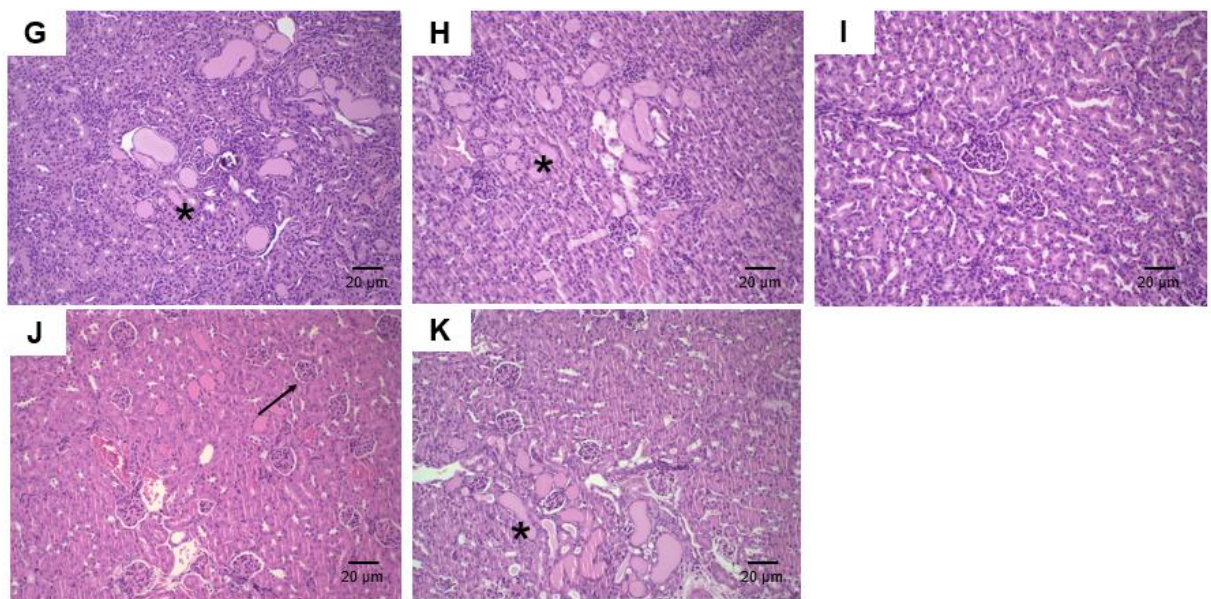
Ao associar com os parâmetros bioquímicos, os dados mostram a preservação da capacidade funcional do rim, pelo equilíbrio dos níveis de ureia e creatinina após 14 dias de tratamento. Embora haja alterações significativas nos valores de ureia e creatinina nos animais tratados por 7 dias, esses efeitos podem ser considerados reversíveis, com a recuperação ao longo do tempo. Ainda assim, o desenvolvimento progressivo dos valores de ureia e creatinina observado para tratamento com DOX na dose de 15mg/kg corroboram com a progressão da lesão renal encontrada.

Figura 18: Cortes histológicos do rim de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 14 dias.



Legenda: A= Salina 0,9%. B= DOX 15mg/kg. C= LPNP-DOX-ST 15mg/kg. D= LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg. E= LPNP-DOX-ST 20mg/kg. F= Lip-DOX. As setas pretas indicam regiões com lesões escleróticas glomerulares. Os asteriscos indicam cilindros hialinos. Coloração HE, ampliação de 20x.

Figura 19: Cortes histológicos do rim de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 7 dias.

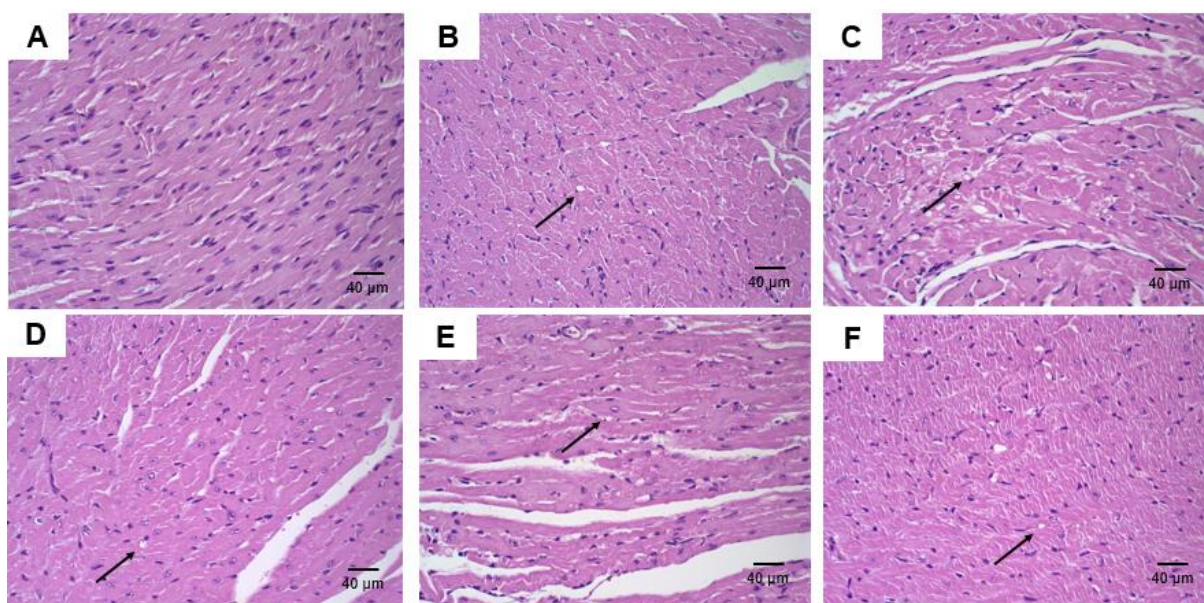


Legenda: G= DOX 15mg/kg. H= DOX 17,5mg/kg. I= LPNP-DOX-ST 15mg/kg. J= LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg. K= LPNP-DOX-ST 20mg/kg. As setas pretas indicam regiões com lesões escleróticas glomerulares. Os asteriscos indicam cilindros hialinos. Coloração HE, ampliação de 20x.

Como mencionado anteriormente, a principal dificuldade associada ao tratamento com doxorrubicina é a cardiotoxicidade. Pois, apesar da eficácia terapêutica ser promissora, o agravamento da função cardíaca na maioria dos pacientes, impede a continuidade do tratamento (VEJPONGSA & YEH, 2014). A lesão cardíaca associada ao uso de doxorrubicina é tipicamente caracterizada por hialinização e vacuolização dos cardiomiócitos. Essas alterações estruturais nos músculos cardíacos podem levar a alterações no eletrocardiograma e elevação nos níveis séricos de CK-MB (LIU et al., 2016; AZARKHIAVI et al., 2016).

