UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

GISELE LELES MAIA

OBTENÇÃO DE MICELAS POLIMÉRICAS MISTAS CARREADORAS DE PACLITAXEL

Belo Horizonte
2022

GISELE LELES MAIA

OBTENÇÃO DE MICELAS POLIMÉRICAS MISTAS CARREADORAS DE PACLITAXEL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Amaral Leite
Coorientador: Prof. Dr. André Luís Branco de Barros
Coorientadora: Dra. Caroline Mari Ramos Oda

Belo Horizonte
2022

Maia, Gisele Leles.
M217o Obtenção de micelas poliméricas mistas carreadoras de paclitaxel [recurso eletrônico] /Gisele Leles Maia. – 2022.
1 recurso eletrônico (106 f. : il.) : pdf

Orientadora: Elaine Amaral Leite.
Coorientador: André Luís Branco de Barros.
Coorientadora: Caroline Mari Ramos Oda.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Micelas poliméricas – Teses. 2. Paclitaxel – Teses. 3. Câncer – Teses. 4. Medicamentos – Teses. I. Leite, Elaine Amaral. II. Barros, André Luís Branco de. III. Oda, Caroline Mari Ramos. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 615.4

Elaborado por Aline Guimarães Amorim – CRB-6/2292

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

"OBTENÇÃO DE MICELAS POLIMÉRICAS MISTAS CARREADORAS DE PACLITAXEL" **GISELE LELES MAIA**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Prof. Dr. Daniel Crístian Ferreira Soares

Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI

Profa. Dra. Marta Marques Gontijo de Aguiar

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Elaine Amaral Leite - Orientadora

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. André Luís Branco de Barros - Coorientador

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Dra. Caroline Mari Ramos Oda - Coorientadora

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 08 de novembro de 2022.

Documento assinado eletronicamente por **Elaine Amaral Leite**, **Professora do Magistério Superior**, em 08/11/2022, às 16:36, 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 **Andre Luis Branco de Barros**, **Professor do Magistério Superior**, em 08/11/2022, às 18:00, 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 **Marta Marques Gontijo de Aguiar**, **Professora do Magistério Superior**, em 08/11/2022, às 21:56, 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 **Daniel Cristian Ferreira Soares**, **Usuário Externo**, em 10/11/2022, às 06:18, 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 **Caroline Mari Ramos Oda**, **Usuária Externa**, em 11/11/2022, às 20:47, 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 https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1841324** e o código CRC **098D20C0**.

COLABORADORES

Departamento de Produtos Farmacêuticos, UFMG

Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira

Departamento de Física, UFMG

Prof. Dr. Ângelo Malachias de Souza

Me. Maria Victória Heiderick Machado

Departamento de Química, UFMG

Profa. Dra. Maria Irene Yoshida

Dra. Maria Betânia de Freitas Marques

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Otávio e Aparecida, pelo apoio em todos os momentos, desde o princípio quando ensinaram, ainda quando criança, o valor dos estudos e da dedicação, por estimularem a leitura e por instigarem a paixão pela ciência.

À minha irmã, Grazi, por toda a motivação, amor e presença, especialmente nos momentos mais difíceis. Sou grata por me inspirar a sonhar e a alcançar meus objetivos, por me ouvir e acolher incondicionalmente.

Ao meu irmão, Gustavo, pelo suporte e sempre deposição de confiança nas minhas capacidades.

Aos meus amigos da Engenharia Química, em especial ao Moacyr, por me ouvirem e incentivarem, pelo carinho, pelas sugestões e contribuições ao meu aprendizado. Agradeço a boa companhia e todos os momentos de felicidade compartilhados.

Às minhas gestoras e líderes inspiradoras, Bárbara Vieira e Rafaela Nascimento, pelo apoio às minhas decisões, pela compreensão, por todos os ensinamentos e por terem contribuído tanto para minha trajetória profissional.

À Elaine e ao André Barros, por toda a orientação, por terem me acolhido no PPGCF mesmo eu tendo uma formação acadêmica diferente, pelo apoio nas dificuldades, por ensinar o que era novo para mim, por ouvir as minhas indagações e por esclarecer as minhas dúvidas. Agradeço, sobretudo, pela confiança em compartilhar este projeto comigo.

À Carol Oda, pela concepção da ideia deste trabalho, pelos treinamentos na bancada e pelo auxílio nas principais dúvidas. Agradeço o grande legado deixado no campo de estudo de micelas poliméricas, com suas excelentes publicações e contribuições.

Aos colegas do laboratório, Cris, Jaque, Carol Dohanik, Eliza, Luiza, Francielly, Gabriel e Thaís, pelos treinamentos, ajudas nos experimentos, paciência ao ensinar e aprazível companhia.

Ao Ângelo e à Mavi, por todo o apoio no ajuste de modelos para obtenção de resultados e análises de dados de SAXS.

À Profa. Mônica, pela parceria, pelos treinamentos e pela colaboração neste projeto.

À Betânia, pelo apoio na obtenção e interpretação dos dados de Análise Térmica, pela paciência, sugestões e compartilhamento de seu vasto conhecimento.

À esta Universidade e às instituições de fomento, por possibilitarem a execução de projetos como este e tantos outros que contribuem para o crescimento e manutenção da pesquisa científica no nosso país.

Reforço o meu muito obrigada a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, cada um, à sua maneira, teve papel fundamental para que eu chegasse até aqui.

“For me, I am driven by two main philosophies: know more today about the world than I knew yesterday and lessen the suffering of others. You'd be surprised how far that gets you.”

(Neil deGrasse Tyson)

RESUMO

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu anteriormente micelas poliméricas de diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol (DSPE-PEG_{2000}) carreadoras de PTX que apresentaram características físico-químicas e biológicas promissoras para aplicação em tratamento de câncer. A fim de dar continuidade ao estudo desses sistemas, o desenvolvimento de micelas poliméricas mistas surgiu como uma abordagem interessante para possivelmente melhorar algumas propriedades e superar limitações observadas para o sistema de micelas convencionais. O objetivo deste estudo foi obter e caracterizar, sob o aspecto físico-químico, formulações de micelas mistas contendo DSPE-PEG_{2000} e poli-Ɛ-caprolactona-polietilenoglicol (PCL_{5000}-PEG_{5000}) nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1, respectivamente, com características adequadas para carrear PTX. As formulações apresentaram diâmetro médio de 10,7 ± 1,4 nm e potencial zeta médio de -4,2 ± 1,7 mV, as maiores eficiências de encapsulação foram obtidas para as formulações contendo 1,0 mg/mL de PTX (> 82%). Os resultados obtidos por SAXS sugeriram que variações na razão molar do copolímero e na concentração de PTX impactaram parâmetros da organização estrutural dos sistemas mistos como número de agregação, densidade das cadeias de PEG e tamanhos do raio do núcleo e raio da casca. Essas alterações apontaram para a obtenção de ganho na capacidade carreadora do sistema misto (máximo 1 mg/mL de PTX) com relação àquele de DSPE-PEG_{2000} (máximo 0,6 mg/mL de PTX). As técnicas de análise térmica permitiram estudar efeitos da presença do PCL_{5000}-PEG_{5000} no sistema micelar misto, para o qual foi observada diminuição da entalpia requerida para fusão e impacto nos fenômenos de decomposição. Além disso, foi observado incremento no teor de fármaco retido após sete dias em ambiente aquoso com relação ao sistema convencional, todavia, verificou-se que a inserção do copolímero não representou efeito importante de ganho de estabilidade ao longo de 60 dias. O estudo de liberação *in vitro* mostrou um perfil controlado com liberação de cerca de 60% de PTX em 48 horas em meio aquoso contendo salicilato de sódio. Não foi possível observar diferença no perfil de liberação da formulação de micelas mistas contendo 0,5% de PCL_{5000}-PEG_{5000} com relação à formulação de DSPE-PEG_{2000}, além disso, a formulação similar à comercial Taxol® apresentou o perfil de liberação mais lento. Finalmente, os resultados obtidos sugeriram o sistema micelar misto enquanto um carreador promissor para PTX, que mostrou, inclusive, melhoria em algumas características físico-químicas com relação ao sistema micelar convencional.

Palavras-chave: micelas poliméricas mistas; paclitaxel; DSPE-PEG; PCL-PEG; SAXS.

ABSTRACT

Our research group developed previously distearoylphosphatidylethanolamine-polyethyleneglycol (DSPE-PEG_{2000}) polymeric micelles carrying PTX which showed promising physicochemical and biological characteristics for aplication in cancer treatment. Aiming to continuing studying these systems, the development of mixed polymeric micelles emerged as an interesting approach to possibly improve some of its properties and overcome limitations observed for the conventional micelle formulation. The objective of this study was to obtain and characterize, under the physicochemical aspect, mixed micelle formulations containing DSPE-PEG_{2000} and poly-Ɛ-caprolactone-polyethylene glycol (PCL_{5000}-PEG_{5000}) in molar ratios of 99.5:0.5 and 99:1, respectively, with appropiate characteristics for carrying PTX. The mixed micelles exhibited a mean diameter of 10,7 ± 1,4 nm and a zeta potential of -4,2 ± 1,7 mV, the highest loading efficiencies were obtained for formulations containing 1.0 mg/mL of PTX (> 82%). The results obtained by SAXS suggested that variations in the copolymer molar ratio and PTX concentration impacted structural organization parameters such as aggregation number, density of PEG chains and sizes of core and shell radius. These alterations indicated improvement in the mixed micelle loading capacity (maximum 1 mg/mL of PTX) when compared with the DSPE-PEG_{2000} formulation (maximum 0.6 mg/mL of PTX). Thermal analysis techniques allowed to study the effect of the PCL_{5000}-PEG_{5000} presence in the mixed micellar system, a decrease in melting enthalpy value and a impact on decomposition phenomena was observed. Compared to the conventional micelle formulation, an increase in the amount of drug retained after seven days was observed in an aqueous environment, however, it was found that the copolymer insertion did not represent an important effect of stability improvement over 60 days. The *in vitro* release study showed a sustained profile with a release of about 60% PTX in 48 hours in a aqueous medium containing sodium salicylate. It was not possible to observe difference in the release profile of the mixed micelle formulation containing 0.5% PCL_{5000}-PEG_{5000} when compared to the DSPE-PEG_{2000} formulation, in addition, the formulation similar to Taxol® presented the slower release profile. Finally, these findings suggested that the mixed polymeric micelle system is a promising PTX carrier, which showed improved physicochemical characteristics when compared to the conventional micellar system.

Keywords: mixed polymeric micelles; paclitaxel; DSPE-PEG; PCL-PEG; SAXS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estágios de desenvolvimento de um tumor.....18
Figura 2 – Representação de carcinoma ductal *in situ.* 19
Figura 3 – Análise das aprovações da FDA para câncer de mama e outros cânceres no período de 1949 a 2018.....22
Figura 4 – Estrutura química do Paclitaxel. 23
Figura 5 – Cromossomos e fuso mitótico durante os estágios iniciais da mitose, quando os centríolos estão situados nos polos das células, mas os cromossomos ainda não agrupados no centro. 25
Figura 6 – Estrutura, polimerização e despolimerização dos microtúbulos. 26
Figura 7 – Estrutura química do Cremophor EL. 26
Figura 8 – Representação esquemática do efeito EPR. Os vasos sanguíneos na região tumoral são anormais apresentando grandes lacunas entre as células endoteliais que permitem a passagem de nanopartículas.....29
Figura 9 – Ilustração da heterogeneidade do efeito EPR relacionada a atividades trombogênicas. A formação de trombos resultou na supressão do fluxo sanguíneo na região do tumor.....30
Figura 10 – Ilustração representativa dos componentes de uma micela polimérica convencional em meio aquoso e sua autoassociação acima da CMC.....34
Figura 11 – Estrutura química do 1,2-diestearoil-sn-glicero-2-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietileno-glicol)-2000] ou DSPE-$PEG_{2000.}$ 37
Figura 12 – Ilustração representativa dos componentes de uma micela polimérica mista do tipo AB+CB em ambiente aquoso e sua autoassociação acima da CMC. 38
Figura 13 – Estrutura química do copolímero PCL-PEG.....39
Figura 14 – Esquema representativo de um experimento de espalhamento de raios-X. 41
Figura 15 – Etapas do processo de preparo de uma formulação de micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000}: (A) filme obtido pelo método de evaporação do solvente, (B) produto obtido após hidratação do filme com solução de NaCl 0,9% (p/v), (C) formulação obtida após processo de purificação. 52
Figura 16 – Distribuição de tamanho obtida por DLS (análise de número) para amostra de formulação de micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} na razão molar 99:1. 54
Figura 17 – Padrões de espalhamento obtidos por SAXS para micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 (A) e 99:1 (B) para diferentes concentrações de PTX. 59
Figura 18 – Variação do diâmetro e distância centro a centro para micelas poliméricas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 (A) e 99:1 (B) para diferentes concentrações de PTX. 60
Figura 19 – Variação do empacotamento (α) e densidade superficial (σ) das cadeias da casca para micelas mistas de DSPE-$PEG_{2000:}PCL_{5000\text{-}}PEG_{5000}$ nas razões molares de 99,5:0,5 (A) e 99:1 (B) para diferentes concentrações de PTX. 62
Figura 20 – Comportamento térmico dos componentes matéria-prima DSPE-PEG_{2000} (A) e PCL_{5000}-PEG_{5000} (B). 66
Figura 21 – Comportamento térmico avaliado por DSC das formulações de micelas não carregadas de DSPE-PEG_{2000} (A) e micelas mistas não carregadas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-

PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 (B) e 99:1 (C). A região em cinza destaca o pico de fusão endotérmico.....68
Figura 22 – Comportamento térmico avaliado por TGA das formulações de micelas não carregadas com PTX de DSPE-PEG_{2000} (curva preta), DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} na razão molar de 99,5:0,5 (curva vermelha) e DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} na razão molar de 99:1 (curva azul). O quadro em cinza marca a região comum de desidratação das amostras com perda de umidade e de componentes voláteis. As setas nas respectivas cores apontam o início dos eventos térmicos de decomposição das amostras. 69
Figura 23 – Diâmetro hidrodinâmico médio (análise de número) em diferentes tempos de análise para micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1. 71
Figura 24 – Concentração de PTX encapsulado e teor de encapsulação em diferentes tempos de análise para micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1. 73
Figura 25 – Precipitado branco (apontado pelas setas) no fundo do microtubo após 30 dias do preparo das formulações evidenciando a perda de fármaco do sistema de micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 (esquerda) e 99:1 (direita)..74
Figura 26 – Percentual cumulativo de PTX liberado *versus* tempo para as formulações de DSPE-PEG_{2000} (0,6 mg/mL de PTX), DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} na razão molar de 99,5:0,5 (1,0 mg/mL de PTX) e dispersão CrEL/EtOH/PTX (1 mg/mL de PTX).....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nanoformulações contendo PTX disponíveis comercialmente ou em fase de estudo clínico e informações sobre sua composição principal. 31
Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos obtidos para as formulações de micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1. 53
Tabela 3 – Capacidade carreadora de PTX e tamanho reportados para alguns sistemas micelares poliméricos. 57
Tabela 4 – Dados obtidos para os parâmetros número de agregação (Nagg), raio do núcleo (Rc) e raio da casca (Rs) para micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1 para diferentes concentrações de PTX. 64
Tabela 5 – Potencial zeta obtido por DLS associado à mobilidade eletroforética em diferentes tempos de análise para micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1. 72
Tabela 6 – Coeficientes de correlação (R^2) obtidos por regressão linear para os perfis de liberação das formulações estudadas de acordo com diferentes modelos cinéticos. 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	Sociedade Americana do Câncer, do inglês *American Cancer Society*
AUC	Área sob a curva, do inglês *Area Under the Curve*
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Concentração Micelar Crítica
CrEL	Cremophor EL
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz, do inglês *Dynamic Light Scattering*
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*
DSPE-PEG	Diestearoilfosfatidiletanolamina associada ao Polietilenoglicol
DTA	Análise Térmica Diferencial, do inglês *Differential Thermal Analysis*
EMA	Agência Europeia de Medicamentos, do inglês *European Medicines Agency*
EPR	Permeabilidade e Retenção Aumentada, do inglês *Enhanced Permeability and Retention*
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês *Food and Drug Administraion*
FRET	Transferência de Energia de Ressonância por Fluorescência, do inglês *Förster/Fluorescence Ressonance Energy Transfer*
GDP	Guanosina Difosfato, do inglês *Guanosine Diphosphate*
GTP	Guanosina Trifosfato, do inglês *Guanosine Triphosphate*
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer*
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncroton
mPEG-b-P(Asp)	metoxi-polietilenoglicol associado ao poliácido aspártico
mPEG-PDLLA	metoxi-polietilenoglicol associado ao poli(D, L-ácido lático)
MWCO	Peso Molecular de Corte, do inglês *Molecular Weight Cutoff*
Nagg	Número de agregação
NCI	Instituto Nacional do Câncer (EUA), do inglês *National Cancer Institute*
PBO	Polióxido de Butileno

PBS	Tampão Fosfato-Salino, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*
PCL-PEG	Poli-ε-Caprolactona associado ao Polietilenoglicol
PEG	Polietilenoglicol
PEG-b-PPhe	Polietilenoglicol associado a Polifenilalanina
PEG-P(Asp(Bzl)	Polietilenoglicol associado ao Poli(Ácido Aspártico) parcialmente Benzil-esterificado
PLA	Poli(Ácido Lático)
PLGA	Poli(Ácido Lático-co-Glicólico)
PTX	Paclitaxel
Rc	Raio do Núcleo, do inglês *Core Radius*
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*
Rs	Raio da Casca, do inglês *Shell Radius*
SAXS	Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo, do inglês *Small Angle X-Ray Scattering*
TGA	Análise Termogravimétrica, do inglês *Thermogravimetric Analysis*
USAXS	Espalhamento de Raios-X a Ângulo Ultra Baixo, do inglês *Ultra Small Angle X-Ray Scattering*
WAXS	Espalhamento de Raios-X a Ângulo Amplo, do inglês *Wide Angle X-Ray Scattering*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
2.1 CÂNCER 18
2.2 PACLITAXEL 23
2.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS 28
2.3.1 O EFEITO DE PERMEABILIDADE E RETENÇÃO AUMENTADA 28
2.3.2 NANOFORMULAÇÕES PARA ENTREGA DE PACLITAXEL 30
2.3.2.1 MICELAS POLIMÉRICAS 33
2.3.2.2 MICELAS POLIMÉRICAS MISTAS 37
2.4 CARACTERIZAÇÃO POR ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO 40
3 OBJETIVOS 43
3.1 OBJETIVO GERAL 43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 43
4 MATERIAL E MÉTODOS 44
4.1 PREPARO DA FORMULAÇÃO 44
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA 45
4.2.1 DIÂMETRO MÉDIO 45
4.2.2 POTENCIAL ZETA 45
4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE PTX 46
4.3 CARACTERIZAÇÃO POR ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO 47
4.4 ANÁLISE TÉRMICA 47
4.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE 48
4.6 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* 48
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA 50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 51
5.1 OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA 51
5.2 CARACTERIZAÇÃO POR ESPALHAMENTO DE RAIO-X A BAIXO ÂNGULO 59
5.3 ANÁLISE TÉRMICA 65
5.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE 70
5.5 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* 77
6 CONCLUSÃO 84
7 PERSPECTIVAS 85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo e está entre as principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade), sendo considerado uma barreira ao incremento da expectativa de vida humana. Dentre as principais causas para o aumento da sua incidência e mortalidade destacam-se o crescimento populacional bem como as mudanças na distribuição e na prevalência de fatores de risco associados (HYUNA *et al.*, 2021).

Dentre os variados tipos, o câncer de mama em mulheres é aquele com maior incidência, cerca de 2,3 milhões de novos casos segundo estimativa mundial de 2020 representando 11,7% do total de novos casos e 24,5% do total dentre os 10 tipos mais comuns de neoplasias acometidas em mulheres, podendo alcançar até 29,7% (exceto câncer de pele não melanoma) segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o Brasil no triênio 2020-2022 (HYUNA *et al.*, 2021; INCA, 2022).

Até 2040 estima-se um crescimento de 41,1% no número de novos casos de câncer de mama em mulheres no mundo, o que reforça a necessidade do desenvolvimento e aprimoramento das mais diversas abordagens para prevenção e tratamento da doença (IARC, 2020).

A escolha do tratamento do câncer de mama está geralmente relacionada à fase em que a doença é diagnosticada e pode incluir abordagens como cirurgia, radioterapia, quimioterapia e/ou hormonioterapia (INCA, 2022).

No caso da quimioterapia, devido ao seu mecanismo de ação, o Paclitaxel (PTX) é um dos fármacos mais empregados (ZHU & CHEN, 2019). Entretanto, é conhecido que a formulação mais utilizada contendo esse fármaco disponível comercialmente, o Taxol®, apresenta efeitos adversos associados como reações anafilactóides e neurotoxicidade, o que tem sido relacionado à presença do solvente Cremophor EL (GELDERBLOM *et al.*, 2001).

Com o objetivo de melhorar a segurança e eficácia desse fármaco, estudos vêm sendo conduzidos utilizando formulações nanoestruturadas contendo o PTX (KIM *et al.*, 2001; HAMAHUCHI *et al.*, 2005; PILLAI, 2014; ZHANG *et al.*, 2014; ODA *et al.*, 2020b).

Diversas nanoformulações encontram-se disponíveis no mercado ou estão em fase avançada de estudo clínico na forma de nanopartículas conjugadas, micelas poliméricas e lipossomas (BERNABEU *et al.*, 2017).

Pode-se citar como exemplo o medicamento Abraxane®, que consiste em uma nanopartícula de albumina ligada ao PTX, e que já teve o seu uso aprovado para tratamento de

câncer de mama metastático pela FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês *Food and Drug Administraion*) e pela EMA (Agência Europeia de Medicamentos, do inglês *European Medicines Agency)*. Outro exemplo é o Genexol®-PM, que consiste em micelas poliméricas de metoxi-(polietilenoglicol-poli(D, L-ácido lático) (mPEG-PDLLA) com aprovação para comercialização na Coréia do Sul, Índia, Vietnam, Filipinas e Indonésia (BERNABEU *et al.*, 2017).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um sistema de micelas poliméricas compostas por diestearoilfosfatidiletanolamina associada ao polietilenoglicol (DSPE-PEG_{2000}) carreadoras de PTX (0,6 mg/mL) e radiomarcadas com tecnécio-99m, o qual apresentou características físico-químicas e biológicas promissoras para uma plataforma teranóstica anticâncer, com um grande potencial para acumular no tecido tumoral e reduzida neuropatia periférica (ODA *et al.*, 2018; ODA *et al.*, 2020b).

A fim de viabilizar a veiculação de maior quantidade do fármaco encapsulado, bem como melhorar a estabilidade do sistema desenvolvido por Oda *et al.* (2020b), o uso de micelas poliméricas mistas surge como uma alternativa interessante. As micelas mistas têm se destacado devido à promoção do aumento da capacidade de carreamento e estabilidade de fármacos hidrofóbicos em função de um incremento da interação entre o fármaco e a parte hidrofóbica do sistema micelar (ATTIA *et al.*, 2011).

Nesse contexto, foram iniciados neste grupo alguns estudos sobre a associação entre o DSPE-PEG_{2000} e o copolímero poli-ε-caprolactona acoplado ao polietilenoglicol (PCL_{5000}-PEG_{5000}). Resultados preliminares interessantes foram sugeridos para a associação mista, que foi brevemente estudada em diferentes razões molares (SOUSA, 2017; TEIXEIRA, 2019).

No estudo de Souza (2017) foi investigada a razão molar polimérica de 90:10 para um sistema de micelas mistas contendo DSPE-$PEG_{2000:}PCL_{5000}$-PEG_{5000} e PTX, todavia foi observado um efeito relevante de precipitação do copolímero. Dessa forma, foi iniciado por Teixeira (2019) um estudo utilizando menores proporções e resultados promissores foram observados para as razões molares poliméricas de 99,5:0,5 e 99:1 de DSPE-$PEG_{2000:}PCL_{5000}$-PEG_{5000}.

Entretanto, ainda se fazem necessárias maiores investigações especialmente em termos de uma caracterização físico-química mais aprofundada que permita análises mais detalhadas acerca da organização desse novo sistema carreador. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi obter e caracterizar sob o aspecto físico-químico formulações de micelas mistas de DSPE-$PEG_{2000:}PCL_{5000}$-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1 contendo diferentes concentrações de PTX e avaliar a sua potencialidade enquanto um sistema carreador de PTX.

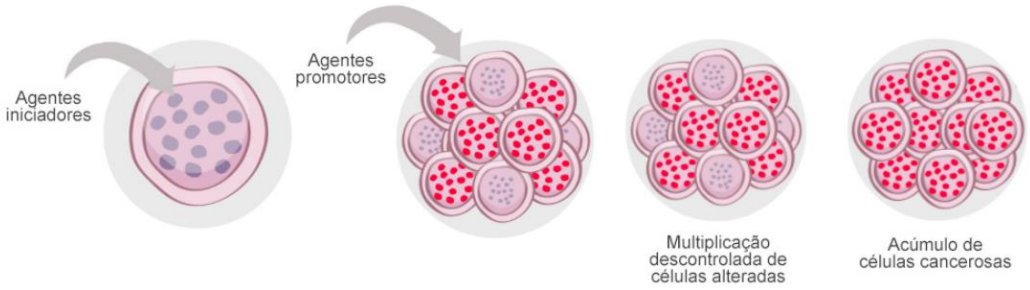
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

O câncer é um termo amplo utilizado para diferentes tipos de doenças cuja característica em comum é o crescimento desordenado de células que, devido a uma expansão rápida e descontrolada, determina a formação de tumores capazes de se espalhar pelo corpo ao invadir tecidos adjacentes ou órgãos a distância. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo que são afetadas (INCA, 2022).

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese e os principais estágios de desenvolvimento são a iniciação, a promoção e a progressão. Esse processo é ilustrado na Figura 1 a seguir.

Figura 1 – Estágios de desenvolvimento de um tumor.



Fonte: Adaptado de INCA (2022).

No estágio de iniciação as células são expostas aos agentes carcinógenos. Nessa fase, ainda não é possível identificar clinicamente a presença de um tumor, entretanto as células se encontram geneticamente alteradas e preparadas para a ação de um segundo grupo de agentes que atuará no próximo estágio. No estágio de promoção é observado o efeito dos oncopromotores sobre as células geneticamente modificadas, que são agentes cancerígenos que atuam de forma gradual gerando novas alterações e transformando essas células em células malignas. Finalmente, o estágio de progressão é caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas o que evolui para o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. Nesse ponto diz-se que o câncer já está instalado e as células possuem autonomia para proliferação, tornando-se invasivas a partir do momento em que situações de perda da coesão e obtenção de mobilidade são observadas (INCA, 2022).

Uma estimativa mundial para o ano de 2020 apontou que ocorreram no mundo 19,3 milhões de novos casos de câncer (18,1 milhões excluindo-se os casos de câncer de pele não

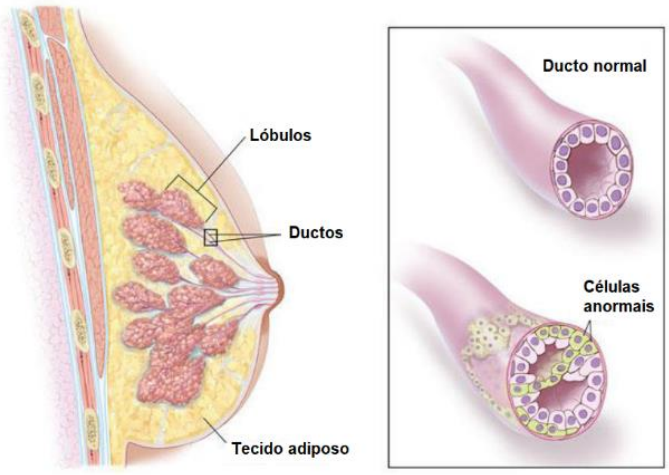
melanoma) e 10 milhões de óbitos (9,9 milhões excluindo os cânceres de pele não melanoma). O câncer de mama em mulheres é o mais incidente no mundo com 2,3 milhões de novos casos o que representa 11,7% do total de todos os casos incluindo câncer de pele não melanoma, seguido pelo câncer de pulmão com 2,2 milhões de novos casos (11,4% do total) e câncer de próstata com 1,4 milhão de novos casos (7,3% do total) (HYUNA *et al.*, 2021).

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres em todo o mundo, embora também possa acometer homens, porém os casos são mais raros, representando apenas 1% do total de casos da doença. Entre mulheres o câncer de mama é a quinta causa de mortalidade no mundo com 685 mil mortes em 2020, representando 1 em cada 4 casos de câncer e 1 em cada 6 mortes por câncer (HYUNA *et al.*, 2021). No Brasil, em uma estimativa do ano de 2020, foram contabilizados cerca de 66,2 mil novos casos de câncer de mama, representando 29,7% do total de neoplasias em mulheres exceto câncer de pele não melanoma (INCA, 2022).

Existem diferentes tipos de câncer de mama, o que geralmente está relacionado ao seu local de origem e ao grau de invasão para outros tecidos. Segundo a Sociedade Americana do Câncer (ACS, do inglês *American Cancer Society*) o carcinoma ductal, também denominado carcinoma intraductal, é um tipo de câncer que afeta as células que revestem os ductos condutores e o carcinoma lobular se refere aos casos nos quais os lóbulos ou unidades secretoras da mama são afetados pelas células cancerosas (ACS, 2022).

Quando as células cancerosas ainda não se disseminaram através das paredes dos ductos ou lóbulos para tecidos mamários adjacentes tem-se os casos de carcinoma ductal ou lobular *in situ*, uma representação do caso ductal é mostrada na Figura 2 a seguir.

Figura 2 – Representação de carcinoma ductal *in situ.*



Fonte: Adaptado de *National Cancer Institute* (2022).

Quando ocorre a invasão ou infiltração de células cancerosas para tecidos adjacentes tem-se os tipos de câncer denominados invasivos que influenciam o tipo de tratamento e prognóstico para o paciente, dentre esses se destacam os casos de câncer de mama triplo negativo e câncer de mama inflamatório. No caso do triplo negativo, as células não possuem receptores dos hormônios estrogênio e progesterona e não expressam, ou expressam em baixa quantidade, a proteína HER2 (fator de crescimento epidérmico humano) o que restringe especialmente os tratamentos de base hormonal. Esse tipo representa cerca de 15% dos casos, e tende a ser mais agressivo, com sobrevida global mais curta e alta mortalidade nos primeiros 5 anos após o diagnóstico inicial (COLLIGNON *et al.*, 2016). O câncer de mama do tipo inflamatório tem incidência menor, cerca de 1% dos casos, e nesse caso as células cancerosas invadem o sistema linfático, causando reação inflamatória intensa na área afetada (ACS, 2022).

Os altos números de mortalidade para o câncer de mama refletem a severidade da doença, que está relacionada ao alto grau de malignidade e ao surgimento de metástases desses tumores. Para o câncer de mama em mulheres, especificamente, cerca de 20 a 30% das pacientes tem a chance de desenvolver metástases em locais distantes do sítio primário do tumor e aproximadamente 90% da mortalidade está associada a complicações metastáticas (CHEN *et al.*, 2018).

A metástase pode permanecer indetectável por longos períodos, o que se caracteriza como um fator agravante do quadro do paciente. O câncer sistêmico, assim denominado quando ocorre a disseminação e subsequente crescimento de células cancerosas distantes do tumor original, ocorre em duas fases: inicialmente tem-se um estágio latente no qual acontece a disseminação oculta e posteriormente tem-se a metástase manifestada, que na maioria dos casos tem baixa chance de cura (HOSSEINI *et al.*, 2016).

O tratamento do câncer de mama depende da fase em que a doença se encontra (estadiamento) e do tipo do tumor. As abordagens utilizadas podem incluir cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica (terapia alvo), que podem ser usadas isoladamente ou em combinação (INCA, 2022).

Para o câncer de mama não metastático, especialmente nas fases iniciais de desenvolvimento da doença, os principais objetivos terapêuticos são a erradicação do tumor e a prevenção da recorrência. A terapia local para pacientes com câncer de mama não metastático consiste em ressecção cirúrgica, com consideração de radiação pós-operatória se a mastectomia for realizada (WAKS & WINER, 2019).

Para uma abordagem sistêmica, a terapia para câncer de mama não metastático é determinada por subtipo: pacientes com tumores positivos para receptores hormonais podem

receber terapia endócrina sendo que uma minoria recebe também a quimioterapia e pacientes com tumores triplo-negativos recebem apenas quimioterapia. Cada vez mais, alguma terapia sistêmica é administrada antes da cirurgia (quimioterapia neoadjuvante) e a adaptação do tratamento pós-operatório com base na resposta ao tratamento pré-operatório está sob investigação (WAKS & WINER, 2019).

Adicionalmente, o câncer de mama metastático também é tratado de acordo com o subtipo, com objetivos de prolongar a vida e aliviar os sintomas do paciente. Aspectos próprios do tumor e do paciente são importantes para o prognóstico: metástases viscerais, cerebrais e múltiplos sítios metastáticos normalmente conferem pior prognóstico, enquanto um melhor estado de saúde, idade mais jovem no diagnóstico e maior intervalo livre de doença entre o diagnóstico inicial e o desenvolvimento de recorrência metastática conferem um melhor prognóstico (WAKS & WINER, 2019).

A quimioterapia é geralmente o principal tratamento de câncer de mama com presença de metástase e a escolha do regime terapêutico e do fármaco a ser utilizado é criteriosa e são avaliados fatores como idade, função de órgãos como rins e fígado, resistência a fármacos e o tempo em que o paciente ficou sem o tratamento (JHONSTON, 2011).

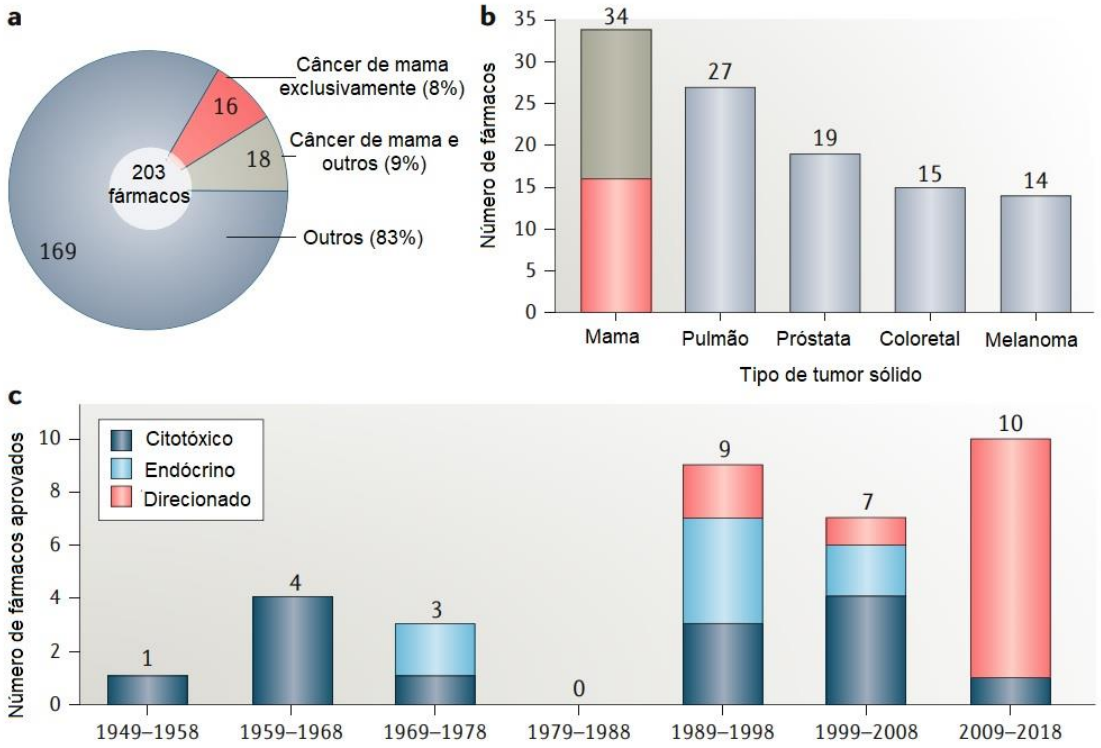
Uma análise do número de aprovações da FDA para medicamentos oncológicos em um período de 70 anos, de 1949 a 2018, identificou 203 aprovações, dentre essas, 34 fármacos (17% do total) são utilizados para tratamento de câncer de mama, o maior número dentre todos os tipos de tumores sólidos (LEO *et al.*, 2020). Os resultados desta pesquisa estão sumarizados na Figura 3.

