

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**MARJORIE COIMBRA ROQUE**

**ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE PREPARAÇÃO LIPOSSOMAL  
CONTENDO PACLITAXEL E DOXORRUBICINA: AVALIAÇÃO DA  
TOXICIDADE AGUDA E LIOFILIZAÇÃO**

Belo Horizonte

2021

**MARJORIE COIMBRA ROQUE**

**ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE PREPARAÇÃO LIPOSSOMAL  
CONTENDO PACLITAXEL E DOXORRUBICINA: AVALIAÇÃO DA  
TOXICIDADE AGUDA E LIOFILIZAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Cristina de Oliveira – UFMG.

Belo Horizonte

2021

R726e Roque, Marjorie Coimbra.  
Estudos de pré-formulação de preparação lipossomal contendo paclitaxel e doxorubicina: avaliação da toxicidade aguda e liofilização / Marjorie Coimbra Roque. – 2021.  
138 f. : il.

Orientadora: Mônica Cristina de Oliveira.

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

1. Liofilização – Teses. 2. Lipossomas – Teses. 3. Doxorubicina – Teses. 4. Paclitaxel – Teses. 5. Sinergismo – Teses. 6. Toxicidade aguda – Teses. 7. Câncer de mama – Teses. I. Oliveira, Mônica Cristina de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 616.994



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

### FOLHA DE APROVAÇÃO

*“ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE PREPARAÇÃO LIPOSSOMAL CONTENDO PACLITAXEL E DOXORRUBICINA: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E LIOFILIZAÇÃO”*

MARJORIE COIMBRA ROQUE

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

Profa. Dra. Cristiane dos Santos Giuberti  
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Profa. Dra. Gisele Assis Castro Goulart  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Elaine Amaral Leite  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira - Orientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 22 de novembro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Assis Castro Goulart, Professora do Magistério Superior**, em 22/11/2021, às 13:43, 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 **Elaine Amaral Leite, Professora do Magistério Superior**, em 22/11/2021, às 13:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Monica Cristina de Oliveira, Membro**, em 22/11/2021, às 15:29, 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 **Cristiane dos Santos Giuberti, Usuária Externa**, em 23/11/2021, às 10:31, 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 **Elenara Maria Teixeira Lemos Senna, Usuária Externa**, em 23/11/2021, às 16:36, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1085545** e o código CRC **060E716F**.

## COLABORADORES

### UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (UFMG)

*Faculdade de Farmácia – Departamento de Produtos Farmacêuticos*

MSc. Caroline Dohanik da Silva

*Faculdade de Farmácia – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas*

Prof. Dr. André Luís Branco de Barros

*Instituto de Ciências Biológicas – Departamento de Patologia Geral*

Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

*Escola de Medicina Veterinária – Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Martins Melo

MSc. Marthin Raboch Lempek

### UNIVERSIDADE DE CAMPINAS (UNICAMP)

*Faculdade de Ciências Farmacêuticas*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laura de Oliveira Nascimento

MSc. Danilo Costa Geraldes

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por tantas bênçãos e oportunidades;

À minha mãe, Iraci, por sempre acreditar na educação e se esforçar para que eu pudesse desfrutar de uma de qualidade. Obrigada por me apoiar e incentivar a ir mais longe;

Ao meu marido Rafael, por ser meu porto seguro, minha alegria e minha paz, por dividir a vida levando a promessa à risca “na alegria e na tristeza, na saúde e na doença...”;

À Prof<sup>a</sup>. Mônica, pela amizade, carinho, amparo, por compartilhar seu conhecimento, por ser um exemplo de ética e profissionalismo. Por seu otimismo e persistência que muitas vezes me faltavam. Pela gentileza e delicadeza em tratar as pessoas, pela elegância invejável e por me aturar nos últimos 7 anos;

À Marina, que iniciou a idealização do projeto, de quem sou admiradora. Pesquisadora excepcional de quem me orgulha ser amiga para além da ciência e para além dos oceanos e continentes;

À Eliza, minha “Sis”, que foi meu ombro amigo, confidente e conselheira. Que dividiu as dores e delícias de um doutorado, o pânico do desemprego, além de alguns cafés;

À Carol Dohanik que foi luz quando eu não conseguia mais enxergar, apoio e consolo nas minhas dificuldades, e primor no seu trabalho;

À todos os professores, colaboradores, técnicos e colegas do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, muito obrigada pela convivência, pelas trocas de experiência, pelo incentivo e cumplicidade ao longo dos anos.