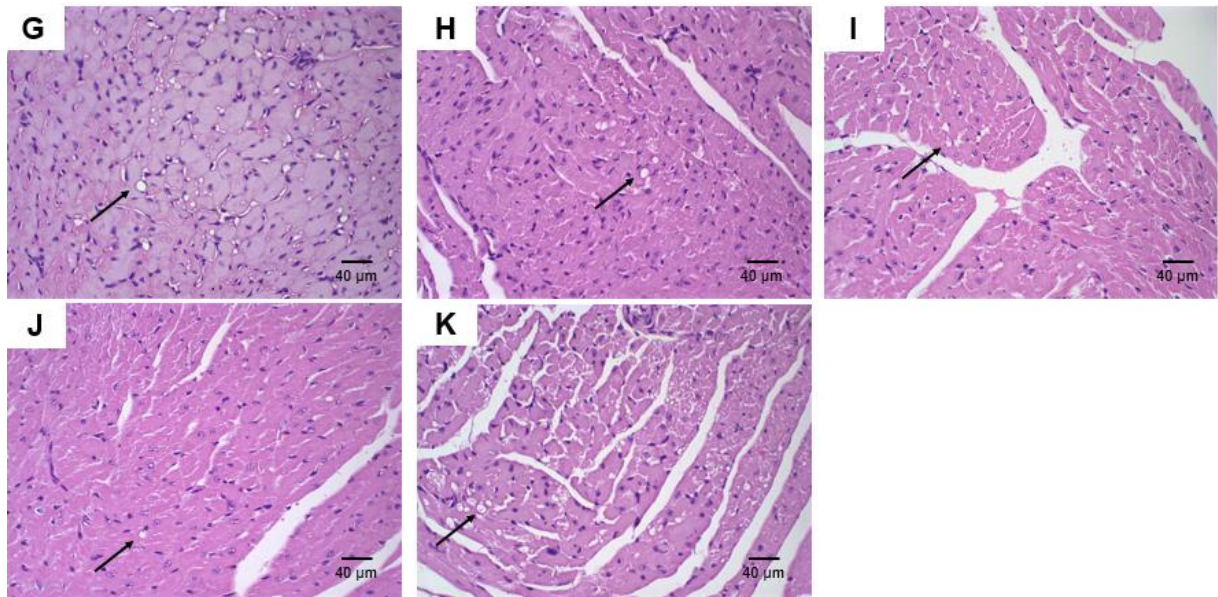
A análise das lâminas histológicas de coração dos camundongos apresentadas nas figuras 20 e 21, revelaram alterações em todo os grupos tratados. No entanto, os animais tratados com LPNP-DOX-ST em diferentes concentrações de doxorrubicina, demonstraram alterações focais e discretas, enquanto que para DOX 15mg/kg (14 dias de tratamento) obteve alteração mais acentuada, com intensidade variando de leve a moderada. Esses resultados sugerem que o encapsulamento da doxorrubicina reduz significativamente a toxicidade cardíaca em comparação com danos associados a doxorrubicina em solução. Esses dados estão alinhados com os resultados de outros estudos (SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2018; CHATTERJEE et al., 2010).

Figura 20: Cortes histológicos do coração de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 14 dias.



Legenda: A= Salina 0,9%. B= DOX 15mg/kg. C= LPNP-DOX-ST 15mg/kg. D= LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg. E= LPNP-DOX-ST 20mg/kg. F= Lip-DOX. As setas pretas indicam vacuolização de cardiomiócitos. Coloração HE, ampliação de 40x.

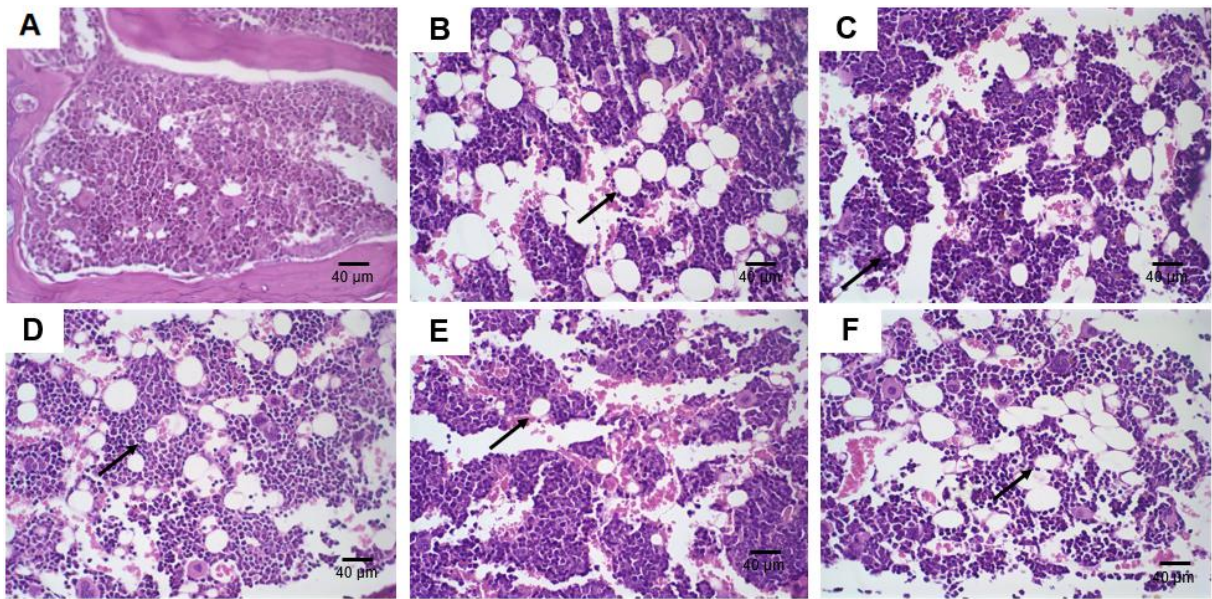
Figura 21: Cortes histológicos do coração de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 7 dias.



Legenda: G= DOX 15mg/kg. H= DOX 17,5mg/kg. I= LPNP-DOX-ST 15mg/kg. J= LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg. K= LPNP-DOX-ST 20mg/kg. As setas pretas indicam vacuolização de cardiomíocitos. Coloração HE, ampliação de 40x.

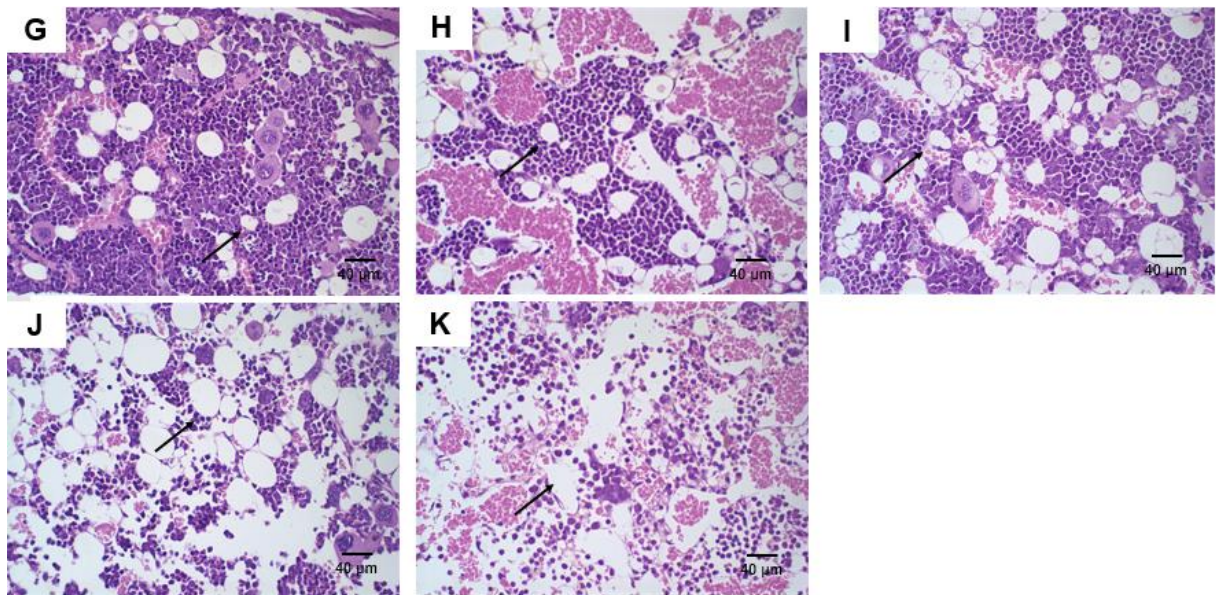
As figuras 22 e 23 expressam a análise dos cortes histológicos da medula óssea dos camundongos revelou que os danos observados após 7 dias de tratamento são progressivos com o aumento da dose administrada, sendo mais pronunciados do que aqueles observados após 14 dias de tratamento. Esse padrão sugere uma possível recuperação da medula óssea com o tempo. Além disso, a redução observada na série vermelha e na série branca corroborou com a hipocelularidade periférica detectada nos grupos tratados. Tais informações inferem que mielotoxicidade, uma característica grave associada ao uso de doxorubicina é reversível (DOUEDI, CARSON, 2003).