Destaca-se o domínio dos medicamentos citotóxicos nas primeiras décadas, começando com o Metotrexato em 1953. A partir dos anos 1970, outros medicamentos com mecanismos de ação no sistema endócrino ganharam a aprovação, principalmente o Tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrogênio. Durante a década mais recente, de 2009 a 2018, observa-se o domínio da terapêutica direcionada, contribuindo com nove dos dez novos medicamentos contra o câncer de mama, os alvos para esses medicamentos incluem a regulação da via de sinalização da proteína alvo da rapamicina (mTOR) e inibição de quinases dependentes de ciclina (CDK4/CDK6) e poli(ADP-ribose) polimerases (PARP) (LEO *et al.*, 2020).

Entretanto, apesar dos relevantes avanços, dentre os novos fármacos aprovados pela FDA nos últimos seis anos como Abemaciclib, Palbociclib e Ribociclib, ainda são relevantes efeitos adversos como a mielosupressão (anemia, neutropenia e trombocitopenia), além disso, esses fármacos são indicados para terapia endócrina (casos de receptores de hormônio

positivos), dessa forma, a busca por tratamentos mais efetivos, especialmente para os casos de câncer de mama metastático triplo negativo (sem receptores de hormônio), ainda é uma necessidade (WAKS & WINER, 2019).

Figura 3 – Análise das aprovações da FDA para câncer de mama e outros cânceres no período de 1949 a 2018. a) Medicamentos contra o câncer de mama aprovados como parte de todos os medicamentos contra o câncer. b) Número de aprovações de novos medicamentos para tumores sólidos comuns. c) Número de aprovações de medicamentos contra o câncer de mama por ano e mecanismo de ação.



Fonte: Adaptado de Leo *et al.* (2020).

As diretrizes da Sociedade Europeia de Oncologia Médica apontam que a quimioterapia citotóxica é o tratamento padrão para o tratamento de câncer de mama triplo negativo. As estratégias terapêuticas atuais incluem fármacos como taxanos, antraciclinas e derivados de platina. A eficácia dos taxanos e antraciclinas no câncer de mama metastático é maior em tumores com receptores de hormônios negativos, por esse motivo, ambas as classes são indicadas como tratamento de primeira linha para o caso triplo negativo (MUSTACCHI *et al.*, 2015).

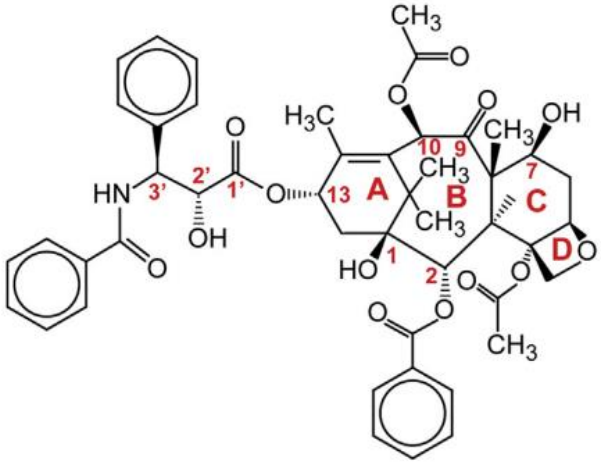
Diversos estudos em terapia neoadjuvante, adjuvante e metastática confirmaram a sensibilidade do tipo triplo negativo a fármacos citotóxicos, assim como a importância de uma quimioterapia a base de taxanos, dentre os quais se destaca o PTX (GHERSI *et al.*, 2015; SPARANO *et al.*, 2015; BAKRANIA *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2020).

2.2 PACLITAXEL

O PTX é um agente terapêutico amplamente estudado e efetivo para o tratamento de uma variedade de tumores sólidos. Esse fármaco foi descoberto como consequência de um estudo desenvolvido pelo *National Cancer Institute* (NCI) nos Estados Unidos no início de 1960 para triagem de substâncias com atividade citotóxica derivadas de plantas (BERNABEU *et al.*, 2017).

O composto foi originalmente isolado da casca do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) por Monre E. Wal e Mansukh C. Wani, que em 1971 o nomearam “Taxol” e elucidaram sua estrutura química, apresentada na Figura 4. O PTX é um pseudoalcalóide diterpeno com núcleo tetracíclico e fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$ (EZRAHI *et al.*, 2019).

Figura 4 – Estrutura química do Paclitaxel.



Fonte: Ezrahi *et al.* (2019).

A sua atividade antitumoral é atribuída especialmente ao anel A, ao anel D (oxetano), ao grupo C benzoíla e a certos componentes (como o grupo C3' amida-acil e o grupo OH em C2') na cadeia lateral anexada ao C13 (EZRAHI *et al.*, 2019).

Em 1979, Susan Horwitz elucidou o seu mecanismo de ação e alguns anos depois foram iniciados os ensaios clínicos. Entretanto, apenas em 1992 a FDA autorizou a sua comercialização, inicialmente para tratamento de câncer de ovário. Esse agente foi desenvolvido comercialmente pela Bristol-Myers Squibb, que registrou o nome Taxol® (BERNABEU *et al.*, 2017).

Inicialmente, o PTX era obtido exclusivamente de fontes naturais por extração da casca do Teixo do Pacífico e apesar de alcançar aumentos nos rendimentos de extração (0,04% p/p de casca seca), uma terapia completa poderia exigir aproximadamente 2 g do antineoplásico ou

o equivalente a quatro árvores. Dessa forma, o teor de PTX era muito baixo para suprir quantidade suficiente para uso clínico (BERNABEU *et al.*, 2017).

As quantidades de PTX encontradas em diferentes partes de plantas, órgãos e tecidos de *Taxus* diferem substancialmente; portanto, explantes de *Taxus* foram cultivados ao longo do tempo de maneira direcionada. Desde 1989 muitas outras espécies de Taxus foram encontradas incluindo *T. baccata, T. yunnanensis, T. cuspidate, T. chinensis, T. canadensis e T. globosa*. O melhoramento com linhagens celulares de alto rendimento, usando sistemas de cultura em dois estágios, otimizando fontes de carboidratos, usando estratégias de pré-alimentação e o uso de indutores de cultura de fungos (por exemplo, extratos de fungos mais ácido salicílico, sulfato de vanadil, quitosana, esqualeno e metil jasmonato) são alguns meios eficazes para aumentar o rendimento da obtenção de PTX (ZHU & CHEN, 2019).

Devido à alta complexidade estrutural da molécula, um método completamente sintético para produção comercial de PTX ainda não foi desenvolvido. Consequentemente, foram desenvolvidas rotas semissintéticas pela acilação de 10-desacetilbacatina III, um precursor presente na folhagem de *T. brevifolia* assim como em *T. baccata*. Esse percursor permitiu obter rendimentos mais elevados do que isolar o fármaco diretamente da árvore (1 kg de PTX a partir de 3000 kg de folhagem) e proporcionou uma melhor escolha para a produção de PTX (PANCHAGNULA, 1998). Atualmente, além método de semissíntese, o PTX pode ser obtido pelo processo de fermentação de células vegetais no qual o fármaco é extraído de culturas celulares de *Taxus*, purificado por cromatografia e isolado por cristalização (GUO *et al.*, 2006).

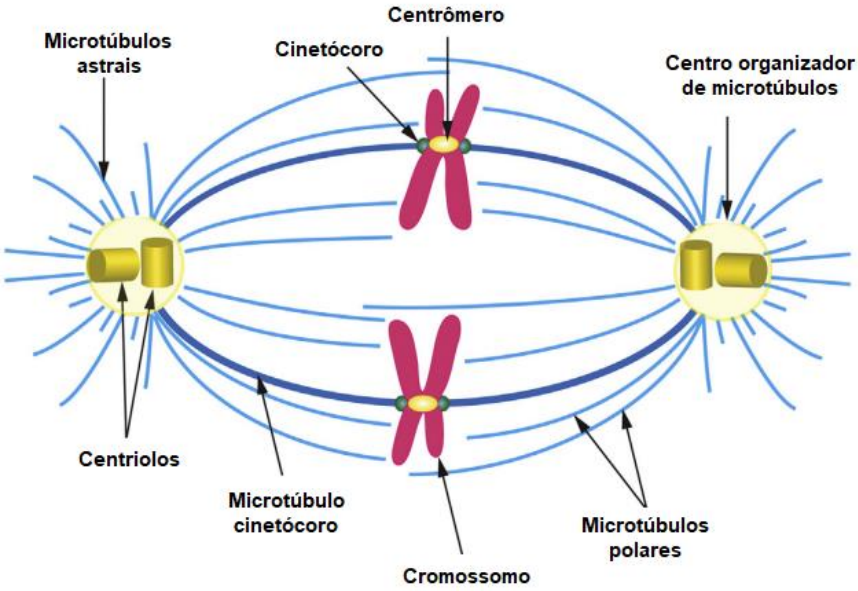
O mecanismo de ação do PTX difere da maioria dos agentes citotóxicos, isso porque esse fármaco não interage diretamente com os componentes nucleares como o DNA e RNA, ao contrário de alguns outros agentes quimioterápicos. De forma geral, o PTX atua durante a fase mitótica da divisão celular promovendo a polimerização de proteínas tubulinas e sua montagem, resultando no fenômeno de estabilização dos microtúbulos e bloqueio do ciclo celular (DUMONTET & SIKIC, 1999).

O fuso mitótico é uma estrutura celular temporária responsável pelos movimentos dos cromossomos durante a mitose e é constituído por feixes de microtúbulos que se alinham longitudinalmente e que no conjunto apresentam uma forma elipsoide, como mostra a Figura 5 (EZRAHI *et al.*, 2019).

Os microtúbulos são polímeros das proteínas α- e β-tubulina. Essas proteínas se alinham totalmente em paralelo com rearranjo cilíndrico para formar filamentos ocos ou tubos de cerca de 240-250 Å de diâmetro externo e que podem ter muitos micrômetros de comprimento. Esse

arranjo é alcançado com 13 protofilamentos (polímeros lineares com disposição cabeça-cauda das subunidades α- e β-tubulina) (EZRAHI *et al.*, 2019).

Figura 5 – Cromossomos e fuso mitótico durante os estágios iniciais da mitose, quando os centríolos estão situados nos polos das células, mas os cromossomos ainda não agrupados no centro.

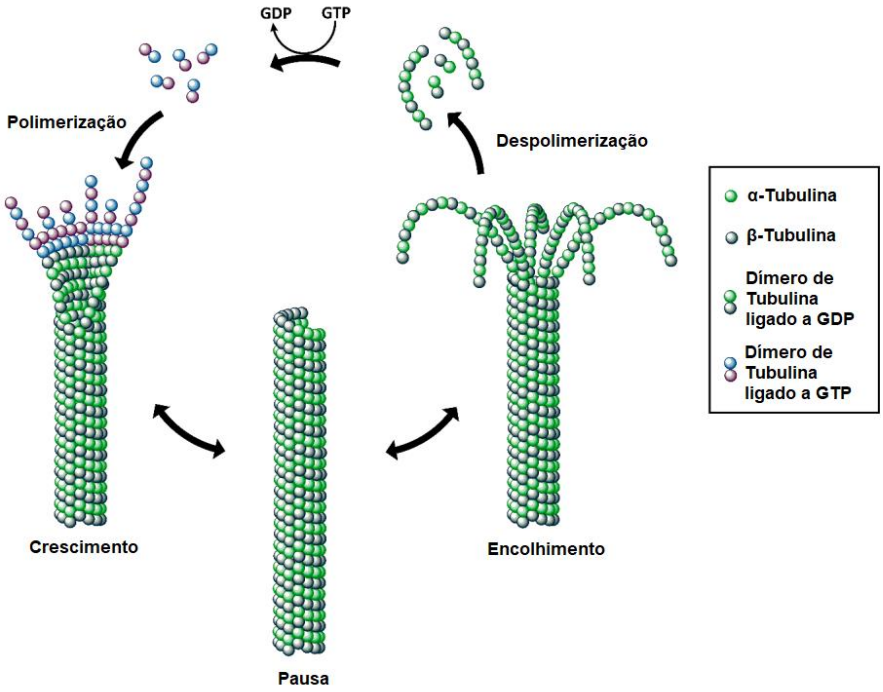


Fonte: Adaptado de Ezrahi *et al.* (2019).

As extremidades dos microtúbulos se alternam dinamicamente entre crescimento (polimerização) e encolhimento (despolimerização) em um fenômeno conhecido como instabilidade dinâmica. Dímeros de tubulina ligados a GTP (guanosina trifosfato) são adicionados à ponta do microtúbulo na fase de polimerização, enquanto GTP ligado à β-tubulina pode ser hidrolisado a GDP (guanosina difosfato) e assim é iniciada a fase despolimerização (EZRAHI *et al.*, 2019). Esse processo está ilustrado na Figura 6.

Taxanos (como o PTX e outros compostos semelhantes) ligam-se a microtúbulos polimerizados por meio de uma interação não covalente irreversível. Assim, eles estabilizam os protofilamentos de β-tubulina ligados ao GDP (que são propensos à despolimerização) endireitando-os em uma conformação semelhante à das estruturas ligadas ao GTP mais estáveis. Essa ligação promove o processo de polimerização da tubulina, estabilizando os microtúbulos e inibindo o fenômeno de instabilidade dinâmica. O fenômeno de estabilização dos microtúbulos pelo PTX os torna disfuncionais, e seu principal efeito é impossibilitar a separação dos centrômeros impedindo que a fase G2-M na anáfase ocorra, evitando assim a divisão celular e ocasionando a sua morte (apoptose) (EZRAHI *et al.*, 2019).

Figura 6 – Estrutura, polimerização e despolimerização dos microtúbulos.

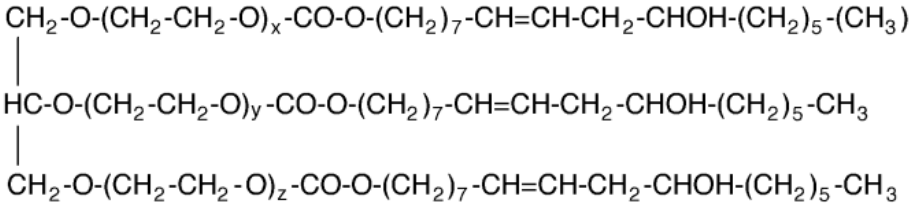


Fonte: Chen *et al.* (2017).

Apesar de sua eficácia terapêutica enquanto agente citotóxico, o PTX possui baixa biodisponibilidade devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso (0,3 - 0,5 µg/mL) e alta lipofilicidade (log P ~ 4) (SURAPANENI *et al.*, 2012; BERNABEU *et al.*, 2016).

A primeira formulação comercialmente disponível contendo o PTX, o Taxol®, é uma forma farmacêutica geralmente administrada por via intravenosa em um veículo composto de óleo de rícino polioxietilado também denominado Cremophor EL (CrEL) e álcool desidratado em partes iguais em volume, a estrutura química do CrEL é mostrada na Figura 7 a seguir.

Figura 7 – Estrutura química do Cremophor EL.



Fonte: Gelderblom *et al.* (2001).

A forma farmacêutica clínica atual contém em cada mililitro 6 mg de PTX, 527 mg de CrEL e 49,7% (v/v) de etanol absoluto (EtOH) (BERNABEU *et al.*, 2017).

O CrEL é utilizado como um veículo para a solubilização de uma ampla variedade de fármacos hidrofóbicos, incluindo anestésicos, fotossensibilizadores, sedativos, agentes imunossupressores e fármacos anticancerígenos. A quantidade de CrEL administrada com esses fármacos é de em média 5 mL (faixa de 1,5 mL a 10,3 mL), embora o PTX seja uma exceção, a quantidade de CrEL no Taxol® é consideravelmente maior por administração, cerca de 26 mL (GELDERBLOM *et al.*, 2001).

A grande quantidade do CrEL nessa formulação está relacionada a efeitos adversos em cerca de 25% a 30% dos pacientes tratados. Vários estudos apontaram que o CrEL administrado por via intravenosa tem sido associado a reações agudas de hipersensibilidade anafilactóides como dispneia, letargia, dor no peito, taquicardia, vasodilatação, hiperlipidemia, angioedema, urticária geral, erupção cutânea e hipotensão (GELDERBLOM *et al.*, 2001; PELTIER *et al.*, 2006; HENNENFENT *et al.*, 2006).

Consequentemente, os pacientes recebendo Taxol® devem ser pré-medicados com corticoides e anti-histamínicos para prevenção de reações de hipersensibilidade (BERNABEU *et al.*, 2017).

Além disso, com relação a neurotoxicidade, o CrEL foi associado à degeneração axonal e desmielinização, resultando em neuropatia periférica. As propriedades neurotóxicas de CrEL são provavelmente induzidas por resíduos insaturados de ácidos graxos, possivelmente devido ao aparecimento de produtos de peroxidação. Foi sugerido que derivados etoxilados do óleo de rícino são responsáveis pela maior parte do dano neuronal observado (BRAT *et al.*, 1992; PODRATZ & WINDEBANK, 1993; GELDERBLOM *et al.*, 2001).

Nesse contexto, considerando-se o potencial do PTX enquanto agente antineoplásico e as suas limitações em termos de biodisponibilidade e toxicidade, destacam-se as oportunidades alavancadas pelo crescimento da nanotecnologia farmacêutica: grandes empresas e outras crescentes no ramo da biotecnologia têm buscado o desenvolvimento de novas formulações com o objetivo de conquistar o mercado de PTX aumentando a sua eficácia terapêutica (SOFIAS *et al.*, 2017).

Algumas nanoformulações carregadas de PTX alcançaram aumento da solubilidade do fármaco, evitando o uso de CrEL e reduzindo a toxicidade associada. Diferentes plataformas nanotecnológicas baseadas em PTX já estão disponíveis no mercado ou em fase avançada e ensaios clínicos e podem ser mencionadas como nanopartículas conjugadas (Abraxane®), lipossomas (Lipusu®) e micelas poliméricas (Genexol®-PM, Paclical® e NK 105) (KIM *et al.*, 2001; HAMAHUCHI *et al.*, 2005; MORENO-ASPITIA & PEREZ, 2005; GREEN *et al.*, 2006)

2.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

As limitações da quimioterapia convencional geralmente vão de encontro a fatores como efeitos adversos do tratamento devido a toxicidade, resistência ao fármaco, falta de seletividade celular, além da complexidade do microambiente tumoral. Agentes quimioterápicos convencionais, como é o caso do Taxol®, se distribuem por todo o corpo, onde afetam tecidos cancerosos e normais causando um sérios efeitos tóxicos os quais geralmente limitam a terapia antitumoral. Nas últimas duas décadas, a pesquisa testemunhou um crescimento notável no uso da nanotecnologia para aplicações terapêuticas, especialmente na oncologia (KHALIFA *et al.*, 2019).

Alguns dos objetivos do estudo de formulações nanoestruturadas para tratamento de câncer incluem: aumentar o acúmulo de fármaco na região tumoral, reduzir a toxicidade fora do alvo, evitar a depuração rápida do fármaco após administração sistêmica e aprimorar os parâmetros farmacocinéticos de forma a possibilitar um tratamento mais eficiente (KHALIFA *et al.*, 2019).

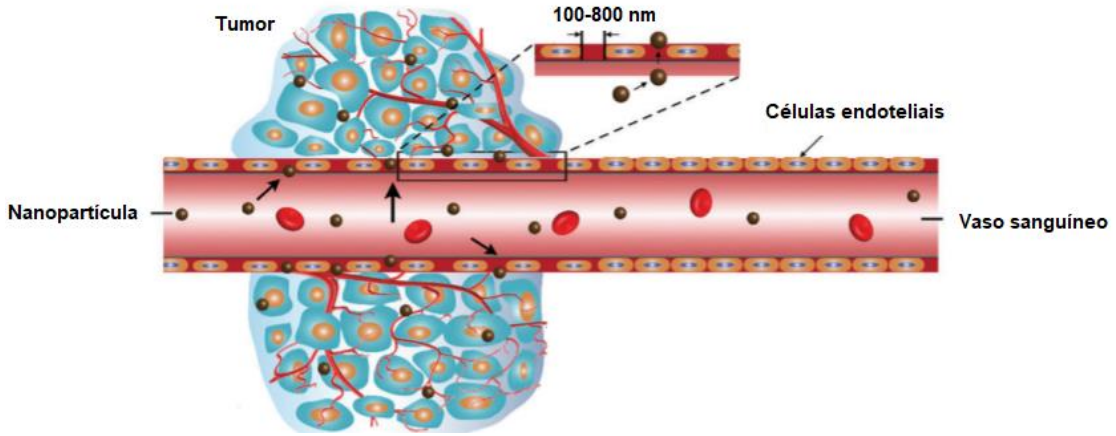
2.3.1 O EFEITO DE PERMEABILIDADE E RETENÇÃO AUMENTADA

O microambiente tumoral tem uma fisiologia única e complexa que desempenha um papel importante no crescimento, progressão e metástase de tumores (LIU *et al.*, 2017).

Nanocarreadores permitem a entrega preferencial de fármacos ao local do tumor por meio do efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentada (EPR, do inglês *Enhanced Permeability and Retention*), um fenômeno particular descoberto em 1986 por Maeda e Matsumura que ocorre em tumores sólidos em decorrência de suas características anatômicas e fisiopatológicas intrínsecas que os diferenciam de tecidos normais (BERNABEU *et al.*, 2017). Uma representação esquemática simplificada do efeito EPR é apresentada na Figura 8.

Devido a uma elevada taxa de angiogênese que não ocorre de forma uniforme, as células endoteliais dos vasos sanguíneos na região tumoral apresentam lacunas maiores (≥100 nm) do que as junções de vasos sanguíneos normais (5-10 nm). Além disso, a maioria dos vasos linfáticos dessa região são colapsados e comprimidos, o que afeta o processo de drenagem, em consequência, nanopartículas na faixa de tamanho de até 200 nm tendem a ser retidas no ambiente tumoral (BERNABEU *et al.*, 2017).

Figura 8 – Representação esquemática do efeito EPR. Os vasos sanguíneos na região tumoral são anormais apresentando grandes lacunas entre as células endoteliais que permitem a passagem de nanopartículas.



Fonte: Adaptado de Dai *et al.* (2017).

Muitos estudos validaram a eficácia desse efeito baseado no direcionamento de fármacos para tecidos tumorais, não apenas em modelos de tumores animais, mas também em pacientes com câncer (MAEDA *et al.*, 2000; MAEDA, 2010a; MAEDA *et al.*, 2016; MAEDA; 2017; GOLOMBEK *et al.*, 2018).

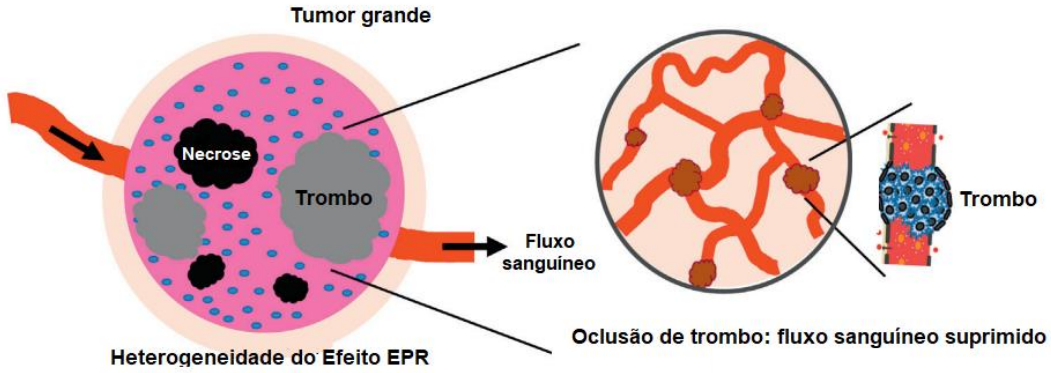
No entanto, é importante salientar que outras pesquisas recentes para vários tipos de tumores e diferentes sistemas apontaram que o efeito EPR das nanoformulações não é observado de forma universal (MAEDA, 2015; WILHELM *et al.*, 2016; LAMMERS, 2019; SINDHWANI *et al.*, 2020).

Efeitos EPR caracterizados como inadequados foram observados em diferentes tumores e em diferentes áreas do mesmo tumor. Além das diferenças de estrutura, tamanho e densidade vascular nos variados tipos de tumores, a heterogeneidade na patologia do câncer também se relaciona com efeitos de coagulação e formação de trombos nos vasos tumorais, levando à hipóxia do tecido ou fluxo sanguíneo prejudicado, o que pode suprimir a entrega de fármacos nessas regiões. Esse feito também ocorre como resultado de fibrinólise ativada, necroses, trombocitopenia ou sangramentos, embora seja importante destacar que sua ocorrência é mais pronunciada em tumores de maior volume (MAEDA, 2015). Esse fenômeno está ilustrado na Figura 9.

Adicionalmente, foi relatado que células imunes do microambiente tumoral desempenham um papel importante no acúmulo, retenção e distribuição de nanopartículas (MILLER *et al.*, 2015). Além disso, fatores fisiopatológicos podem ser utilizados para controlar ou aumentar o efeito EPR e têm sido alvo de estudos diversos, a elevação da pressão sanguínea com o uso de compostos como a nitroglicerina e o uso de mediadores vasculares como a

angiotensina II, por exemplo, mostraram-se úteis em aplicações clínicas para melhoria de entrega de fármacos na região de tumores em hipoxia (NAGAMITSU *et al.*, 2009, SEKI *et al.*, 2009; MAEDA, 2010b).

Figura 9 – Ilustração da heterogeneidade do efeito EPR relacionada a atividades trombogênicas. A formação de trombos resultou na supressão do fluxo sanguíneo na região do tumor.



Fonte: Adaptado de Fang *et al.* (2020).

Investigações adicionais de potenciadores do efeito EPR e sua tradução para aplicações clínicas são, portanto, criticamente importantes para o sucesso da terapia oncológica com nanoformulações e tais estudos podem fornecer novas oportunidades para a futura quimioterapia do câncer (FANG *et al.*, 2020).

Para além do efeito de heterogeneidade, deve-se ressaltar que o efeito EPR é um fenômeno dinâmico e envolve muitos fatores fisiológicos incluindo o acontecimento de eventos biológicos simultâneos *in vivo*, as consequências do crescimento tumoral e de possíveis processos fisiopatológicos e inflamatórios, o que confere considerável complexidade. Ademais, é importante destacar que esse efeito não determina o resultado de um sistema de entrega de fármacos de sucesso. Portanto, o desenvolvimento de nanoformulações requer considerações multifatoriais, de forma que devem ser consideradas as diferentes características físico-químicas das nanopartículas complementarmente a análise de tamanho como: carga superficial associada, biocompatibilidade, estabilidade durante o tempo de circulação e minimização da depuração pelo sistema fagocitário mononuclear (MAEDA, 2015; ISLAM *et al.*, 2021).

2.3.2 NANOFORMULAÇÕES PARA ENTREGA DE PACLITAXEL

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, sistemas de entrega têm sido desenvolvidos para aumentar a eficácia terapêutica e abordar as limitações farmacocinéticas de diferentes

fármacos. Nas décadas recentes, várias nanoformulações foram desenvolvidas e avaliadas para entrega de PTX às células tumorais (LIU *et al.*, 2019). A Tabela 1 a seguir mostra alguns exemplos.

Tabela 1 – Nanoformulações contendo PTX disponíveis comercialmente ou em fase de estudo clínico e informações sobre sua composição principal.

Formulação	Composição
Disponível comercialmente	
Abraxane®	Nanopartícula (Albumina/PTX)
Lipusu®	Lipossoma (Lecitina/Colesterol/PTX)
Genexol®-PM	Micela polimérica (mPEGb-PDLLA/PTX)
Paclical®	Micela polimérica (XR-17/PTX)
PICN	Nanopartícula lipídico-polimérica (Polivinilpirrolidona/Sulfato de Colesterol/Ácido Caprílico/PTX)
Fase II	
LEP-ETU	Lipossoma (Fosfatidilcolina/Colesterol/Cardiolipina/Succinato ácido de alfa-tocoferol/PTX)
Taxoprexin	Conjugado (Ácido docosahexaenóico/ PTX)
ANG1005	Conjugado (Angiopep-2/PTX)
Fase III	
Opaxio™/Xyotax®	Conjugado (Ácido-poli-L-glutâmico/PTX)
NK105	Micela polimérica (mPEG-b-P(Asp)/PTX)

Fonte: Adaptado de Liu *et al.* (2019).

O Abraxane®, originalmente fabricado pela Abraxis Bioscience, foi aprovado pela FDA e pela EMA em 2005 e 2008, respectivamente, como terapia de segunda linha para pacientes com câncer de mama metastático com resistência a um regime de antraciclina e taxano. Os dados clínicos que levaram à aprovação do Abraxane® demonstraram superioridade em relação ao Taxol® em termos de redução da toxicidade que, por sua vez, resultou em uma dose máxima tolerada significativamente mais alta (GRADISHAR *et al.*, 2005; MORENO-ASPITIA & PEREZ, 2005; GREEN *et al.*, 2006).

Essa formulação é preparada pela homogeneização a alta pressão do PTX em presença de albumina sérica. As moléculas de PTX são ligadas de forma não covalente a moléculas de albumina formando um agregado primário de PTX-albumina de 4-14 nm. Esses então se agregam para formar uma partícula de albumina-PTX de aproximadamente 130 nm de diâmetro (MORENO-ASPITIA & PEREZ, 2005; GREEN *et al.*, 2006; DESAI *et al.*, 2009; FU *et al.*, 2009).

O Abraxane® contém 100 mg de PTX em 900 mg de albumina em forma de pó liofilizado que é ressuspendido em 20 mL de solução de cloreto de sódio 9 mg/mL para formar uma suspensão reconstituída de concentração igual a 5 mg/mL de PTX. Estudos pré-clínicos mostraram que o Abraxane® melhora a eficácia, em comparação com o Taxol®, devido ao aumento do acúmulo do fármaco na região tumoral (DESAI *et al.*, 2006; GARDNER *et al.*, 2008). Além disso, estudos clínicos mostraram que a ausência de CrEL reduz a toxicidade dessa formulação, permitindo que uma dose 49% maior do medicamento seja administrada sem a necessidade de pré-medicação com corticosteroides (GRADISHAR *et al.*, 2005; DRANITSARIS *et al.*, 2014).

Destacam-se alguns do pontos fortes do Abraxane® como: facilidade de administração, redução nas reações de hipersensibilidade, melhor resposta geral e sobrevida, bem como melhorias nos anos de vida ganhos e anos de vida ajustados à qualidade (MCLEOD *et al.*, 2010; ALBA *et al.*, 2013; LAZZARO *et al.*, 2013; DRANITSARIS *et al.*, 2015).

Com relação ao perfil de toxicidade, embora essa formulação mostre uma diminuição na incidência de neutropenia, um aumento na incidência de neurotoxicidade foi relatado quando Abraxane® foi administrado em combinação com Gemcitabina para tratamento de câncer pancreático (SALTZ & BACH, 2014). Adicionalmente, essa formulação possui elevado custo de produção, de tal forma que a pesquisa por novas alternativas ainda é uma necessidade (SZNITOWSKA *et al.*, 2008).

Nas últimas três décadas, as micelas poliméricas surgiram como uma plataforma de entrega de fármacos altamente promissora para compostos terapêuticos pouco solúveis. Esses sistemas mostraram perfis farmacocinéticos aprimorados em modelos animais pré-clínicos e eficácia aumentada com um perfil de segurança superior. Algumas formulações de micelas poliméricas atingiram o estágio de ensaios clínicos ou são aprovadas para uso humano devido ao perfil farmacocinético aprimorado e alta eficácia (HWANG *et al.*, 2020).

Dentre as principais formulações micelares destacam-se o Genexol®-PM, o Paclical® e o NK105.

O Genexol®-PM é uma formulação micelar polimérica originalmente desenvolvida pela Samyang Biopharmaceuticals Corp. Essa foi a primeira formulação de micelas poliméricas aprovada para uso humano na Coréia do Sul e em vários outros países como Índia, Vietnam, Filipinas e Indonésia para pacientes com câncer de mama metastático, câncer de ovário e câncer de pulmão. Essa formulação consiste em PTX encapsulado em micelas poliméricas de mPEGb-PDLLA (mPEG: 2000 g/mol, PDLLA: 1750 g/mol). As micelas, fabricadas pelo método de dispersão sólida seguida da técnica de hidratação de filme fino, são partículas nanométricas

com estrutura esférica bem definida em meio aquoso com 20 a 50 nm de diâmetro que contém 30 mg de PTX para cada 150 mg de polímero configurando 16,7% de capacidade carreadora de fármaco (KIM *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2004).

O Paclical®, desenvolvido pela Oasmia Pharmaceutical AB, é baseado no excipiente patenteado XR-17, uma mistura de derivados de vitamina A composta de sal de sódio de éster metílico de ácido N-(transretinoil)-L-cisteico e sal de sódio de éster metílico de ácido N-(13-cisretinoil)-L-cisteico que formam micelas de 20 a 60 nm para encapsulação de PTX. Em 2015, o Paclical® recebeu aprovação para tratamento de câncer de ovário em combinação com carboplatina na Rússia. Além disso, um estudo clínico comparativo entre o Paclical® e o Abraxane® mostrou perfis farmacocinéticos semelhantes para essas formulações, sugerindo a oportunidade de aprovação global dessa formulação para tratamento de câncer de mama (SOFIAS *et al.*, 2017).

O NK105 é uma formulação de micelas poliméricas carregadas com PTX que foi originalmente desenvolvida pelo grupo de Kataoka e NanoCarrier Co. Ltd. no início de 1990 e avançou para ensaios clínicos (fase III concluída). Essa formulação consiste em PTX encapsulado em micelas poliméricas de polietilenoglicol e poliácido aspártico modificado ou mPEG-b-P(Asp) (mPEG = 12.000 g/mol e P(Asp) = 8000 g/mol), sendo metade do bloco de grupos carboxílicos do poliácido aspártico modificado com 4-fenil-1-butanol para aumentar a sua hidrofobicidade e melhorar a incorporação do fármaco no núcleo da micela. As micelas dessa formulação apresentam diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 90 nm e contém 30 mg de PTX para cada 100 mg de polímero, configurando cerca de 23,1 % de capacidade carreadora de fármaco (HAMAHUCHI *et al.*, 2005).

Dada a potencialidade das formulações de micelas poliméricas alguns dos principais aspectos desses sistemas serão abordados com mais detalhes adiante.