## RESUMO

A terapia combinada entre paclitaxel (PTX) e doxorubicina (DXR) é aplicada como tratamento de primeira linha para o câncer de mama. A co-administração desses fármacos em proporção sinérgica para tratamento é facilitada com o uso de nanocarreadores, como os lipossomas. No entanto, apesar da alta taxa de resposta dos tumores sólidos a essa combinação, um sinergismo de cardiotoxicidade pode limitar seu uso. Uma dispersão aquosa de lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo PTX e DXR na razão molar sinérgica de 1:10 (LFCP-PTX/DXR) foi desenvolvida anteriormente e caracterizada por Roque *et al.* (2019). Dando continuidade aos estudos pré-clínicos para o desenvolvimento farmacêutico dessa formulação lipossomal, realizamos nessa tese de doutorado os estudos relativos à investigação da toxicidade aguda *in vivo* assim como da viabilidade do emprego da liofilização como processo para se obter uma formulação farmacêutica sob a forma de pó. Os resultados do estudo indicaram que o intervalo de dose LD<sub>50</sub> (dose letal para levar a morte de 50% dos animais) do tratamento com LFCP-PTX/DXR (28,9 - 34,7 mg/kg) é muito maior do que o encontrado para o tratamento PTX/DXR livre (20,8 - 23,1 mg/kg). A administração de LFCP-PTX/DXR permitiu proteger o coração dos animais ao não elevar os níveis de CK-MB, mantendo os cardiomiócitos sem lesões ou alterações eletrocardiográficas. Além disso, a taxa de sobrevivência de animais tratados com LFCP-PTX/DXR foi três vezes maior do que aqueles tratados com os fármacos livres, o que apresenta vantagens para esta nova plataforma de tratamento clínico para o câncer de mama. Entretanto, ainda existem desvantagens já conhecidas para essas dispersões lipídicas aquosas, como as instabilidades física e química que limitam seu uso generalizado e frequentemente resultam em uma vida útil reduzida do produto. Para superar esse obstáculo a secagem por liofilização é um dos processos que pode ser adotado. A escolha de excipientes e parâmetros da liofilização para proteger a integridade da membrana contra tensões causadas por congelamento e desidratação é um desafio. Apesar da investigação de diferentes parâmetros para a execução de liofilização de LFCP-PTX/DXR, foi verificado que esse método não se mostrou viável, já que



as condições de secagem em temperaturas muito negativas para máxima retenção de PTX e DXR nas vesículas não são promissoras para aplicação industrial.

Palavras-chave: liofilização; lipossomas; doxorrubicina; paclitaxel; co-encapsulação; sinergismo; toxicidade aguda; câncer de mama.

## ABSTRACT

Combination therapy between paclitaxel (PTX) and doxorubicin (DXR) is applied as a first-line treatment for breast cancer. The co-administration of these drugs in a synergistic proportion for treatment is facilitated with the use of nanocarriers, such as liposomes. However, despite the high response rate of solid tumors to this combination, a synergism of cardiotoxicity may limit its use. An aqueous dispersion of long-circulating fusogenic liposomes containing PTX and DXR in a synergistic molar ratio of 1:10 (LFPC-PTX/DXR) was previously developed and characterized by Roque *et al.* (2019). Continuing the pre-clinical studies for the pharmaceutical development of this liposomal formulation, in this doctoral thesis we carried out studies related to the investigation of acute toxicity *in vivo* as well as the feasibility of using freeze-drying as a process to obtain a pharmaceutical formulation in the form of powder. The results of the study indicated that the LD<sub>50</sub> dose range (lethal dose to kill 50% of the animals) of LFPC-PTX/DXR treatment (28.9 - 34.7 mg/kg) is much greater than the found for the free PTX/DXR treatment (20.8 - 23.1 mg/kg). The administration of LFPC-PTX/DXR allowed protecting the heart of animals by not increasing the levels of CK-MB, keeping the cardiomyocytes without lesions or electrocardiographic alterations. Furthermore, the survival rate of animals treated with LFPC-PTX/DXR was three times higher than those treated with free drugs, which presents advantages for this new clinical treatment platform for breast cancer. However, there are still known disadvantages for these aqueous lipid dispersions, such as physical and chemical instabilities that limit their widespread use and often result in a reduced shelf life of the product. To overcome this obstacle, freeze drying is one of the processes that can be adopted. Choosing excipients and freeze-drying parameters to protect membrane integrity against stresses caused by freezing and dehydration is a challenge. Despite the investigation of different parameters for the execution of LFPC-PTX/DXR freeze-drying, it was verified that this method was not viable, since the drying conditions at very negative temperatures for maximum retention of PTX and DXR in the vesicles are not promising for industrial application.