Figura 22: Cortes histológicos da medula de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 14 dias.



Legenda: A= Salina 0,9%. B= DOX 15mg/kg. C= LPNP-DOX-ST 15mg/kg. D= LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg. E= LPNP-DOX-ST 20mg/kg. F= Lip-DOX. As setas pretas indicam hipocelularidade. Coloração HE, ampliação de 40x.

Figura 23: Cortes histológicos da medula de camundongos BALB/c fêmeas, tratados por 7 dias.



Legenda: G= DOX 15mg/kg. H= DOX 17,5mg/kg. I= LPNP-DOX-ST 15mg/kg. J= LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg. K= LPNP-DOX-ST 20mg/kg. As setas pretas indicam hipocelularidade. Coloração HE, ampliação de 40x.

5.8 Análise eletrocardiográfica

Como previamente mencionado, o desenvolvimento de cardiotoxicidade induzida pelo uso de antraciclina é frequentemente observado em tratamentos de quimioterapia antineoplásica. A cardiotoxicidade geralmente se manifesta por arritmias transitórias,

e em alguns casos, como na taquicardia ventricular, pode evoluir para insuficiência cardíaca ou morte súbita (Moura, et al., 2015; Ewer, et al., 2010; Cardinale, et al., 2002). Nesse contexto, a avaliação eletrocardiográfica constitui um parâmetro adicional, que, juntamente com as análises bioquímicas e histopatológicas, fornece informações precisas sobre os efeitos do tratamento, permitindo comparações entre diferentes doses e grupos experimentais no presente estudo.

O eletrocardiograma (ECG) é uma ferramenta diagnóstica não invasiva, amplamente utilizada na prática clínica e na pesquisa para monitorar a função cardiovascular. Ele permite a análise da atividade elétrica do coração, detectando alterações no ritmo, na frequência e na condução do impulso elétrico. Essas alterações podem ser reflexo de diversas condições patológicas, como doenças das artérias coronárias, hipertensão arterial, cardiomiopatias, distúrbios metabólicos e desequilíbrios eletrolíticos. Além disso, o ECG pode ser fundamental na identificação do tipo, da origem e da gravidade das arritmias, fornecendo informações cruciais para a definição do tratamento terapêutico mais adequado (Barros, et al., 2016; Moura, et al., 2015; Nicolau, et al., 2003).

Os valores obtidos referentes a frequência cardíaca (FC), Onda T, Intervalo PR e Complexo QRS foram expressos na tabela 10. A análise dos dados referentes à LPNP-Branca revela que sua composição não induz alterações nos parâmetros eletrocardiográficos, evidenciando que é uma formulação segura e compatível para o tratamento. Com relação a FC, é possível observar uma redução significativa exclusivamente no grupo tratado com solução de DOX, ao comparar os animais nos dias 7 e 14 com o dia 0, resultado semelhante descrito por Monkni e colaboradores (2012). E o Complexo QRS exibiu um aumento significativo no grupo tratado com lipossoma contendo doxorubicina, no dia 7, ao contrário dos outros grupos tratados.

Tabela 10: Parâmetros eletrocardiográficos de camundongos BALB/c fêmeas tratados com Salina, DOX, LPNP-Branca, LPNP-DOX-ST e Lip-DOX em determinadas concentrações, conforme indicado na tabela.

Parâmetro	Tempo (dias)	LPNP-Branca	DOX 15mg/kg	LPNP-DOX-ST 15mg/kg	LPNP-DOX-ST 17,5mg/kg	LPNP-DOX-ST 20mg/kg	Lip-DOX 20mg/kg
FC (bpm)	0	274,5 ± 25,52	289,0 ± 13,72	192,22 ± 6,79	267,5 ± 67,93	264,167 ± 43,82	240,0 ± 42,65
	7	235,41 ± 15,55	194,3 ± 39,41 ^a	247,0 ± 16,10	241,83 ± 33,72	279,5 ± 28,31	223,0 ± 45,09

	14	250,91 ± 59,31	191,5 ± 25,68 ^b	244,0 ± 15,96	249,66 ± 29,05	239,91 ± 31,56	256,5 ± 37,30
Onda T (ms)	0	18,83 ± 7,49	30,75 ± 26,12	17,33 ± 8,93	13,91 ± 4,16	18,16 ± 4,36	16,08 ± 5,01
	7	27,91 ± 10,74	24,41 ± 17,57	33,33 ± 27,67	22,83 ± 12,93	18,08 ± 4,37	16,16 ± 5,40
	14	23,66 ± 17,06	18,58 ± 4,44	16,5 ± 5,41	19,08 ± 8,64	16,33 ± 9,05	18,91 ± 8,60
Intervalo PR (ms)	0	29,0 ± 1,85	31,33 ± 1,66	27,75 ± 2,34	29,08 ± 1,72	28,0 ± 1,41	30,0 ± 1,47
	7	31,08 ± 1,67	30,75 ± 1,54	31,66 ± 1,77	31,33 ± 1,55	31,41 ± 1,92	30,58 ± 3,24
	14	28,0 ± 0,95	30,75 ± 1,60	29,91 ± 1,16	29,91 ± 1,44	29,41 ± 1,50	28,16 ± 1,85
Complexo QRS (ms)	0	47,66 ± 12,52	49,33 ± 2,87	51,66 ± 3,84	45,16 ± 1,80	41,25 ± 6,15	38,25 ± 4,45
	7	42,16 ± 5,70	54,33 ± 6,35	43,41 ± 11,37	52,58 ± 1,56	37,75 ± 10,93	50,58 ± 3,24 ^c
	14	42,83 ± 2,62	54,83 ± 2,40	51,33 ± 1,61	51,58 ± 3,65	49,83 ± 1,47	47,0 ± 6,29

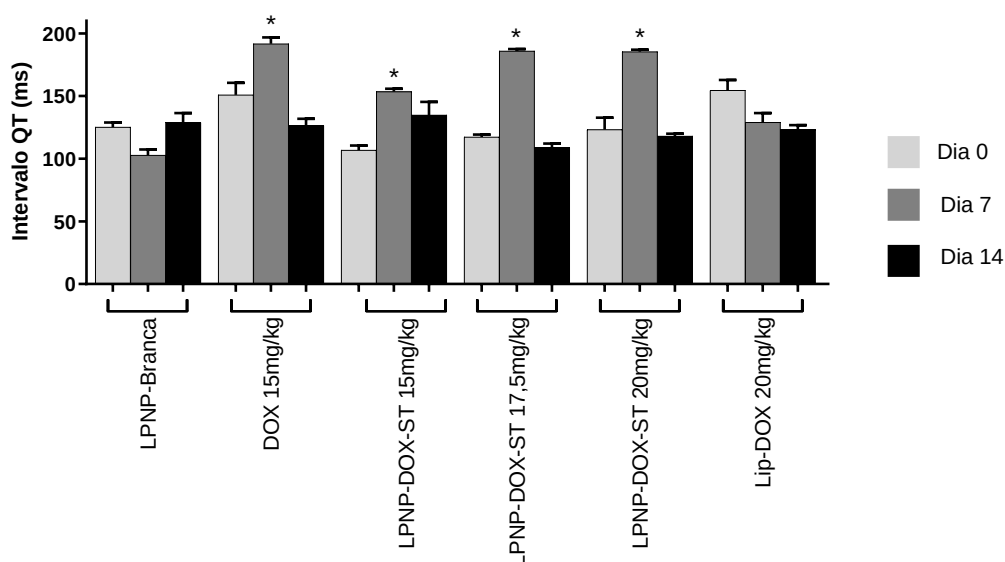
Legenda: DOX= doxorubicina livre em solução. LPNP-Branca= nanopartícula híbrida lipídica polimérica sem os ativos doxorubicina e α -succinato de tocoferila. LPNP-DOX-ST= nanopartícula híbrida lipídica polimérica contendo doxorubicina e α -succinato de tocoferila. Lip-DOX= lipossoma contendo doxorubicina. Os números revelam a concentração das doses administradas em mg/kg. (^a representa diferença significativa em relação ao grupo DOX 15mg/kg entre baseline e dia 7; ^b representa diferença significativa entre baseline e dia 14 do grupo DOX 15mg/kg; ^c representa diferença significativa entre baseline e dia 7 do grupo tratado com Lip-DOX 20mg/kg). Os dados foram analisados pelo teste de variância ANOVA e os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$).