2.3.2.1 MICELAS POLIMÉRICAS

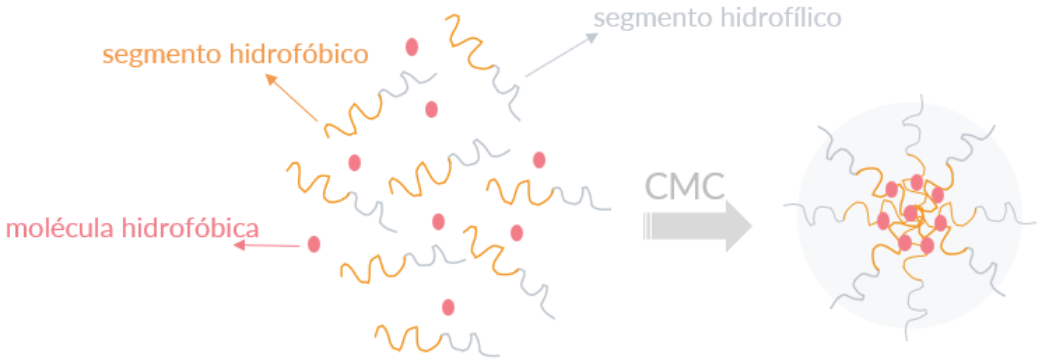
Cerca de três décadas atrás, micelas formadas por copolímeros anfifílicos em bloco em solução aquosa foram concebidas como sistemas carreadores de compostos terapêuticos pouco solúveis que foram incorporados não covalentemente às micelas (KABANOV *et al.*, 1989) ou ligados covalentemente às cadeias de polímero (YOKOYAMA *et al.*, 1990). Desde então, as aplicações desses componentes no desenvolvimento de micelas poliméricas contendo fármacos têm sido extensivamente estudadas (KWON & KATAOKA, 1995; KIM *et al.*, 2001; HAMAGUCHI *et al.*, 2005; MATSUMURA, 2008).

A característica definidora dos sistemas micelares poliméricos é a capacidade de autoassociação das unidades anfifílicas de polímeros. O processo de micelização é um evento termodinâmico, no qual os polímeros anfifílicos se autoassociam em soluções aquosas com as cadeias hidrofóbicas agregando-se para formar o núcleo e as cadeias hidrofílicas em direção ao ambiente aquoso. As cadeias hidrofílicas protegem as cadeias hidrofóbicas da interação com a água, reduzindo a energia livre interfacial do sistema polímero-água, portanto, minimizar a energia livre interfacial é a principal força motriz para a formação das micelas (OWEN *et al.*, 2012).

Devido à sua estrutura com núcleo hidrofóbico e uma casca externa hidrofílica as micelas são capazes de incorporar fármacos hidrofóbicos em seus núcleos e liberá-los de forma controlada, uma característica considerada interessante para o carreamento de fármacos anticancerígenos pouco solúveis em ambiente aquoso (GILL *et al.*, 2014).

A associação micelar ocorre apenas quando as unidades anfifílicas atingem uma concentração limite em solução, conhecida como concentração micelar crítica (CMC). Abaixo da CMC as moléculas existem apenas como cadeias simples em uma dispersão molecular (CROY & KWON, 2006). Uma ilustração desse processo é mostrada na Figura 10 a seguir.

Figura 10 – Ilustração representativa dos componentes de uma micela polimérica convencional em meio aquoso e sua autoassociação acima da CMC.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Para que uma micela seja termodinamicamente estável, a concentração de copolímero deve estar acima da sua CMC. Dessa forma, no desenvolvimento de sistemas micelares é interessante selecionar copolímeros com uma CMC mais baixa. Esse parâmetro é influenciado por diversos fatores incluindo as propriedades dos blocos formadores de núcleo, como a hidrofobicidade e o grau de cristalinidade, além da proporção entre segmentos (balanço hidrofóbico/hidrofílico). Geralmente, um aumento no comprimento do bloco hidrofóbico de um

copolímero resulta em uma CMC mais baixa se o segmento hidrofílico for mantido constante (NISHIYAMA & KATAOKA; 2006; WIRADHARMA *et al.*, 2009).

Adicionalmente, a formação de micelas ocorre como resultado de duas forças: as forças atrativas que levam à associação das moléculas e as forças repulsivas que impedem o crescimento das micelas para uma fase macroscópica distinta (ASTAFIEVA *et al.*, 1993; PRICE, 1983).

O tamanho de uma micela é influenciado pelas características dos seus constituintes, dependendo principalmente dos comprimentos e pesos moleculares dos blocos hidrofóbicos e hidrofílicos. Essas propriedades influenciam qual o será o número de agregação micelar (Nagg) ou número de unidades que compõem as micelas, a morfologia e o quão bem as cadeias de unímeros se empacotam nas micelas, o que determina finalmente o tamanho total da estrutura (CROY & KWON, 2006). A maioria das micelas poliméricas apresentam a faixa de tamanho entre 10 e 200 nm e são esféricas, apesar de outras morfologias como bastões também serem possíveis (OWEN *et al.*, 2012).

Com relação ao método de preparo desses sistemas, um dos mais comumente utilizados é o método de evaporação do solvente seguido da hidratação de filme. Nesse método, a fase orgânica capaz de solubilizar os polímeros e o fármaco é evaporada e um filme fino é produzido. As micelas são então formadas quando esse filme é reidratado com uma fase aquosa. Algumas das vantagens mais relevantes desse método são os altos níveis de encapsulação alcançados e a possibilidade de uma interação íntima e favorável do polímero com o fármaco, uma vez que ambos são solubilizados na mesma fase. Por outro lado, uma das desvantagens é a utilização de solventes orgânicos, que devem ser totalmente removidos ou, pelo menos, devem estar abaixo de certos níveis permitidos (CAGEL *et al.*, 2017).

Muitos avanços significativos no desenvolvimento de micelas poliméricas têm sido feitos para otimizar a entrega de fármacos. A escolha de copolímeros em bloco adequados destina-se a encapsular efetivamente os compostos terapêuticos por meio de várias interações moleculares que resultam na proteção da carga contra o ambiente externo e melhorias no perfil farmacocinético (KATAOKA *et al.*, 2012; CABRAL & KATAOKA; 2014). Espera-se que formulações de micelas poliméricas ideais possam melhorar os resultados terapêuticos do fármaco encapsulado devido as funcionalidades da formulação conferidas pelos polímeros (HWANG *et al.*, 2020).

Sob o aspecto biológico, por exemplo, o perfil farmacocinético de fármacos encapsulados em micelas poliméricas difere daquele dos compostos livres, o que influencia

parâmetros como concentração sistêmica máxima, área sob a curva (AUC, do inglês *Area Under the Curve*), depuração e biodistribuição (HOUDAIHED *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, diferentes biomateriais têm sido empregados para preparar sistemas micelares poliméricos, apesar de não serem exclusivamente copolímeros em bloco (CAGEL *et al.*, 2017).

O uso de fosfolípides com bloco hidrofóbico potencializa a estabilização das nanoestruturas, quando comparadas com micelas estritamente poliméricas. Além disso, a hidrofobia conferida pelas cadeias lipídicas permite excelente solubilização de fármacos pouco solúveis em meio aquoso, como é o caso do PTX (TORCHILIN, 2007; GILL *et al.*, 2014).

O fosfolípide DSPE acoplado ao PEG (DSPE-PEG) vem sendo amplamente utilizado no preparo de micelas poliméricas, por apresentar características que permitem a formação de micelas com diâmetro variando de 7 a 35 nm, dependendo do comprimento da cadeia de PEG, e valores de CMC baixos, na ordem de 10^{-5} a 10^{-6} mol/L (LUKYANOV *et al.*, 2002; SAWANT & TORCHILIN, 2010).

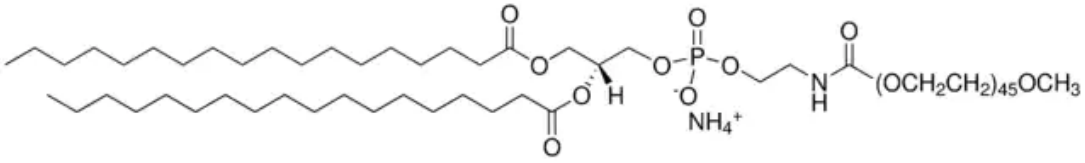
O PEG tem sido o bloco hidrofílico mais frequentemente empregado em micelas poliméricas devido ao seu perfil de segurança e aprovação pela FDA. O PEG de baixo peso molecular e conjugados de PEG de 20 kDa ou menos apresentam baixa incidência de toxicidade (VERONESE, 2009; WEBSTER *et al.*, 2009; RUDMAN *et al.*, 2013).

Além disso, quando o PEG forma a casca das micelas poliméricas, sua característica hidrofílica e sua flexibilidade ajudam, por meio de uma estabilização estérica, a evitar a adsorção de proteínas plasmáticas e processos de opsonização que podem causar a depuração antecipada do fármaco e das micelas pelo sistema fagocitário mononuclear (CERUTI *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2007; SHIRAISHI *et al.*, 2015).

Cadeias de PEG com pesos moleculares variando de 1 a 6 kDa são consideradas ideais para conferir as nanopartículas propriedades eficientes e são frequentemente empregadas para preparar copolímeros em bloco destinados a entrega de fármacos (MILLER *et al.*, 2012; LOGIE *et al.*, 2014; EMAMI *et al.*, 2015). A Figura 11 apresenta a estrutura química de uma molécula de DSPE-PEG_{2000}.

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu anteriormente micelas poliméricas de DSPE-PEG_{2000} contendo PTX, o qual apresentou características físico-químicas e biológicas promissoras com grande potencial para acumular no tecido tumoral (ODA *et al.*, 2020b). Embora essa formulação tenha apresentado boa capacidade de encapsulação do PTX, o sistema não apresentou estabilidade em ambiente aquoso durante um período de sete dias (ODA, 2015).

Figura 11 – Estrutura química do 1,2-diestearoil-sn-glicero-2-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietileno-glicol)-2000] ou DSPE-PEG$_{2000}$.



Fonte: Avanti Polar Lipids (2022).

Para explorar com sucesso as micelas poliméricas para entrega de fármacos, vários parâmetros importantes, incluindo a estabilidade, capacidade de carga do fármaco, tamanho e possibilidade de incorporação de funcionalidades, devem ser cuidadosamente considerados e otimizados a depender da aplicação (ATTIA *et al.*, 2011). É conhecido que a estabilidade do sistema micelar é regida, principalmente, pelo estado físico do seu núcleo hidrofóbico, pelas interações entre as frações apolares e pelo seu peso molecular (WIRADHARMA *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010).

Adicionalmente, a afinidade entre o fármaco carregado e o polímero formador do núcleo é um dos fatores mais relevantes que determina a capacidade de carregamento (CROY & KWON, 2006; CHIAPPETTA *et al.*, 2007).

Nesse sentido, uma abordagem interessante para otimizar essas propriedades e superar algumas das limitações dos sistemas de micelas convencionais é a combinação de dois ou mais polímeros anfifílicos distintos para formar sistemas micelares mistos (ATTIA *et al.*, 2011).

2.3.2.2 MICELAS POLIMÉRICAS MISTAS

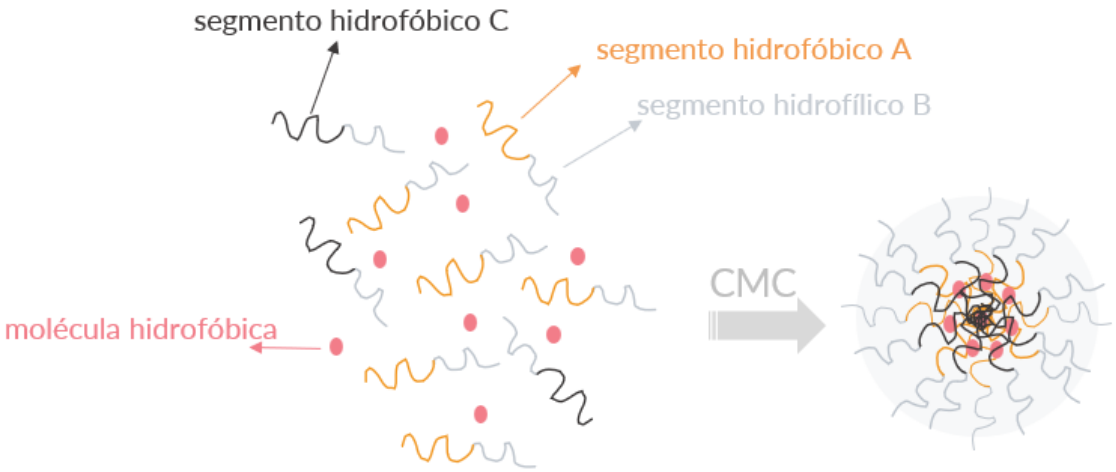
Em comparação com micelas poliméricas convencionais, os sistemas micelares mistos podem apresentar algumas vantagens interessantes. A combinação de dois ou mais constituintes diferentes (por exemplo, AB+CB, AB+AC ou AB+CD) para formar micelas mistas é uma abordagem prática e eficiente para tratar muitas das limitações geralmente encontradas sem a necessidade de esquemas complexos de síntese (CAGEL *et al.*, 2017).

Shim *et al.* (1991) propôs um modelo para a co-micelização de copolímeros dibloco em solução, que foi descrito como dependente das concentrações relativas das duas espécies.

Embora seja comum para os sistemas de micelas mistas o uso de dois copolímeros em bloco com o mesmo bloco hidrofílico, mas diferentes blocos hidrofóbicos (AB+AC) com o objetivo de geralmente melhorar a estabilidade e capacidade carreadora, copolímeros dibloco com o mesmo bloco hidrofóbico, mas diferentes blocos hidrofílicos (AB+CB) também podem

formar micelas mistas com a casca tendo funções duplas (LI *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009). A Figura 12 a seguir ilustra um processo de formação de uma estrutura micelar mista.

Figura 12 – Ilustração representativa dos componentes de uma micela polimérica mista do tipo AB+CB em ambiente aquoso e sua autoassociação acima da CMC.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Algumas das vantagens que micelas mistas desenvolvidas a partir de copolímeros em bloco anfifílicos quimicamente diferentes podem apresentar sobre sistemas convencionais incluem: melhorias nas estabilidades termodinâmica (reduzindo a CMC) e/ou cinética (por meio do aprimoramento das interações hidrofóbicas), melhoria na capacidade carreadora, melhoria do controle de tamanho e facilidade de incorporar múltiplas funcionalidades, por exemplo, responsividade a estímulos e direcionamento celular (GAO *et al.*, 2003; YOO *et al.*, 2004; DABOLKHAR *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2009; LO *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009)

Dentre os diferentes sistemas micelares mistos, os tipos de interação não covalente mais frequentemente estudados são as interações hidrofóbicas entre diferentes copolímeros em bloco (ATTIA *et al.*, 2011).

Copolímeros em bloco de PEG e poli(óxido de propileno), comercializados como polímeros Pluronic, são os materiais mais utilizados para formar sistemas micelares para liberação de fármacos, pois estão prontamente disponíveis, são biocompatíveis e exibem baixa toxicidade. Todavia, suas limitações estão na incapacidade de encapsular grandes quantidades de fármacos hidrofóbicos e nos altos valores de CMC, que levam à baixa estabilidade e dissociação das micelas quando diluídas pelo sangue após injeção intravenosa. Dessa forma, foi reportado na literatura que a mistura de polímeros Pluronic com copolímeros mais

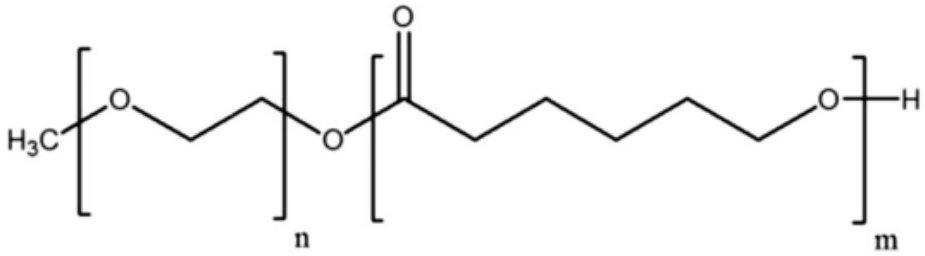
hidrofóbicos pode melhorar a estabilidade das micelas mistas resultantes e, portanto, a biodisponibilidade dos fármacos encapsulados (KABANOV *et al.*, 2002; CHIAPPETTA *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007; LI & TAN, 2008; WANG *et al.*, 2008; MU *et al.*, 2010).

Algumas macromoléculas anfifílicas relevantes comumente utilizadas em sistemas micelares mistos são aquelas formadas por blocos hidrofóbicos biodegradáveis de poliésteres covalentemente ligados a blocos hidrofílicos, principalmente ao PEG. Alguns exemplos são os poliésteres hidrofóbicos como poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) e poli(ε-caprolactona) (PCL), que são copolímeros aprovados pela FDA para aplicações biomédicas em humanos (KWON, 2003; CAGEL *et al.*, 2017).

Devido à sua baixa toxicidade e biocompatibilidade o PCL-PEG é um material bastante promissor para utilização em sistemas de administração de fármacos (VAKIL & KWON, 2006; HASSANZADEH *et al.*, 2014).

O PCL é sintetizado por polimerização por abertura de anel a partir do monômero ε-caprolactona, um poliéster alifático hidrofóbico, e, portanto, é um excelente bloco para adsorver, dissolver e/ou fixar-se a fármacos com baixa solubilidade aquosa (SINHA *et al.*, 2004; PING *et al.*, 2005; SHI *et al.*, 2009). Anexado ao PEG, para formação do copolímero PCL-PEG, tem-se a construção de um componente com propriedades aprimoradas para potenciais aplicações como nanocarreadores (LETCHFORD *et al.*, 2004; HUA *et al.*, 2007; X. WEI *et al.*, 2009). A estrutura desse copolímero é mostrada na Figura 13 a seguir.

Figura 13 – Estrutura química do copolímero PCL-PEG.



Fonte: Cagel *et al.* (2017).

O comprimento dos segmentos de PCL fornece controle crucial sobre a hidrofobicidade dos copolímeros de PCL-PEG, o que determina a afinidade do fármaco e dos núcleos micelares hidrofóbicos (KIM *et al.*, 1998; GE *et al.*, 2002).

Adicionalmente, o grau de cobertura de PEG na superfície da partícula também é determinado pelo comprimento do polímero, assim como pela sua densidade. Isso significa que

o controle do peso molecular dos constituintes é fundamental para o projeto eficiente de um sistema de entrega (ALLEN *et al.*, 2002).

Cadeias de PEG mais longas estendem a meia-vida do fármaco de forma mais significativa, Gref *et al.* (2000) reportou que o aumento do comprimento da cadeia de PEG de 2000 para 5000 reduziu a adsorção de proteínas plasmáticas em mais de 50%.

Essas características são algumas das que apontaram esse copolímero como uma opção interessante para ser incorporado em um sistema de micelas mistas. Nesse sentido, a seleção cuidadosa dos componentes-chave, a identificação e análise criteriosa das principais características desses sistemas são fatores determinantes para o desenvolvimento próspero de formulações.

Dado o tamanho reduzido das micelas poliméricas, destaca-se na literatura o uso da técnica de espalhamento de raio-X a baixo ângulo (ângulos menores que 10º), a qual permite o estudo de nanopartículas na faixa de 1 a 100 nm. Essa técnica é uma ferramenta poderosa para determinação de parâmetros como tamanho e forma, além de possibilitar a investigação de detalhes da organização estrutural desses sistemas (FEIGIN & SVERGUN, 1987; ROE, 2000; AKIBA *et al.*, 2010; SHIRAISHI *et al.*, 2015).

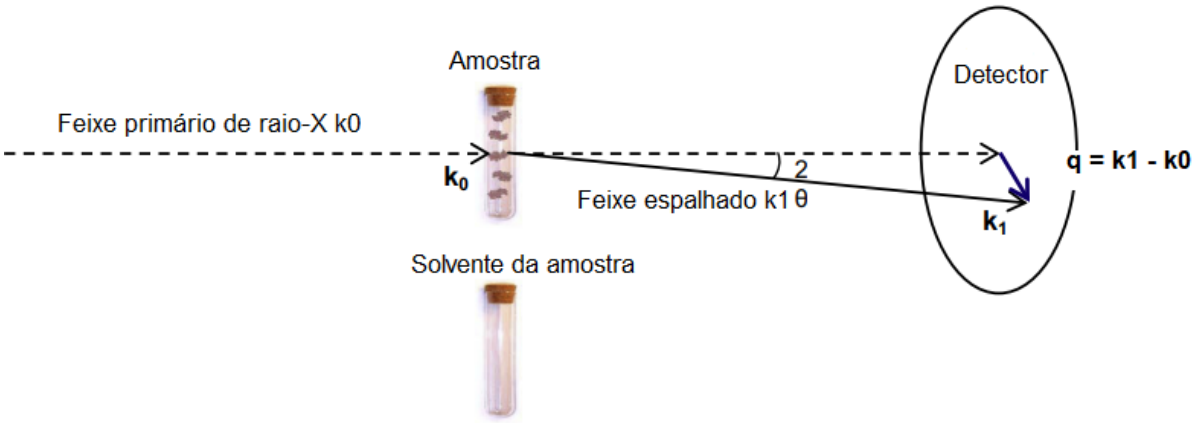
2.4 CARACTERIZAÇÃO POR ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO

O comportamento do espalhamento é ditado pelo comprimento de onda relativo da radiação comparado ao tamanho do elemento espalhador. Dessa forma, devido à escala nanométrica dos sistemas micelares, o comprimento de onda de radiação necessário para análise deve ser de tamanho comparável (DONG & BOYD, 2011).

Com base na lei de Bragg, dado um determinado comprimento de onda, o ângulo de espalhamento é inversamente proporcional às distâncias interplanares. Portanto, o espalhamento de raios-X pode fornecer informações sobre uma ampla gama de ângulos de dispersão permitindo o estudo de estruturas de tamanhos diversos. Para ângulos ultrabaixos (0,001° a 0,3°) a técnica é denominada USAXS (do inglês *Ultra Small Angle X-Ray Scattering*), que permite estudar estruturas maiores que 100 nm, para ângulos baixos (0,1° a 10°) a técnica é denominada SAXS (do inglês *Small Angle X-Ray Scattering*) sendo possível estudar estruturas na faixa de tamanho de 1 a 100 nm e para ângulos amplos (>10°) a técnica é denominada WAXS (do inglês *Wide Angle X-Ray Scattering*) utilizada para estruturas menores que 1 nm (DONG & BOYD, 2011).

Embora existam vários desafios técnicos associados ao desenvolvimento da instrumentação para espalhamento de raios-X, esquematicamente a configuração experimental é relativamente simples, como mostra a Figura 14 a seguir.

Figura 14 – Esquema representativo de um experimento de espalhamento de raios-X.



Fonte: Adaptado de Kikhney & Svergun (2015).

Nessa técnica um feixe de raios-X altamente colimado é usado para iluminar a amostra. A fonte de raios-X usada em estudos estruturais experimentais pode ser uma fonte de bancada ou fonte síncrotron.

Instrumentos de espalhamento de raios-X de bancada geram raios-X utilizando um feixe de elétrons focado acelerado através de um campo de alta tensão, que bombardeia um alvo sólido (Cobre ou Molibdênio). À medida que os elétrons colidem com os átomos no alvo e desaceleram, um espectro contínuo de raios-X é emitido, que depois é monocromatizado e colimado. Instrumentos de espalhamento de raios-X de bancada têm fluxo relativamente baixo (normalmente cerca de 10^8 fótons/s) e, portanto, são geralmente usados para obter informações estruturais em amostras de equilíbrio estático, além disso, tempos de aquisição de minutos até horas são necessários (DONG & BOYD, 2011).

A radiação síncrotron, por sua vez, é emitida por elétrons viajando a uma velocidade próxima da luz em um anel circular. A perda de momento dos elétrons quando forçados a dobrar em torno do anel é emitida como energia em diferentes comprimentos de onda, dependendo do tipo de experimento. A radiação de raios-X sincrotron tem um fluxo significativamente alto (tipicamente cerca de 10^{12} fótons/s) permitindo a obtenção de padrões de difração em milissegundos. Como tal, as fontes de raios-X baseadas em sincrotron podem ser usadas para experimentos de alto rendimento (DONG & BOYD, 2011).

Após a incidência dos raios-X, a radiação espalhada pela amostra é registrada em um detector bidimensional cujo tamanho e posição são fatores-chave que determinam o ângulo mínimo medido em um experimento. O padrão de espalhamento do solvente da amostra analisada também é obtido e subtraído do espalhamento da amostra em solução, deixando apenas o sinal das partículas de interesse (KIKHNEY & SVERGUN, 2015).

Devido às orientações aleatórias das partículas em solução, o padrão de espalhamento é isotrópico e, portanto, pode ser integrado radialmente para fornecer uma função de espalhamento unidimensional. A intensidade de luz espalhada (I) tem uma dependência angular (q), onde q é a amplitude do vetor de espalhamento, definido pela equação 1 a seguir, sendo λ o comprimento de onda da radiação incidente e θ metade do ângulo de espalhamento (KIKHNEY & SVERGUN, 2015).

$$Q = \frac{4\pi \operatorname{sen} \Theta}{\lambda} \quad (1)$$

Os padrões de espalhamento obtidos são plotados como curvas unidimensionais I (q) e para sua interpretação em termos da estrutura das partículas analisadas são ajustados às curvas modelos matemáticos adequados ao sistema estudado.

A caracterização estrutural pela técnica de SAXS, com uma adequada modelagem e ajuste de dados, pode fornecer informações de extrema importância para compreensão das propriedades físicas e químicas dos sistemas estudados. Para o caso de micelas poliméricas essa técnica permite a determinação de parâmetros como: diâmetro, forma, número de agregação, localização do fármaco, raio do núcleo, além da conformação, densidade e interação das cadeias poliméricas, mostrando-se uma abordagem extremamente sensível para estudar a organização estrutural de nanocarreadores e elucidar as diferentes interações entre seus constituintes (PEDERSEN *et al.*, 2003; SATO *et al.*, 2007; AKIBA *et al.*, 2010; SANADA *et al.*, 2010; SANADA *et al.*, 2013; SHIRAISHI *et al.*, 2015; ODA *et al.*, 2020a).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Obter micelas mistas de DSPE-PEG_{2000} e PCL_{5000}-PEG_{5000} com características adequadas para uso como plataforma para carrear PTX e avaliar possíveis melhorias em suas características físico-químicas com relação ao sistema de micelas convencional de DSPE-PEG_{2000}.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar formulações de micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1 contendo PTX em diferentes concentrações.

- Realizar a caracterização físico-química das formulações quanto ao diâmetro médio, potencial zeta e teor de encapsulação.

- Avaliar a organização estrutural das formulações por meio da técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) investigando o efeito da presença do PCL_{5000}-PEG_{5000} no sistema.

- Caracterizar as formulações por meio de análise térmica investigando o efeito da presença do PCL_{5000}-PEG_{5000} no sistema.

- Avaliar a estabilidade físico-química das formulações em solução aquosa ao longo de 60 dias em termos de alterações no diâmetro médio, potencial zeta e teor de encapsulação.

- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* da melhor formulação de micelas mistas obtida e comparar com o perfil de liberação de uma formulação de micelas de DSPE-PEG_{2000} e de uma formulação similar ao Taxol® (dispersão de CrEL/EtOH/PTX).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O componente 1,2-diestearoil-sn-glicero-2-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietileno-glicol) (DSPE-PEG_{2000}) foi adquirido da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha) e o componente polietilenoglicol metil éter-poli(ε-caprolactona) (PCL_{5000}-PEG_{5000}) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). O PTX foi fornecido pela Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Brasil) com pureza maior que 97%. Cloreto de sódio P.A. foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Salicilato de Sódio P.A. foi adquirido da Dinâmica (Indaiatuba, Brasil). Água ultrapura foi obtida utilizando um sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, EUA). Cremophor EL foi adquirido da Sigma-Aldrich Co (Missouri, USA). Todos os demais reagentes utilizados apresentavam grau analítico ou superior.

4.1 PREPARO DA FORMULAÇÃO

As formulações de micelas poliméricas foram preparadas pelo método adaptado de evaporação do solvente anteriormente descrito por Oda *et al.* (2017). As formulações de micelas mistas contendo ou não PTX eram compostas por DSPE-PEG_{2000} e PCL_{5000}-PEG_{5000} nas respectivas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1. Previamente foram preparadas em clorofórmio soluções estoque de DSPE-PEG_{2000} a 10 mmol/L, PCL_{5000}-PEG_{5000} a 0,1 mmol/L e PTX a 1 mg/mL.

Para o preparo de 1 mL da formulação de micelas mistas não carregadas, inicialmente, uma alíquota de 0,5 mL (para a formulação 99,5:0,5) ou 1 mL (para a formulação 99:1) da solução estoque de PCL_{5000}-PEG_{5000} foi transferida para um balão de fundo redondo de volume igual a 50 mL e o solvente foi evaporado em um rotaevaporador Buchi Labortechnik AG CH-9233, modelo R-210, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça), utilizando as seguintes condições: rotação de 150 rpm, banho-maria à 55 ºC e pressão de 131 mbar, por cerca de 45 minutos.

Após obtenção de um filme fino e uniforme na parede do balão foi adicionada uma alíquota de 0,995 mL (para a formulação 99,5:0,5) ou 0,990 mL (para a formulação 99:1) da solução estoque de DSPE-PEG_{2000}. Para o preparo das formulações carregadas com o fármaco, adicionou-se, juntamente à alíquota da solução estoque de DSPE-PEG_{2000} 0,6 mL, 1 mL ou 1,4 mL da solução estoque de PTX a depender da formulação a ser produzida. Os componentes líquidos adicionados foram agitados rapidamente em vórtex de maneira a solubilizar o filme de PCL_{5000}-PEG_{5000} formado anteriormente. A preparação foi novamente levada ao

rotaevaporador, nas mesmas condições descritas anteriormente, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos até que todo o solvente fosse evaporado.

Após se obter um filme fino e uniforme na parede do balão, a preparação foi hidratada com 1,0 mL de solução previamente aquecida a 55 ºC de NaCl 0,9% (p/v) em um banho-maria na mesma temperatura, o filme foi hidratado completamente girando-se o balão lentamente. O filme hidratado foi mantido no banho-maria a 55 ºC por 5 minutos e posteriormente foi submetido à agitação utilizando um vórtex por 3 minutos de forma a garantir que fosse completamente desprendido do balão.

O conteúdo foi resfriado naturalmente até a temperatura ambiente e o conteúdo do balão foi recolhido com seringa de 1 mL e transferido para um microtubo. Uma amostra de 40 µL foi coletada para doseamento do teor total de fármaco. Posteriormente, o conteúdo restante do microtubo foi purificado à temperatura ambiente por centrifugação a 6500 g em centrífuga Thermo Scientific Espresso, modelo 11210801 (França) por 15 minutos, o sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana de poro 0,22 µm para remoção do PTX não encapsulado.

Finalmente, a formulação purificada obtida foi armazenada em um microtubo na geladeira a 4 ºC.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.2.1 DIÂMETRO MÉDIO

O diâmetro hidrodinâmico médio e a distribuição de tamanho foram avaliados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), a 25 °C, a um ângulo de 90º utilizando o instrumento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra).

As amostras foram preparadas utilizando 50 µL da formulação previamente purificada em filtro de 0,22 µm e posteriormente diluídas quatro vezes em solução de NaCl 0,9% (p/v) previamente filtrada em membrana de poro 0,45 µm. Posteriormente, as amostras foram transferidas para uma microcubeta de poliestireno para realização da análise**.**

As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão.

4.2.2 POTENCIAL ZETA

O potencial zeta foi determinado pela técnica de DLS associada à mobilidade eletroforética, a 25 °C, em um ângulo de 90°, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra).

As amostras de formulação previamente purificadas em filtro de 0,22 µm foram diluídas vinte vezes em solução NaCl 0,9% (p/v) previamente filtrada em membrana de poro 0,45 µm. Posteriormente, as amostras foram transferidas para uma célula capilar DTS1070 para realização da análise.

As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão.

4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE PTX

A quantificação do teor de PTX nas formulações foi avaliada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um método analítico previamente validado conforme descrito por Barbosa *et al.* (2015).

As condições cromatográficas utilizadas foram: sistema eluente constituído de acetonitrila e água ultrapura, na proporção de 55:45 (v/v), respectivamente; coluna de fase reversa Lichrospher®, C18, 5 µm, 4 mm x 25 cm (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha); fluxo isocrático de 1,2 mL/min; temperatura de 25 ºC; volume de injeção igual a 10 µL. A absorbância do eluato foi monitorada a 227 nm. Foi utilizado o equipamento modelo Agilent 1260 Infinity Quaternary LC (Alemanha).

A quantidade de fármaco foi determinada nas formulações antes e após purificação (centrifugação e filtração em membrana de poro de 0,22 µm) e a eficiência de encapsulação foi obtida pela razão da quantidade de fármaco presente na amostra purificada e não purificada.

Para o preparo das amostras foi utilizado álcool isopropílico na proporção de 4:1 (v/v) em relação ao volume de amostra. Esse procedimento foi realizado a fim de possibilitar o rompimento das micelas para liberação do PTX a ser quantificado. Em seguida, a preparação foi diluída com o sistema eluente, sendo posteriormente filtrada em membrana de poro 0,45 µm. Finalmente, as amostras foram injetadas no cromatógrafo para análise.

A equação da reta utilizada para relacionar a área sob a curva do pico referente ao PTX obtido no cromatograma e a concentração de fármaco na amostra foi $y = 2136000x - 38263$, onde y é a área sob a curva obtida e x é a concentração de PTX (µg/mL).

As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão.

4.3 CARACTERIZAÇÃO POR ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO

A análise foi executada utilizando um colimador de feixe de comprimento de onda fixo igual a 1,57 Å (8 keV) e um detector 2D Pilatus 300K, posicionado a uma distância de 1,5 m da amostra. O intervalo de q analisado foi de 0,05 nm^{-1} a 3 nm^{-1}. Esse experimento foi realizado na linha de luz SAXS-1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, São Paulo).

Todas as amostras foram analisadas à temperatura ambiente e injetadas diretamente em uma célula com temperatura controlada constituída de duas janelas de mica separadas por 1 mm, os experimentos foram realizados sob vácuo.

As imagens bidimensionais obtidas no detector foram normalizadas pela intensidade do feixe de entrada e absorção da amostra. As contribuições de espalhamento de fundo da câmara de amostra (mica) e solvente (solução NaCl 0,9% p/v) foram subtraídas, e finalmente os dados obtidos foram convertidos em perfis de intensidade em função do vetor de espalhamento I(q) usando o software Fit2D.

Os padrões de espalhamento obtidos foram ajustados utilizando um modelo matemático baseado na intensidade de espalhamento de micelas poliméricas esféricas de copolímeros dibloco propostos por Pedersen & Gerstenberg (1996). Maiores detalhes da modelagem utilizada para os sistemas de micelas poliméricas desenvolvidos anteriormente neste grupo de pesquisa podem ser encontrados no material suplementar da publicação de Oda *et al.* (2020a).

4.4 ANÁLISE TÉRMICA

O comportamento térmico dos componentes matéria prima DSPE-PEG_{2000} e PCL_{5000}-PEG_{5000} e das formulações de micelas não carregadas de DSPE-PEG_{2000}, micelas mistas não carregadas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} (99,5:0,5) e micelas mistas não carregadas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} (99:1) foi avaliado por meio de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) e Termogravimetria (TGA, do inglês *Thermogravimetric Analysis*)/Análise Térmica Diferencial (DTA, *Differential Thermal Analysis*) simultâneas.