Keywords: freeze-drying; liposomes; doxorubicin; paclitaxel; co-encapsulation; synergism; acute toxicity; breast cancer.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura química dos fármacos paclitaxel e doxorubicina.....	<b>19</b>
<b>Figura 2</b> – Administração de combinação de substâncias bioativas em sua razão sinérgica na forma livre ou co-encapsuladas em nanosistema.....	<b>20</b>
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática de um lipossoma.....	<b>21</b>
<b>Figura 4</b> – Diagrama de transição de fase durante liofilização com transferência de calor e massa.....	<b>25</b>
<b>Figura 5</b> – Mecanismo de substituição da água durante a liofilização e reidratação.....	<b>34</b>
<b>Figura 6</b> – Frente de sublimação durante a secagem primária.....	<b>36</b>
<b>Figura 7</b> – Parâmetros envolvidos em um ciclo completo de liofilização.....	<b>38</b>
<b>Figura 8</b> – Esquema da preparação dos lipossomas fusogênicos de circulação prolongada co-encapsulando PTX e DXR na razão molar de 1:10.....	<b>45</b>
<b>Figura 9</b> – Esquema de tratamento dos animais em estudo de toxicidade aguda para determinação de dose máxima tolerada seguindo a OECD adaptada.....	<b>50</b>
<b>Figura 10</b> – Cortes histológicos do coração e da medula óssea de camundongos Balb / c fêmeas.....	<b>64</b>
<b>Figura 11</b> – Cortes histológicos de fígado e baço de camundongos Balb/c fêmeas.....	<b>66</b>
<b>Figura 12</b> – Determinação de parâmetros eletrocardiográficos para camundongos Balb/c fêmeas após 7 dias de tratamento com LFCP-PTX/DXR e PTX/DXR livres.....	<b>68</b>
<b>Figura 13</b> – Determinação de parâmetros eletrocardiográficos para camundongos Balb/c fêmeas após 14 dias de tratamento com LFCP-PTX/DXR e PTX/DXR livres.....	<b>70</b>
<b>Figura 14</b> – Determinação da proporção de animais vivos ao final do estudo de toxicidade aguda.....	<b>71</b>
<b>Figura 15</b> – Gráfico do processo de liofilização completo para LFCP-PTX/DXR para os ciclos 1 e 2.....	<b>94</b>