As alterações associadas à cardiotoxicidade aguda, geralmente observadas até 14 dias após o tratamento, podem incluir alterações súbitas na repolarização ventricular, prolongamento do intervalo QT, arritmias ventriculares e supraventriculares, além de síndromes coronárias agudas, pericardite e miocardite. Essas manifestações refletem o impacto proporcionado pela ação da doxorubicina, no sistema cardiovascular, variando de alterações eletrocardiográficas discretas a condições mais graves (Raschi, et al., 2010; Albini, et al., 2010).

As figuras 24 e 25, apresentam os intervalos QT (ms) e QTc (ms) respectivamente. Como esperado, a LPNP-Branca também não induziu alterações significativas nesses parâmetros eletrocardiográficos. Em QT, observou-se um aumento significativo no dia 7 dos animais tratados com a LPNP-DOX-ST em todas as doses administradas, seguindo por uma recuperação satisfatória. Esse padrão também foi observado no grupo tratado com solução de DOX, indicando os efeitos colaterais associados ao uso

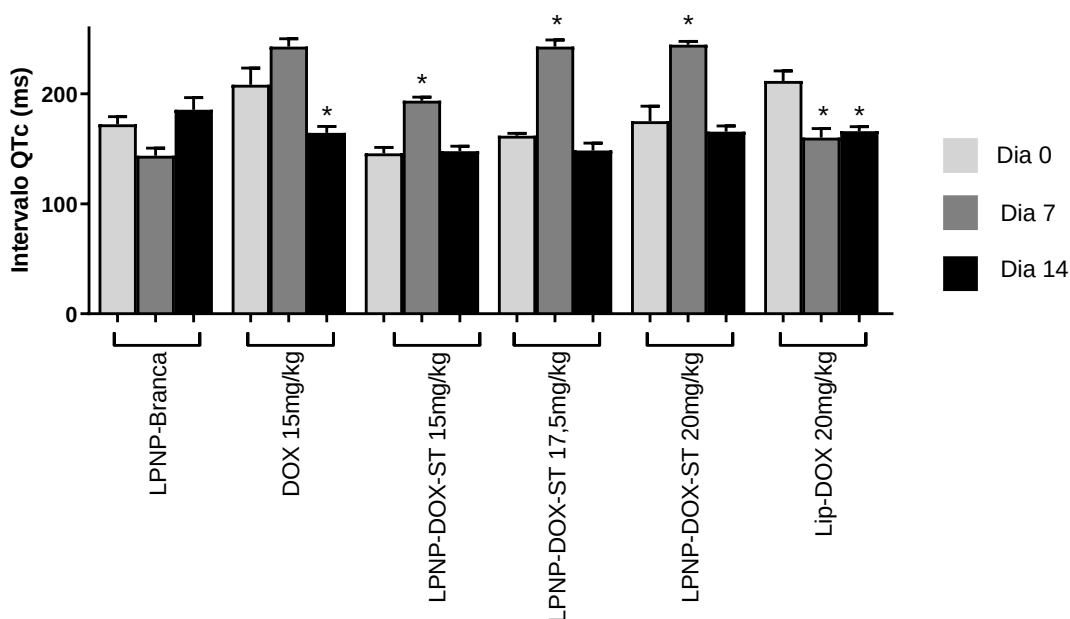
da doxorubicina. O mesmo comportamento foi identificado no intervalo QTc, corroborando com os resultados encontrados por Guangsong, Youngwu e colaboradores, em estudos com tratamentos envolvendo a doxorubicina. Ao comparar o prolongamento do intervalo QT entre DOX e LPNP-DOX-ST, ambos na mesma concentração (15 mg/kg), observa-se de forma evidente que o prolongamento foi mais pronunciado no grupo tratado com DOX. Esse resultado destaca uma vantagem significativa do LPNP-DOX-ST, sugerindo que o encapsulamento da doxorubicina em nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas pode reduzir os efeitos cardiotoxicos normalmente associados ao tratamento com a doxorubicina livre.

Figura 24: Intervalo QT (ms) de camundongos BALB/c fêmeas tratados com Salina, DOX, LPNP-Branca, LPNP-DOX-ST e Lip-DOX em determinadas concentrações.



Legenda: DOX= doxorubicina livre em solução. LPNP-Branca= nanopartícula híbrida lipídica polimérica sem os ativos doxorubicina e α -succinato de tocoferila. LPNP-DOX-ST= nanopartícula híbrida lipídica polimérica contendo doxorubicina e α -succinato de tocoferila. Lip-DOX= lipossoma contendo doxorubicina. Os números revelam a concentração das doses administradas em mg/kg. Os dados foram analisados pelo teste de variância ANOVA e os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$).

Figura 25: Intervalo QTc (ms) de camundongos BALB/c fêmeas tratados com Salina, DOX, LPNP-Branca, LPNP-DOX-ST e Lip-DOX em determinadas concentrações.



Legenda: DOX= doxorubicina livre em solução. LNP-Branca= nanopartícula híbrida lipídica polimérica sem os ativos doxorubicina e α -succinato de tocoferila. LNP-DOX-ST= nanopartícula híbrida lipídica polimérica contendo doxorubicina e α -succinato de tocoferila. Lip-DOX= lipossoma contendo doxorubicina. Os números revelam a concentração das doses administradas em mg/kg. Os dados foram analisados pelo teste de variância ANOVA e os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$).

6 Conclusão

Diante do exposto, podemos concluir que as nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas contendo doxorubicina e α -succinato de tocoferila contemplam de uma boa caracterização físico-química. Os parâmetros como diâmetros médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação estão adequados para uso em estudos com animais. A liofilização do sistema contribuiu para uma extensão significativa no prazo de estabilidade de armazenamento, facilitando o manuseio e a conservação do nanossistema. Os dados referentes ao estudo de hemólise mostraram que a formulação é segura para administração endovenosa, evidenciando a biocompatibilidade do sistema com o organismo. Em termos de toxicidade aguda, os resultados indicaram que o encapsulamento da doxorubicina em nanopartículas híbridas reduziram significativamente os efeitos tóxicos associados ao fármaco. Embora haja alteração de alguns parâmetros bioquímicos, a análise histológica revelou que as lesões são menos intensas e apresentaram sinais de possível reversibilidade. Especificamente, as alterações histológicas observadas nas

nanopartículas híbridas (LPNP-DOX-ST) foram menos graves quando comparadas àquelas associadas à doxorrubicina em solução. A análise eletrocardiográfica apresentou redução dos efeitos cardiotoxicos normalmente associados ao tratamento com a doxorrubicina livre. Isso sugere que o uso de nanopartículas híbridas pode oferecer uma abordagem mais segura e eficaz, reduzindo os efeitos adversos do tratamento. Esses resultados são promissores e indicam a viabilidade de continuar com os estudos das nanopartículas híbridas para explorar ainda mais seu potencial terapêutico e segurança.