Foi feita Termogravimetria Derivada (DTGA, do inglês *Derivative Thermogravimetric Analysis*) em 1ª ordem por meio do *software* Ta60 do equipamento a partir das curvas TGA para confirmação dos eventos térmicos.

Para realização desta análise as formulações foram previamente liofilizadas. Alíquotas de 1 mL das formulações foram transferidas para frascos crioresistentes. Os frascos foram congelados em nitrogênio líquido por 5 minutos e levados ao liofilizador modelo iModulyolyophilizer (Thermo Electron Corporation, USA) em um ciclo de 24 horas.

As curvas DSC foram obtidas na célula DSC60 Shimadzu®, calibrado com Índio (fusão: 156,63 ºC - T_{onset}; ΔH_{fus}= 28,45 $J.g^{-1}$) sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL/min, razão de aquecimento de 10 ºC por minuto, de 30 a 400 ºC, cadinho de alumínio fechado e massa de amostra de 1,5 mg.

As curvas TG/DTA foram obtidas na termobalança DTG60 Shimadzu® com razão de aquecimento de 10 ºC por minuto, de 30 a 600 ºC, atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, cadinho de alumina e massa de amostra de 2,5 mg.

4.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE

A estabilidade das formulações em meio aquoso foi estudada por meio da avaliação de alterações físico-químicas nos parâmetros diâmetro médio, potencial zeta e teor de fármaco retido.

As formulações foram armazenadas a 4 °C durante todo o período do estudo. As avaliações foram feitas 1, 7, 15, 30 e 60 dias após o preparo das formulações. A cada dia avaliado os lotes das formulações foram purificados em filtro de 0,22 µm e os resultados foram comparados àqueles obtidos imediatamente após o preparo (dia 0).

As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão.

4.6 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Perfis de liberação *in vitro* das formulações de micelas de DSPE-PEG_{2000} (0,6 mg/mL de PTX), micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} (1 mg/mL de PTX) na razão molar de 99,5:0,5 e dispersão de CrEL/EtOH (1 mg/mL de PTX) foram investigados em meio aquoso contendo salicilato de sódio 1 mol/L conforme método descrito por Cho *et al.* (2004).

A solubilidade do PTX nesse meio de diluição foi verificada por meio de incubação de excesso de PTX em 2 mL de solução de salicilato de sódio 1 mol/L sob agitação (120 rpm) a 37 ºC, após os tempos de 24 horas e 72 horas foram coletadas alíquotas de 0,5 mL, as quais foram posteriormente filtradas em membrana de 0,22 µm para remoção do fármaco precipitado.

A concentração de PTX solubilizado foi obtida por CLAE conforme método descrito anteriormente.

Para o início do estudo de liberação, adicionou-se em membranas de diálise (MWCO = 14000 Da, Sigma Aldrich Co, Missouri, USA), previamente amarradas em uma das extremidades, 0,5 mL de cada formulação (preparadas imediatamente antes do experimento).

As membranas foram seladas amarrando-se a outra extremidade e posteriormente foram introduzidas em frascos de vidro âmbar contendo 50 mL de solução de salicilato de sódio 1 mol/L preparada em água ultrapura. Os fracos tampados foram levados a um agitador IKA® modelo KS 4000i Control (Werke, Alemanha) a 120 rpm e mantidos a uma temperatura de a 37 ºC.

Em intervalos de tempo predeterminados (15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 10h, 24h e 48h) alíquotas de 0,5 mL foram retiradas dos frascos e imediatamente substituídas por igual volume de meio (salicilato de sódio 1 mol/L a 37 ºC). Este estudo foi conduzido por 48 horas e a concentração de PTX liberado ao longo do tempo foi determinada por CLAE conforme método descrito anteriormente.

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão.

Para investigar a cinética de liberação, alguns modelos matemáticos foram ajustados de acordo com as equações 2 a 5 descritas a seguir (HIGUCHI, 1961; KORSMEYER & PEPPAS, 1981; KORSMEYER *et al.*, 1983; BOURNE, 2002). O melhor modelo foi definido de acordo com o ajuste linear dos dados experimentais considerando-se como fator decisivo o maior coeficiente de determinação (R^2).

Ordem-zero: $Mt/M\infty = Kt$ (2)

Primeira ordem: $Mt/M\infty = 1 - e^{-Kt}$ (3)

Higuchi: $Mt/M\infty = K\sqrt{t}$ (4)

Korsmeyer-Peppas: $Mt/M\infty = Kt^n$ (5)

sendo $Mt/M\infty$ a fração de fármaco liberado, K as respectivas constates cinéticas de cada modelo e n, para o modelo Korsmeyer-Peppas, o expoente de liberação, indicativo do

mecanismo de liberação do fármaco, para o qual: n=0,5 indica um mecanismo de difusão Fickiana, 0,5<n<1,0 indica um mecanismo de difusão por transporte anômalo, n=1 indica um mecanismo de difusão por transporte caso II e n>1,0 indica um mecanismo de difusão por transporte super-caso II.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos com relação à média ± desvio padrão. A normalidade e homoscedasticidade foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e teste Brown-Forsythe, respectivamente. Variáveis sem distribuição normal foram transformadas, quando necessário, segundo as equações y = (variável^2) ou y = (1/variável). Diferenças entre os grupos foram avaliadas pelos testes t-Student ou *one-way* ANOVA seguida de um pós-teste de Tukey. Foi adotado o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$). Para todas as análises foi utilizado o *software* GraphPad Prism 8.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

O principal parâmetro a ser inicialmente definido para a obtenção de formulações micelares é a CMC, concentração a partir da qual é iniciada a associação das unidades anfifílicas em solução.

Neste grupo de pesquisa, Oda *et al.* (2017) obtiveram para micelas de DSPE-PEG_{2000} uma CMC de 1,8 x 10^{-5} mol/L e Souza (2017) obteve para micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} na razão molar de 90:10 uma CMC de 1,9 x 10^{-5} mol/L, ambas determinadas pelo método de fluorescência utilizando pireno.

O baixo valor de CMC dos sistemas constituídos por DSPE-PEG_{2000} (geralmente em torno de 1 µmol/L) está relacionado à forte força motriz hidrofóbica para auto-organização dos unímeros originada da presença de duas cadeias acíclicas saturadas de 18 carbonos (KASTANTIN *et al.*, 2009; SAWANT & TORCHILIN, 2010).

Adicionalmente, o baixo valor da CMC de copolímeros em geral (cerca de 0,1 a 1 µmol/L) comparavelmente a CMC de tensoativos (cerca de 0,1 a 1 mmol/L) tem efeito positivo sobre a obtenção de formulações micelares poliméricas, uma vez que o fenômeno termodinâmico de agregação dos unímeros é favorecido (LA *et al.*, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 2002; HUSSEIN *et al.*, 2018).

Yoo *et al.* (1999) obtiveram pelo método de tensiometria superficial uma CMC de 5,0 x 10^{-6} mol/L para o copolímero PCL_{5000}-PEG_{5000} e Fairley *et al.* (2008) obtiveram pelo método de fluorescência utilizando difenil hexatrieno uma CMC de 4,6 x 10^{-6} mol/L para o copolímero PEG_{5000}-PCL_{4100}.

Dessa forma, dado o baixo valor da CMC do PCL_{5000}-PEG_{5000} e visto que não foi observada diferença importante no valor da CMC comparando-se a formulação micelar de DSPE-PEG_{2000} com aquela obtida após a inserção do PCL_{5000}-PEG_{5000} na razão molar de 10%, optou-se por não calcular a CMC das formulações preparadas neste trabalho para as quais foram utilizadas razões molares ainda menores de PCL_{5000}-PEG_{5000} (0,5% e 1,0%).

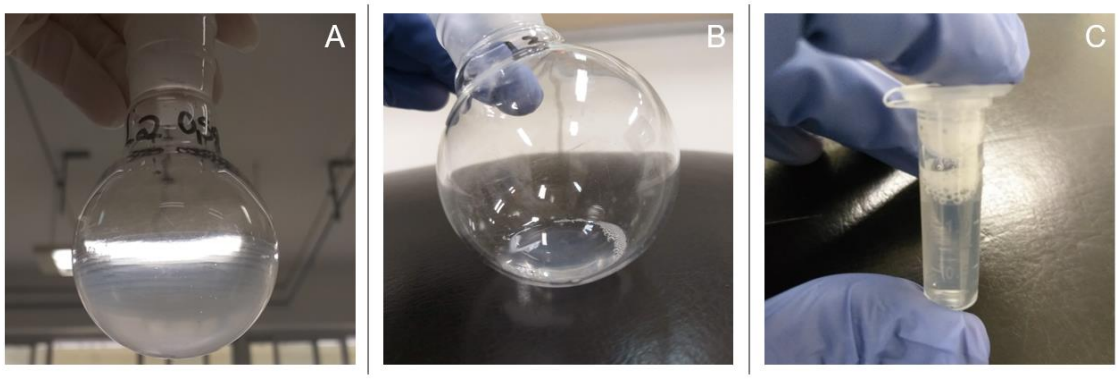
A definição da concentração total de 10 mmol/L de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} utilizada neste trabalho, cerca de 500 vezes o valor da CMC, se deu de forma a garantir a robustez dessa formulação após diluição. Essa definição é importante uma vez que tanto os critérios físico-químicos quanto os critérios biológicos devem ser considerados para o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos. Após injeção intravenosa, por exemplo,

considerando-se especialmente a volemia humana, os sistemas micelares são sujeitos aos efeitos de uma severa diluição, o que pode afetar substancialmente a estabilidade desses sistemas levando ao rompimento precoce das micelas e ao extravasamento do fármaco encapsulado fora da região de interesse (KULTHE *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2018). A formulação micelar comercial Genexol®-PM, por exemplo, apresenta uma concentração polimérica cerca de 700 vezes o valor da sua CMC de aproximadamente 2,8 x 10^{-5} mol/L (KIM *et al.*, 2001; FAN *et al.*, 2015).

Após a definição da concentração total dos componentes, as quantidades necessárias das soluções estoque, previamente preparadas em clorofórmio, foram transferidas para um balão de fundo redondo e levadas ao rotaevaporador. A obtenção das formulações de micelas mistas pelo método de evaporação do solvente seguido da hidratação do filme foi, em termos práticos, um processo de fácil execução na escala laboratorial proposta neste trabalho.

Esse método é um dos mais frequentemente utilizados para obtenção de micelas poliméricas quando os seus constituintes são solúveis em solventes orgânicos voláteis e quando existe um balanço hidrofílico-hidrofóbico adequado para facilitar a obtenção de um filme hidratado (SEO & LEE, 2011; PHAM *et al.*, 2020). Todavia, é importante destacar os desafios relacionados ao escalonamento de processos que envolvem a utilização de solventes orgânicos como o clorofórmio que, apesar de apresentarem viabilidade para produção em larga escala, envolvem o uso de equipamentos de alto custo, além da necessidade de análises para rastreamento de solventes residuais (GRODOWSKA & PARCZEWSKI, 2010; PHAM *et al.*, 2020). A Figura 15 a seguir mostra etapas do processo de produção para uma das formulações preparadas.

Figura 15 – Etapas do processo de preparo de uma formulação de micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000}: (A) filme obtido pelo método de evaporação do solvente, (B) produto obtido após hidratação do filme com solução de NaCl 0,9% (p/v), (C) formulação obtida após processo de purificação.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O filme formado apresentou aspecto de distribuição uniforme na superfície do balão e coloração esbranquiçada (Figura 15A). Após a hidratação com solução de NaCl 0,9% (p/v) foi obtida a formulação em estado líquido com característica turva e sem precipitados visíveis (Figura 15B). Finalmente, a formulação purificada apresentou aspecto límpido (Figura 15C).

Ao total foram preparadas oito formulações variando-se a razão molar de PCL_{5000}:PEG_{5000} e a concentração de PTX. As amostras dos produtos obtidos após o processo de purificação foram caracterizadas quanto aos parâmetros: diâmetro hidrodinâmico médio, potencial zeta, teor de PTX encapsulado e eficiência de encapsulação. Os resultados estão apresentados na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos obtidos para as formulações de micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1.

Concentração teórica de PTX (mg/mL)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial Zeta (mV)	Teor de PTX (mg/mL)	Eficiência de encapsulação (%)
		99,5:0,5		
-	10,8 ± 1,4	-4,3 ± 1,5	-	-
0,6	11,9 ± 0,7	-5,3 ± 0,6^{d,*}	0,4 ± 0,1 ^{a,c,d}	72,1 ± 7,8^{a}
1,0	11,0 ± 0,3	-3,2 ± 1,3	0,9 ± 0,1 ^{a,b}	91,1 ± 3,6^{a,d}
1,4	11,8 ± 2,5	-2,5 ± 0,2^{b}	0,9 ± 0,1 ^{a,b}	63,9 ± 13,5^{a,c}
		99:1		
-	9,2 ± 1,9	-5,0 ± 1,4	-	-
0,6	11,0 ± 1,3	-7,2 ± 0,4^{c,d,*}	0,4 ± 0,1^{a,c,d}	79,7 ± 15,3^{a}
1,0	10,3 ± 0,8	-3,1 ± 0,2^{b}	0,8 ± 0,1^{a,b}	87,3 ± 5,1^{a,d}
1,4	10,1 ± 2,0	-2,8 ± 0,6^{a,b}	0,9 ± 0,2^{a,b}	64,4 ± 11,1^{a,c}

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

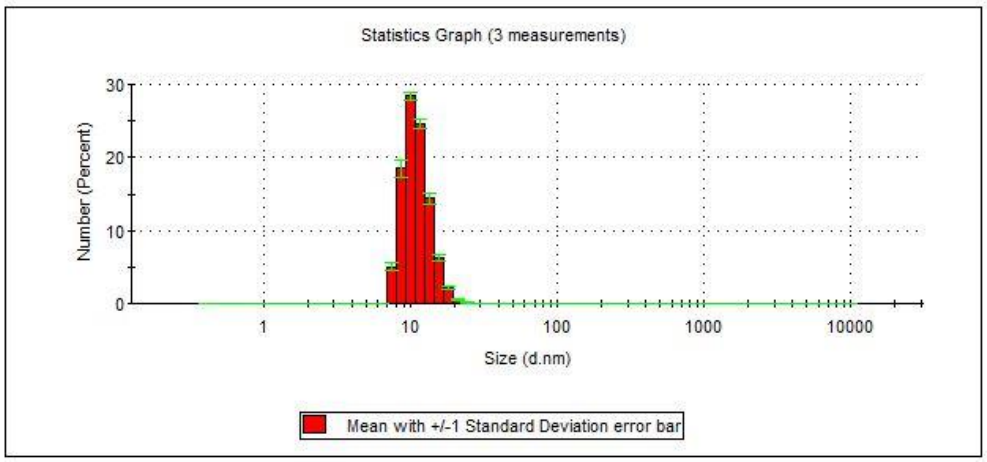
Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3). As letras a,b,c e d representam, para a mesma razão molar de PCL_{5000}:PEG_{5000}, diferença significativa do parâmetro quando comparado às formulações contendo 0 mg/mL, 0,6 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,4 mg/mL de PTX, respectivamente, determinada por ANOVA *one-way* seguida do pós teste de Tukey. O asterisco representa diferença significativa quando comparadas entre si as formulações de razão molar 99,5:0,5 e 99:1, fixada a concentração teórica de PTX, determinada por teste t-Student. O nível de significância foi considerado para valores de $p \leq 0,05$.

O valor obtido para o diâmetro hidrodinâmico das formulações foi de, em média, 10,7 ± 1,4 nm com distribuição de tamanho estreita, como mostra a Figura 16. Não foi observada diferença significativa na avaliação desse parâmetro para nenhuma das formulações.

Neste mesmo grupo de pesquisa, Oda *et al.* (2020b) obtiveram valor de diâmetro hidrodinâmico de 10,7 ± 0,8 nm para micelas de DSPE-PEG_{2000} contendo 0,6 mg/mL de PTX.

Outros trabalhos na literatura reportaram a faixa de 7 a 35 nm para micelas de DSPE-PEG_{2000} (LUKYANOV & TORCHILIN, 2004; DABHOLKAR *et al.*, 2006; MUSACCHIO *et al.*, 2009; KASTANTIN *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2015).

Figura 16 – Distribuição de tamanho obtida por DLS (análise de número) para amostra de formulação de micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} na razão molar 99:1.



Fonte: Captura de tela do software *Zetasizer Nano* ZS90, elaborada pelo autor (2022).

Portanto, foi possível observar que tanto a variação da razão molar de PCL_{5000}-PEG_{5000} quanto a variação na concentração do fármaco adicionado não foram capazes de promover alterações significativas no diâmetro médio das micelas mistas.

É amplamente conhecido que no desenvolvimento de nanoformulações, especialmente para aplicação antitumoral para a qual se destaca o efeito EPR, o tamanho desempenha papel fundamental na determinação de fatores como biodistribuição, penetração tumoral, internalização celular, depuração plasmática e dos tecidos, e, portanto, tem impacto significativo na eficácia terapêutica (JIANG *et al.*, 2008; PETROS *et al.*, 2010; CABRAL *et al.*, 2011).

Estudos recentes apontaram que nanopartículas com faixas de tamanhos próximo ou menor que 50 nm exibiram desempenho aprimorado *in vivo* com internalização celular mais eficiente, maior penetração nos tecidos e maior inibição do tumor (CABRAL *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2014).

Nesse sentido, o tamanho reduzido das micelas obtidas neste estudo mostrou-se favorável para um sistema carreador de um fármaco de aplicação antitumoral, o que é relevante para futuros ensaios biológicos, especialmente tratando-se de administração intravenosa. Utilizando um modelo experimental *in vivo* de tumor de mama murino, Oda *et al.* (2017) observaram o efeito de circulação prolongada e acumulação preferencial na região tumoral para um sistema de tamanho análogo de micelas de DSPE-PEG_{2000}

A caracterização físico-química das formulações obtidas prosseguiu com a avaliação do parâmetro potencial zeta. O valor médio obtido para os sistemas micelares mistos foi de -4,2 ± 1,7 mV.

Oda *et al.* (2020b) obtiveram para um sistema de micelas de DSPE-PEG_{2000} o valor de -3,0 ± 0,4 mV. Foram reportados na literatura alguns estudos para sistemas de micelas de DSPE-PEG_{2000} valores de potencial zeta na faixa de -7 mV a -18 mV (DABHOLKAR *et al.*, 2006; MUSACCHIO *et al.*; 2009; YANG *et al.*, 2015).

O baixo valor de potencial zeta geralmente obtido para sistemas de partículas peguiladas tem sido relacionado na literatura ao aumento da espessura da camada aquosa ao redor dessas partículas. A presença de cadeias de PEG na superfície move o plano de cisalhamento hidrodinâmico para longe do plano de carga, reduzindo, assim, a mobilidade eletroforética, o que resulta em um potencial zeta geralmente próximo da neutralidade (STOLNIK *et al.*, 1994; MENG *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2005). Além disso, também foi reportada na literatura a relação entre o aumento do tamanho das cadeias de PEG na superfície e a diminuição mais expressiva do potencial zeta (SHI *et al.*, 2005).

Esse resultado também contribuiu para melhor compreensão da potencialidade biológica das formulações preparadas.

Os baixos valores de potencial zeta, em módulo, observados para partículas peguiladas foram relacionados na literatura à redução da ativação e agregação plaquetária, o que tem efeito importante na redução da possibilidade de trombose para nanopartículas de tamanho muito reduzido (FUENTES *et al.*, 2016).

Além disso, devido à carga negativa da superfície endotelial vascular luminal, nanosistemas com cargas superficiais positivas ou polímeros catiônicos geralmente são facilmente ligados pela superfície das células endoteliais vasculares, o que resulta em uma rápida diminuição da concentração plasmática, uma AUC mais baixa e consequente redução no acúmulo de fármacos em tumores via efeito EPR. Em contraste, espera-se que nanopartículas carregadas negativamente tenham um tempo de meia vida no plasma mais longo, aumentando, assim, a possibilidade de captação pelo sistema mononuclear fagocitário. Nesse sentido, idealmente, o potencial zeta de nanoformulações deve se encontrar próximo da neutralidade ou levemente negativo (CAMPBELL *et al.*, 2002; FANG *et al.*, 2020).

Conforme mostrado na Tabela 2, com relação a variação na razão molar de PCL_{5000}-PEG_{5000} de 0,5% para 1,0%, foi observada diferença significativa entre as formulações preparadas apenas para aquela de concentração teórica de PTX igual a 0,6 mg/mL. Por outro lado, variando-se o teor de fármaco para a mesma razão molar de PCL_{5000}-$PEG_{5000,}$ foram observadas diferenças significativas para cinco formulações, embora não tenha sido possível identificar relação de tendência entre o aumento do teor de fármaco e a alteração no valor do potencial zeta.

Contudo, ainda que tenham sido observadas essas diferenças, devido à baixa ordem de grandeza do potencial zeta obtido (< -10 mV) essas diferenças não foram consideradas relevantes de modo a permitir implicações acerca da estabilidade ou potencialidade de uma formulação com relação a outra. Isso porque o limiar comumente aceito para o valor do potencial zeta de suspensões aquosas estáveis (sem agregação de partículas) é ±30 mV, valor a partir do qual ocorre o fenômeno de estabilização eletrostática por meio da repulsão entre as partículas (CLOGSTON & PATRI, 2011).

Adicionalmente, no caso de nanopartículas peguiladas, o mecanismo de estabilização ocorre via impedimento estérico. O revestimento com a casca de PEG, além de prevenir agregação entre as partículas, também desempenha papel fundamental em nível biológico com relação a interação com os componentes do sangue. A redução da ligação dessas nanopartículas com proteínas plasmáticas por meio do fenômeno de estabilização estérica evita a interação com as opsoninas e retarda sua rápida captura pelo sistema mononuclear fagocitário (KOUCHAKZADEH *et al.*, 2010; HONARY & ZAHIR, 2013; YANG *et al.*, 2015; HWANG *et al.*, 2020). Portanto, foi possível constatar que a adequação do parâmetro potencial zeta também apontou para a potencialidade das formulações preparadas enquanto um sistema carreador de PTX.

Finalmente, as formulações foram caracterizadas quanto ao teor de fármaco encapsulado e quanto a eficiência de encapsulação. Conforme mostrado na Tabela 2, fixada a concentração de fármaco, não foram identificadas diferenças significativas entre as formulações com relação a variação da razão molar de PCL_{5000}-PEG_{5000} de 0,5% para 1,0%. Todavia, diferenças significativas foram observadas com relação ao incremento da concentração de PTX adicionado. As maiores eficiências de encapsulação foram encontradas para as formulações de concentração teórica de PTX de 1,0 mg/mL (91,1 ± 3,6% para a formulação contendo 0,5% de PCL_{5000}-PEG_{5000} e 87,3 ± 5,1% para a formulação contendo 1,0% de PCL_{5000}-PEG_{5000}).

As eficiências de encapsulação obtidas para as formulações de concentração teórica de PTX igual a 0,6 mg/mL e 1,4 mg/mL ficaram abaixo do esperado e com desvios importantes com relação à média. Possivelmente, isso está relacionado à menor quantidade preparada para essas formulações (0,3 mL), o que pode ter levado a erros experimentais na manipulação de um menor volume. Para a formulação de 1,0 mg/mL foi preparado um volume maior (1,0 mL).

Oda *et al.* (2020b) obtiveram para micelas de DSPE-PEG_{2000} (0,6 mg/mL de PTX) eficiência de encapsulação elevada (98±5%).

A importância de se manter uma alta eficiência de encapsulação está relacionada, especialmente, à qualidade do processo de obtenção da formulação, é desejável que esse seja

econômico e que a perda de fármaco seja minimizada (HWANG *et al.*, 2020). Todavia, é interessante que esse parâmetro seja analisado junto à quantidade de fármaco efetivamente encapsulada no sistema, uma vez que o aumento nessa quantidade está relacionado à maior a potencialidade biológica da formulação (SARISOZEN *et al.*, 2012).

Foi possível observar que a inserção do PCL_{5000}-PEG_{5000} nas formulações não representou efeito de melhoria na eficiência de encapsulação de PTX quando comparada ao sistema de DSPE-PEG_{2000} desenvolvido por Oda *et al.* (2020b), todavia, foi observado ganho com relação a capacidade carreadora para os sistemas micelares mistos de 1 mg/mL de PTX.

Esse parâmetro foi obtido por meio da razão entre a massa média de fármaco encapsulado (formulações de 1mg/mL de PTX) e a massa total do sistema (fármaco e polímeros), os resultados obtidos neste estudo para essas duas formulações e aqueles obtidos em outros trabalhos nos quais também foram desenvolvidos sistemas micelares poliméricos são mostrados na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3 – Capacidade carreadora de PTX e tamanho reportados para alguns sistemas micelares poliméricos.

Sistema micelar	Capacidade carreadora (m/m%)	Tamanho (nm)	Referência
DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} (99,5:0,5)	3,1%	11 nm	-
DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} (99:1)	2,7%	10 nm	-
DSPE-PEG_{2000}	2,1%	11 nm	Oda *et al.* (2020b)
DSPE-PEG_{2000}	1,5%	7 a 17 nm	Gao *et al.* (2002)
DSPE-PEG_{2000}:EPC (1:4)	4,0%	15 a 60 nm	Gao *et al.* (2003)
DSPE-PEG_{2000}	1,2%	15 nm	Dabolkhar *et al.* (2006)
DSPE-PEG_{2000}:TPGS (1:1)	3,5%	15 nm	Dabolkhar *et al.* (2006)

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Foi reportado na literatura que, para a maioria das nanoformulações, a obtenção de uma alta capacidade carreadora é mais difícil de ser alcançada do que uma alta eficiência de encapsulação. Geralmente, a capacidade carreadora é determinada pela estrutura e propriedades físicas e químicas do material transportador e a eficiência de encapsulação é determinada pelo método de preparo e outras condições experimentais. Ainda, se a capacidade de espaço para acomodação do fármaco do material carreador é baixa, torna-se difícil obter alta capacidade

carreadora ainda que o processo de preparação mostre alta eficiência de encapsulação (ZHANG *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2017; SHEN *et al.*, 2017; TRUCILLO *et al.*, 2017).

Conforme observado na Tabela 3, o aumento da capacidade carreadora de PTX dos sistemas micelares mistos com relação àquele de DSPE-PEG_{2000} desenvolvido anteriormente neste grupo de pesquisa está de acordo com o reportado por outros autores que também observaram incremento nesse parâmetro para sistemas aos quais foram adicionados um segundo componente polimérico (GAO *et al.*, 2003; DABOLKHAR *et al.*, 2006)

A melhoria da capacidade carreadora de sistemas micelares mistos enquanto carreadores de fármacos pouco solúveis está relacionada à adição de porções contendo segmentos hidrofóbicos compatíveis e capazes de provocar maiores interações favoráveis das moléculas do fármaco com o núcleo (ATTIA *et al.*, 2011).

Esse efeito é interessante para além da otimização do processo de desenvolvimento, uma vez que uma capacidade carreadora maior aumenta a quantidade de fármaco por micela, o que, por sua vez, pode aumentar a quantidade de fármaco internalizado nas células, melhorando finalmente as propriedades terapêuticas da formulação. Isso é especialmente verdadeiro se ocorrer saturação dos processos de internalização, de modo que apenas um determinado número de micelas possa ser internalizado por unidade de tempo (WAN *et al.*, 2018; HWANG *et al.*, 2020).

No entanto, é válido destacar que a maioria das nanoformulações em estágio de desenvolvimento pré-clínico conhecidas apresentam capacidades carreadoras menores que 10%, o que está associado a uma maior quantidade de materiais carreadores associados (polímeros e outros excipientes). Para administração intravenosa, por exemplo, o uso extensivo desses materiais pode causar toxicidade sistêmica e/ou impor uma carga extra de degradação, metabolismo e excreção dos materiais para os pacientes, o que geralmente limita as futuras aplicações clínicas e aprovações por órgãos reguladores (SHEN *et al.*, 2017)

Conforme destacado anteriormente, as formulações micelares Genexol®-PM e NK105 apresentam capacidades carreadoras maiores de 16,7% e 23,1%, respectivamente (KIM *et al.*, 2001; HAMAGUCHI *et al.*, 2005). No caso da formulação NK105 os grupos carboxílicos da porção de poliaspartato foram modificados com 4-fenil-1-butanol de modo a aumentar a hidrofobicidade do núcleo e melhorar a incorporação de PTX (HAMAGUCHI *et al.*, 2005). Todavia, esse tipo de otimização não foi considerado neste trabalho.

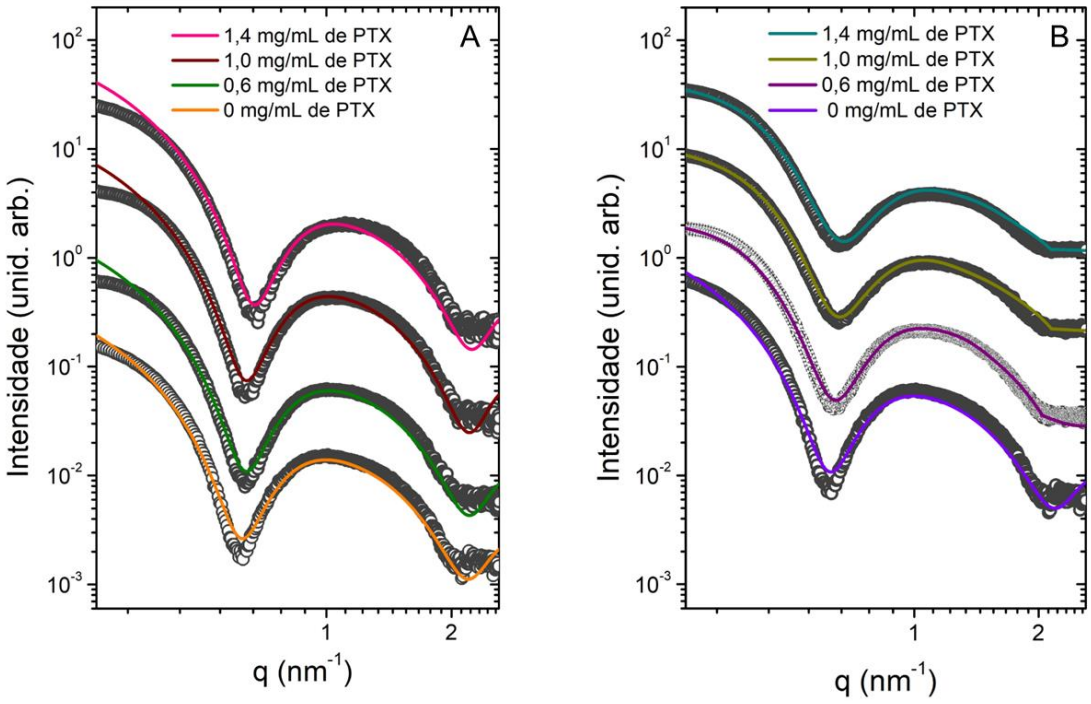
Finalmente, dentro dos objetivos delineados neste estudo, a caracterização físico-química das formulações preparadas apontou para a potencialidade desses sistemas enquanto carreadores de PTX com tamanho e potencial zeta adequados e concentração de fármaco

encapsulado e eficiência de encapsulação interessantes para condução de análises adicionais e complementares.

5.2 CARACTERIZAÇÃO POR ESPALHAMENTO DE RAIO-X A BAIXO ÂNGULO

A técnica de SAXS foi utilizada a fim de investigar detalhes da organização estrutural dos sistemas de micelas mistas. Foi avaliada a influência da presença de PCL_{5000}-PEG_{5000} bem como o efeito do incremento da concentração de PTX nas formulações. Os padrões de espalhamento obtidos para as amostras de micelas mistas em solução de NaCl 0,9% (p/v) são mostrados na Figura 17 a seguir.

Figura 17 – Padrões de espalhamento obtidos por SAXS para micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 (A) e 99:1 (B) para diferentes concentrações de PTX.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Os padrões obtidos para as diferentes formulações foram ajustados para curvas teóricas utilizando o modelo matemático descrito previamente por Oda *et al.* (2020a). Esses padrões são compatíveis com aqueles observados para micelas poliméricas de forma esferoidal com organização do tipo *core-shell*, conforme observado em estudos de Akiba *et al.* (2010) e Oda *et al.* (2020a).

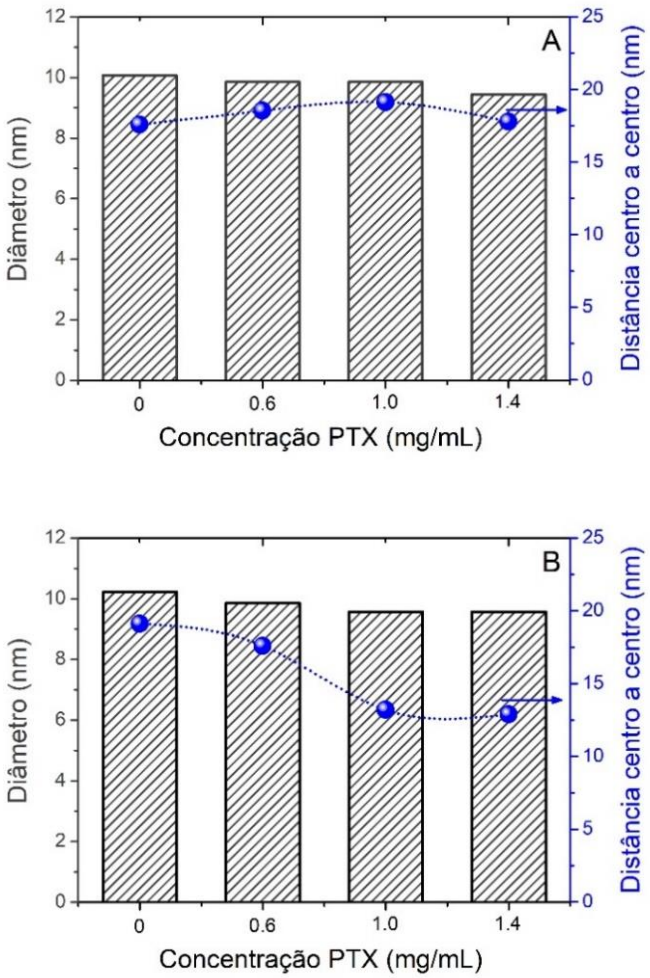
Nas formulações preparadas neste trabalho o núcleo hidrofóbico é composto pelas porções dos componentes DSPE e PCL capaz de acomodar moléculas de PTX (quando

presentes) e a casca hidrofílica é composta pelas porções de PEG com tamanhos de cadeia distintos a depender do seu componente matéria prima de origem.

A posição do primeiro mínimo local ao longo do eixo q entre 0,61 nm^{-1} e 0,68 nm^{-1} observada para todas as curvas apontou para uma faixa de distribuição de tamanho estreita e permitiu uma rápida estimativa do diâmetro das micelas por meio da relação D = 2π/q (SATO *et al.*, 2007; AKIBA *et al.*, 2010; SANADA *et al.*, 2013).

Derivações do modelo matemático ajustado permitiram a obtenção de outros parâmetros que foram capazes de complementar o entendimento de aspectos adicionais da organização dos sistemas micelares estudados. A Figura 18 a seguir apresenta dados de variação do diâmetro e do parâmetro de distância centro a centro das micelas com o incremento da concentração de PTX.