**Figura 16** – Produtos liofilizados resultantes dos ciclos de liofilização 1 e 2...**96**

**Figura 17** – Imagens de criomicroscopia de LFPC-PTX/DXR após processos de congelamento/descongelamento e liofilização.....**102**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Grupos experimentais avaliados nos estudos de toxicidade aguda para os parâmetros bioquímicos, hematológicos e observações de mortalidade e morbidade.....**48**
- Tabela 2** – Grupos experimentais avaliados nas análises eletrocardiográficas.....**53**
- Tabela 3** – Caracterização química e físico-química dos LFCP-PTX/DXR....**54**
- Tabela 4** – Parâmetros hematológicos para camundongos Balb/c tratados com diferentes doses de LFCP-PTX/DXR e uma combinação de PTX/DXR livres.....**59**
- Tabela 5** – Parâmetros bioquímicos para camundongos Balb/c tratados com diferentes doses de LFCP-PTX/DXR e uma combinação de PTX/DXR livres.....**62**
- Tabela 6** – Caracterização química e físico-química de LFCP-PTX/DXR submetido a congelamento/descongelamento com taxa de resfriamento lenta\*.....**82**
- Tabela 7** – Caracterização química e físico-química de LFCP-PTX/DXR submetido a congelamento/descongelamento com taxa de resfriamento rápida.....**84**
- Tabela 8** – Caracterização química e físico-química de LFCP-PTX/DXR adicionado de trealose 5:1 (p/p) durante a hidratação do filme lipídico e submetido a congelamento-descongelamento.....**88**
- Tabela 9** – Temperaturas de transição vítrea e de colapso de LFCP-PTX/DXR em diferentes concentrações de trealose.....**89**
- Tabela 10** – Parâmetros utilizados no ciclo 1 da liofilização de LCFL-PTX/DXR com a inclusão da etapa de *annealing*.....**92**
- Tabela 11** – Parâmetros utilizados no ciclo 2 da liofilização de LCFL-PTX/DXR com a inclusão da etapa de *annealing*.....**93**
- Tabela 12** – Caracterização química e físico-química de LFCP-PTX/DXR após liofilização/reidratação sob diferentes condições.....**99**
- Tabela 13** – Caracterização de LFCP-PTX/DXR usando análise de rastreamento de nanopartículas.....**100**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>CHEMS</b>	Hemisuccinato de colestera
<b>CK-MB</b>	Isoforma MB da enzima creatina quinase
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>DLS</b>	Espalhamento dinâmico da luz
<b>DOPE</b>	Dioleilfosfatidiletanolamina
<b>DSC</b>	Calorimetria exploratória diferencial
<b>DSPE-PEG<sub>2000</sub></b>	Diestearoilfosfatidiletanolamina acoplada ao polietilenoglicol 2000
<b>DXR</b>	Doxorrubicina
<b>ECG</b>	Eletrocardiograma
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>HCT</b>	Hematócrito
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinaetanosulfônico
<b>HGB</b>	Concentração de hemoglobina nas hemácias
<b>IP</b>	Índice de polidispersão
<b>LD<sub>50</sub></b>	Dose letal para 50% dos animais
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NTA</b>	Análise de rastreamento de nanopartículas
<b>OECD</b>	Organization for Economic Cooperation and Development
<b>PE</b>	Porcentagem de encapsulação
<b>PLT</b>	Plaquetas
<b>PTX</b>	Paclitaxel

<b>PZ</b>	Potencial zeta
<b>RBC</b>	Contagem de glóbulos vermelhos
<b>RDW</b>	Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos
<b>T<sub>c</sub></b>	Temperatura de colapso
<b>T<sub>eu</sub></b>	Temperatura eutética
<b>T<sub>g</sub>'</b>	Temperatura de transição vítrea
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de transição de fase
<b>WBC</b>	Diferencial de glóbulos brancos



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
2.1 CONTEXTO DO DESENVOLVIMENTO DOS LFCP-PTX/DXR.....	18
2.2 TOXICIDADE INTRÍNSECA DE DXR E PTX.....	22
2.3 ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA.....	23
2.4 LIOFILIZAÇÃO.....	24
2.5 PARÂMETROS DA LIOFILIZAÇÃO.....	26
2.5.1 Congelamento.....	27
2.5.2 Annealing.....	31
2.5.3 Congelamento com uso de crioprotetores.....	32
2.5.4 Secagem primária.....	35
2.5.5 Secagem secundária.....	37
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3.2.1 <i>Capítulo 1: Estudo de toxicidade aguda de LFCP-PTX/DXR</i> .....	39
3.2.2 <i>Capítulo 2: Estudo dos parâmetros de liofilização dos LFCP-PTX/DXR</i> .....	40

## CAPÍTULO 1: ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA DE LFCP-PTX/DXR

<b>1 MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
1.1 PREPARAÇÃO DOS LFCP-PTX/DXR.....	43
1.2 DETERMINAÇÃO DE TAMANHO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA DOS LFCP-PTX/DXR.....	46
1.3 DETERMINAÇÃO DA ENCAPSULAÇÃO DOS FÁRMACOS NOS LFCP-PTX/DXR.....	46
1.4 TOXICIDADE AGUDA.....	47
1.4.1 <i>Hematologia e bioquímica</i> .....	51
1.4.2 <i>Histologia</i> .....	51
1.4.3 <i>Análise eletrocardiográfica</i> .....	52
1.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	53
<b>2 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
2.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LFCP-PTX/DXR.....	54
2.2.1 <i>Avaliação da mortalidade e morbidade dos animais</i> .....	55
2.2.2 <i>Análises hematológicas</i> .....	57
2.2.5 <i>Análises eletrocardiográficas</i> .....	66
<b>3 CONCLUSÃO</b> .....	<b>71</b>

## CAPÍTULO 2: ESTUDO DOS PARÂMETROS DE LIOFILIZAÇÃO DOS LFCP-PTX/DXR

<b>1 MÉTODOS</b> .....	<b>74</b>
1.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS LFCP-PTX/DXR USADOS NOS ESTUDOS DE LIOFILIZAÇÃO.....	74
1.2 ESTUDOS PRELIMINARES PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM CICLO DE LIOFILIZAÇÃO.....	74
1.2.1 <i>Estudo de congelamento/descongelamento</i> .....	74
1.2.3 <i>Determinação da temperatura de transição vítrea (Tg')</i> .....	75