7 PERSPECTIVAS

- Contagem de reticulócitos.
- Estudo in vitro de células resistentes a doxorrubicina, tratadas com LPNP-DOX-ST.

8 REFERÊNCIAS

Aswathanarayan, J. B.; Vittal, R. R. Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 3:95, 13 nov. 2019.

A.L. Klivanov, K. Maruyama, V.P. Torchilin, L. Huang Os polietilenoglicóis anfipáticos prolongam efetivamente o tempo de circulação dos lipossomas *FEBS Lett.*, 268 (1990), pp. 235-237.

Abdelwahed W., Degobert G., Stainmesse S., Fessi H. Liofilização de nanopartículas: considerações sobre formulação, processo e armazenamento. *Adv. Droga Deliv. Rev.* 2006; 58: 1688-1713. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.017.

Abraham, S. A. et al. *Methods in Enzymology*. In: *The Liposomal Formulation of Doxorubicin*. [s.l.] Elsevier Inc, 2005. p. 71–97.

Akhila JS, Shyamjith D, Alwar M. Estudos de toxicidade aguda e determinação da dose letal mediana. *Curr Sci Índia*. 2007; 2007: 917–20.

A. Albini, G. Pennesi, F. Donatelli, et al. Cardiotoxicity of anticancer drugs: The need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention *J Natl Cancer Inst*, 102 (2010), pp. 14-25.

Al-Habori M, Al-Aghbari A, Al-Mamary M, Baker M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *J Ethnopharmacol*. 2002;83(3):209-17.

Almeida, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quimica Nova*. v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

Angulo-molina, A.; Reyes-leyva, J.; Lopez-malo, A.; Hernandez, J. The Role of Alpha Tocopheryl Succinate (α -TOS) as a Potential Anticancer Agent. *Nutrition and Cancer*. v. 66, p. 167–176, 2013.

Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., Spalla, C., 1969. Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* 11 (6), 1101–1110. <https://doi.org/10.1002/bit.260110607>.

Aso Y, Yoshioka S. Efeito da taxa de congelamento na estabilidade física de lipossomas catiônicos liofilizados. *Chem Pharm Bull.* 2005; 53(3):301–304.

Barros, M. das N. D. da S., Silva, M. C. A. da ., Oliveira Neto, N. R. de ., Escarião, A. G., & Albuquerque, A. L. T. DE .. (2016). Nova Metodologia de Ensino do ECG: Desmistificando a Teoria na Prática – Ensino Prático do ECG. *Revista Brasileira De Educação Médica*, 40(4), 751–756. <https://doi.org/10.1590/1981-52712015v40n4e01292015>.

Batista, C. M.; Carvalho, C. M. B. DE; Magalhães, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p. 167–179, 2007.

Bender EA, Adorne MD, Colomé LM, Abdalla DSP, Guterres SS, Pohlmann AR. Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *Int. J. Pharm.*, 426, 271–279, 2012.

Bibb, M.J., 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* 8 (2), 208–215. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2005.02.016>.

Boratto, F. A.; Barros, A. L. B.; Lopes, S. C. A.; Leite, E. A.; Cassali, G. D.; Ferreira, D.S.; De Oliveira, M.C.. investigation of the antitumor activity of long-circulating and phsensitive liposomes containing doxorubicin in experimental animal model. In: III Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2016, Porto Alegre. III Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2016.

Bose RJ, Ravikumar R, Karuppagounder V, Bennet D, Rangasamy S, Thandavarayan RA. Entrega terapêutica mediada por nanopartículas híbridas lipídicas-poliméricas: avanços e desafios. *Descoberta de drogas hoje*. 2017.

Bray, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394–424, Nov. 2018.

Brockmann, H., 1963. [Anthracyclinones and anthracyclines. (Rhodomycinone, pyrromycinone and their glycosides)]. *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe* = Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. *Progres Dans La Chimie Des Substances Organiques Naturelles* 21, 121–182. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-7149-3_4.

Bush, B. M; Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais. 1 ed. São Paulo: Roca, 2004.

Butowska K, Woziwodzka A, Borowik A, Piosik J. Nanocarreadores poliméricos: uma transformação nas terapias com doxorrubicina. *Materiais (Basileia)*. 22 de abril de 2021; 14(9):2135.

C.C., Y.M. Subeq, R.P. Lee Taxa de infusão lenta de doxorrubicina induz maior produção de citocinas pró-inflamatórias Regul. Toxicol. Farmacol.

CA A Cancer J Clinicians, Volume: 71, Issue: 3, Pages: 209-249, First published: 04 February 2021, DOI: (10.3322/caac.21660).

Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Instabilidade Genética e Seleção Darwiniana em Tumores. *Tendências em Biologia Celular*. 1999; 9:M57–M60.

Caracciolo G. Nanomedicamentos lipossomais clinicamente aprovados: lições aprendidas com a coroa biomolecular. *Nanoescala*. 2018; 10:4167–4172.

Cardinale D, Sandri MT, Martinoni A, Borghini E, Civelli M, Lamantia G, et al. Myocardial injury revealed by plasma troponin I in breast cancer treated with high-dose chemotherapy. *Ann Oncol*. 2002;13(5):710-5.

Carmeliet, P.; Jain, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. v. 407, p. 246-257, 2000.

Carmo, E. H.; Barreto, M. L.; Silva Júnior, J. B. Mudanças nos padrões de morbimortalidade da população brasileira: os desafios para um novo século. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, DF, v. 12, n. 2, p. 63-75, abr./jun. 2003.

Carpinteiro JF, Chang BS, Garzon-Rodriguez W, Randolph TW. Projeto racional de formulações proteicas estáveis. *Pharm Biotechnol*. 2002; 13:109–133.

Chabner, B. N. et al. Antineoplásicos. In: HARDMAN, J. G. & LIMBIRD, L. E. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10. Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. p. 1041.

Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Cardiomiopatia por doxorrubicina. *Cardiologia* 115: 155–162, 2010.

Chen C, Han D, Cai C, Tang X. Uma visão geral da liofilização de lipossomas e seu potencial futuro. *J Liberação de controle*. 2010; 142(3):299–311.

Cheng, Z., Li, M., Dey, R. et al. Nanomateriais para terapia do câncer: progresso atual e perspectivas. *J Hematol Oncol* 14, 85 (2021).

Costa, J. P.; Lourenço, N. V.; Santos, C. C. M. P; Tomé, A. R.; Sousa, G. F.; Sousa, D. P.; Almeida, R. N.; Freitas, R. M. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, São Paulo, v. 3, n. 33, p.421-428, maio 2012.

Creton S, Dewhurst IC, Earl LK, et al. Testes de toxicidade aguda de produtos químicos - oportunidades para evitar testes redundantes e usar abordagens alternativas. *Crit Rev Toxicol*. 2010.

Cuomo A, Rodolico A, Galdieri A, Russo M, Campi G, Franco R, et al. Heart Failure and Cancer: Mechanisms of Old and New Cardiotoxic Drugs in Cancer Patients. *Card*

Fail Rev. 2019 May 24;5(2):112–8. [PMC free article] [PubMed]Cuomo A, Rodolico A, Galdieri A, Russo M, Campi G, Franco R, et al. Heart Failure and Cancer: Mechanisms of Old and New Cardiotoxic Drugs in Cancer Patients. *Card Fail Rev.* 2019 May 24;5(2):112–118.