Figura 18 – Variação do diâmetro e distância centro a centro para micelas poliméricas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 (A) e 99:1 (B) para diferentes concentrações de PTX.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Para todas as formulações estudadas o diâmetro ficou próximo a 10 nm. Este valor é condizente com aquele obtido anteriormente por DLS (aproximadamente 11 nm), embora seja importante destacar que para a técnica de SAXS o diâmetro é derivado do raio de giro enquanto para a técnica de DLS o diâmetro é derivado do raio hidrodinâmico que inclui a camada de solvatação ao redor da partícula, o que tende a torná-lo ligeiramente maior.

Esse resultado reforça a inferência relatada pela técnica de DLS anteriormente, na qual a presença de PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 0,5% e 1,0%, bem como a ausência ou presença de PTX nas diferentes concentrações não alterou de forma significativa o tamanho das micelas mistas. Oda *et al.* (2020a) também obtiveram por SAXS resultados próximos a 10 nm para micelas de DSPE-PEG_{2000} não carregadas ou contendo 0,6 mg/mL de PTX.

Todavia, com relação ao parâmetro distância centro a centro, comportamentos distintos foram observados para os sistemas micelares contendo menor ou maior razão molar de PCL_{5000}-PEG_{5000} à medida em que foi alterada a concentração de fármaco.

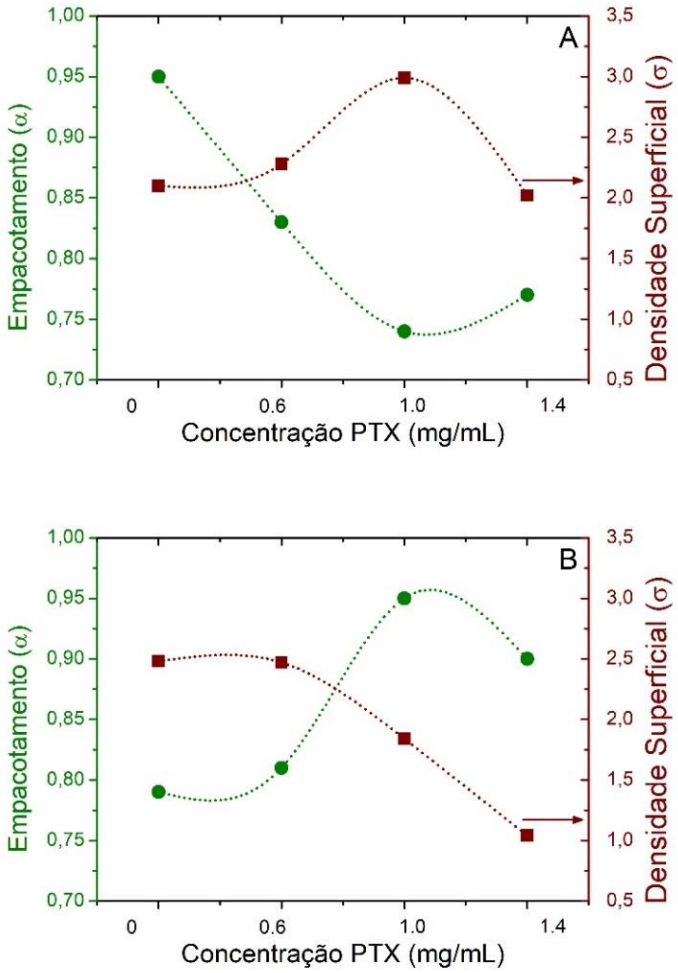
Para o sistema contendo 0,5% de PCL_{5000}-PEG_{5000} (Figura 18A), não foi observada alteração importante nesse parâmetro com o incremento da concentração de PTX, os valores variaram de 17,6 nm a 19,1 nm, ao passo que para o sistema contendo 1,0% de PCL_{5000}-PEG_{5000} (Figura 18B), observou-se uma diminuição de 19,1 nm até 12,9 nm, o que sugere um fenômeno de aproximação entre as micelas para essa formulação.

Adicionalmente, foram avaliadas as variações dos parâmetros de empacotamento (α) e densidade superficial das cadeias de PEG (σ). Os resultados obtidos são mostrados na Figura 19.

O parâmetro α está relacionado ao regime no qual as cadeias da casca se encontram, valores de $\alpha<1$ indicam que a cadeia está ocupando um espaço menor (mais compacto) do que ocuparia isoladamente, isto é, sem interagir com outras cadeias próximas. O parâmetro σ está relacionado com a razão da superfície da casca efetivamente coberta por PEG. Para $\sigma< 1$, tem-se que a interface do núcleo não é completamente coberta com cadeias da casca e essas estão isoladas entre si, para $\sigma \geq 1$, a interface do núcleo é totalmente coberta com cadeias da casca e com aumento desse parâmetro essa região se torna superlotada (*overcrowding*) até as cadeias se tornarem mais esticadas (SANADA *et al.*, 2013).

Para todas as formulações independentemente da razão molar de PCL_{5000}-PEG_{5000}, os valores do parâmetro empacotamento foram menores que 1 e os valores do parâmetro densidade superficial foram maiores que 1, indicando que as cadeias de PEG se encontravam em um regime compacto e com a região da casca completamente coberta.

Figura 19 – Variação do empacotamento (α) e densidade superficial (σ) das cadeias da casca para micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 (A) e 99:1 (B) para diferentes concentrações de PTX.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Sanada *et al.* (2013) encontraram valores de densidade de PEG também maiores que 1 (σ ~2,3) para micelas poliméricas de polietilenoglicol-poli(ácido aspártico parcialmente benzil-esterificado), denotadas PEG-P(Asp(Bzl), sugerindo um sistema com região da casca completamente recoberta por moléculas de PEG. Oda *et al.* (2020a) obtiveram resultados semelhantes (1,2< σ<2) para micelas de DSPE-PEG_{2000} carregadas com PTX 0,6 mg/mL de PTX.

Avaliando-se o incremento da concentração de fármaco, novamente foram observados comportamentos distintos para as duas formulações com relação à tendência dos parâmetros analisados.

Para o sistema contendo 0,5% de PCL_{5000}-PEG_{5000} (Figura 19A), observou-se um incremento no valor de densidade superficial de 2,1 a 3,0 até a concentração de 1,0 mg/mL de PTX, acompanhado de redução do valor do parâmetro de empacotamento de 0,9 a 0,7, o que

sugere que para esta formulação o incremento na concentração de PTX adicionado até 1,0 mg/mL contribui para um sistema com uma região da casca cada vez mais densa com cadeias de PEG em regime mais compacto, este resultado está de acordo com a tendência observada no estudo de Oda *et al.* (2020a), onde a presença de PTX no núcleo de micelas poliméricas levou ao "encolhimento" ou compactação das cadeias de PEG. Entretanto, para concentrações maiores que 1,0 mg/mL esta tendência foi invertida, o que poderia apontar um princípio de desestabilização do sistema.

Para o sistema contendo 1,0% de PCL_{5000}-PEG_{5000} (Figura 19B), observou-se um comportamento oposto, com o incremento de fármaco a densidade superficial das cadeias da casca diminuiu de 2,5 a 1,0, acompanhado de um aumento no valor do parâmetro de empacotamento de 0,8 a 0,9 sugerindo uma tendência de descobertura e descompactação das cadeias de PEG, embora estas não cheguem a atingir um regime de isolamento entre cadeias. Esse resultado sugeriu que o sistema contendo maior razão molar de PCL_{5000}-PEG_{5000} é mais suscetível a desestabilização ou desestruturação da organização estrutural à medida em que é aumentada a concentração de PTX, esse fenômeno poderia estar relacionado a uma possível competição pelo espaço interno da micela entre o fármaco e o copolímero.

É conhecido que as cadeias de PEG podem adquirir duas conformações principais dependendo da densidade das cadeias na superfície: cogumelo (*mushroom*) ou escova (*brush*). A conformação de cogumelo está geralmente associada a uma menor densidade de PEG com cadeias em um regime no qual não estão totalmente estendidas e a conformação em escova está associada a uma maior densidade com cadeias em um regime no qual estão mais esticadas (JORKERST *et al.*, 2011; SHIRAISHI *et al.*, 2015). Os dados obtidos para os sistemas estudados apontam para estruturas de conformação em escova embora, com o incremento da concentração de fármaco, sejam observadas tendências distintas no favorecimento dessa conformação e no nível de empacotamento das cadeias a depender da razão molar de PCL_{5000}-PEG_{5000}.

Sanada *et al.* (2013) reportaram em um estudo, no qual foi avaliada a influência da infiltração de moléculas hidrofóbicas no domínio de PEG, que quando as cadeias se encontram densamente compactadas na região da casca, o domínio de PEG próximo da interface possui hidrofobicidade suficiente para tolerar a presença de componentes hidrofóbicos. A magnitude do parâmetro σ próximo a 2,3 obtida nesse estudo sugeriu aos autores que o alto entrelaçamento de cadeias de PEG possibilitou que uma certa quantidade de água fosse excluída da região da casca, isso significa que, nesse caso, o ambiente das cadeias de PEG se tornou um pouco menos hidrofílico.

Nesse sentido, o incremento da densidade do domínio de PEG observado neste trabalho para o sistema contendo 0,5% de PCL_{5000}-PEG_{5000} poderia indicar que com o aumento da concentração de PTX as moléculas hidrofóbicas do fármaco poderiam estar acomodadas na interface núcleo/casca enquanto para o sistema contendo 1,0 % de PCL_{5000}-PEG_{5000} esse fenômeno não seria possível na mesma intensidade.

A fim de explorar essa observação, foi avaliada a influência do aumento da concentração de fármaco adicionado com relação aos parâmetros número de agregação (N_{agg}), raio do núcleo (R_c) e raio da casca (R_s). Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4 – Dados obtidos para os parâmetros número de agregação (Nagg), raio do núcleo (Rc) e raio da casca (Rs) para micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1 para diferentes concentrações de PTX.

Concentração de PTX (mg/mL)	**N_{agg}**	**R_c (nm)**	**R_s (nm)**
DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} (99,5:0,5)			
0	72,3	3,1	1,6
0,6	76,4	3,2	1,7
1,0	90,4	3,3	1,9
1,4	71,0	3,1	1,6
DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} (99:1)			
0	80,4	3,2	1,7
0,6	80,0	3,2	1,7
1,0	67,0	3,0	1,5
1,4	48,3	2,7	1,1

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

A diferença de comportamento entre as formulações com diferentes razões molares de PCL_{5000}-PEG_{5000} foi novamente observada. Para a formulação contendo 0,5% observou-se incremento no valor do N_{agg}, R_c, R_s até a concentração de 1,0 mg/mL de PTX, entretanto para a maior concentração de fármaco de 1,4 mg/mL, houve uma redução no valor desses parâmetros para valores próximos àqueles da micela não carregada com o fármaco. Para a formulação contendo 1,0% observou-se um comportamento distinto com uma diminuição nos valores de todos esses parâmetros a partir de 1,0 mg/mL.

O N_{agg} é definido como o número de cadeias de polímeros que se organizam para formar uma única micela. É conhecido que a energia livre interfacial entre o núcleo da micela e o solvente decrescem com o aumento do número de agregação, o que contribui para o aumento do tamanho micela (NAGARAJAN & GANESH, 1989). Isso pode ser observado na Tabela 4

com o concomitante aumento dos raios do núcleo e raio da casca da micela para a formulação contendo 0,5% de PCL_{5000}-PEG_{5000} até a concentração de 1,0 mg/mL.

Esse resultado está de acordo com o reportado por Akiba *et al.* (2010) que examinaram como a arquitetura geral de um sistema micelar foi alterada com o carregamento de um composto altamente hidrofóbico (LE540 – um retinóide hidrofóbico artificial). Foi observado que com o aumento da taxa de carregamento, o tamanho do núcleo e o número de agregação também aumentaram.

O decréscimo no valor desses parâmetros para a formulação de 0,5% de PCL_{5000}-PEG_{5000} contendo 1,4 mg/mL e para a concentração de 1,0 mg/mL e 1,4 mg/mL de PTX na formulação contendo 1,0% de PCL_{5000}-PEG_{5000} reforçou a hipótese de ocorrência de um fenômeno de princípio de desestabilização do sistema micelar para essas formulações, de forma que não seriam capazes de acomodar essas quantidades de fármaco.

Oda *et al.* (2020a) observaram comportamento semelhante para micelas contendo DSPE-PEG_{2000}, por meio da análise de variações para os parâmetros R_c e R_s foi sugerida uma concentração limite máxima de 0,6 mg/mL de PTX antes que o sistema começasse a desestabilizar com diminuição significativa do tamanho do raio do núcleo.

A partir desses resultados, aliados as maiores eficiências de encapsulação obtidas anteriormente, a concentração de 1,0 mg/mL de PTX foi selecionada para estudos posteriores.

A análise dos dados obtidos por SAXS permitiu, portanto, elucidar diferentes aspectos sobre a organização estrutural dos nanosistemas carreadores preparados, trazendo informações adicionais para este grupo de pesquisa que caracterizou pela primeira vez sistemas micelares mistos com essa técnica.

Essas análises permitiram esclarecer a influência da presença do segundo constituinte (PCL_{5000}-PEG_{5000}) adicionado e o efeito do incremento da concentração de fármaco nos diferentes sistemas uma vez que as formulações apresentaram comportamentos e tendências distintos para os vários parâmetros avaliados.

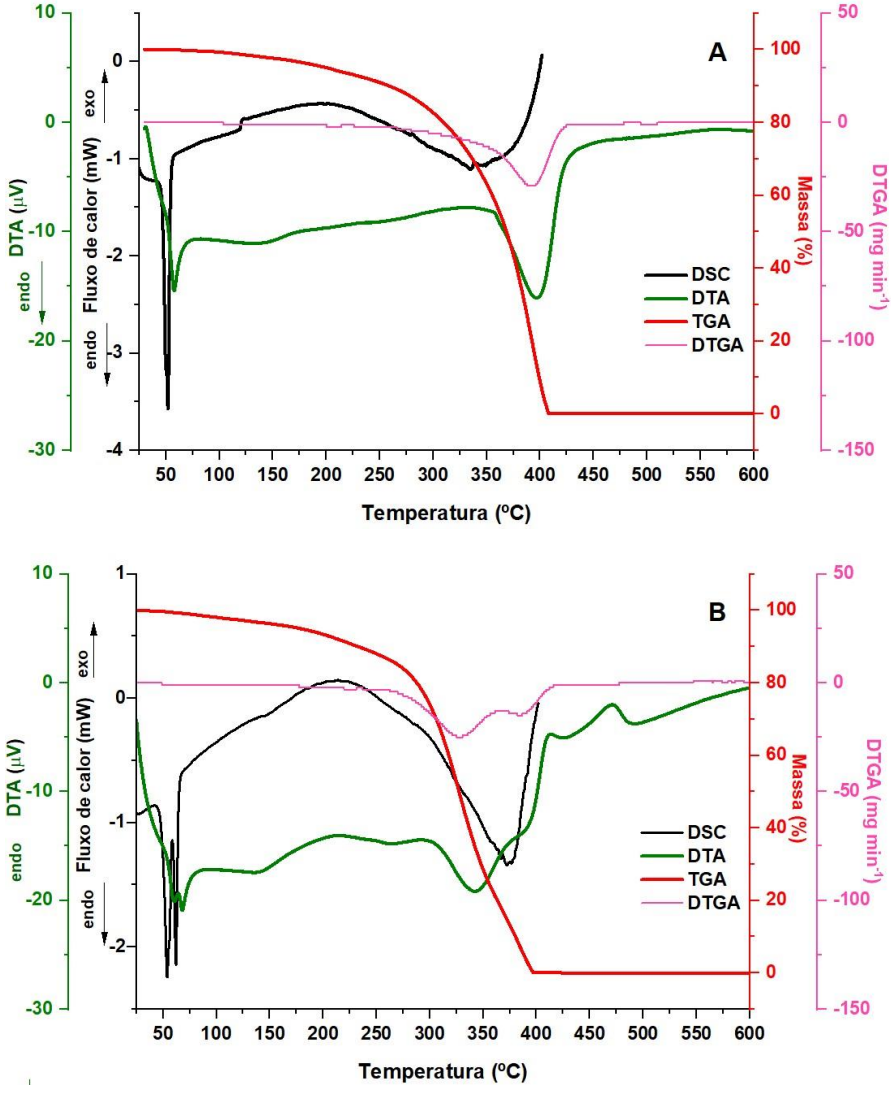
Adicionalmente, essa técnica reforçou a hipótese de que a presença de PCL_{5000}-PEG_{5000}, especialmente na razão de 0,5%, teve efeito sobre o aumento da capacidade carreadora de fármaco do sistema micelar misto se comparado ao sistema de DSPE-PEG_{2000} desenvolvido anteriormente por Oda *et al.* (2020a), embora estudos adicionais se façam necessários para melhor compreensão desse e de outros fenômenos e seus possíveis desdobramentos.

5.3 ANÁLISE TÉRMICA

As técnicas de DSC, DTA e TGA/DTGA foram realizadas a fim de incrementar a caracterização das formulações preparadas e de seus componentes individuais por meio da análise das suas propriedades térmicas, além de investigar o efeito no comportamento térmico do sistema após a adição de PCL_{5000}-PEG_{5000} para a obtenção das formulações de micelas mistas.

Nesta análise foram avaliadas, dentre as formulações, micelas não carregadas com PTX a fim de investigar possíveis alterações nas propriedades térmicas relacionadas especificamente à presença dos componentes poliméricos. A Figura 20 a seguir apresenta os resultados obtidos para a análise térmica dos componentes matéria-prima utilizados, DSPE-PEG_{2000} e PCL_{5000}-PEG_{5000}.

Figura 20 – Comportamento térmico dos componentes matéria-prima DSPE-PEG_{2000} (A) e PCL_{5000}-PEG_{5000} (B).



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Na Figura 20A observou-se na curva DSC (em preto) o pico endotérmico característico de fusão para o DSPE-PEG_{2000} em 46,8ºC (T_{onset}) com variação de entalpia de 123,3 J/g. Esse resultado é semelhante ao apresentado anteriormente por Tahir *et al.* (2019), que obteve um pico de fusão endotérmico próximo a 50 ºC para esse componente.

Uma ampliação da imagem para esse pico permitiu confirmar a contribuição das duas subunidades do DSPE-PEG_{2000} no evento de fusão (dados não mostrados), além disso, não foram observados outros picos definidos antes do início do processo de degradação. Na curva TGA (em vermelho) observou-se que esse componente tem estabilidade térmica até a temperatura de 242,4 ºC, a partir da qual se iniciou um processo de decomposição em estágio único até 437,1 ºC, totalizando uma perda de massa de 98,3% ao final da análise. As curvas DTA (em verde) e DTGA (em rosa) apoiaram, para todas as análises, a confirmação da temperatura de ocorrência dos eventos e variações de massa observadas, respectivamente.

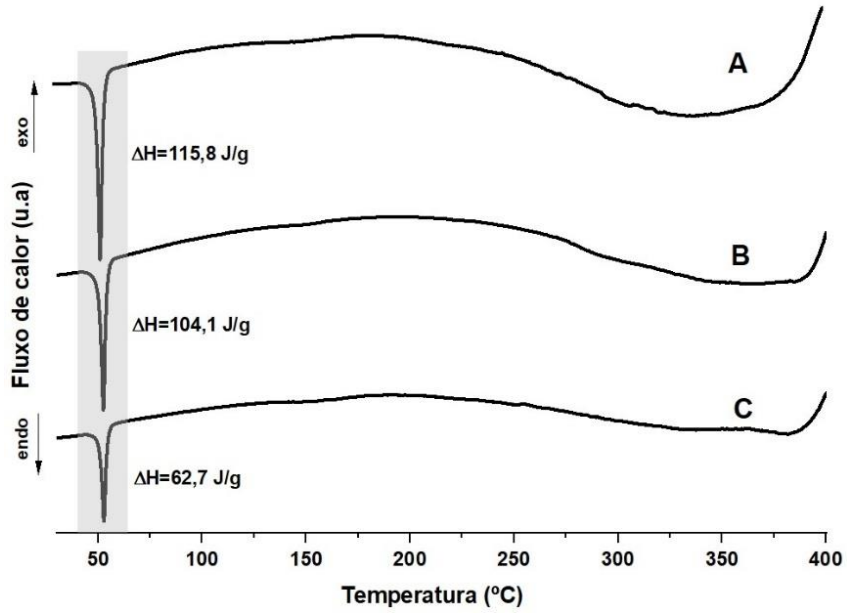
Na Figura 20B observou-se na curva DSC (em preto) dois picos endotérmicos próximos característicos de fusão para o PCL_{5000}-PEG_{5000} em 49,4 ºC (T_{onset}) e 59,7 ºC (T_{onset}) evidenciando a contribuição das duas subunidades do copolímero, com variação de entalpia de 60,7 J/g e 31,9 J/g, respectivamente. Resultados próximos a esse foram reportados na literatura anteriormente por Ravikumar *et al.* (2018) e Danafar *et al.* (2014) que obtiveram pico de fusão endotérmico próximo a 60 ºC para esse componente, embora não tenham sido detalhados nesses estudos os picos das subunidades do copolímero separadamente. Adicionalmente, também não foram observados outros picos definidos antes do início da degradação. A partir da curva TGA (em vermelho) foi possível observar que o copolímero apresentou estabilidade térmica até a temperatura de 240,9 ºC, a partir da qual se iniciou um processo de decomposição em dois estágios, o primeiro até 357,3 ºC com perda de massa de 65,9%, e o segundo entre 358,0 ºC até 424,8 ºC com perda de massa adicional de 27,8%.

A Figura 21 apresenta o comportamento térmico avaliado por DSC da formulação micelar de DSPE-PEG_{2000} (curva A) e das formulações de micelas mistas não carregadas com PTX obtidas após a introdução do PCL_{5000}-PEG_{5000} nas proporções de 0,5% e 1,0% (curvas B e C, respectivamente).

Na curva A observou-se para a formulação de micelas de DSPE-PEG_{2000} um comportamento térmico semelhante àquele observado para o componente matéria prima (Figura 20A) com pico endotérmico característico de fusão em 50,6 ºC (T_{onset}) e com variação de entalpia de 115,8 J/g. Esse resultado permitiu inferir que o processo de micelização, o qual envolveu o uso de solvente orgânico e fornecimento de calor (T=55 ºC), não alterou as

propriedades térmicas do material, o que sugere a ocorrência de um evento de reorganização do sistema para formação das micelas.

Figura 21 – Comportamento térmico avaliado por DSC das formulações de micelas não carregadas de DSPE-PEG_{2000} (A) e micelas mistas não carregadas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 (B) e 99:1 (C). A região em cinza destaca o pico de fusão endotérmico.



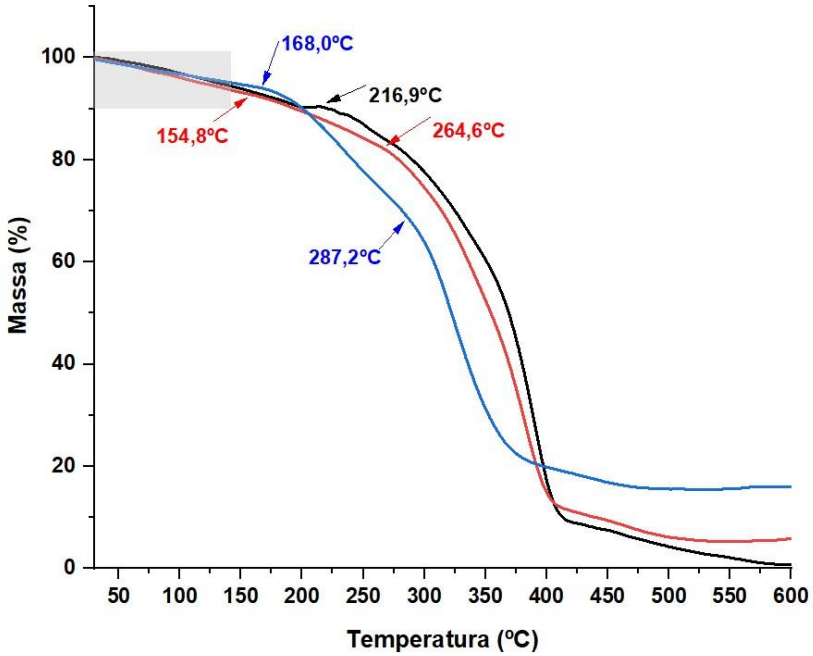
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Para as formulações de micelas mistas contendo PCL_{5000}-PEG_{5000} (curvas B e C) observou-se um comportamento semelhante àquele obtido para a micela de DSPE-PEG_{2000}, com pico endotérmico de fusão único e próximo a 50 ºC característico do componente em maior razão no sistema. Todavia, foi possível observar uma diminuição no valor da entalpia requerida para o processo de fusão, o que sugere um efeito de menor energia atrelada aos sistemas contendo PCL_{5000}-PEG_{5000} na formulação.

Na curva B para a formulação contendo 0,5% de PCL_{5000}-PEG_{5000}, o pico de fusão endotérmico ocorreu a 50,5 ºC (T_{onset}) com variação de entalpia de 104,1 J/g. Na curva C, para a formulação contendo 1,0% de PCL_{5000}-PEG_{5000}, o pico de fusão endotérmico ocorreu a 50,8 ºC (T_{onset}) com variação de entalpia de 62,7 J/g. O efeito de diminuição na entalpia requerida ocorre em acordo com o incremento da participação do PCL_{5000}-PEG_{5000} no sistema - que em seu estado matéria prima de fato apresentou menor variação de entalpia para os eventos de fusão (60,7 J/g e 31,9 J/g) quando comparado ao DSPE-PEG_{2000} (123,3 J/g). Nesse sentido, foi possível inferir que a presença do copolímero tem efeito facilitador no mecanismo de transição de fase dos sistemas de micelas mistas com relação ao sistema micelar convencional.

As formulações também tiveram o seu comportamento térmico avaliado por TGA/DTGA e o resultado obtido para TGA é mostrado na Figura 22 a seguir.

Figura 22 – Comportamento térmico avaliado por TGA das formulações de micelas não carregadas com PTX de DSPE-PEG_{2000} (curva preta), DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} na razão molar de 99,5:0,5 (curva vermelha) e DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} na razão molar de 99:1 (curva azul). O quadro em cinza marca a região comum de desidratação das amostras com perda de umidade e de componentes voláteis. As setas nas respectivas cores apontam o início dos eventos térmicos de decomposição das amostras.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Na curva TGA em preto para a formulação de DSPE-PEG_{2000}, observou-se um processo de desidratação inicial da amostra com perda de cerca de 9,3% de massa até a temperatura de 216,9 ºC a partir da qual se iniciou um processo de decomposição em um único estágio até 426,1 ºC o que ocasionou uma perda de massa adicional de 81,2%. Na curva TGA do componente em seu estado matéria prima, o processo de decomposição foi iniciado em uma temperatura maior (242,4 ºC), também ocorrendo em um único estágio.

Na curva vermelha obtida para a formulação de micelas mistas contendo 0,5% de PCL_{5000}-PEG_{5000} observou-se um processo de decomposição em dois estágios. A desidratação inicial da amostra ocasionou uma perda de massa de 6,8% até a temperatura de 154,8 ºC a partir da qual se iniciou o primeiro estágio de decomposição com término em 262,1 ºC o que ocasionou uma perda de massa de 10,1%, um segundo estágio de decomposição iniciado em 264,6 ºC com término em 442,1 ºC levou a uma perda de massa adicional de 72,4%.

Na curva azul obtida para a formulação de micelas mistas contendo 1,0% de PCL_{5000}-PEG_{5000} também se observou um processo de decomposição em dois estágios, a desidratação inicial da amostra ocasionou uma perda de massa de 5,6%, o primeiro estágio de decomposição

iniciado em 168,0 ºC e com término em 286,1 ºC ocasionou uma perda de massa adicional de 25,1% e um segundo estágio iniciado em 287,2 ºC com término em 474,2 ºC levou a uma perda de massa de mais 52,5%.

A análise termogravimétrica permitiu avaliar a estabilidade térmica e os eventos de decomposição das formulações para as quais foram observados comportamentos distintos com o deslocamento das curvas para a esquerda, indicando o início desses eventos em temperatura menor que a observada para a formulação convencional, além disso, foi observado um processo de decomposição em dois estágios para os sistemas de micelas mistas, refletindo a presença de PCL_{5000}-PEG_{5000} sistema.

De maneira geral, a análise térmica contribuiu para a caracterização adicional dos sistemas estudados, permitindo observar que o comportamento térmico dos sistemas micelares tem certa semelhança com aquele dos seus constituintes puros, não havendo indícios da formação de uma nova entidade química após o processo de preparo da formulação e posterior adição de um segundo componente, o que sugere a ocorrência de um evento de reorganização do sistema durante o processo de micelização.

Todavia, em maior nível de detalhe, por meio da observação da diminuição da entalpia requerida para o processo de fusão após a adição de PCL_{5000}-PEG_{5000} em 10,1% e 45,8% para as razões molares de 0,5% e 1,0%, respectivamente, além dos diferentes fenômenos de decomposição observados por TGA/DTGA, essa análise, complementarmente à técnica de SAXS, permitiu a distinção do sistema de micelas mistas daquele de DSPE-PEG_{2000}, esclarecendo alguns aspectos da influência do PCL_{5000}-PEG_{5000} no sistema.

5.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE

É conhecido que as micelas poliméricas se comportam como estruturas dinâmicas, cuja integridade pode ser afetada por pequenas alterações nos ambientes nos quais estão inseridas (KIM *et al.*, 2010; LANGRIDGE & GEMEINHART, 2020).

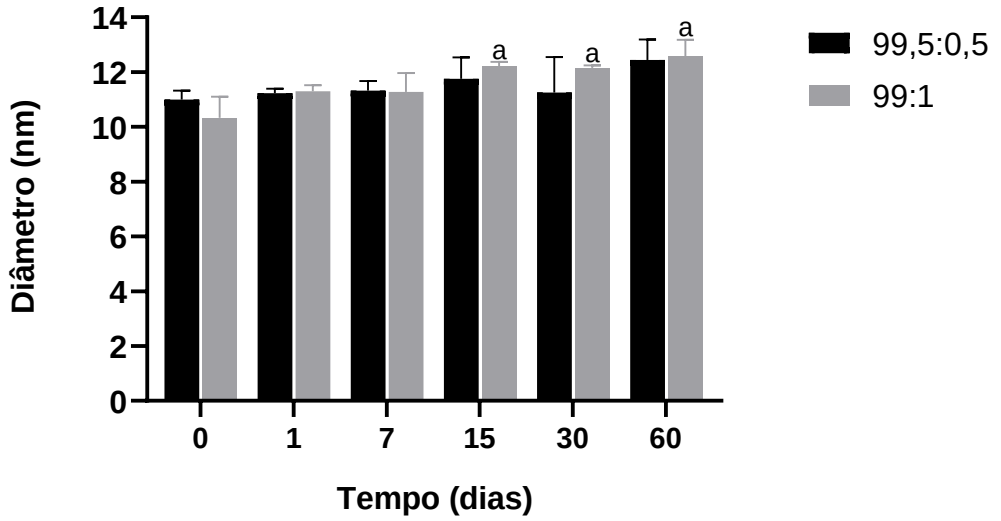
Diante disso, de forma a compreender como as formulações preparadas se comportariam ao longo do tempo em ambiente aquoso foi conduzido um estudo de avaliação da estabilidade com relação às possíveis alterações nos parâmetros de diâmetro hidrodinâmico médio, potencial zeta e teor de encapsulação ao longo de 60 dias de armazenamento em geladeira a 4 ºC.

Os lotes de formulações produzidos foram fracionados em amostras de iguais quantidades correspondentes aos dias do estudo e no dia da avaliação as amostras foram purificadas em filtro de 0,22 µm imediatamente antes da análise do parâmetro de interesse. O

objetivo dessa purificação era remover o fármaco desencapsulado (liberado) ao longo do tempo, isso porque, devido ao tamanho reduzido das micelas qualquer presença de precipitado na solução poderia interferir na análise.

A Figura 23 a seguir apresenta os resultados adquiridos para o parâmetro diâmetro hidrodinâmico médio por meio da técnica de DLS.

Figura 23 – Diâmetro hidrodinâmico médio (análise de número) em diferentes tempos de análise para micelas mistas de DSPE-PEG$_{2000}$:PCL$_{5000}$-PEG$_{5000}$ nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3). A letra a representa diferença significativa quando comparada à mesma formulação no dia 0, determinada por ANOVA *one-way* seguida do pós teste de Tukey. O nível de significância foi considerado para valores de $p \leq 0,05$.

O valor de diâmetro hidrodinâmico médio obtido para as formulações contendo 0,5% ou 1,0% do copolímero ao longo do tempo de estudo foi de 11,5 ± 0,5 nm e 11,6 ± 0,8 nm, respectivamente. Fixado o tempo de análise, não foram observadas diferenças significativas comparando-se a formulação contendo maior ou menor proporção do copolímero.

Para a formulação de DSPE-PEG$_{2000}$:PCL$_{5000}$-PEG$_{5000}$ na razão molar de 99,5:0,5, o valor do diâmetro hidrodinâmico teve valor mínimo de 11,2 nm e máximo de 12,4 nm, e, a um nível de significância de 5%, não foram observadas diferenças significativas nesse parâmetro nos tempos avaliados quando comparado ao dia de preparo da formulação (dia 0).

Para a formulação na razão molar de 99:1, o diâmetro hidrodinâmico teve valor mínimo de 10,3 nm e máximo de 12,6 nm. Nesse caso, foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) a

partir do décimo quinto dia de análise com relação ao valor obtido no dia de preparo da formulação, com uma tendência de aumento no tamanho das micelas.

Embora tenha sido observada alteração no diâmetro hidrodinâmico ao longo do tempo para a formulação na razão molar de 99:1 a partir do décimo quinto dia de análise, essa alteração não foi considerada suficiente a ponto de permitir inferências sobre danos à estabilidade desse sistema, dada a faixa de tamanho estreita.

Adicionalmente, foram conduzidas análises para determinação do potencial zeta das formulações ao longo do tempo de estudo. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5 – Potencial zeta obtido por DLS associado à mobilidade eletroforética em diferentes tempos de análise para micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1.

Tempo (dias)	Potencial Zeta (mV)	
	99,5:0,5	**99:1**
0	-3,2 ± 1,3	-3,1 ± 0,2
1	-3,8 ± 0,5	-3,1 ± 0,2
7	-5,4 ± 0,4[a,*]	-2,7 ± 0,7[*]
15	-4,3 ± 1,0	-2,7 ± 0,8
30	-2,6 ± 0,9	-3,1 ± 0,8
60	-3,1 ± 0,3	-3,9 ± 1,4

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3). A letra a representa diferença significativa quando comparada à mesma formulação no dia 0, determinada por ANOVA *one-way* seguida do pós teste de Tukey. O asterisco representa diferença significativa quando comparadas as formulações entre si, fixado o tempo de análise, determinada por teste t-Student. O nível de significância foi considerado para valores de $p \leq 0,05$.

O valor médio do potencial zeta obtido ao longo do estudo para as formulações contendo 0,5% ou 1,0% do copolímero foi de -3,7 ± 1,0 mV e -3,1 ± 0,4 mV, respectivamente.

Para a formulação na razão molar 99,5:0,5, esse parâmetro apresentou alteração significativa com relação ao dia de preparo e com relação à formulação na razão molar de 99:1 somente para a análise conduzida no sétimo dia. Para os demais tempos de análise não foi possível observar alterações significativas. Para a formulação na razão molar de 99:1 não foram observadas diferenças significativas desse parâmetro para nenhum dos tempos de análise comparados ao dia de preparo.