1.2.4 <i>Determinação da temperatura de colapso (T<sub>c</sub>)</i> .....	76
1.3 LIOFILIZAÇÃO .....	76
1.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE RESIDUAL DO LIÓFILO.....	77
1.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO TEMPO DE REIDRATAÇÃO DO LIÓFILO .....	78
1.6 AVALIAÇÃO QUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS LFCP-PTX/DXR APÓS LIOFILIZAÇÃO SEGUIDA DE REIDRATAÇÃO DOS LIÓFILOS .....	78
1.7 ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS APÓS LIOFILIZAÇÃO /REIDRATAÇÃO .....	79
1.8 CRIOMICROSCOPIA.....	79
<b>2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
2.1 ESTUDOS PRELIMINARES PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM CICLO DE LIOFILIZAÇÃO .....	80
2.1.2 <i>Estudo de congelamento-descongelamento</i> .....	80
2.1.3 <i>Determinação da temperatura de transição vítrea e de colapso</i> .....	89
2.2 DESENVOLVIMENTO DO CICLO DE LIOFILIZAÇÃO .....	90
2.3.1 <i>Avaliação macroscópica de produtos liofilizados após ciclos completos de liofilização, determinação de umidade e tempos de reconstituição</i> .....	95
2.3.3 <i>Análise de rastreamento de nanopartículas</i> .....	100
2.3.4 <i>Criomicroscopia</i> .....	101
<b>3 CONCLUSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>103</b>
<b>5 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>104</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>125</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos principais problemas de saúde do século 21, sendo o câncer de mama a doença maligna mais comum em mulheres. Estima-se que mais de 23 milhões de casos serão diagnosticados até 2030 (BRAY *et al.*, 2018; FRAGUAS-SÁNCHEZ *et al.*, 2020). Atualmente, várias abordagens terapêuticas estão disponíveis, dependendo do subtipo de câncer: cirurgia, terapia hormonal, radioterapia, imunoterapia e quimioterapia (FRAGUAS-SÁNCHEZ *et al.*, 2020; MEYER *et al.*, 2021). No caso da quimioterapia do câncer de mama, o tratamento combinado com paclitaxel (PTX) e doxorubicina (DXR) é uma das abordagens mais comuns. O tratamento associado é parcialmente bem-sucedido devido ao efeito sinérgico entre os fármacos, que apresentam diferentes mecanismos de ação superando em certa medida a resistência do organismo a eles (FENG *et al.*, 2019; ROQUE *et al.*, 2019; WANG, YINGLI *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2020). Este sinergismo implica um maior efeito da combinação em relação ao efeito da soma dos fármacos individuais. Essa abordagem permite que a eficácia terapêutica seja alcançada com doses menores dos fármacos, o que conseqüentemente também traz uma redução dos efeitos colaterais (BAABUR-COHEN *et al.*, 2016; CHOU, T.-C.; MARTIN, 2005; CHOU, T. C., 2006; FRANCO e OLIVEIRA, 2018).

Porém, a administração sistêmica do coquetel de substâncias bioativas não garante que elas cheguem ao alvo juntas e na concentração adequada para o sinergismo, devido a farmacocinética própria de cada uma delas (BAABUR-COHEN *et al.*, 2016; TARDI *et al.*, 2007). A necessidade de controlar as proporções combinatórias para que a proporção sinérgica seja alcançada no corpo e entregue ao local do tumor levou ao desenvolvimento de nanosistemas co-encapsulando fármacos (FRANCO e OLIVEIRA, 2018; FRANCO e OLIVEIRA, 2017; TARDI *et al.*, 2007).