Dash, B. C. et al. The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. *Biomaterials*, v. 31, n. 32, p. 8188-8197, 2010.

Data PV, Samad A, Devarajan PV. Descongelamento: uma abordagem simples para previsão de crioprotetor ideal para liofilização. *AAPS Pharm-SciTech.* 2010; 11(1):304–313.

Date, T.; Nimbalkar, V.; Kamat, J.; Mittal, A.; Mahato, R.I.; chitkara, d. Lipid-polymer hybrid nanocarriers for delivering cancer therapeutics. *Journal of Controlled Release.* v. 217, p. 60-73, 2018.

Del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. Estudio de estabilidad de curto e longo prazo de nanopartículas lipídicas sólidas liofilizadas para terapia gênica. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 71(2):181–189.

Deng Y, Li F, He P, Yang Y, Yang J, Zhang Y, et al. Triptolide sensitizes breast cancer cells to Doxorubicin through the DNA damage response inhibition. *Mol Carcinog.* 2018 Jun 1;57(6):807–14.

Dobrovolskaia, M. A. et al. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, n. 4, p. 487-495, 2008.

Duarte, P. R. A. (2017). Efeitos da leucina no estresse oxidativo hepático e renal em ratos tratados com doxorubicina. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/21055>. Acesso em: 29 de abr. 2024.

E. Cenni, D. Granchi, S. Avnet, C. Fotia, M. Salerno, D. Micieli, M.G. Sarpietro, R. Pignatello, F. Castelli, N. Baldini Biocompatibilidade de nanopartículas de poli(d,l-lactídeo-co-glicolídeo) conjugadas com alendronato *Biomateriais*, 29 (2008), pp. 1400-1411.

Efaie, M. M. M. et al. Possible Protective Effect of Diacerein on DoxorubicinInduced Nephrotoxicity in Rats. *Journal of Toxicology.* v. 2016, pp. 9, 2016.

Elias TC, Mendes LC, Soares MBO, Haas VJ, Silva SR. Influência de variáveis clínicas na capacidade funcional de mulheres em tratamento quimioterápico. *Esc Anna Nery Rev Enferm.* 2015;19(4):571-7. doi: 10.5935/1414-8145.20150076.

Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7(10):564-75.

Fernandes, R. S. et al. Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification. *Nuclear Medicine Communications.* v. 37, n. 37, p. 307-312, 2016.

Fernandes RS, Arribada RG, Silva JO, Silva-Cunha A, Townsend DM, Ferreira LAM, Barros ALB. Efeito in vitro e in vivo de nanopartículas híbridas à base de PLGA-TPGS sensíveis ao pH carregadas com doxorubicina para terapia do câncer de mama. *Farmacêutica*. 6 de novembro de 2022; 14(11):2394.

Fisher B, Anderson S, Redmond CK, et al. Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1995; 333:1456-61.

Fisher B, Brown AM, Dimitrov NV, Poisson R, Redmond C, Margolese RG, et al. Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. *J Clin Oncol*. 1990;8(9):1483-96.

F. Mazzini, T. Netscher, P. Salvadori *Eur. J. Org. Chem.* (2009), pág. 2063.

Fonte P, Araújo F, Seabra V, Reis S, Van De Weert M, Sarmiento B. A co-encapsulação de lioprotetores melhora a estabilidade de nanopartículas de PLGA carregadas com proteínas após liofilização. *Int J Pharm*. 2015; 496(2):850–862.

Franca, Larissa Chaves Costa. Lipossomas Sítio-específicos Contendo β -lapachona Como Estratégia Para a Terapia Do Câncer. 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/25255>. Acesso em: 31 de mar. 2024.

Freitas, C. F. de, Batistela, V. R., Caetano, W., & Hioka, N. (2020). LONG-CIRCULATING LIPOSOMES AS A PROMISING STRATEGY FOR THE TRANSPORT AND BIOAVAILABILITY OF DRUGS IN CANCER TREATMENT. *Uningá Review*, 35, eRUR3400. Retrieved from <https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/3400>.

Frézard, F., Schettini, D. A., Rocha, O. G. F., & Demicheli, C.. (2005). Lipossomas: propriedades físicoquímicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*, 28(3), 511–518.

Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights sobre classificações moleculares do câncer de mama triplo-negativo: melhorando a seleção de pacientes para tratamento. *Câncer Discov*. 2019; 9(2):176–198. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-1177.

Gobbi, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012 • *J Bras Patol Med Lab* • v. 48 • n. 6 • p. 463-474 • dezembro 2012.

Gozzano Joa, Gozzano MLC. Hepatotoxicidade devido ao uso de metformina. *Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba* [Internet]. 2º de dezembro de 2019 [citado 5º de março de 2024];21(Supl.). Disponível em: <https://revistas.pucsp.br/index.php/RFCMS/article/view/46259>.

GRUBER, J.; STANIEK, K.; KREWENKA, C.; MOLDZIO, R.; PATEL, A.; et al. Tocopheramine succinate and tocopheryl succinate: Mechanism of mitochondrial

inhibition and superoxide radical production. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 22, p. 684–691, 2014.

Guangzhong Liu, Yongwu Liu, Renjun Wang, Tingting Hou, Chaoyi Chen, Sijia Zheng, Dong de Zengxiang. Primeira publicação: 20 de abril de 2016. <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12189>.

Henry NL, Shah PD, Haider I, Freer PE, Jagsi R, Sabel MS. Chapter 88: Cancer of the Breast. In: Niederhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, Kastan MB, Tepper JE, eds. *Abeloff's Clinical Oncology*. 6th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier; 2020.

H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori Permeabilidade vascular tumoral e o efeito EPR na terapêutica macromolecular: uma revisão *J. Controle. Lançamento*, 65 (2000), pp. 271-284.

Jagsi R, King TA, Lehman C, Morrow M, Harris JR, Burstein HJ. Chapter 79: Malignant Tumors of the Breast. In: DeVita VT, Lawrence TS, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 11th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2019.

Hassett K.J., Higgins J., Woods A., Levy B., Xia Y., Hsiao C.J., Acosta E., Almarsson O., Moore M.J., Brito L.A. Impacto do tamanho da nanopartícula lipídica na imunogenicidade da vacina de mRNA. *J. Controle. Soltar*. 2021; 335:237–246.

Hinrichs WLJ, Mancenido FA, Sanders NN, et al. A escolha de um oligossacarídeo adequado para evitar a agregação de nanopartículas PEGuladas durante o congelamento, descongelamento e liofilização. *Int J Pharm*. 2006; 311(1–2):237–244.

Hu, C.-M. J.; Aryal, S.; Zhang, L. Nanoparticle-assisted combination therapies for effective cancer treatment. *Therapeutic Delivery*, v. 1, n. 2, p. 323–334, ago. 2010.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Estimativa 2020: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2022: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva, 2022.

J Hematol Oncol. 2022; 15: 121. Publicado online 2022 Aug 29. DOI: 10.1186/s13045-022-01341-0.

J. Oliveira, T.; Weber, N.; Oliveira, C.; Weber Irmão J. *Câncer*, 84 (2001), p. 87.

J.O. Silva, R.S. Fernandes, S.C. Lopes, V.N. Oliveira, E.A. Leite, G.D. Cassali, M.C. Marzola, D. Rubello, M.C. De Oliveira, A.L.B. Barros Lipossomas sensíveis ao pH e de longa circulação como uma ferramenta alternativa para administrar doxorrubicina em tumores: um estudo de viabilidade em animais *Mol. Imagem Biol.*, 18 (2016), pp. 898-904.