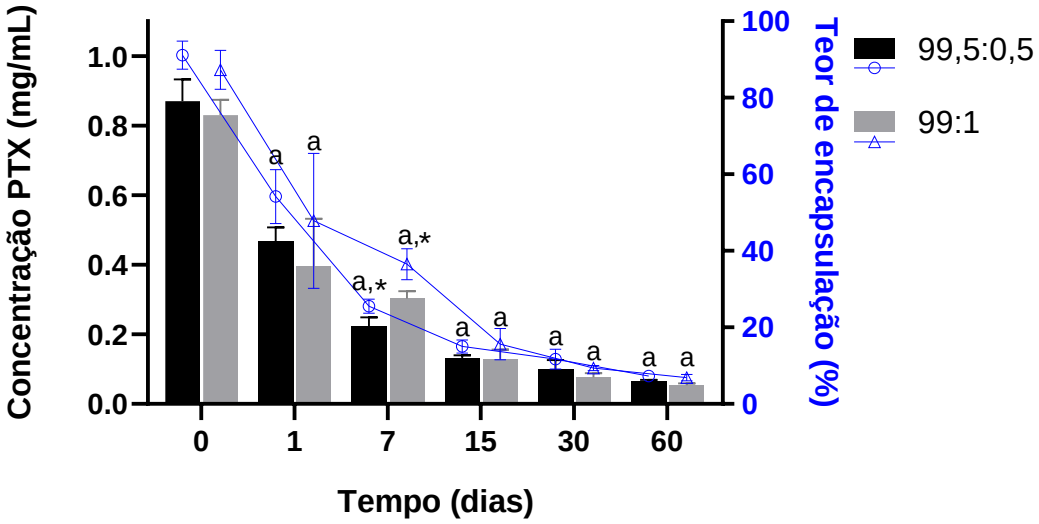
Sob a mesma perspectiva para a análise de tamanho, é importante salientar que essa diferença observada novamente não foi considerada suficiente para permitir inferências acerca

da estabilidade do sistema, dado que o valor do parâmetro permaneceu próximo da faixa de neutralidade.

Além disso, conforme discutido anteriormente, devido à cobertura de PEG na casca das micelas, o principal fator relacionado à estabilização dessas partículas em sistemas aquosos é o efeito estérico e não o de repulsão eletrônica (HONARY & ZAHIR, 2013; KOUCHAKZADEH, 2010).

Finalmente, foi avaliada a concentração de fármaco encapsulado ao longo do tempo. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 24 a seguir.

Figura 24 – Concentração de PTX encapsulado e teor de encapsulação em diferentes tempos de análise para micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1.



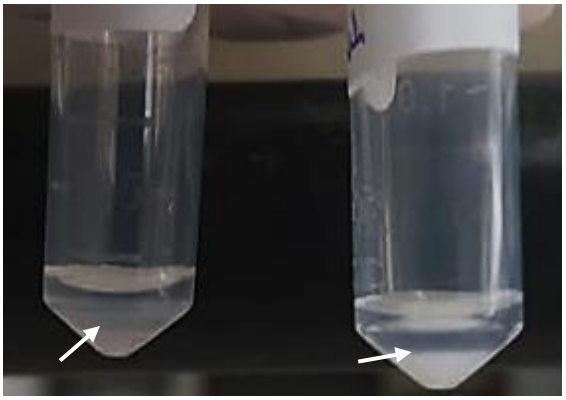
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3). A letra a representa diferença significativa para a concentração de PTX e teor de encapsulação quando comparada à mesma formulação no dia 0, determinada por ANOVA *one-way* seguida do pós teste de Tukey. O asterisco representa diferença significativa para a concentração de PTX e teor de encapsulação quando comparadas as formulações entre si, fixado o tempo de análise, determinada por teste t-Student. O nível de significância foi considerado para valores de $p \leq 0,05$.

Embora tenham sido alcançados teores de encapsulação elevados no dia do preparo para ambas as formulações, não foi possível observar um perfil de retenção do fármaco no sistema de micelas mistas ao longo do tempo avaliado. Todos os tempos de análise apresentaram diferença significativa com relação ao dia de preparo das formulações.

A partir do primeiro dia de análise foi possível identificar a perda aparente do fármaco do nanosistema sob a forma de um precipitado branco no fundo do microtubo, como mostra a Figura 25. O precipitado se tornou mais evidente em tempos mais avançados do estudo.

Figura 25 – Precipitado branco (apontado pelas setas) no fundo do microtubo após 30 dias do preparo das formulações evidenciando a perda de fármaco do sistema de micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 (esquerda) e 99:1 (direita).



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Comparando-se as formulações entre si, foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) apenas para o sétimo dia de análise, no qual a formulação de micelas mistas na razão molar 99:1 reteve em média 36,5 ± 4,1% do fármaco encapsulado enquanto a formulação na razão de 99,5:0,5 reteve em média 25,5 ± 1,8%. Oda (2015) obteve resultado médio de 14,0 ± 5,3% de retenção de fármaco no sétimo dia de análise para micelas de DSPE-PEG_{2000} para a mesma concentração inicial teórica de 1,0 mg/mL de PTX.

Para os demais tempos de análise não foi possível observar diferença significativa entre as formulações, o que sugere que o perfil de retenção do fármaco no sistema de micelas mistas não depende da razão molar de PCL_{5000}-PEG_{5000} adicionado à formulação.

Dessa forma, foi possível verificar que a inserção do copolímero para as formulações de micelas mistas não representou efeito importante de ganho de estabilidade do sistema micelar ao longo do tempo nas condições avaliadas neste estudo, todavia, foi observado incremento no teor de fármaco retido até o sétimo dia de análise com relação ao sistema desenvolvido anteriormente sem PCL_{5000}-PEG_{5000}.

A baixa estabilidade de sistemas micelares poliméricos em ambientes especialmente aquosos é um fenômeno conhecido e uma das mais relevantes limitações da eficiência desses sistemas que vêm sendo discutidas por diversos autores. É conhecido que a concentração polimérica, massa molecular do bloco formador do núcleo, incorporação do fármaco e compatibilidade do fármaco e núcleo são alguns exemplos de fatores capazes de influenciar esse fenômeno (KIM *et al.*, 2010; OWEN *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012; LANGRIDGE & GEMEINHART, 2020).

Sendo a micela polimérica uma estrutura dinâmica, para compreensão da sua estabilidade devem ser considerados tanto os aspectos pertinentes a estabilidade termodinâmica, relacionada especialmente à CMC, quanto a estabilidade cinética, relacionada ao tempo de exposição ao meio no qual o sistema micelar está introduzido e a decorrente troca de unímeros entre as micelas (KIM *et al.*, 2010).

Nesse sentido, dadas as condições deste estudo, no qual não foram alterados diretamente ao longo do tempo de análise os parâmetros de diluição e CMC, buscou-se compreender a baixa estabilidade do sistema de micelas mistas em ambiente aquoso sob a perspectiva da estabilidade cinética, na qual se destacam os mecanismos de hidrólise e desestabilização por dessorção dos monômeros.

Copolímeros em bloco como o PCL-PEG e o DSPE-PEG têm um grupo éster sensível a hidrólise localizado entre os segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos. Em micelas com estrutura do tipo *core-shell* esse grupo está localizado na interface com o meio e por isso é facilmente acessado para reações, de forma que a hidrólise do éster de interface leva ao desprendimento do bloco PEG e a posterior desestabilização do sistema micelar (ZHU *et al.*, 2012).

O fenômeno de dessorção dos monômeros é um processo ativado de desestabilização micelar no qual um estado de transição de alta energia é criado quando a maior parte da porção hidrofóbica do sistema micelar se encontra exposta ao solvente do meio, estando o monômero ancorado à micela apenas por uma pequena porção de seu comprimento. Após se soltar do núcleo da micela, o monômero ganha graus de liberdade rotacional e translacional de forma a diminuir sua energia geral. Dados cinéticos sugeriram que esse fenômeno ocorre mesmo a baixas temperaturas como 5 ºC (KASTANTIN *et al.*, 2009).

Todavia, para de fato verificar a ocorrência desses e outros mecanismos de desestabilização, seria necessária a condução de outras análises. Zhu *et al.* (2012) determinaram a cinética de hidrólise do grupo éster por ^{1}HNMR e modificaram a interface de micelas de PCL-PEG por meio da adição de um terceiro bloco de copolímero hidrofóbico (PBO, ou polióxido de butileno) o que reduziu a taxa de hidrólise do grupo éster por um fator de 2,7.

Kastantin *et al.* (2009) avaliaram as taxas de dessorção de monômenos de micelas de DSPE-PEG_{2000} utilizando rodamina como marcador de fluorescência em função da temperatura. As micelas marcadas com alta densidade de rodamina (fluorescência auto-extinta) foram misturadas com micelas não marcadas e o aumento na fluorescência foi observado à medida que os monômeros deixaram as micelas marcadas e foram incorporados em micelas não marcadas ou retornaram ao meio aquoso. Dessa forma, a intensidade de fluorescência

observada foi relacionada à taxa de dessorção do polímero e as maiores taxas de dessorção foram observadas a partir de 15 ºC.

De maneira geral, o impasse da baixa estabilidade dos sistemas micelares em ambiente aquoso sob a perspectiva do armazenamento da formulação pode ser contornado por meio de processos de secagem como a liofilização, por exemplo.

Oda *et al.* (2018) desenvolveram um sistema liofilizado de micelas de DSPE-PEG_{2000} contendo PTX e a estabilidade foi avaliada ao longo de 180 dias. Nesse estudo não foram observadas alterações significativas nos parâmetros de diâmetro e potencial zeta, e aproximadamente 85% do fármaco permaneceu retido no sistema micelar. Um estudo semelhante poderia ser adicionalmente conduzido neste trabalho a fim de verificar se o mesmo poderia ser constatado para o sistema de micelas mistas.

Contudo, ainda seria necessário esclarecer o fenômeno de desestabilização micelar após ressuspensão especialmente em meios complexos e fisiologicamente relevantes como soro e sangue, de forma a possibilitar a investigação mais aprofundada da potencialidade desse sistema sob o aspecto biológico.

Na literatura foram reportados alguns estudos utilizando a técnica de Transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET, do inglês *Förster/Fluorescence Ressonance Energy Transfer*) para avaliar a estabilidade de sistemas micelares em ambientes biológicos e monitorar a liberação de moléculas hidrofóbicas (CHEN *et al.*, 2008; DIEZI *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2011; LANGRIDGE & GEMEINHART, 2020).

Nessa técnica, que é sensível a pequenas alterações de distância entre grupos moleculares, pares de doadores e receptores fluorescentes são encapsulados no domínio hidrofóbico da micela. Uma vez que uma micela se dissocia após diluição ou outras alterações ambientais, o incremento da distância resultante entre o par doador e receptor levará a uma queda na emissão do receptor e a um aumento na emissão do doador, o que permite a identificação do fenômeno de desestabilização (LU *et al.*, 2018).

A importância de estudos como esses reside no fato de que para além da capacidade de transportar quantidades de fármaco suficientes para garantir a eficácia terapêutica, em termos de direcionamento passivo, os sistemas micelares devem apresentar estabilidade estrutural suficiente para manter sua carga encapsulada até que seja atingido o local de interesse (LANGRIDGE & GEMEINHART, 2020).

Algumas estratégias foram desenvolvidas e têm sido avaliadas para melhorar a estabilidade de micelas carregadas como investigar a compatibilidade do fármaco com o(s) polímero(os) ou mesmo possibilitar a formação de ligações covalentes (estratégia *crosslinking*)

para reforçar as interações intermoleculares desses sistemas (SOO *et al.*, 2002; CARSTENS *et al.*, 2008; TAO *et al.*, 2012). Essas táticas poderiam ser avaliadas em estudos futuros para os sistemas preparados neste trabalho enquanto estratégias de otimização.

Finalmente, para concluir este trabalho foi conduzido um ensaio de liberação *in vitro* com o intuito de estudar a cinética de liberação e o possível mecanismo pelo qual o PTX é liberado das formulações de micelas mistas preparadas. Visto que não foram observadas diferenças importantes nos aspectos físico-químicos e de estabilidade das micelas mistas contendo 0,5% ou 1,0% de PCL_{5000}-PEG_{5000}, foi escolhida para a realização do estudo de liberação a formulação contendo a menor razão molar do copolímero.

5.5 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Conhecer o perfil de liberação de um fármaco *in vitro* é uma das etapas de grande importância no processo de desenvolvimento de um sistema carreador. Contudo, durante a condução desses estudos, especialmente para fármacos altamente hidrofóbicos como o PTX, um dos principais desafios encontrados está relacionado ao atingimento e manutenção de condições experimentais adequadas.

O termo condição *sink* é geralmente definido como o volume de meio de liberação pelo menos três vezes maior que o necessário para formar uma solução saturada do fármaco (ROHRS, 2001; US PHARMACOPEIAL FORUM, 2004; BROWN *et al.*, 2004). A manutenção dessa condição significa assegurar que a concentração do fármaco no meio de estudo seja baixa o suficiente a fim de que a continuidade do fenômeno da liberação não seja limitada pela saturação. Isso significa que a concentração do fármaco no meio de liberação deve ser mantida abaixo de cerca de 33% da solubilidade do fármaco naquele meio.

Alguns estudos sugerem, com maior rigor, a concentração máxima de 20% abaixo do limite de solubilidade ou 10% para o atingimento de condições *sink* ditas perfeitas (SIEPMANN & SIEPMANN, 2020). Para o caso de fármacos pouco solúveis em água, satisfazer essa condição é muitas vezes difícil uma vez que se faz necessária a utilização de grandes volumes de meio de liberação (CHO *et al.*, 2004; ABOUELMAGD *et al.*, 2015).

A exemplo do PTX, considerando-se a solubilidade em meio aquoso reportada por Lee *et al.* (2003) de 0,3 µg/mL a 37 ºC, para realização de um estudo de liberação pelo método de diálise utilizando 0,5 mL das formulações micelares preparadas neste trabalho contendo aproximadamente 1 mg/mL de PTX, seriam necessários cerca de 5 L de meio aquoso para manutenção da condição *sink* (considerando-se o limite de 33% da solubilidade).

De modo a possibilitar melhores condições de execução de estudos desse tipo em escala laboratorial, foram reportados na literatura, especialmente para estudos de liberação *in vitro* de carreadores poliméricos contendo PTX, o uso de diversos modificadores de solubilidade como agentes surfactantes, sais inorgânicos, proteínas e solventes orgânicos (LIGGINS & BURT, 2001; NSEREKO *et al.*, 2002; JACKSON *et al.*, 2002; PHILLIPS *et al.*, 2012).

Todavia, especialmente para o caso de micelas poliméricas, as dificuldades experimentais relacionadas são ainda mais críticas. A adição ao meio de alguns tipos de agentes surfactantes e solventes orgânicos, por exemplo, pode ocasionar alterações significativas na estrutura das micelas gerando, assim, distorções no perfil de liberação (CHO *et al.*, 2004).

Foi possível encontrar na literatura estudos de liberação de nanoestruturas carreadoras de PTX nos quais foram utilizados meios como PBS, PBS+Tween 80 e PBS+PEG em proporções diversas (LIU *et al.*, 2005; CHA *et al.*, 2009; SAADAT *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2012). Entretanto, em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, a reprodutibilidade de métodos como esses não foi alcançada, ocorrendo geralmente a precipitação de PTX dentro da membrana de diálise.

Nesse sentido, foi utilizado neste trabalho o método descrito anteriormente por Cho *et al.* (2004), no qual foi utilizado o agente hidrotrópico salicilato de sódio como meio para estudo de liberação de micelas poliméricas de polietilenoglicol e polifenilalanina (PEG-b-PPhe) contendo PTX.

Os agentes hidrotrópicos são sais orgânicos iônicos que não exibem propriedades coloidais, mas que são capazes de melhorar a solubilidade por meio da formação de ligações com as moléculas do soluto hidrofóbico via interações van der Waals fracas como π–π ou interações atrativas do tipo dipolo-dipolo (NEUMANN *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2014). Os hidrótropos contêm frações hidrofóbicas e hidrofílicas, todavia, em comparação com os agentes surfactantes a porção hidrofóbica é consideravelmente pequena (KAPADIYA *et al.*, 2011).

A solubilidade do PTX em salicilato de sódio na concentração de 1 mol/L reportada no estudo de Cho *et al.* (2004) foi de 28,1 µg/mL, o que representa um incremento de cerca de 90 vezes com relação a solubilidade de 0,3 µg/mL reportada para esse fármaco por Lee *et al.* (2003). Além disso, nesse mesmo estudo foi avaliado por DLS o efeito do uso desse agente com relação a possíveis alterações na estrutura das micelas e não foram observadas alterações significativas no diâmetro nessa concentração (dados não mostrados).

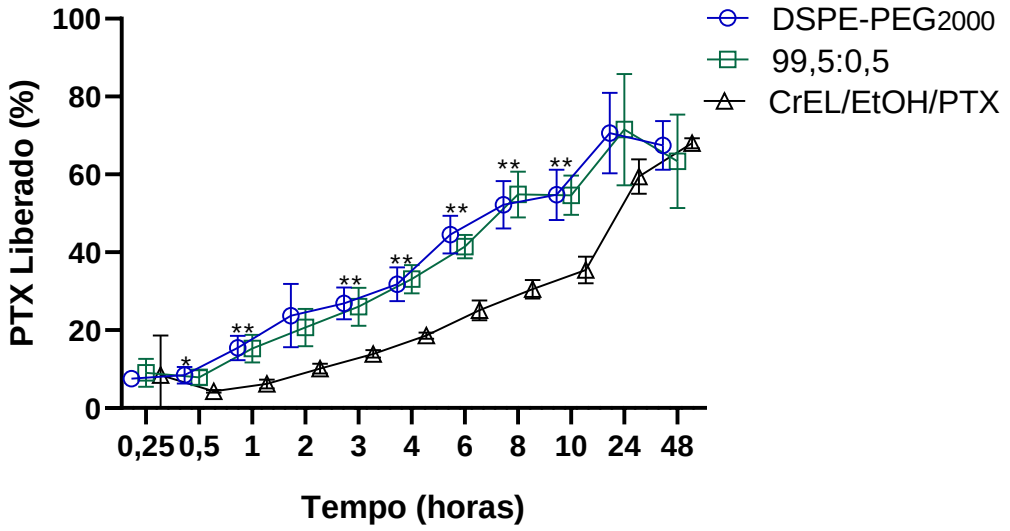
Para o estudo de solubilidade do PTX em salicilato de sódio 1 mol/L reproduzido neste trabalho foi encontrado o valor médio de 32,9 ± 4,8 µg/mL após 24 horas de incubação. De forma a investigar uma possível degradação do fármaco nessas condições a avaliação da

solubilidade foi estendida até 72 horas de incubação e foi obtido o valor de 27,8 ± 3,4 µg/mL. Adicionalmente, observou-se que o diâmetro hidrodinâmico médio das micelas (avaliado por DLS) não foi alterado na presença desse agente. Esses resultados apontaram para a viabilidade da utilização desse meio de diluição para a condução do estudo de liberação.

Para comparação com o perfil de liberação da formulação de micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} na razão molar de 99,5:0,5 (1 mg/mL de PTX) foram preparadas adicionalmente uma formulação de micelas poliméricas de DSPE-PEG_{2000} (0,6 mg/mL de PTX), conforme descrito por Oda *et al.* (2020b), e uma dispersão CrEL/EtOH/PTX (6 mg/mL), similar à formulação comercial Taxol®.

A preparação das formulações de micelas poliméricas e a diluição da dispersão CrEL/EtOH/PTX para 1 mg/mL foram realizadas imediatamente antes do início do estudo de liberação, de modo a evitar qualquer perda de fármaco durante o armazenamento. Os resultados obtidos em percentual de PTX liberado o *versus* tempo são mostrados na Figura 26 a seguir.

Figura 26 – Percentual cumulativo de PTX liberado *versus* tempo para as formulações de DSPE-PEG_{2000} (0,6 mg/mL de PTX), DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} na razão molar de 99,5:0,5 (1,0 mg/mL de PTX) e dispersão CrEL/EtOH/PTX (1 mg/mL de PTX).



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=3). O asterisco representa diferença significativa entre a formulação assinalada (DSPE-PEG_{2000} e/ou DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} na razão molar de 99,5:0,5) e a formulação CrEL/EtOH/PTX, fixado o tempo de análise. As diferenças foram determinadas por ANOVA *one-way* seguida do pós teste de Tukey. O nível de significância foi considerado para valores de $p \leq 0,05$.

As três formulações estudadas apresentaram perfil de liberação controlado ao longo de 48 horas. O total de PTX liberado nesse tempo para as formulações de DSPE-PEG_{2000}, DSPE-

PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} (99,5:0,5) e CrEL/EtOH/PTX foi de 67,5 ± 6,3%, 63,4 ± 12,0% e 68,0 ± 1,3%, respectivamente.

Não foi possível observar diferença significativa comparando-se o perfil de liberação das formulações de DSPE-PEG_{2000} e DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} (99,5:0,5), o que permitiu inferir que na razão molar de 0,5% a adição do copolímero PCL_{5000}-PEG_{5000} não teve efeito importante sobre a liberação do fármaco no sistema de micelas mistas. Todavia, com relação à dispersão CrEL/EtOH/PTX, que apresentou a liberação mais lenta, foi observada diferença significativa quando comparada a ambas as formulações de micelas poliméricas.

O perfil de liberação mais controlado observado para a dispersão CrEL/EtOH/PTX diverge de alguns estudos publicados anteriormente na literatura. Em um estudo de método similar, Z. Wei *et al.* (2009) observaram a liberação de cerca 76% de PTX dessa formulação nas primeiras duas horas em um meio contendo salicilato de sódio 1 mol/L, sugerindo que o fármaco se difundiu livremente através da membrana de diálise. Nie *et al.* (2011) observaram a liberação de mais de 90% PTX dessa formulação em quatro horas em um meio contendo PBS+Tween 80 (0,1% v/v).

Foi proposto na literatura que o efeito do CrEL na farmacocinética do PTX está associado à possibilidade de encapsulação do fármaco em micelas compostas primariamente por polietilenoglicerol triricinoleato e que a porcentagem de PTX efetivamente encapsulado aumenta desproporcionalmente com o aumento da quantidade de CrEL (SPARREBOOM *et al.*, 1999; GELDERBLOM *et al.*, 2001).

Com relação à formulação comercial (Taxol® 6 mg/mL) foi realizada neste trabalho uma diluição de seis vezes em solução de NaCl 0,9% (p/v). Nos estudos de Z. Wei *et al.* (2009) e Nie *et al.* (2011) foram realizadas diluições maiores de sessenta e vinte vezes, respectivamente. Nesse sentido, é possível que o perfil de liberação mais lento observado para essa formulação neste estudo com relação àquele dos estudos reportados pelos outros autores esteja relacionado à ocorrência de um maior processo de micelização devido à maior presença de CrEL, o que poderia ter dificultado a liberação do fármaco. Todavia, outros estudos seriam necessários para sustentar essa inferência, como, por exemplo, avaliar o perfil de liberação de diferentes diluições da dispersão CrEL/EtOH/PTX.

Os perfis de liberação das formulações de micelas mistas ou não preparadas neste estudo também divergem dos perfis observados para outros sistemas de micelas poliméricas disponíveis na literatura. Dabolkhar *et al.* (2006) observou para micelas mistas de DSPE-PEG_{2000}:TPGS (1:1) a liberação de apenas 20% de PTX ao longo de 48 horas em meio contendo

PBS. Musacchio *et al.* (2008) observou para micelas de DSPE-PEG_{2000} a liberação de 30% de PTX após 48 horas em meio de salicilato de sódio 1 mol/L.

A máxima concentração alcançada de PTX no meio para o estudo desenvolvido neste trabalho foi de 7,9 µg/mL, enquanto a solubilidade desse fármaco na solução estoque preparada de salicilato de sódio 1 mol/L após 72 horas de incubação foi de 27,8 ± 3,4 µg/mL, dessa forma, considerando-se o limite recomendado de 33% da solubilidade máxima do fármaco no meio, foi possível constatar que a condição *sink* foi atendida.

É importante ressaltar que nos casos em que essa condição não é respeitada são observados baixos níveis do fármaco efetivamente solúvel no meio, o que leva a errônea interpretação de uma liberação muito sustentada, quando na realidade essa liberação já ocorreu e o fármaco se encontra precipitado (PHILLIPS *et al.*, 2012).

Finalmente, de forma a investigar melhor a cinética de liberação dos sistemas estudados, alguns modelos matemáticos comumente utilizados foram ajustados conforme as equações 2 a 5 descritas anteriormente. A Tabela 6 a seguir apresenta os resultados obtidos.

Tabela 6 – Coeficientes de correlação (R^2) obtidos por regressão linear para os perfis de liberação das formulações estudadas de acordo com diferentes modelos cinéticos.

Modelo Cinético	**DSPE-PEG_{2000}**	**99,5:0,5**	**CrEL/EtOH/PTX**
	R^2	**R^2**	**R^2**
Ordem zero	0,57	0,52	0,84
Primeira ordem	0,41	0,39	0,53
Higuchi	0,80	0,74	0,94
Korsmeyer-Peppas	0,91	0,88	0,86

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Avaliando-se os valores obtidos de R^2 para as formulações de micelas poliméricas de DSPE-PEG_{2000} e DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} (99,5:0,5), o melhor modelo ajustado foi o de Korsmeyer-Peppas. Esse modelo é geralmente utilizado para analisar a liberação de formulações poliméricas quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando mais de um tipo de fenômeno de liberação pode estar envolvido.

Para o valor do expoente n obtido neste estudo igual a 0,58 para a formulação de DSPE-PEG_{2000} e 0,57 para a formulação de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} (99,5:0,5), o mecanismo de difusão é denominado anômalo. Nesse mecanismo a extensão e a velocidade de liberação do fármaco resulta da combinação do fenômeno de difusão do fármaco, ou transporte Fickiano, que ocorre devido a um gradiente de potencial, e do fenômeno controlado pelo relaxamento das

cadeias poliméricas, ou transporte não-Fickiano, que está associado a alterações de tensões e/ou transições de estado dos polímeros (RITGER & PEPPAS, 1987).

Avaliando-se os valores obtidos de R^2 para a formulação CrEL/EtOH/PTX o melhor modelo ajustado foi o de Higuchi (simplificado). Esse modelo descreve o mecanismo de liberação do fármaco como um processo único de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo.

É importante destacar que a validade desse modelo está limitada a algumas hipóteses como a de que a difusividade do fármaco é constante e que o entumecimento/relaxamento da matriz é desprezível (HIGUCHI, 1961). Além disso, esse modelo foi inicialmente desenvolvido para uma matriz planar, adequações foram propostas posteriormente para matrizes esféricas, entretanto, para sua utilização seria necessário conhecer outros parâmetros mais complexos (HIGUCHI, 1963).

Nesse sentido, consideradas essas limitações, o segundo melhor modelo ajustado para essa formulação foi o de Korsmeyer-Peppas (n =0,60), dessa forma, caso esse modelo fosse considerado, seria possível conceber a ocorrência de um mecanismo de liberação combinado envolvendo o relaxamento das cadeias do CrEL, cujos componentes principais são éteres e ésteres de polietilenoglicol de ácido ricinoleico e éteres de polietilenoglicol de glicerol. Todavia, um R^2 elevado também foi obtido para o ajuste de ordem zero para o qual a liberação de fármaco ocorre de maneira constante, dessa forma, não foi possível compreender com clareza o mecanismo que melhor descreve a liberação de PTX desse sistema.

Embora seja comum o ajuste de modelos matemáticos clássicos para compreender os mecanismos de liberação de fármacos é importante destacar que esses processos geralmente envolvem múltiplos fatores físicos e químicos, o que torna difícil ou mesmo improvável, a utilização de um modelo definitivo para completa descrição do fenômeno. Esses modelos são capazes de melhor descrever a liberação em sistemas farmacêuticos quando essa resulta de um fenômeno simples ou quando um fenômeno, por ser um passo limitante de velocidade, condiciona todos os outros (COSTA & LOBO, 2001).

Adicionalmente, devido aos avanços significativos no campo de desenvolvimento de novos sistemas de entrega de fármacos é importante destacar conjuntamente o crescimento do campo de modelagem matemática. Desde a publicação dos modelos clássicos de Higuchi em 1961 e Korsmeyer-Peppas em 1983 diversos modelos modernos têm sido propostos incluindo teorias matemáticas mecanicistas que permitem a determinação de parâmetros específicos do sistema, de forma a oferecer uma visão mais profunda dos mecanismos subjacentes de liberação de fármacos (SIEPMANN *et al.*, 1998; NARASIMHAN 2001; FRENNING & STROMME,

2003; LEMAIRE *et al.*, 2003; ZHOU & WU 2003; FRENNING *et al.*, 2005; RAMAN *et al.*, 2005). Todavia, dentro do escopo deste trabalho não foram avaliados modelos de maior complexidade.

De maneira geral, a utilização do meio de diluição contendo o agente hidrotrópico salicilato de sódio, além de fornecer uma alternativa às dificuldades anteriormente reportadas neste grupo de pesquisa para realização de um estudo de liberação *in vitro* envolvendo PTX, desempenhou um papel importante na análise inicial do perfil de liberação sustentado das formulações preparadas, atendendo ao objetivo de contribuir com a caracterização das formulações e auxiliar na compreensão do comportamento cinético desses sistemas em ambiente aquoso.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram preparadas formulações de micelas poliméricas mistas de DSPE-PEG_{2000}:PCL_{5000}-PEG_{5000} nas razões molares de 99,5:0,5 e 99:1 carregadas com diferentes concentrações de PTX. Os sistemas apresentaram características promissoras para carreamento do fármaco e para uma possível aplicação antitumoral quanto ao tamanho, potencial zeta, com eficiência de encapsulação elevada (>82% para a concentração de 1,0 mg/mL de PTX) e perfil de liberação controlado. As técnicas de SAXS, DSC, DTA e TG enriqueceram o processo de caracterização esclarecendo aspectos diversos da influência da adição do PCL_{5000}-PEG_{5000} sobre a organização estrutural do sistema e seu comportamento térmico. A composição mista mostrou-se interessante enquanto estratégia de otimização de características de sistemas micelares carreadores de fármaco, apesar de não ter sido obtido incremento relevante de estabilidade no período de 60 dias, foi observada maior retenção de fármaco após sete dias em ambiente aquoso e ganho na capacidade carreadora de PTX, o que representa melhoria com relação à formulação convencional de DSPE-PEG_{2000} desenvolvida anteriormente no nosso grupo de pesquisa. Os resultados deste trabalho forneceram, portanto, perspectivas positivas para a continuidade da investigação da potencialidade do sistema de micelas poliméricas mistas enquanto carreadores de PTX.

7 PERSPECTIVAS

▪ Avaliar a estabilidade das formulações de micelas mistas em meio biológico contendo proteínas séricas.

▪ Avaliar a viabilidade celular em linhagens de células de tumor de mama humano (MDA-MB-231 e MCF-7), tumor de mama murino (4T1) e células não tumorais (fibroblastos) tratadas com as formulações de micelas mistas contendo PTX.

▪ Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* das formulações de micelas mistas contendo PTX em modelo experimental de tumor de mama, utilizando a linhagem de adenocarcinoma murino 4T1 bem como avaliar a neuropatia periférica em comparação com as formulações comerciais Taxol® e Abraxane®.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUELMAGD, Sara A.; SUN, Bo; CHANG, Alice C.; KU, Youn Jin; YEO, Yoon. Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: are we doing it right? **Molecular Pharmaceutics**, [*S.L]*, v. 12, n. 3, p. 997-1003, 17 fev. 2015. http://dx.doi.org/10.1021/mp500817h.

ACS, American Cancer Society. **Types of breast Cancer.** Disponível em: https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer.html. Acesso em: 23 jan. 2022.

AVANTI POLAR LIPIDS. Produto 880128 DSPE-PEG2000 Amine. Disponível em: https://avantilipids.com/product/880128. Acesso em: 12 ago 2022.

AKIBA, Isamu; TERADA, Naotaka; HASHIDA, Satoshi; SAKURAI, Kazuo; SATO, Taku; SHIRAISHI, Kouichi; YOKOYAMA, Masayuki; MASUNAGA, Hiroyasu; OGAWA, Hiroki; ITO, Kazuki. Encapsulation of a Hydrophobic Drug into a Polymer-Micelle Core Explored with Synchrotron SAXS. **Langmuir**, *[s. l.]*, v. 26, n. 10, p. 7544-7551, 2 abr. 2010. http://dx.doi.org/10.1021/la904355p.

ALBA, Emilio, CIRUELOS, Eva, LOPEZ, Rafael, LÓPEZ-VEGA, José Manuel, LLUCH, Ana, MARTIN, Miguel, MONTSERRAT, Munoz. Cost–utility analysis of nanoparticle albumin-bound paclitaxel versus paclitaxel in monotherapy in pretreated metastatic breast cancer in Spain. **Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research**, *[s. l.]*, v. 13, n. 3, p. 381-391, 2013. https://doi.org/10.1586/erp.13.18.

ALLEN, C.; SANTOS, N. dos; GALLAGHER, R.; CHIU, G.N.C.; SHU, Y.; LI, W.M.; JOHNSTONE, S.A.; JANOFF, A.s.; MAYER, L.D.; WEBB, M.s. Controlling the Physical Behavior and Biological Performance of Liposome Formulations Through Use of Surface Grafted Poly(ethylene Glycol). **Bioscience Reports**, *[s. l.]*, v. 22, n. 2, p. 225-250, 1 abr. 2002. http://dx.doi.org/10.1023/a:1020186505848.

ASTAFIEVA, Irina; ZHONG, Xing Fu; EISENBERG, Adi. Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions. **Macromolecules**, *[s. l.]*, v. 26, n. 26, p. 7339-7352, dez. 1993. http://dx.doi.org/10.1021/ma00078a034.

ATTIA, Amalina Bte Ebrahim; ONG, Zhan Yuin; HEDRICK, James L.; LEE, Phin Peng; EE, Pui Lai Rachel; HAMMOND, Paula T.; YANG, Yi-Yan. Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery. **Current Opinion In Colloid & Interface Science**, *[s. l.]*, v. 16, n. 3, p. 182-194, jun. 2011. http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2010.10.003.

BAKRANIA, Anita K.; VARIYA, Bhavesh C.; PATEL, Snehal S. Novel targets for paclitaxel nano formulations: hopes and hypes in triple negative breast cancer. **Pharmacological Research**, *[s. l.]*, v. 111, p. 577-591, set. 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.023.

BARBOSA, Marcos V.; MONTEIRO, Liziane O. F.; MALAGUTTI, Andréa R.; OLIVEIRA, Mônica C.; CARVALHO-JUNIOR, Alvaro D.; LEITE, Elaine A. Comparative Study of First-Derivative Spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography Methods for Quantification of Paclitaxel in Liposomal Formulation. **Journal Of The Brazilian Chemical**

Society, [S.L.], v. 26, n. 7, p. 1338-1343, 2015. http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150100.

BERNABEU, Ezequiel; GONZALEZ, Lorena; CAGEL, Maximiliano; GERGIC, Esteban P.; MORETTON, Marcela A.; CHIAPPETTA, Diego A. Novel Soluplus®-TPGS mixed micelles for encapsulation of paclitaxel with enhanced in vitro cytotoxicity on breast and ovarian cancer cell lines, **Colloids and Surfaces B**: **Biointerfaces,** [S.L], v. 140, p. 403-411, 16 abr. 2016. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.

BERNABEU, Ezequiel; CAGEL, Maximiliano; LAGOMARSINO, Eduardo; MORETTON, Marcela; CHIAPPETTA, Diego A. Paclitaxel: what has been done and the challenges remain ahead. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 526, n. 1-2, p. 474-495, jun. 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.016.