Considerando esta estratégia, Roque *et al.* (2019) desenvolveram e caracterizaram uma formulação de lipossomas fusogênicos e de circulação prolongada co-encapsulando PTX e DXR na razão molar 1:10 (LFCP-PTX/DXR) para o tratamento do câncer de mama. A formulação possui

características químicas e físico-químicas adequadas para administração intravenosa e é capaz de co-encapsular os fármacos nas relações molares pré-estabelecidas. Os LFCP-PTX/DXR mostraram-se estáveis por trinta dias, mantendo suas características de tamanho ( $244,4 \pm 28,1$  nm), índice de polidispersão (IP) ( $0,29 \pm 0,01$ ), potencial zeta (PZ) ( $-4,97 \pm 0,64$  mV) e conteúdo de retenção de fármacos ( $74,0 \pm 2,0\%$  para PTX e  $89,6 \pm 12,3\%$  para DXR). Os resultados apoiam seu uso como sistemas de administração terapêutica para o tratamento do câncer de mama, conforme demonstrado pelos efeitos biológicos observados *in vitro* e *in vivo* por Roque *et al.* (2019), Franco *et al.* (2019) e Franco, Roque e Oliveira (2019).

Apesar disso, quando se objetiva a introdução de novos produtos farmacêuticos para o uso clínico, os estudos de toxicidade são uma etapa importante que precisa ser realizada (LIU *et al.*, 2010; LIU, CHANG e LEE, 2014). Os testes toxicológicos pré-clínicos permitem o embasamento científico para prever os principais efeitos colaterais e as consequências de uma overdose para posterior escalonamento em humanos (CHAPMAN *et al.*, 2010). O objetivo principal é identificar uma dose inicial segura para os estudos clínicos de fase I, o potencial toxicológico do fármaco e a reversibilidade dos efeitos adversos (NEWELL *et al.*, 2004).

Outro ponto que precisa ser investigado e superado está relacionado a estabilidade da formulação. As possíveis limitações no desenvolvimento dos lipossomas estão geralmente relacionadas a fenômenos de oxidação e/ou hidrólise de lipídios, liberação dos fármacos durante o armazenamento e a formação de agregados ou fusão de vesículas. Por consequência, as formulações podem ter a estabilidade reduzida além de alteração do perfil de biodistribuição e comprometimento da eficácia e segurança. Quando abordagens de alterações em parâmetros da formulação farmacêutica, tais como o uso de lipídios saturados e/ou com alta temperatura de transição de fase ( $T_m$ ), adição de agentes antioxidantes, design de partículas carregadas e funcionalizadas ou condições de armazenamento de precaução (conservação em atmosfera inerte, a  $-20$  °C, protegido de luz) não são suficientes, a única opção para superar esses problemas de instabilidade é secar as formulações, uma vez que os fenômenos mencionados acima são facilitados em um

ambiente aquoso (FRANZÉ *et al.*, 2018; GUAN *et al.*, 2015; GUIMARÃES *et al.*, 2019; MARÍN *et al.*, 2018; WANG e GRAINGER, 2019).

As técnicas de secagem ideais devem ser capazes de preservar as propriedades químicas e físico-químicas dos nanossistemas após reconstituição, tais como o tamanho das partículas, potencial zeta e capacidade de encapsulação de fármacos (GUAN *et al.*, 2015). Como a liofilização é um processo caro e demorado do ponto de vista operacional, o ciclo precisa ser rápido, reproduzível, escalável e robusto. Dessa forma todas as suas etapas devem ser avaliadas criteriosamente para assegurar a integridade dos lipossomas e a retenção dos compostos encapsulados (BJELOŠEVIĆ *et al.*, 2018; FRANZÉ *et al.*, 2018; WANG e GRAINGER, 2019).

Um processo típico de liofilização consiste em três fases principais: congelamento, secagem primária e secagem secundária (CHEN *et al.*, 2015; FRANZÉ *et al.*, 2018; INGVARSSON *et al.*, 2011; WANG e GRAINGER, 2019). O processo de congelamento é presumivelmente o mais complexo, pois afeta tanto o desempenho do processo quanto a qualidade do produto. Nessa etapa, a remoção do solvente conduz a uma concentração dramática dos solutos. A cinética da nucleação do gelo e o crescimento dos cristais determinam as propriedades finais do produto liofilizado, uma vez que a morfologia do gelo está diretamente correlacionada com a taxa de sublimação na secagem primária e secundária (HOTTOT, VESSOT e ANDRIEU, 2007; KASPER e FRIESS, 2011). Seguindo para a secagem primária, os cristais de gelo oriundos da etapa de congelamento, são sublimados até atingir o ponto final de secagem (NAIL *et al.*, 2002; OHORI e YAMASHITA, 2017). A próxima etapa, secagem secundária, tem o objetivo reduzir a umidade para um nível ótimo de estabilidade do produto, uma vez que mesmo após a secagem primária o produto ainda contém 10-35% de água ligada (LIETTA *et al.*, 2019; MORAIS *et al.*, 2016; ODDONE, BARRESI e PISANO, 2017).