Jain RA. As técnicas de fabricação de vários dispositivos de poli (lactídeo-co-glicolídeo) biodegradáveis carregados com drogas (PLGA). *Biomateriais*. 2000; 21:2475–2490.

Jain, V. et al. Paclitaxel loaded PEGylated glyceryl monooleate based nanoparticulate carriers in chemotherapy. *Biomaterials*, v. 33, n. 29, p. 7206-7220, 2012.

K. Hadinoto, et al. Nanopartículas híbridas lipídico-poliméricas como plataforma de entrega terapêutica de nova geração: uma revisão *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 85 (2013), pp. 427-443

K.S. Ribeiro, G.; Oliveira, K.; Krishnan, B.B. Aparecida J. *Biol. Chem.*, 282 (2007), p. 809.

Kasper JC, Inverno G, Friess W. Avanços recentes e outros desafios na liofilização. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013; 85(2):162–169.

Ladislau, Taciane. Estudo in vitro da eficácia antineoplásica de metformina e de everolimus em monoterapia e terapia combinada com antineoplásicos convencionais no tratamento do câncer de ovário. Disponível em: <http://repositorio.ufes.br/handle/10/4476>. Acesso em: 24 de maio 2022.

Lehmann B, Bauer J, Chen X, Sanders M, Chakravarthy A, Shyr Y, et al. *J Clin Investig*. 2011; 121(7):2750–2767. DOI: 10.1172/JCI45014.

Li Y, Zhang H, Merkhher Y, Chen L, Liu N, Leonov S, Chen Y. Avanços recentes nas estratégias terapêuticas para o câncer de mama triplo-negativo. *J Hematol Oncol*. 29 de agosto de 2022; 15(1):121.

Li Y., Wang J., Wientjes M.G. Entrega de nanomedicamentos aos compartimentos extracelulares e intracelulares de um tumor sólido. *Adv Drug Deliv. Rev*. 2012; *Isaías* 64:29–39.

LIU, G. et al. Spironolactone Attenuates Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Rats. *Cardiovascular Therapy*. v. 34, n. 4, p. 216-224, 2016.

LIU, C. et al. Preliminary evaluation of acute toxicity of 188Re–BMEDA–liposome in rats. *Journal of Applied Toxicology*. v. 30, p. 680-687, 2010. 34

LIU, S. et al. Single dose acute toxicity testing for N,N-bis(2-mercaptoethyl)-N0,N0 diethylethylenediamine in beagles. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. v. 69, p. 217–225, 2014.

Liu Y, Liu J, Liang J, et al. Transferência mucosa de nanopartículas híbridas de lipídio-polímero modificadas com aglutinina de gérmen de trigo para administração oral de oridonina. *Nanomed*. 2017.

M.S. Oliveira, S.V. Mussi, D.A. Gomes, M.I. Yoshida, F. Frezard, V.M. Carregal, L.A.M. Ferreira. O succinato de α -tocoferol melhora o encapsulamento e a atividade anticancerígena da doxorubicina carregada em nanopartículas lipídicas sólidas *Colóides surfam. B Biointerfaces*, 140 (2016), pp. 246-253

Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*, v. 65, p. 271-284, 2000.

Maitani Y, Aso Y, Yamada A, Yoshioka S. Efeito dos açúcares na estabilidade de armazenamento de complexos lipossomas / DNA liofilizados com alta eficiência de transfecção. *Int J Pharm*. 2008; 356(1–2):69–75.

Mamot, C.; Drummond, D.C.; Hong, K.; Kirpotin, D.B.; Park, J.W. Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. *Drug Resistance Update*, v. 6, p. 271- 279, 2003.

McCall RL, Sirianni RW. Nanopartículas de PLGA formadas por emulsão simples ou dupla com vitamina E-TPGS. *J Vis Exp*. 2013 27 de dezembro; (82):51015.

McGowan J V, Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, Yellon DM. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2017 Feb 9;31(1):63–75.

Mehnert, W., Mader, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, p. 165-196, 2001.

Miller O, Gonçalves RR. Laboratório para o clínico. 8. ed. São Paulo: Editora Arheneu; 1999. 607 p.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004 Jun;56(2):185–229.

Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. O Receptor HER2 no Câncer de Mama: Fisiopatologia, Uso Clínico e Novos Avanços na Terapia. *Chemother Res Pract*. 2012;2012:743193. DOI: 10.1155/2012/743193.

Mokni, M., Hamlaoui-Guesmi, S., Amri, M. et al. Extrato de semente e casca de uva protege contra toxicidade aguda de quimioterapia induzida por doxorrubicina no coração de ratos. *Cardiovasc Toxicol* 12, 158–165 (2012). <https://doi.org/10.1007/s12012-012-9155-1>.

Mordente A., Meucci E., Silvestrini A., Martorana G.E., Giardina B. Antraciclinas e mitocôndrias. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 942:385–419.

Motta, V. T. Bioquímica Clínica para o Laboratório-Princípios e Interpretações. 5ª ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2009. Moura, L.; Viegas, Ângela.; Nasciutti, P. R.; Carvalho, R.;

Moura, V. M.. CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA: PATOGENIA, DIAGNÓSTICO E TERAPIAS ANTIOXIDANTES. *ENCICLOPEDIA BIOSFERA*, [S. I.], v. 11, n. 22, 2015. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/1497>. Acesso em: 1 abr. 2024.

Mukherjee, A.; Waters, A.K.; Kalyan, P.; Achrol, A.S.; Kesari, S.; Yenugonda, V.M. Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: state

of the art, emerging technologies, and perspectives. *International Journal of Nanomedicine*. v. 14, p.1937-1952, 2019.

Müller, R.H., Aäder, K., Gohla, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, p. 161-177, 2000.

Murtagh, G. et al. Late cardiac effects of chemotherapy in breast cancer survivors treated with adjuvant doxorubicin: 10-year follow-up. *Breast Cancer Research and Treatment*. v. 156, n. 3, p. 501-506, 2016.

N. Nafee, M. Schneider, U.F. Schaefer, C.M. Lehr Relevância da estabilidade coloidal de nanopartículas de quitosana/PLGA em seu perfil de citotoxicidade *Int. J. Pharm.*, 381 (2009), pp. 130-139.

Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB, Kaplowitz N. Alanina aminotransferase sérica em doenças do músculo esquelético. *Hepatologia*. 2005; 41(2):380–382.

Nicolau, J. C., Polanczyk, C. A., Pinho, J. A., Bacellar, M. S. de C., Ribeiro, D. G. L., Darwich, R. N., Ribeiro, A. L. P., Dunda, M. M. E., Germiniani, H., França, F. F., Saraiva, L., Ribeiro, C. M. R., Ginefra, P., Gus, I., Fernandes, E., Riera, A., Pedrosa, A., Friedman, A. A., Firmiani, A. C., ... Nishioka, S.. (2003). Diretriz de interpretação de eletrocardiograma de repouso. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, 80, 1–18. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2003000800001>

O'brien, M.E.; Wigler, N.; Inbar, M.; Rosso, R.; Grischke, E.; Santoro, A.; et al. Breast Cancer Study Group. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/ Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, v. 15, p. 440-449, 2004.

OECD - organisation for economic co-operation and development. OECD guideline for testing of chemicals: acute oral toxicity – acute toxic class method. 2001. Disponível em: < http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf>. Acesso em: 10/06/2016.

Oliveira Silva J, Fernandes RS, de Alcântara Lemos J, Cassali GD, de Paula Sabino A, Townsend DM, Oliveira MC, de Barros ALB. Avaliação da toxicidade aguda e da atividade antitumoral in vitro de um novo lipossomo sensível ao pH revestido com folato carregado de doxorubicina. *Farmacoterapia Biomédica*. Setembro de 2023;165:115280. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115280. Epub 2023 2 de agosto. PMID: 37541172; PMCID: PMC10720880.