BOURNE D.W.: **Pharmacokinetics. in: Modern pharmaceutics**. 4. ed. Banker GS, Rhodes CT, Eds., Marcel Dekker Inc, New York, 2002

BRAT, Daniel J.; WINDEBAK, Anthony J.; BRIMIJOIN, Stephen. Emulsifier for intravenous cyclosporin inhibits neurite outgrowth, causes deficits in rapid axonal transport and leads to structural abnormalities in differentiating N1E. 115 neuroblastoma. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, *[s. l.]*, v**.** 261, n. 2, p. 803-810, 1992.

BROWN Cynthia K.; CHOKSHI, Hitesh P; NICKERSON, Beverly; REED, Robert A.; ROHRS, Brian R; SHAH, Pankaj. Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds. ***Dissolution Technologies,*** *[S.L], v.* 12 p. 56-65, 26. dez. 2004. https://doi.org/10.14227/DT120405P6

CABRAL, H.; MATSUMOTO, Y.; MIZUNO, K.; CHEN, Q.; MURAKAMI, M.; KIMURA, M.; TERADA, Y.; KANO, M. R.; MIYAZONO, K.; UESAKA, M. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. **Nature Nanotechnology**, *[s. l.]*, v. 6, n. 12, p. 815-823, 23 out. 2011. http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2011.166.

CABRAL, Horacio; KATAOKA, Kazunori. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 190, p. 465-476, set. 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.042.

CAGEL, Maximiliano; TESAN, Fiorella C.; BERNABEU, Ezequiel; SALGUEIRO, Maria J.; ZUBILLAGA, Marcela B.; MORETTON, Marcela A.; CHIAPPETTA, Diego A. Polymeric mixed micelles as nanomedicines: achievements and perspectives. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 113, p. 211-228, abr. 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.019.

CAMPBELL, Robert B.; FUKUMURA, Dai; BROWN, Edward B.; MAZZOLA, Laureen M.; IZUMI, Yotaro; JAIN, Rakesh K.; TORCHILIN, Vladimir P.; MUNN, Lance L. Cationic charge determines the distribution of liposomes between the vascular and extravascular compartments of tumors. **Cancer research**, *[s. l.]*, v. 62, n. 23 p. 6831-6836, 1 dez. 2002.

CARSTENS, Myrra G.; JONG, Pascal H.; VAN NOSTRUM, Cornelus F.; KEMMINK, Johan; VERRIJK, Ruud; LEEDE, Leo G.J.; CROMMELIN, Daan J.A.; HENNIK, Wim E.

The effect of core composition in biodegradable oligomeric micelles as taxane formulations. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 68, n. 3, p. 596-606, mar. 2008. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.014.

CERUTI, Maurizio; CROSASSO, Paola; BRUSA, Paola; ARPICCO, Silvia; DOSIO, Franco; CATTEL, Luigi. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing water-soluble prodrugs of paclitaxel. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 63, n. 1-2, p. 141-153, jan. 2000. http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00198-4.

CHA, Eui-Joon; KIM, Ju Eun; AHN, Cheol-Hee. Stabilized polymeric micelles by electrostatic interactions for drug delivery system. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, *[s. l.]*, v. 38, n. 4, p. 341-346, nov. 2009. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2009.08.006.

CHEN, Hao; LIN, Zongtao; ARNST, Kinsie; MILLER, Duane; LI, Wei. Tubulin Inhibitor-Based Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. **Molecules**, *[s. l.]*, v. 22, n. 8, p. 1281, 1 ago. 2017. http://dx.doi.org/10.3390/molecules22081281.

CHEN, Hongtao; KIM, Sungwon; LI, Li; WANG, Shuyi; PARK, Kinam; CHENG, Ji-Xin. Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Förster resonance energy transfer imaging. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, *[s. l.]*, v. 105, n. 18, p. 6596-6601, 6 maio 2008. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0707046105.

CHEN, Hongtao; KIM, Sungwon; HE, Wei; WANG, Haifeng; LOW, Philip S.; PARK, Kinam; CHENG, Ji-Xin. Fast Release of Lipophilic Agents from Circulating PEG-PDLLA Micelles Revealed by in Vivo Förster Resonance Energy Transfer Imaging. **Langmuir**, *[s. l.]*, v. 24, n. 10, p. 5213-5217, 8 fev. 2008. http://dx.doi.org/10.1021/la703570m.

CHEN, Wenjing, HOFFMANN, Andrew D.; LIU, Huiping, LIU, Xia. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. **NPJ Precision Oncology,** *[s. l.]*, v. 2, n. 1, p. 1-12, 16 fev. 2018. http://dx.doi.org/10.1038/s41698-018-0047-0.

CHIAPPETTA, Diego A.; SOSNIK, Alejandro. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 66, n. 3, p. 303-317, jun. 2007. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.03.022.

CHO, Yong Woo; LEE, Jaehwi; LEE, Sang Cheon; HUH, Kang Moo; PARK, Kinam. Hydrotropic agents for study of in vitro paclitaxel release from polymeric micelles. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 97, n. 2, p. 249-257, jun. 2004. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.03.013.

CLOGSTON, Jeffrey D.; PATRI, Anil K. Zeta Potential Measurement. **Methods In Molecular Biology**, *[s. l.]*, p. 63-70, 19 out. 2010. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6.

COLLIGNON, Joelle; SCHROEDER, Helene; LOUSBERG, Laurence; JERUSALEM, Guy. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. **Breast Cancer**: Targets and Therapy, *[s. l.]*, p. 93, maio 2016. http://dx.doi.org/10.2147/bctt.s69488.

COSTA, Paulo; LOBO, José Manuel Sousa. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, *[s. l.]*, v. 13, n. 2, p. 123-133, maio 2001. http://dx.doi.org/10.1016/s0928-0987(01)00095-1.

CROY, S.; KWON, G. Polymeric Micelles for Drug Delivery. **Current Pharmaceutical Design**, *[s. l.]*, v. 12, n. 36, p. 4669-4684, 1 dez. 2006. http://dx.doi.org/10.2174/138161206779026245.

DABHOLKAR, Rupa D.; SAWANT, Rishikesh M.; MONGAYT, Dimitriy A.; DEVARAJAN, Padma V.; TORCHILIN, Vladimir P. Polyethylene glycol–phosphatidylethanolamine conjugate (PEG–PE)-based mixed micelles: some properties, loading with paclitaxel, and modulation of p-glycoprotein-mediated efflux. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 315, n. 1-2, p. 148-157, jun. 2006. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.02.018.

DAI, Yunlu; XU, Can; SUN, Xiaolian; CHEN, Xiaoyuan. Nanoparticle design strategies for enhanced anticancer therapy by exploiting the tumour microenvironment. **Chemical Society Reviews**, *[s. l.]*, v. 46, n. 12, p. 3830-3852, 2017. http://dx.doi.org/10.1039/c6cs00592f.

DANAFAR, Hossein; DAVARAN, Soodabeh; ROSTAMIZADEH, Kobra; VALIZADEH, Hadi; HAMIDI, Mehrdad. Biodegradable m-PEG/PCL core-shell micelles: preparation and characterization as a sustained release formulation for curcumin. **Advanced pharmaceutical bulletin** v. 4, n. Suppl 2, p.501, 4. dez. 2014. http://dx.doi.org/10.5681/APB.2014.074.

DESAI, Neil; TRIEU, Vuong; YAO, Zhiwen; LOUIE, Leslie; CI, Sherry; YANG, Andrew; TAO, Chunlin; DE, Tapas; BEALS, Bridget; DYKES, Donald. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. **Clinical Cancer Research**, *[s. l.]*, v. 12, n. 4, p. 1317-1324, 15 fev. 2006. http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-05-1634.

DESAI, Neil; TRIEU, Vuong; DAMASCELLI, Bruno; SOON-SHIONG, Patrick. SPARC Expression Correlates with Tumor Response to Albumin-Bound Paclitaxel in Head and Neck Cancer Patients. **Translational Oncology**, *[s. l.]*, v. 2, n. 2, p. 59-64, jun. 2009. http://dx.doi.org/10.1593/tlo.09109.

DIEZI, Thomas A.; BAE, Younsoo; KWON, Glen S. Enhanced Stability of PEG-block-poly(N-hexyl stearate l-aspartamide) Micelles in the Presence of Serum Proteins. **Molecular Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 7, n. 4, p. 1355-1360, 30 jun. 2010. http://dx.doi.org/10.1021/mp100069p.

DONG, Yao-Da; BOYD, Ben J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 417, n. 1-2, p. 101-111, set. 2011. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.022.

DRANITSARIS, George; YU, Bo; WANG, Leiping; SUN, Weili; ZHOU, Yan; KING, Jennifer; KAURA, Satyin; ZHANG, Adams; YUAN, Peng. Abraxane® versus Taxol® for patients with advanced breast cancer: a prospective time and motion analysis from a chinese health care perspective. **Journal Of Oncology Pharmacy Practice**, *[s. l.]*, v. 22, n. 2, p. 205-211, 14 out. 2014. http://dx.doi.org/10.1177/1078155214556008.

DRANITSARIS, George; KING, Jennifer; KAURA, Satyin; YU, Bo; ZHANG, Adams. Nab-paclitaxel, docetaxel, or solvent-based paclitaxel in metastatic breast cancer: a cost-utility analysis from a chinese health care perspective. **Clinicoeconomics And Outcomes Research**, *[s. l.]*, p. 249, maio 2015. http://dx.doi.org/10.2147/ceor.s82194.

DUMONTET, Charles; SIKIC, Branimir I. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. **Journal of Clinical Oncology,** *[s. l.]*, v. 17, n. 3, p.1061-1061. 17 mar. 1999.

EMAMI, Jaber; REZAZADEH, Mahboubeh; HASANZADEH, Farshid; SADEGHI, Hojjat; MOSTAFAVI, Abolfazl; MINAIYAN, Mohsen; ROSTAMI, Mahboubeh; DAVIES, Neal. Development and in vitro/in vivo evaluation of a novel targeted polymeric micelle for delivery of paclitaxel. **International Journal Of Biological Macromolecules**, *[s. l.]*, v. 80, p. 29-40, set. 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.062.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Basic principles of drug delivery systems – the case of paclitaxel. **Advances In Colloid And Interface Science**, *[s. l.]*, v. 263, p. 95-130, jan. 2019. http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2018.11.004.

FAIRLEY, Nichole; HOANG, Bryan; ALLEN, Christine. Morphological Control of Poly(ethylene glycol)-block-poly(ε-caprolactone) Copolymer Aggregates in Aqueous Solution. **Biomacromolecules**, *[s. l.]*, v. 9, n. 9, p. 2283-2291, 15 ago. 2008. http://dx.doi.org/10.1021/bm800572p.

FAN, Zhuoyang; CHEN, Cheng; PANG, Xiaoying; YU, Zhou; QI, Yang; CHEN, Xinyi; LIANG, Huihui; FANG, Xiaoling; SHA, Xianyi. Adding Vitamin E-TPGS to the Formulation of Genexol-PM: specially mixed micelles improve drug-loading ability and cytotoxicity against multidrug-resistant tumors significantly. **Plos One**, *[s. l.]*, v. 10, n. 4, p. e0120129, 1 abr. 2015. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0120129.

FANG, Jun; ISLAM, Waliul; MAEDA, Hiroshi. Exploiting the dynamics of the EPR effect and strategies to improve the therapeutic effects of nanomedicines by using EPR effect enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[s. l.]*, v. 157, p. 142-160, 2020. http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.005.

FEIGIN L. A.; SVERGUN, D. I. **Structure Analysis by Small-Angle X-ray and Neutron Scattering**; Plenum Press: New York, 1987

FRENNING, Göran.; STRØMME, Maria. Drug release modeled by dissolution, diffusion, and immobilization. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 250, n. 1, p. 137-145, jan. 2003. http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00539-2.

FRENNING, Göran; BROHEDE, Ulrika; STRØMME, Maria. Finite element analysis of the release of slowly dissolving drugs from cylindrical matrix systems. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 107, n. 2, p. 320-329, out. 2005. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.06.016.

FU, Qiang; SUN, Jin; ZHANG, Wenping; SUI, Xiaofan; YAN, Zhongtian; HE, Zhonggui. Nanoparticle Albumin - Bound (NAB) Technology is a Promising Method for Anti-Cancer Drug Delivery. **Recent Patents On Anti-Cancer Drug Discovery**, *[s. l.]*, v. 4, n. 3, p. 262-272, 1 nov. 2009. Bentham Science Publishers Ltd. http://dx.doi.org/10.2174/157489209789206869

FUENTES, Eduardo; YAMEEN, Basit; BONG, Soung- Jae; SALVADOR-MORALES, Carolina; PALOMO, Ivan; VILOS, Cristian. Antiplatelet effect of differentially charged PEGylated lipid-polymer nanoparticles. **Nanomedicine**: **Nanotechnology, Biology and Medicine.** *[s. l.]*, v. 13, n. 3, p. 1089-1094, abr. 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2016.10.010.

GAO, Zhonggao; LUKYANOV, Anatoly N.; SINGHAL, Anurag; TORCHILIN, Vladimir P. Diacyllipid-Polymer Micelles as Nanocarriers for Poorly Soluble Anticancer Drugs. **Nano Letters**, *[s. l.]*, v. 2, n. 9, p. 979-982, 17 ago. 2002. http://dx.doi.org/10.1021/nl025604a.

GAO, Z.; LUKYANOV, A.N.; CHAKILAM, A.R.; TORCHILIN, V.P. PEG-PE/Phosphatidylcholine Mixed Immunomicelles Specifically Deliver Encapsulated Taxol to Tumor Cells of Different Origin and Promote their Efficient Killing. **Journal Of Drug Targeting**, *[s. l.]*, v. 11, n. 2, p. 87-92, jan. 2003. http://dx.doi.org/10.1080/1061186031000138623.

GARDNER, Erin R.; DAHUT, William L.; SCRIPTURE, Charity D.; JONES, Jacquin; ARAGON-CHING, Jeanny B.; DESAI, Neil; HAWKINS, Michael J.; SPARREBOOM, Alex; FIGG, William D. Randomized Crossover Pharmacokinetic Study of Solvent-Based Paclitaxel and nab-Paclitaxel. **Clinical Cancer Research**, *[s. l.]*, v. 14, n. 13, p. 4200-4205, 1 jul. 2008. http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-4592.

GE, Haixiong; HU, Yong; JIANG, Xiqun; CHENG, Daming; YUAN, Yuyan; BI, Hong; YANG, Changzheng. Preparation, characterization, and drug release behaviors of drug nimodipine-loaded poly(ε-caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(ε-caprolactone) amphiphilic triblock copolymer micelles. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, *[s. l.]*, v. 91, n. 6, p. 1463-1473, jun. 2002. http://dx.doi.org/10.1002/jps.10143.

GELDERBLOM, Hans; VERWEIJ, Jaap; NOOTER, Kees; SPARREBOOM, Alex. Cremophor EL. **European Journal Of Cancer**, *[s. l.]*, v. 37, n. 13, p. 1590-1598, set. 2001. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0959-8049(01)00171-x.

GHERSI, Davina; WILLSON, Melina L.; KI CHAN, Matthew Ming; SIMES, John; DONOGUE; Emma; WILCKEN, Nicholas. Taxane-containing regimens for metastatic breast cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews,** *[s. l.]*, i. 6, n. CD003366, jun. 2015. http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd003366.pub3

GILL, Kanwaldeep K.; KADDOUMI, Amal; NAZZAL, Sami. PEG–lipid micelles as drug carriers: physiochemical attributes, formulation principles and biological implication. **Journal Of Drug Targeting**, *[s. l.]*, v. 23, n. 3, p. 222-231, 30 dez. 2014. http://dx.doi.org/10.3109/1061186x.2014.997735.

GOLOMBEK, Susanne K.; MAY, Jan-Niklas; THEEK, Benjamin; APPOLD, Lia; DRUDE, Natascha; KIESSLING, Fabian; LAMMERS, Twan. Tumor targeting via EPR: strategies to enhance patient responses. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[s. l.]*, v. 130, p. 17-38, maio 2018. http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.007.

GRADISHAR, William J.; TJULANDIN, Sergei; DAVIDSON, Neville; SHAW, Heather; DESAI, Neil; BHAR, Paul; HAWKINS, Michael; O'SHAUGHNESSY, Joyce. Phase III Trial of Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel Compared With Polyethylated Castor Oil–Based Paclitaxel in Women With Breast Cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, *[s. l.]*, v. 23, n. 31, p. 7794-7803, 1 nov. 2005. http://dx.doi.org/10.1200/jco.2005.04.937.

GREEN, M.R.; MANIKHAS, G.M.; ORLOV, S.; AFANASYEV, B.; MAKHSON, A.M.; BHAR, P.; HAWKINS, M.J. Abraxane®, a novel Cremophor®-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. **Annals Of Oncology**, *[s. l.]*, v. 17, n. 8, p. 1263-1268, ago. 2006. http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdl104.

GREF, R; LÜCK, M; QUELLEC, P; MARCHAND, M; DELLACHERIE, E; HARNISCH, S; BLUNK, T; MÜLLER, R.H. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (peg chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. **Colloids And Surfaces B**: Biointerfaces, *[s. l.]*, v. 18, n. 3-4, p. 301-313, out. 2000. http://dx.doi.org/10.1016/s0927-7765(99)00156-3.

GRODOWSKA, Katarzyna; PARCZEWSKI, Andrzej. Organic solvents in the pharmaceutical industry. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research,** *[s. l.]*, v. 67, n. 1, p. 3-12, 2010

GUO, B. H., KAI, G. Y.; JIN, H. B. TANG, K. X. Taxol synthesis. **African Journal of Biotechnology.** *[s. l.]*, v. 5, n. 1, p. 15-20, 2 jan. 2006.

HAMAGUCHI, Tetsuya; MATSUMURA, Yasuhiro; SUZUKI, Masanobu; SHIMIZU, Kazuhisa; GODA, Rika; NAKAMURA, Iwao; NAKATOMI, Ichiro; YOKOYAMA, Masayuki; KATAOKA, Kazunori; KAKIZOE, Tadao. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. **British Journal Of Cancer**, *[s. l.]*, v. 92, n. 7, p. 1240-1246, 22 mar. 2005. http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6602479.

HASSANZADEH, Salman; KHOEE, Sepideh; FARROKHI, Vahid; MAHDAVI, Mohamad; FOROUMADI, Alireza. Mixed micellar nanoparticles based on PCL-PEG-PPO-PEG-PCL pentablocks. **Journal Of Polymer Research**, *[s. l.]*, v. 21, n. 7, p. 1-12, jul. 2014. http://dx.doi.org/10.1007/s10965-014-0508-2.

HENNENFENT, K.L.; GOVINDAN, R. Novel formulations of taxanes: a review. old wine in a new bottle? **Annals Of Oncology**, *[s. l.]*, v. 17, n. 5, p. 735-749, maio 2006. http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdj100.

HIGUCHI, Takeru. Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, *[s. l.]*, v. 50, n. 10, p. 874-875, out. 1961. http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600501018.

HIGUCHI, Takeru. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, *[s. l.]*, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, dez. 1963. http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600521210.

HONARY, Soheyla; ZAHIR, Foruhe. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. [S.L], v.12, n. 2, p. 255-264, 9 maio. 2012. http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19

HOSSEINI, Hedayatollah; OBRADOVIć, Milan M. S.; HOFFMANN, Martin; HARPER, Kathryn L.; SOSA, Maria Soledad; WERNER-KLEIN, Melanie; NANDURI, Lahiri Kanth; WERNO, Christian; EHRL, Carolin; MANECK, Matthias. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. **Nature**, *[s. l.]*, v. 540, n. 7634, p. 552-558, 14 dez. 2016. http://dx.doi.org/10.1038/nature20785.

HU, Yong; XIE, Jingwei; TONG, Yen Wah; WANG, Chi-Hwa. Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 118, n. 1, p. 7-17, mar. 2007. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.11.028.

HUA, Chong; DONG, Chang-Ming. Synthesis, characterization, effect of architecture on crystallization of biodegradable poly(ε-caprolactone)-b-poly(ethylene oxide) copolymers with

different arms and nanoparticles thereof. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, *[s. l.]*, v. 82, n. 3, p. 689-700, 2007. http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.31167.

HUSSEIN, Yasser; YOUSSRY, Mohamed. Polymeric Micelles of Biodegradable Diblock Copolymers: enhanced encapsulation of hydrophobic drugs. **Materials**, *[s. l.]*, v. 11, n. 5, p. 688, 27 abr. 2018. http://dx.doi.org/10.3390/ma11050688.

HWANG, Duhyeong; RAMSEY, Jacob D.; KABANOV, Alexander V. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: from nanoformulation to clinical approval. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[s. l.]*, v. 156, p. 80-118, 2020. http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2020.09.009.

HYUNA, Sung, FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L; LAVERSANNE, Mathieu; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin; BRAY, Freddie. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J. Clin**, *[s. l.]*, v. 71, n. 3, p. 209-249, 4. fev. 2021. https://doi.org/10.3322/caac.21660

IARC, International Agency for Research on Cancer, Cancer Tomorrow, **Estimated number of new cases from 2020 to 2040.** Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz. Acesso em: 14 de out. 2021.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, **Estimativa 2020 - Introdução.** Disponível em: https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao. Acesso em: 08 de novembro de 2020.

ISLAM, Rayhanul; MAEDA, Hiroshi; FANG, Jun. Factors affecting the dynamics and heterogeneity of the EPR effect: pathophysiological and pathoanatomic features, drug formulations and physicochemical factors. **Expert Opinion On Drug Delivery**, *[s. l.]*, v. 19, n. 2, p. 199-212, 29 jan. 2021. http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2021.1874916.

JACKSON, John K.; SKINNER, Kevin C.; BURGESS, Laurette; SUN, Tyler; HUNTER, William L.; BURT, Helen M. Clitaxel-Loaded Crosslinked Hyaluronic Acid Films for the Prevention of Postsurgical Adhesions. **Pharmaceutical Research**, *[s. l.]*, v. 19, n. 4, p. 411-417, 2002. http://dx.doi.org/10.1023/a:1015175108183.

JOHNSTON, Stephen R.D. The role of chemotherapy and targeted agents in patients with metastatic breast cancer. **European Journal Of Cancer**, *[s. l.]*, v. 47, p. 38-47, set. 2011. http://dx.doi.org/10.1016/s0959-8049(11)70145-9.

JIANG, Xulin; LI, Lihua; LIU, Jia; HENNINK, Wim E.; ZHUO, Renxi. Facile Fabrication of Thermo-Responsive and Reduction-Sensitive Polymeric Micelles for Anticancer Drug Delivery. **Macromolecular Bioscience**, *[s. l.]*, v. 12, n. 5, p. 703-711, 11 abr. 2012. http://dx.doi.org/10.1002/mabi.201100459.

JIANG, Wen; KIM, Betty Y. S.; RUTKA, James T.; CHAN, Warren C. W. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. **Nature Nanotechnology**, *[s. l.]*, v. 3, n. 3, p. 145-150, mar. 2008. http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2008.30.

JOKERST, Jesse V; LOBOVKINA, Tatsiana; ZARE, Richard N; GAMBHIR, Sanjiv s. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. **Nanomedicine**, *[s. l.]*, v. 6, n. 4, p. 715-728, jun. 2011. http://dx.doi.org/10.2217/nnm.11.19.

KABANOV, A.V.; CHEKHONIN, V.P.; ALAKHOV, V.Yu.; BATRAKOVA, E.V.; LEBEDEV, A.s.; MELIK-NUBAROV, N.s.; ARZHAKOV, S.A.; LEVASHOV, A.V.; MOROZOV, G.V.; SEVERIN, E.s. The neuroleptic activity of haloperidol increases after its

solubilization in surfactant micelles. **Febs Letters**, *[s. l.]*, v. 258, n. 2, p. 343-345, 4 dez. 1989. http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(89)81689-8.

KABANOV, Alexander V; BATRAKOVA, Elena V; ALAKHOV, Valery Yu. Pluronic® block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[s. l.]*, v. 54, n. 5, p. 759-779, set. 2002. http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00047-9.

KAPADIYA, Nidhi; INDRAJEET, Singhvi; KHUSHBOO, Mehta; GAURI, Karwani; SEN, Dhrubo Jyoti. Hydrotropy: A promising tool for solubility enhancement: A review. **International Journal of Drug Development and Research**, *[s. l.]*, v3, n. 2, p.26-33, 12 abr. 2011.

KASTANTIN, Mark; ANANTHANARAYANAN, Badriprasad; KARMALI, Priya; RUOSLAHTI, Erkki; TIRRELL, Matthew. Effect of the Lipid Chain Melting Transition on the Stability of DSPE-PEG(2000) Micelles. **Langmuir**, *[s. l.]*, v. 25, n. 13, p. 7279-7286, 9 abr. 2009. http://dx.doi.org/10.1021/la900310k.

KATAOKA, Kazunori; HARADA, Atsushi; NAGASAKI, Yukio. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[s. l.]*, v. 64, p. 37-48, dez. 2012. http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.013.

KHALIFA, Alaa M.; ELSHEIKH, Manal A.; KHALIFA, Amr M.; ELNAGGAR, Yosra S.R. Current strategies for different paclitaxel-loaded Nano-delivery Systems towards therapeutic applications for ovarian carcinoma: a review article. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 311-312, p. 125-137, out. 2019. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.08.034.

KIKHNEY, Alexey G.; SVERGUN, Dmitri I. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. **Febs Letters**, *[s. l.]*, v. 589, n. 19, p. 2570-2577, 29 ago. 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.027.

KIM, So Yeon; SHIN, Il Gyun; LEE, Young Moo; CHO, Chong Su; SUNG, Yong Kiel. Methoxy poly(ethylene glycol) and ϵ-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 51, n. 1, p. 13-22, jan. 1998. http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659(97)00124-7.

KIM, Sung Chul; KIM, Dong Wook; SHIM, Yong Ho; BANG, Joon Seok; OH, Hun Seung; KIM, Sung Wan; SEO, Min Hyo. In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 72, n. 1-3, p. 191-202, maio 2001. http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00275-9.

KIM, Tae-You; KIM, Dong-Wan; CHUNG, Jae-Yong; SHIN, Sang Goo; KIM, Sung-Chul; HEO, Dae Seog; KIM, Noe Kyeong; BANG, Yung-Jue. Phase I and Pharmacokinetic Study of Genexol-PM, a Cremophor-Free, Polymeric Micelle-Formulated Paclitaxel, in Patients with Advanced Malignancies. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 3708-3716, 1 jun. 2004. http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0655.

KIM, Sung Ho; TAN, Jeremy P. K.; NEDERBERG, Fredrik; FUKUSHIMA, Kazuki; YANG, Yi Yan; WAYMOUTH, Robert M.; HEDRICK, James L. Mixed Micelle Formation through Stereocomplexation between Enantiomeric Poly(lactide) Block Copolymers. **Macromolecules**, *[s. l.]*, v. 42, n. 1, p. 25-29, 2009. http://dx.doi.org/10.1021/ma801739x.

KIM, Sung Ho; TAN, Jeremy P.K.; FUKUSHIMA, Kazuki; NEDERBERG, Fredrik; YANG, Yi Yan; WAYMOUTH, Robert M.; HEDRICK, James L. Thermoresponsive nanostructured polycarbonate block copolymers as biodegradable therapeutic delivery carriers. **Biomaterials**, *[s. l.]*, v. 32, n. 23, p. 5505-5514, ago. 2011. http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.017.

KIM, Sungwon; SHI, Yunzhou; KIM, Ji Young; PARK, Kinam; CHENG, Ji-Xin. Overcoming the barriers in micellar drug delivery: loading efficiency, in vivo stability and micelle cell interaction. **Expert Opinion On Drug Delivery**, *[s. l.]*, v. 7, n. 1, p. 49-62, 2010. http://dx.doi.org/10.1517/17425240903380446.

KORSMEYER, R.W.; PEPPAS, N.A. Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems. In: ROSEMAN, T.J.; MANSDORF, S.Z., (Eds.). **Controlled release delivery systems**. New York: Marcel Dekker Inc., p. 77-90, 1981.7

KORSMEYER, Richard W.; GURNY, Robert; DOELKER, Eric; BURI, Pierre; PEPPAS, Nikolaos A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 15, n. 1, p. 25-35, maio 1983. http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9.

KOUCHAKZADEH, Hasan; SHOJAOSADATI, Seyed Abbas; MAGHSOUDI, Amir; FARAHANI, Ebrahim Vasheghani. Optimization of PEGylation Conditions for BSA Nanoparticles Using Response Surface Methodology. **Aaps Pharmscitech**, *[s. l.]*, v. 11, n. 3, p. 1206-1211, 3 ago. 2010. http://dx.doi.org/10.1208/s12249-010-9487-8.

KULTHE, Sushant S.; CHOUDHARI, Yogesh M.; INAMDAR, Nazma N.; MOURYA, Vishnukant. Polymeric micelles: authoritative aspects for drug delivery. **Designed Monomers And Polymers**, *[s. l.]*, v. 15, n. 5, p. 465-521, 2 jul. 2012. http://dx.doi.org/10.1080/1385772x.2012.688328.

KUMAR, V. Sampath, RAJA, C. Raja; JAYAKUMAR, C. A review on solubility enhancement using hydrotropic phenomena. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci**, [S.L], v. 6, n. 6, p. 1-7, 2014.

KWON, Glen S. Polymeric Micelles for Delivery of Poorly Water-Soluble Compounds. **Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems**, *[s. l.]*, v. 20, n. 5, p. 357-403, 2003. http://dx.doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v20.i5.20.

KWON, Glen S.; KATAOKA, Kazunori. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[s. l.]*, v. 16, n. 2-3, p. 295-309, set. 1995. http://dx.doi.org/10.1016/0169-409x(95)00031-2.

LA, Sung Bum; OKANO, Teruo; KATAOKA, Kazunori. Preparation and Characterization of the Micelle-Forming Polymeric Drug Indomethacin-lncorporated Polyfethylene oxide-Poly(β-benzyl L-aspartate) Block Copolymer Micelles. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, *[s. l.]*, v. 85, n. 1, p. 85-90, jan. 1996. http://dx.doi.org/10.1021/js950204r.

LAMMERS, Twan. Macro-nanomedicine: targeting the big picture. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 294, p. 372-375, jan. 2019. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.11.031.

LANGRIDGE, Timothy D.; GEMEINHART, Richard A. Toward understanding polymer micelle stability: density ultracentrifugation offers insight into polymer micelle stability in human fluids. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 319, p. 157-167, mar. 2020. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.038.

LAZZARO, Carlo; BORDONARO, Roberto; COGNETTI, Francesco; FABI; PLACIDO, Sabino de; MARCHETTI; BOTTICELLI; PRONZATO; MARTELLI; ARPINO, Grazia. An Italian cost-effectiveness analysis of paclitaxel albumin (nab-paclitaxel) versus conventional paclitaxel for metastatic breast cancer patients: the costanza study. **Clinicoeconomics And Outcomes Research**, *[s. l.]*, p. 125, abr. 2013. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.2147/ceor.s41850.

LEE, Jaehwi; LEE, Sang Cheon; ACHARYA, Ghanashyam; CHANG, Ching-Jer; PARK, Kinam. Hydrotropic Solubilization of Paclitaxel: Analysis of Chemical Structures for Hydrotropic Property. **Pharmaceutical Research**, *[s. l.]*, v. 20, n. 7, p. 1022-1030, 2003. http://dx.doi.org/10.1023/a:1024458206032.

LEMAIRE, V. Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 258, n. 1-2, p. 95-107, 4 jun. 2003. http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(03)00165-0.

LEO, Chandra P.; LEO, Cornelia; SZUCS, Thomas D. Breast cancer drug approvals by the US FDA from 1949 to 2018. **Nature Reviews Drug Discovery**, *[s. l.]*, v. 19, n. 1, p. 11-11, 2020. http://dx.doi.org/10.1038/d41573-019-00201-w.

LETCHFORD, Kevin; ZASTRE, Jason; LIGGINS, Richard; BURT, Helen. Synthesis and micellar characterization of short block length methoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(caprolactone) diblock copolymers. **Colloids And Surfaces B**: Biointerfaces, *[s. l.]*, v. 35, n. 2, p. 81-91, maio 2004. http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.02.012.

LI, Guiying; SHI, Linqi; MA, Rujiang; AN, Yingli; HUANG, Nan. Formation of Complex Micelles with Double-Responsive Channels from Self-Assembly of Two Diblock Copolymers. **Angewandte Chemie International Edition**, *[s. l.]*, v. 45, n. 30, p. 4959-4962, 24 jul. 2006. http://dx.doi.org/10.1002/anie.200600172.

LI, Lingbing; TAN, Ye Bang. Preparation and properties of mixed micelles made of Pluronic polymer and PEG-PE. **Journal Of Colloid And Interface Science**, *[s. l.]*, v. 317, n. 1, p. 326-331, jan. 2008. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2007.09.053.

LIGGINS, Richard T.; BURT, Helen M. Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres: properties of microspheres made with low molecular weight polymers. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 222, n. 1, p. 19-33, jul. 2001. http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00690-1.

LIN, Jiaping; ZHU, Jianqi; CHEN, Tao; LIN, Shaoliang; CAI, Chunhua; ZHANG, Liangshun; ZHUANG, Ying; WANG, Xiao-Song. Drug releasing behavior of hybrid micelles containing polypeptide triblock copolymer. **Biomaterials**, *[s. l.]*, v. 30, n. 1, p. 108-117, jan. 2009. http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.010.

LIU, Junjie; LI, Menghuan; LUO, Zhong; DAI, Liangliang; GUO, Xingming; CAI, Kaiyong. Design of nanocarriers based on complex biological barriers in vivo for tumor therapy. **Nano Today**, *[s. l.]*, v. 15, p. 56-90, ago. 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2017.06.010.

LIU, S. Q.; TONG, Y. W.; YANG, Y. Y. Thermally sensitive micelles self-assembled from poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide)-b-poly(d,l-lactide-co-glycolide) for controlled delivery of paclitaxel. **Molecular Biosystems**, *[s. l.]*, v. 1, n. 2, p. 158, 2005. http://dx.doi.org/10.1039/b501756b.

LIU, Yuanxiu; KHAN, Abdur Rauf; DU, Xiyou; ZHAI, Yujia; TAN, Haining; ZHAI, Guangxi. Progress in the polymer-paclitaxel conjugate. **Journal Of Drug Delivery Science**

And Technology, *[s. l.]*, v. 54, p. 101237, dez. 2019. http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101237.

LO, Chun-Liang; LIN, Sheng-Jie; TSAI, Hsieh-Chih; CHAN, Wei-Hsiang; TSAI, Cheng-Hung; CHENG, Chien-Hsin D.; HSIUE, Ging-Ho. Mixed micelle systems formed from critical micelle concentration and temperature-sensitive diblock copolymers for doxorubicin delivery. **Biomaterials**, *[s. l.]*, v. 30, n. 23-24, p. 3961-3970, ago. 2009. http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.002.

LOGIE, Jennifer; OWEN, Shawn C.; MCLAUGHLIN, Christopher K.; SHOICHET, Molly S. PEG-Graft Density Controls Polymeric Nanoparticle Micelle Stability. **Chemistry Of Materials**, *[s. l.]*, v. 26, n. 9, p. 2847-2855, 23 abr. 2014. http://dx.doi.org/10.1021/cm500448x.

LU, Jiao; OWEN, Shawn C.; SHOICHET, Molly S. Stability of Self-Assembled Polymeric Micelles in Serum. **Macromolecules**, *[s. l.]*, v. 44, n. 15, p. 6002-6008, 8 jul. 2011. http://dx.doi.org/10.1021/ma200675w.

LU, Yang; ZHANG, Ershuai; YANG, Jianhai; CAO, Zhiqiang. Strategies to improve micelle stability for drug delivery. **Nano Research**, *[s. l.]*, v. 11, n. 10, p. 4985-4998, 1 ago. 2018. http://dx.doi.org/10.1007/s12274-018-2152-3.

LUKYANOV, Anatoly N.; GAO, Zhonggao; MAZZOLA, Laureen; TORCHILIN, Vladimir P. Polyethylene Glycol-Diacyllipid Micelles Demonstrate Increased Accumulation in Subcutaneous Tumors in Mice. **Pharmaceutical Research**, *[s. l.]*, v. 19, n. 10, p. 1424-1429, 2002. Springer Science and Business Media LLC.http://dx.doi.org/10.1023/a:1020488012264.

LUKYANOV, Anatoly N.; TORCHILIN, Vladimir P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[s. l.]*, v. 56, n. 9, p. 1273-1289, maio 2004. http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2003.12.004.

MAEDA, Hiroshi; WU, Jun; SAWA, Tomohiro; MATSUMURA, Yasuhiro; HORI, Katsuyoshi. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 65, n. 1-2, p. 271-284, mar. 2000. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00248-5.

MAEDA, Hiroshi. Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs via the EPR Effect: background and future prospects. **Bioconjugate Chemistry**, *[s. l.]*, v. 21, n. 5, p. 797-802, 16 abr. 2010a. http://dx.doi.org/10.1021/bc100070g.

MAEDA, Hiroshi. Nitroglycerin enhances vascular blood flow and drug delivery in hypoxic tumor tissues: analogy between angina pectoris and solid tumors and enhancement of the epr effect. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 142, n. 3, p. 296-298, mar. 2010b. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.002.

MAEDA, Hiroshi. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[s. l.]*, v. 91, p. 3-6, ago. 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.002.

MAEDA, Hiroshi; TSUKIGAWA, Kenji; FANG, Jun. A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors: next-generation chemotherapeutics and photodynamic therapy-problems, solutions, and prospects. **Microcirculation**, *[s. l.]*, v. 23, n. 3, p. 173-182, abr. 2016. http://dx.doi.org/10.1111/micc.12228

MAEDA, Hiroshi. Polymer therapeutics and the EPR effect. **Journal Of Drug Targeting**, *[s. l.]*, v. 25, n. 9-10, p. 781-785, 9 out. 2017. http://dx.doi.org/10.1080/1061186x.2017.1365878.

MATSUMURA, Yasuhiro. Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[s. l.]*, v. 60, n. 8, p. 899-914, maio 2008. http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.11.010.

MCLEOD, E; A LLOYD; SAMYSHKIN, Y; PRUNIÈRAS, F; CANNEY, P. A UK cost-utility analysis of paclitaxel albumin compared to solvent-based paclitaxel monotherapy and docetaxel monotherapy for pretreated metastatic breast cancer (MBC). **Value In Health**, *[s. l.]*, v. 13, n. 7, p. 269-275, nov. 2010. http://dx.doi.org/10.1016/s1098-3015(11)71991-x.

MENG, Fenghua; ENGBERS, Gerard H. M.; FEIJEN, Jan. Polyethylene glycol-grafted polystyrene particles. **Journal Of Biomedical Materials Research**, *[s. l.]*, v. 70, n. 1, p. 49-58, 2004. http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30056.

MILLER, Miles A.; ZHENG, Yao-Rong; GADDE, Suresh; PFIRSCHKE, Christina; ZOPE, Harshal; ENGBLOM, Camilla; KOHLER, Rainer H.; IWAMOTO, Yoshiko; YANG, Katherine S.; ASKEVOLD, Bjorn. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug. **Nature Communications**, *[s. l.]*, v. 6, n. 1, p. 1-13, 27 out. 2015. http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9692.

MILLER, Tobias; RACHEL, Reinhard; BESHEER, Ahmed; UEZGUEN, Senta; WEIGANDT, Markus; GOEPFERICH, Achim. Comparative Investigations on In Vitro Serum Stability of Polymeric Micelle Formulations. **Pharmaceutical Research**, *[s. l.]*, v. 29, n. 2, p. 448-459, fev. 2012. http://dx.doi.org/10.1007/s11095-011-0555-x.

MORENO-ASPITIA, Alvaro; A PEREZ, Edith. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel (ABI-007): a newer taxane alternative in breast cancer. **Future Oncology**, *[s. l.]*, v. 1, n. 6, p. 755-762, dez. 2005. Future Medicine Ltd. http://dx.doi.org/10.2217/14796694.1.6.755.

MU, Chao-Feng; BALAKRISHNAN, Prabagar; CUI, Fu-De; YIN, Yong-Mei; LEE, Yong-Bok; CHOI, Han-Gon; YONG, Chul Soon; CHUNG, Suk-Jae; SHIM, Chang-Koo; KIM, Dae-Duk. The effects of mixed MPEG–PLA/Pluronic® copolymer micelles on the bioavailability and multidrug resistance of docetaxel. **Biomaterials**, *[s. l.]*, v. 31, n. 8, p. 2371-2379, mar. 2010. http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.102.

MUSACCHIO, Tiziana; LAQUINTANA, Valentino; LATROFA, Andrea; TRAPANI, Giuseppe; TORCHILIN, Vladimir P. PEG-PE Micelles Loaded with Paclitaxel and Surface-Modified by a PBR-Ligand: synergistic anticancer effect. **Molecular Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 6, n. 2, p. 468-479, 2009. http://dx.doi.org/10.1021/mp800158c.

MUSTACCHI, Giorgio; LAURENTIIS, Michelino de. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: literature review. **Drug Design, Development And Therapy**, *[s. l.]*, p. 4303, ago. 2015. http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s86105.

NAGAMITSU, Akinori; GREISH, Khaled; MAEDA, Hiroshi. Elevating Blood Pressure as a Strategy to Increase Tumor-targeted Delivery of Macromolecular Drug SMANCS: cases of advanced solid tumors. **Japanese Journal Of Clinical Oncology**, *[s. l.]*, v. 39, n. 11, p. 756-766, 11 jul. 2009. http://dx.doi.org/10.1093/jjco/hyp074.

NAGARAJAN, R.; GANESH, K. Block copolymer self-assembly in selective solvents: spherical micelles with segregated cores. **The Journal Of Chemical Physics**, *[s. l.]*, v. 90, n. 10, p. 5843-5856, 15 maio 1989. http://dx.doi.org/10.1063/1.45639.

NARASIMHAN, Balaji. Mathematical models describing polymer dissolution: consequences for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[s. l.]*, v. 48, n. 2-3, p. 195-210, 11 jun. 2001. http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00117-x.

NCI, National Cancer Institute. **Drugs Approved for Breast Cancer**. Dipsonível em: https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/breast. Acesso em: 23 ago. 2022.

NEUMANN, Miguel G.; SCHMITT, Carla C.; PRIETO, Katia R.; GOI, Beatriz E. The photophysical determination of the minimum hydrotrope concentration of aromatic hydrotropes. **Journal Of Colloid And Interface Science**, *[s. l.]*, v. 315, n. 2, p. 810-813, nov. 2007. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2007.07.020.

NIE, Shufang; HSIAO, Wl Wendy; PAM, Weisan; YANG, Zhijun. Thermoreversible Pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. **International Journal Of Nanomedicine**, *[s. l.]*, p. 151, jan. 2011. http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s15057.

NISHIYAMA, Nobuhiro; KATAOKA, Kazunori. Nanostructured Devices Based on Block Copolymer Assemblies for Drug Delivery: designing structures for enhanced drug function. **Polymer Therapeutics II**, *[s. l.]*, p. 67-101, 2006 Springer-Verlag. http://dx.doi.org/10.1007/12_025.

NSEREKO, Sarah; AMIJI, Mansoor. Localized delivery of paclitaxel in solid tumors from biodegradable chitin microparticle formulations. **Biomaterials**, *[s. l.]*, v. 23, n. 13, p. 2723-2731, jul. 2002. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00005-4.

ODA, Caroline Mari Ramos. **Desenvolvimento de micelas poliméricas carreadoras de paclitaxel radiomarcadas com tecnécio-99m para aplicação no tratamento e diagnóstico de câncer**. 2015. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

ODA, Caroline Mari Ramos; FERNANDES, Renata Salgado; LOPES, Sávia Caldeira de Araújo; OLIVEIRA, Mônica Cristina de; CARDOSO, Valbert Nascimento; SANTOS, Daniel Moreira; PIMENTA, Adriano Monteiro de Castro; MALACHIAS, Angelo; PANIAGO, Rogério; TOWNSEND, Danyelle M. Synthesis, characterization and radiolabeling of polymeric nano-micelles as a platform for tumor delivering. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, *[s. l.]*, v. 89, p. 268-275, maio 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.144.

ODA, Caroline Mari Ramos; BARROS, André Luis Branco de; FERNANDES, Renata Salgado; MIRANDA, Sued Eustáquio Mendes; TEIXEIRA, Marina Xavier; CARDOSO, Valbert Nascimento; OLIVEIRA, Mônica Cristina; LEITE, Elaine Amaral. Freeze-dried diethylenetriaminepentaacetic acid-functionalized polymeric micelles containing paclitaxel: a kit formulation for theranostic application in cancer. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, *[s. l.]*, v. 46, p. 182-187, ago. 2018. http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.007.

ODA, Caroline Mari Ramos; MALFATTI-GASPERINI, Antônio Augusto; MALACHIAS, Angelo; POUND-LANA, Gwenaelle; MOSQUEIRA, Vanessa Carla Furtado; FERNANDES, Renata Salgado; OLIVEIRA, Mônica Cristina de; BARROS, André Luis Branco de; LEITE, Elaine Amaral. Physical and biological effects of paclitaxel encapsulation on disteraroylphosphatidylethanolamine-polyethyleneglycol polymeric micelles. **Colloids And Surfaces B**: Biointerfaces, *[s. l.]*, v. 188, p. 110760, abr. 2020a. http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110760.

ODA, Caroline Mari Ramos; SILVA, Juliana de Oliveira; FERNANDES, Renata Salgado; BRAGA, Alysson Vinícius; MACHADO, Renes de Resende; COELHO, Márcio de Matos; CASSALI, Geovanni Dantas; REIS, Diego Carlos; BARROS, André Luís Branco de; LEITE, Elaine Amaral. Encapsulating paclitaxel in polymeric nanomicelles increases antitumor activity and prevents peripheral neuropathy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, *[s. l.]*, v. 132, p. 110864, dez. 2020b. http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110864.

OWEN, Shawn C.; CHAN, Dianna P.y.; SHOICHET, Molly S. Polymeric micelle stability. **Nano Today**, *[s. l.]*, v. 7, n. 1, p. 53-65, fev. 2012. http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2012.01.002.

PANCHAGNULA, Ramesh. Pharmaceutical aspects of paclitaxel. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 172, n. 1-2, p. 1-15, out. 1998. http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(98)00188-4.

PEDERSEN, Jan Skov; GERSTENBERG, Michael C. Scattering Form Factor of Block Copolymer Micelles. **Macromolecules**, *[s. l.]*, v. 29, n. 4, p. 1363-1365, 1 jan. 1996. http://dx.doi.org/10.1021/ma9512115.

PEDERSEN, Jan Skov; SVANEBORG, Carsten; ALMDAL, Kristoffer; HAMLEY, Ian W.; YOUNG, Ron N. A Small-Angle Neutron and X-ray Contrast Variation Scattering Study of the Structure of Block Copolymer Micelles: ⁖ corona shape and excluded volume interactions. **Macromolecules**, *[s. l.]*, v. 36, n. 2, p. 416-433, 2003. http://dx.doi.org/10.1021/ma0204913.

PELTIER, Sandra; OGER, Jean-Michel; LAGARCE, Frédéric; COUET, William; BENOÎT, Jean-Pierre. Enhanced Oral Paclitaxel Bioavailability After Administration of Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules. **Pharmaceutical Research**, *[s. l.]*, v. 23, n. 6, p. 1243-1250, 25 maio 2006. http://dx.doi.org/10.1007/s11095-006-0022-2.

PETROS, Robby A.; DESIMONE, Joseph M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, *[s. l.]*, v. 9, n. 8, p. 615-627, 9 jul. 2010. http://dx.doi.org/10.1038/nrd2591.

PHAM, Duy Toan; CHOKAMONSIRIKUN, Athittaya; PHATTARAVORAKARN, Vipasiri; TIYABOONCHAI, Waree. Polymeric micelles for pulmonary drug delivery: a comprehensive review. **Journal Of Materials Science**, *[s. l.]*, v. 56, n. 3, p. 2016-2036, 7 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10853-020-05361-4.

PHILLIPS, Daniel J; PYGALL, Samuel R; COOPER, V Brett; MANN, James C. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, *[s. l.]*, v. 64, n. 11, p. 1549-1559, 25 abr. 2012. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01523.x.

PILLAI, Gopalakrishna. Nanomedicines for cancer therapy: an update of FDA approved and those under various stages of development. **SOJ Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.1, n. 2, p. 1-13, 2014.

PING, Peng; WANG, Wenshou; CHEN, Xuesi; JING, Xiabin. Poly(ε-caprolactone) Polyurethane and Its Shape-Memory Property. **Biomacromolecules**, *[s. l.]*, v. 6, n. 2, p. 587-592, 14 jan. 2005. http://dx.doi.org/10.1021/bm049477j.

PODRATZ, J. L.; WINDEBANK, A. J. Dialyzer associated neurotoxicity due to a change in fatty acid structure. **Trans Am Soc Neurochem**, *[s. l.]*, v. 24, 1993.

PRICE, Colin. Micelle formation by block copolymers in organic solvents. **Pure And Applied Chemistry**, *[s. l.]*, v. 55, n. 10, p. 1563-1572, 1 jan. 1983. http://dx.doi.org/10.1351/pac198355101563.

RAMAN, Chandrashekar; BERKLAND, Cory; KIM, Kyekyoon (Kevin); PACK, Daniel W. Modeling small-molecule release from PLG microspheres: effects of polymer degradation and nonuniform drug distribution. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 103, n. 1, p. 149-158, mar. 2005. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.012.

RAVIKUMAR, Rramaswamy; GANESH, Mani; SENTHIL, Venkatachalam; RAMESH, Yasam Venkata; JAKKI, Satya Lavanya; CHOI, Eun Young. Tetrahydro curcumin loaded PCL-PEG electrospun transdermal nanofiber patch: preparation, characterization, and in vitro diffusion evaluations. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, *[s. l.]*, v. 44, p. 342-348, abr. 2018. http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2018.01.016.

RIBEIRO, Caroline A. S.; CASTRO, Carlos E. de; ALBUQUERQUE, Lindomar J. C.; BATISTA, Carin C. S.; GIACOMELLI, Fernando C. Biodegradable nanoparticles as nanomedicines: are drug-loading content and release mechanism dictated by particle density? **Colloid And Polymer Science**, *[s. l.]*, v. 295, n. 8, p. 1271-1280, 9 jan. 2017. http://dx.doi.org/10.1007/s00396-016-4007-3.

RITGER, Philip L.; PEPPAS, Nikolaos A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 5, n. 1, p. 37-42, jun. 1987. http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659(87)90035-6.

ROE, Ryong-Joon. **Methods of X-ray and neutron scattering in polymer science.** Oxford University Press on Demand, 2000.

ROHRS, Brian R. **Dissolution method development for poorly soluble compounds**. Dissolution Technologies 8, n. 3 p. 6-12. 2001

RUDMANN, Daniel G.; ALSTON, James T.; HANSON, Jeffrey C.; HEIDEL, Shawn. High Molecular Weight Polyethylene Glycol Cellular Distribution and PEG-associated Cytoplasmic Vacuolation Is Molecular Weight Dependent and Does Not Require Conjugation to Proteins. **Toxicologic Pathology**, *[s. l.]*, v. 41, n. 7, p. 970-983, 20 jun. 2013. http://dx.doi.org/10.1177/0192623312474726.

SAADAT, Ebrahim; AMINI, Mohsen; KHOSHAYAND, Mohammad Reza; DINARVAND, Rassoul; DORKOOSH, Farid A. Synthesis and optimization of a novel polymeric micelle based on hyaluronic acid and phospholipids for delivery of paclitaxel, in vitro and in-vivo evaluation. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 475, n. 1-2, p. 163-173, nov. 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.030.

SALTZ, Leonard B.; BACH, Peter B. Albumin-Bound Paclitaxel plus Gemcitabine in Pancreatic Cancer. **New England Journal Of Medicine**, *[s. l.]*, v. 370, n. 5, p. 478-480, 30 jan. 2014. Massachusetts Medical Society. http://dx.doi.org/10.1056/nejmc1314761.

SANADA, Yusuke; AKIBA, Isamu; SAKURAI, Kazuo; SHIRAISHI, Kouichi; YOKOYAMA, Masayuki; MYLONAS, Efstratios; OHTA, Noboru; YAGI, Naoto; SHINOHARA, Yuya; AMEMIYA, Yoshiyuki. Hydrophobic Molecules Infiltrating into the Poly(ethylene glycol) Domain of the Core/Shell Interface of a Polymeric Micelle: evidence

obtained with anomalous small-angle x-ray scattering. **Journal Of The American Chemical Society**, *[s. l.]*, v. 135, n. 7, p. 2574-2582, 31 jan. 2013. http://dx.doi.org/10.1021/ja308965j.

SARISOZEN, Can; VURAL, Imran; LEVCHENKO, Tatyana; HINCAL, A. Atilla; TORCHILIN, Vladimir P. PEG-PE-based micelles co-loaded with paclitaxel and cyclosporine A or loaded with paclitaxel and targeted by anticancer antibody overcome drug resistance in cancer cells. **Drug Delivery**, *[s. l.]*, v. 19, n. 4, p. 169-176, 16 abr. 2012. http://dx.doi.org/10.3109/10717544.2012.674163.

SATO, Takaaki; SAKAI, Hiromi; SOU, Keitaro; BUCHNER, Richard; TSUCHIDA, Eishun. Poly(ethylene glycol)-conjugated Phospholipids in Aqueous Micellar Solutions: hydration, static structure, and interparticle interactions. **The Journal Of Physical Chemistry B**, *[s. l.]*, v. 111, n. 6, p. 1393-1401, 18 jan. 2007. http://dx.doi.org/10.1021/jp067011k.

SAWANT, Rupa R.; TORCHILIN, Vladimir P. Polymeric Micelles: polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine (peg-pe)-based micelles as an example. **Methods In Molecular Biology**, *[s. l.]*, p. 131-149, 2010. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2_9.

SEKI, Takahiro; FANG, Jun; MAEDA, Hiroshi. Enhanced delivery of macromolecular antitumor drugs to tumors by nitroglycerin application. **Cancer Science**, *[s. l.]*, v. 100, n. 12, p. 2426-2430, dez. 2009. http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01323.x.

SEO, Min Hyo; LEE, Won. **Preparation method of polymeric micellar nanoparticles composition containing a poorly water-soluble drug.** Depositante: Min Hyo Seo, Won Lee. Procurador: Samyang Corportation. US 2011/0257253 A1. Depósito: 29 jun. 2009. Concessão: 20 out. 2011.

SHEN, Shihong; WU, Youshen; LIU, Yongchun; WU, Daocheng. High drug-loading nanomedicines: progress, current status, and prospects. **International Journal Of Nanomedicine**, *[s. l.]*, v. 12, p. 4085-4109, maio 2017. http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s132780.

SHI, Bin; FANG, Chao; YOU, Mei Xian; ZHANG, Yan; FU, Shoukuan; PEI, Yuanying. Stealth MePEG-PCL micelles: effects of polymer composition on micelle physicochemical characteristics, in vitro drug release, in vivo pharmacokinetics in rats and biodistribution in s180 tumor bearing mice. **Colloid And Polymer Science**, *[s. l.]*, v. 283, n. 9, p. 954-967, 2005. http://dx.doi.org/10.1007/s00396-004-1243-8.

SHI, Rui; CHEN, Dafu; LIU, Quanyong; WU, Yan; XU, Xiaochuan; ZHANG, Liqun; TIAN, Wei. Recent Advances in Synthetic Bioelastomers. **International Journal Of Molecular Sciences**, *[s. l.]*, v. 10, n. 10, p. 4223-4256, 29 set. 2009. http://dx.doi.org/10.3390/ijms10104223.

SHIM, D. F. K., MARQUES, C; CATES, M. E. Diblock copolymers: comicellization and coadsorption. **Macromolecules,** *[s. l.]*, v. 24, n. 19, p.5309-5314, 1991.

SHIRAISHI, Kouichi; SANADA, Yusuke; MOCHIZUKI, Shinichi; KAWANO, Kumi; MAITANI, Yoshie; SAKURAI, Kazuo; YOKOYAMA, Masayuki. Determination of polymeric micelles' structural characteristics, and effect of the characteristics on pharmacokinetic behaviors. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 203, p. 77-84, abr. 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.017.

SIEPMANN, J.; AINAOUI, A.; VERGNAUD, J.M.; BODMEIER, R. Calculation of the Dimensions of Drug-Polymer Devices Based on Diffusion Parameters. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, *[s. l.]*, v. 87, n. 7, p. 827-832, jul. 1998. http://dx.doi.org/10.1021/js980006a.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Sink conditions do not guarantee the absence of saturation effects. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 577, p. 119009, mar. 2020. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.119009.

SINDHWANI, Shrey; SYED, Abdullah Muhammad; NGAI, Jessica; KINGSTON, Benjamin R.; MAIORINO, Laura; ROTHSCHILD, Jeremy; MACMILLAN, Presley; ZHANG, Yuwei; RAJESH, Netra Unni; HOANG, Tran. The entry of nanoparticles into solid tumours. **Nature Materials**, *[s. l.]*, v. 19, n. 5, p. 566-575, 13 jan. 2020. http://dx.doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2.

SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly-ϵ-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 278, n. 1, p. 1-23, jun. 2004. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.01.044.

SOFIAS, Alexandros Marios; DUNNE, Michael; STORM, Gert; ALLEN, Christine. The battle of “nano” paclitaxel. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[s. l.]*, v. 122, p. 20-30, dez. 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2017.02.003.

SOO, Patrick Lim; LUO, Laibin; MAYSINGER, Dusica; EISENBERG, Adi. Incorporation and Release of Hydrophobic Probes in Biocompatible Polycaprolactone-block-poly(ethylene oxide) Micelles: implications for drug delivery. **Langmuir**, *[s. l.]*, v. 18, n. 25, p. 9996-10004, 7 nov. 2002. http://dx.doi.org/10.1021/la026339b.

SOUZA, Anna Carolina da Silva. **Micelas mistas de diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol e poli-Ɛ-caprolactona-polietilenoglicol contendo paclitaxel: caracterização físico-química e estudo de estabilidade.** 2017. 64f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

SURAPANENI, Madhu S.; DAS, Sudip K.; DAS, Nandita G. Designing Paclitaxel Drug Delivery Systems Aimed at Improved Patient Outcomes: current status and challenges. **Isrn Pharmacology**, [s. l.], v. 2012, p. 1-15, 12 ago. 2012. http://dx.doi.org/10.5402/2012/623139.

SPARANO, Joseph A.; ZHAO, Fengmin; MARTINO, Silvana; LIGIBEL, Jennifer A.; PEREZ, Edith A.; SAPHNER, Tom; WOLFF, Antonio C.; SLEDGE, George W.; WOOD, William C.; DAVIDSON, Nancy E. Long-Term Follow-Up of the E1199 Phase III Trial Evaluating the Role of Taxane and Schedule in Operable Breast Cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, *[s. l.]*, v. 33, n. 21, p. 2353-2360, 20 jul. 2015. http://dx.doi.org/10.1200/jco.2015.60.9271.

SPARREBOOM, Alex; ZUYLEN, Lia Van; BROUWER, Eric; LOOS, Walter J.; BRUJIN, Peter De; GELDERBLOM, Hans; PILLAY, Marrimuthoo; NOOTER, Kees; STOTER, Gerrit; VERWEIJ, Jaap. Cremophor EL-mediated alteration of paclitaxel distribution in human blood: clinical pharmacokinetic implications. **Cancer research,** *[s. l.]*, v. 59, n. 7, p. 1454-1457, 1999

STOLNIK, Snjezana; DUNN, Susan E.; GARNETT, Martin C.; DAVIES, Martyn C.; COOMBES, Allan G. A.; TAYLOR, D. C.; IRVING, M. P.; PURKISS, S. C.; TADROS, T. F.; DAVIS, Stanley S. Surface Modification of Poly(lactide-co-glycolide) Nanospheres by Biodegradable Poly(lactide)-Poly(ethylene glycol) Copolymers. **Pharmaceutical Research**, *[s. l.]*, v. 11, n. 12, p. 1800-1808, 1994. http://dx.doi.org/10.1023/a:1018931820564.

SZNITOWSKA, Malgorzata; KLUNDER, Malgorzata; PLACZEK, Marcin. Paclitaxel Solubility in Aqueous Dispersions and Mixed Micellar Solutions of Lecithin. **Chemical And**

Pharmaceutical Bulletin, *[s. l.]*, v. 56, n. 1, p. 70-74, 2008. Pharmaceutical Society of Japan. http://dx.doi.org/10.1248/cpb.56.70.

TAHIR, Nayab; MADNI, Asadullah; CORREIA, Alexandra; REHMAN, Mubashar; BALASUBRAMANIAN, Vimalkumar; KHAN, Muhammad Muzamil; A SANTOS, Hélder. Lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled delivery of hydrophilic and lipophilic doxorubicin for breast cancer therapy. **International Journal Of Nanomedicine**, *[s. l.]*, v. 14, p. 4961-4974, jul. 2019. http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s209325.

TANG, Li; YANG, Xujuan; YIN, Qian; CAI, Kaimin; WANG, Hua; CHAUDHURY, Isthier; YAO, Catherine; ZHOU, Qin; KWON, Mincheol; HARTMAN, James A. Investigating the optimal size of anticancer nanomedicine. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, *[s. l.]*, v. 111, n. 43, p. 15344-15349, 14 out. 2014. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1411499111.

TAO, Youhua; XU, Jing; CHEN, Mingqing; BAI, Huiyu; LIU, Xiaoya. Core cross-linked hyaluronan-styrylpyridinium micelles as a novel carrier for paclitaxel. **Carbohydrate Polymers**, *[s. l.]*, v. 88, n. 1, p. 118-124, mar. 2012. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.075.

TEIXEIRA, Marina Xavier. **Avaliação dos parâmetros físico-químicas e da atividade hemolítica de micelas poliméricas mistas de paclitaxel.** 2019. 49f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

TORCHILIN, Vladimir P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 73, n. 2-3, p. 137-172, jun. 2001. http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00299-1.

TORCHILIN, Vladimir P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **The Aaps Journal**, *[s. l.]*, v. 9, n. 2, p. 128-147, jun. 2007. http://dx.doi.org/10.1208/aapsj0902015.

TRUCILLO, P.; CAMPARDELLI, R.; REVERCHON, E. Supercritical CO 2 assisted liposomes formation: optimization of the lipidic layer for an efficient hydrophilic drug loading. **Journal Of Co2 Utilization**, *[s. l.]*, v. 18, p. 181-188, mar. 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcou.2017.02.001.

US Pharmacopeial Forum, The Dissolution Procedure: Development and Validation, **Pharmacopeial Previews**, v. 30, n.1, p. 351–363, 2004.

VAKIL, Ronak; KWON, Glen S. Poly(ethylene glycol)-b-Poly(ε-caprolactone) and PEG-Phospholipid Form Stable Mixed Micelles in Aqueous Media. **Langmuir**, *[s. l.]*, v. 22, n. 23, p. 9723-9729, 7 out. 2006. http://dx.doi.org/10.1021/la061408y.

VERONESE, Francesco M. **PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications**, Springer Science & Business Media, 2009.

WAKS, Adrienne G.; WINER, Eric P. Breast Cancer Treatment. **Jama**, *[s. l.]*, v. 321, n. 3, p. 288, 22 jan. 2019. http://dx.doi.org/10.1001/jama.2018.19323.

WAN, Xiaomeng; MIN, Yuanzeng; BLUDAU, Herdis; KEITH, Andrew; SHEIKO, Sergei S.; JORDAN, Rainer; WANG, Andrew Z.; SOKOLSKY-PAPKOV, Marina; KABANOV, Alexander V. Drug Combination Synergy in Worm-like Polymeric Micelles Improves

Treatment Outcome for Small Cell and Non-Small Cell Lung Cancer. **Acs Nano**, *[s. l.]*, v. 12, n. 3, p. 2426-2439, 13 mar. 2018. http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.7b07878.

WANG, Yongzhong; YU, Li; HAN, Limei; SHA, Xianyi; FANG, Xiaoling. Difunctional Pluronic copolymer micelles for paclitaxel delivery: synergistic effect of folate-mediated targeting and pluronic-mediated overcoming multidrug resistance in tumor cell lines. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 337, n. 1-2, p. 63-73, jun. 2007. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.12.033.

WANG, Yongzhong; LI, Yajuan; ZHANG, Lijun; FANG, Xiaoling. Pharmacokinetics and biodistribution of paclitaxel-loaded pluronic P105 polymeric micelles. **Archives Of Pharmacal Research**, *[s. l.]*, v. 31, n. 4, p. 530-538, abr. 2008. http://dx.doi.org/10.1007/s12272-001-1189-2.

WEBSTER, Rob; ELLIOTT, Victoria; PARK, B. Kevin; WALKER, Donald; HANKIN, Mark; TAUPIN, Philip. PEG and PEG conjugates toxicity: towards an understanding of the toxicity of peg and its relevance to pegylated biologicals. **Pegylated Protein Drugs**: Basic Science and Clinical Applications, *[s. l.]*, p. 127-146, 2009. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7643-8679-5_8.

WEI, Xiawei; GONG, Changyang; SHI, Shuai; FU, Shaozhi; MEN, Ke; ZENG, Shi; ZHENG, Xiuling; GOU, Maling; CHEN, Lijuan; QIU, Liyan. Self-assembled honokiol-loaded micelles based on poly(ε-caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ε-caprolactone) copolymer. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 369, n. 1-2, p. 170-175, mar. 2009. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.027.

WEI, Zhang; HAO, Junguo; YUAN, Shi; LI, Yajuan; JUAN, Wu; SHA, Xianyi; FANG, Xiaoling. Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: formulation, optimization and in vitro characterization. **International Journal Of Pharmaceutics**, *[s. l.]*, v. 376, n. 1-2, p. 176-185, jul. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.030.

WILHELM, Stefan; TAVARES, Anthony J.; DAI, Qin; OHTA, Seiichi; AUDET, Julie; DVORAK, Harold F.; CHAN, Warren C. W. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. **Nature Reviews Materials**, *[s. l.]*, v. 1, n. 5, p. 1-12, 26 abr. 2016. http://dx.doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14.

WIRADHARMA, Nikken; ZHANG, Ying; VENKATARAMAN, Shrinivas; HEDRICK, James L.; YANG, Yi Yan. Self-assembled polymer nanostructures for delivery of anticancer therapeutics. **Nano Today**, *[s. l.]*, v. 4, n. 4, p. 302-317, ago. 2009. http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2009.06.001.

WU, Chenglin; MA, Rujiang; HE, Huan; ZHAO, Lizhi; GAO, Hongjun; AN, Yingli; SHI, Linqi. Fabrication of Complex Micelles with Tunable Shell for Application in Controlled Drug Release. **Macromolecular Bioscience**, *[s. l.]*, v. 9, n. 12, p. 1185-1193, 8 dez. 2009. http://dx.doi.org/10.1002/mabi.200900232.

YAMAMOTO, Yuji; YASUGI, Kenji; HARADA, Atsushi; NAGASAKI, Yukio; KATAOKA, Kazunori. Temperature-related change in the properties relevant to drug delivery of poly(ethylene glycol)–poly(d,l-lactide) block copolymer micelles in aqueous milieu. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 82, n. 2-3, p. 359-371, ago. 2002. http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00147-5.

YANG, Qiuhong; COHEN, Mark S.; CAI, Shuang Cai; FORREST, Laird M. Cabozantinib loaded DSPE-PEG2000 micelles as delivery system: formulation, characterization and cytotoxicity evaluation. **BAOJ pharmaceutical sciences**, *[s. l.]*, v. 1, p. 1-20, 5 jan. 2015

YANG, Yang; WANG, Jiancheng; ZHANG, Xuan; LU, Wangliang; ZHANG, Qiang. A novel mixed micelle gel with thermo-sensitive property for the local delivery of docetaxel. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 135, n. 2, p. 175-182, 17 abr. 2009. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.007.

YOKOYAMA, Masayuki; MIYAUCHI, Mizue; YAMADA, Noriko. OKANO, Teruo; SAKURAI, Yasuhisa; KATAOKA, Kazunori; INOUE, Shohei. Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly (ethylene glycol)-poly (aspartic acid) block copolymer. ***Cancer Research,*** *[s. l.]*, v. 50, n. 6, p. 1693-1700, 1990

YOO, Youngtai, KIM, Dong-Chul, KIM, Tae-Yoon. Preparation and characterization of enalapril maleate–loaded nanoparticles using amphiphilic diblock copolymers. **Journal of applied polymer Science**, [s. l.], v. 74, n. 12, p. 2856-2867, 1999.

YOO, Hyuk Sang; PARK, Tae Gwan. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 96, n. 2, p. 273-283, abr. 2004. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.02.003.

YU, Ke-Da; YE, Fu-Gui; HE, Min; FAN, Lei; MA, Ding; MO, Miao; WU, Jiong; LIU, Guang-Yu; DI, Gen-Hong; ZENG, Xiao-Hua. Effect of Adjuvant Paclitaxel and Carboplatin on Survival in Women With Triple-Negative Breast Cancer. **Jama Oncology**, *[s. l.]*, v. 6, n. 9, p. 1390, 1 set. 2020. http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2965.
ZHANG, Dongshan; YANG, Ruhao; WANG, Shixuan; DONG, Zheng. Paclitaxel: new uses for an old drug. **Drug Design, Development And Therapy**, *[s. l.]*, p. 279, fev. 2014. http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s56801.

ZHANG, Wenli; WANG, Guangji; FALCONER, James R.; BAGULEY, Bruce C.; SHAW, John P.; LIU, Jianping; XU, Hongtao; SEE, Esther; SUN, Jianguo; AA, Jiye. Strategies to Maximize Liposomal Drug Loading for a Poorly Water-soluble Anticancer Drug. **Pharmaceutical Research**, *[s. l.]*, v. 32, n. 4, p. 1451-1461, abr. 2015 http://dx.doi.org/10.1007/s11095-014-1551-8.

ZHOU, Y.; WU, X.Y. Modeling and analysis of dispersed-drug release into a finite medium from sphere ensembles with a boundary layer. **Journal Of Controlled Release**, *[s. l.]*, v. 90, n. 1, p. 23-36, jun. 2003. http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659(03)00128-7.

ZHU, Linyan; CHEN, Liqun. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. **Cellular & Molecular Biology Letters**, *[s. l.]*, v. 24, n. 1, p. 1-11, 13 jun. 2019. http://dx.doi.org/10.1186/s11658-019-0164-y.

ZHU, Xiaobo; FRYD, Michael; TRAN, Benjamin D.; ILIES, Marc A.; WAYLAND, Bradford B. Modifying the Hydrophilic–Hydrophobic Interface of PEG-b-PCL To Increase Micelle Stability: preparation of peg-b-pbo-b-pcl triblock copolymers, micelle formation, and hydrolysis kinetics. **Macromolecules**, *[s. l.]*, v. 45, n. 2, p. 660-665, 10 jan. 2012. http://dx.doi.org/10.1021/ma202530v