P. Anand, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes *Pharmaceutical Research-Dordr*, 25 (2008), pp. 2097-2116.

Pang B, Qiao X, Janssen L, Velds A, Groothuis T, Kerkhoven R, et al. Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin. *Nat Commun*. 2013 Jan;4:1908. doi:<https://doi.org/10.1038/ncomms2921>.

Pareja F, Geyer FC, Marchio C, Burke KA, Weigelt B, Reis-Filho JS. 2016. Câncer de mama triplo-negativo: a importância da subtipagem molecular e histológica e o reconhecimento de variantes de baixo grau. *NPJ Câncer de Mama* 2:16036. E.

Raschi, V. Vasina, M.G. Ursino, et al. Anticancer drugs and cardiotoxicity: Insights and perspectives in the era of targeted therapy *Pharmacol Ther*, 125 (2010), pp. 196-218.

Razavi-azarkhiavi, K. et al. The Comparison of Biodistribution, Efficacy and Toxicity of Two PEGylated Liposomal Doxorubicin Formulations in Mice Bearing C-26 Colon Carcinoma: a Preclinical Study. *Drug Research*. v. 66, n. 6, p. 330-336, 2016.

S.K. Hobbs, W.L. Monsky, F. Yuan, W.G. Roberts, L. Griffith, V.P. Torchilin, R.K. Junior Regulação das vias de transporte em vasos tumorais: papel do tipo tumoral e do microambiente *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 95 (1998), pp. 4607-4612.

Sallman DA, Cluzeau T, Basiorka AA, et al. Desvendando a patogênese da SMD: o inflamassoma NLRP3 e a piroptose impulsionam o fenótipo da SMD. *Frente Oncol* 2016; 6:151.

Schwartz GF, Solin LJ, Olivotto IA, et al. The consensus conference on the treatment of in situ ductal carcinoma of the breast. *Breast J* 2000; 6:4-13.

Sharon A, Center DMV. Avaliação fitoquímica da função hepática no cão e gato. In: *Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais*. 1995. p. 1166-83.

Sheppard, A. J.; Pennington, J. A. T.; Weihrauch J. L. Em *Vitamin E in health and disease*; Packer, L.; Fuchs, J., eds.; Marcel Dekker: New York, 1992, cap. 1.

Silva JO, Fernandes RS, Lopes SCA, Cardoso VN, Leite EA, Cassali GD, Marzola MC, Rubello D, Oliveira MC, Barros ALB, lipossomas sensíveis ao pH e de longa circulação como uma ferramenta alternativa para administrar doxorubicina em tumores: um estudo animal de viabilidade, *Mol.* 18 (2016) 898–904, 10.1007/s11307-016-0964-7.

Silva JO, Miranda SEM, Leite EA, Sabino AP, Borges KBG, Cardoso VN, Cassali GD, Guimarães AG, Oliveira MC, Barros ALB, Estudo toxicológico de um novo lipossoma sensível ao pH carregado com doxorubicina: uma abordagem pré-clínica, *Toxicol.* 352 (2018) 162–169, 10.1016/j.taap.2018.05.037.

Sindhvani S., Syed A.M., Ngai J., Kingston B.R., Maiorino L., Rothschild J., MacMillan P., Zhang Y., Rajesh N.U., Hoang T., et al. A entrada de nanopartículas em tumores sólidos. *Nat. Mater.* 2020.

STORM, G. et al. A comparative study on the antitumor effect, cardiotoxicity and nephrotoxicity of doxorubicin given as a bolus, continuous infusion or entrapped in liposomes in the Lou/M Wsl rat. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. v. 24, p. 341-348, 1989

Stubbs, M.; MC Sheehy, P. M. J.; Griffiths, R. Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. *Adv. Enzyme Regul.* 1999, 39, 13-30.

SU, Z. et al. Protective effects of madecassoside against Doxorubicin induced nephrotoxicity in vivo and in vitro. *Scientific Reports*. v. 14, n. 5, p. 1-14, 2015.

Subik K, Lee JF, Baxter L, et al. Os padrões de expressão de ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 e AR por análise imuno-histoquímica em linhagens celulares de câncer de mama. *Câncer de mama (Auckl)* 2010;4:35-4.

Tadros, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 108–109, p. 303–318, maio 2004.

Thrall, M. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária* 1 ed. Roca: São Paulo, p. 335-354, 2007. Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2017.168>.

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

Trenkenschuh E., Friess W. Liofilização de nanopartículas: como superar a instabilidade coloidal por formulação e otimização de processos. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2021; 165:345–360. DOI: 10.1016/j.ejpb.2021.05.024.

Um. Gabizon, H. Shmeeda, Y. Barenholz Farmacocinética da doxorubicina lipossomal peguilada: revisão de estudos em animais e humanos *Clin. Farmacocinética.*, 42 (2003), pp. 419-436.

Vassileva, V. et al. Novel biocompatible intraperitoneal drug delivery system increases tolerability and therapeutic efficacy of paclitaxel in a human ovarian cancer xenograft model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. v. 60, p. 907-914, 2007.

Vejpongsa, P. & Yeh, E. T. H. Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Challenges and Opportunities, *Journal of the American College of Cardiology*. v. 64, n. 9, 2014.

V.P. Torchilin, V.S. Trubetskoy Quais polímeros podem fazer com que os transportadores de medicamentos nanoparticulados circulem por muito tempo? *Adv. Droga Deliv. Rev.*, 16 (1995), pp. 141-155.

Vallejos CS, Gómez HL, CruzWR, Pinto JA, Dyer RR, Velarde R, et al. Classificação do câncer de mama de acordo com marcadores imuno-histoquímicos: subtipos e associação com variáveis clínico-patológicas em um banco de dados de um hospital peruano. *Clin Câncer de Mama*. 2010;10(04):294-300. Doi: 10.3816/CBC.2010.n.038.

Vieira, Débora Braga; Gamarra, Lionel Fernel. Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. *einstein (São Paulo)*, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 99-103, mar. 2016. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082016RB3475>

W. Abdelwahed, G. Degobert, H. Fessi Investigação da estabilização de nanocápsulas por excipientes amorfos durante liofilização e armazenamento *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 63 (2006), pp. 87-94.

Weber T, Lu M, Andera L, Lahm H, Gellert N, Fariss MW, Korinek V, Sattler W, Ucker DS, Terman A, Schroder A, Erl W, Brunk UT, et al. Vitamin E succinate is a potent novel antineoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) in vivo. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:863–9.

Who. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fact sheets Cancer. Disponível em: . Acesso em: 11 jul. 2021a.

Wojtacki, J.; LEWICKA-NOWAK, E. & LESNIEWSKI-KMAK, K. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention - review of the literature. *Medical Science Monitor*. v. 6, n. 2, p. 411-420, 2000.

Wooster, T. J.; GOLDING, M.; SANGUANSRI, P. Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability. *Langmuir*, v. 24, n. 22, p. 12758–12765, 18 nov. 2008.

World health organization. Early detection. Geneva: WHO, 2007. (Cancer control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes, module 3). (WHO, 2007; INCA, 2015).

Yechezkel (Chezy) Barenholz, Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *Journal of Controlled Release*, Volume 160, Issue 2, 2012, Pages 117-134, ISSN 0168-3659, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.

Yuan, F.; Dellian, M.; Fukumura, D.; Leunig, M.; Berk, D.A.; Torchilin, V. P.; Jain, R. Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size. *Cancer Research*. v. 55, p. 3752-3756, 1995.

Zhang, C. et al. Quantification of DOX bioavailability in biological samples of mice by sensitive and precise HPLC assay. *Pharmaceutical Biology*. v. 54, n. 1, p. 55- 61, 2015.