Até o momento, os dados encontrados na literatura sobre o processo de liofilização de lipossomas são limitados e esse aspecto será abordado nessa tese de doutorado junto com o estudo de toxicidade aguda de LFCP-PTX/DXR (HUA *et al.*, 2003).

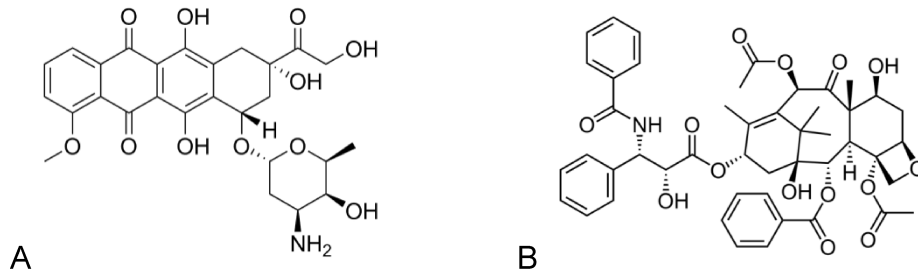
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Contexto do desenvolvimento dos LFCP-PTX/DXR

Em média, para uma vasta gama de tipos de câncer de mama, é indicado que o tratamento seja realizado com a associação de antraciclinas e taxanos uma vez que integrados em regimes de quimioterapia adjuvante, esses fármacos produzem ganhos de sobrevivência adicionais aos pacientes (ANAMPA, MAKOWER e SPARANO, 2015; BINES *et al.*, 2014; COATES *et al.*, 2015; TAN *et al.*, 2017). Para o tratamento do câncer de mama metastático a terapia combinada e sequencial de doxorrubicina (DOX) e paclitaxel (PTX) (**Figura 1**) já é usada como tratamento de primeira linha (BHATNAGAR *et al.*, 2019; GE, MA, e LI 2016) e é observado que a co-administração leva a uma melhor eficácia em comparação com a sua administração sequencial (AKUTSU *et al.*, 1995; KOECHLI *et al.*, 1993).

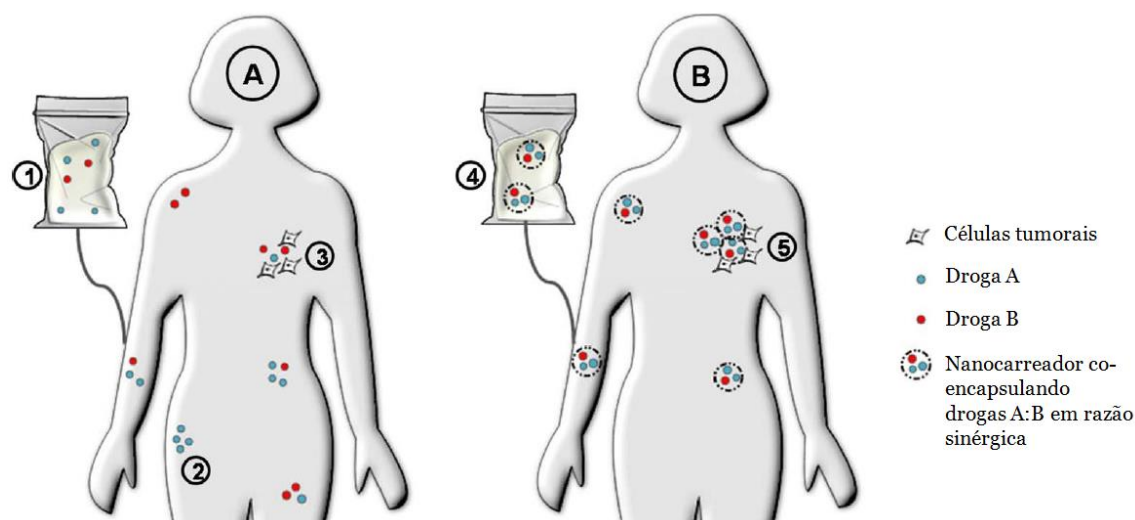
Atualmente, a interferência com a função da enzima topoisomerase II, interrompendo com o processo de replicação celular, é geralmente mais reconhecida como o principal alvo celular da DXR (SEMPKOWSKI *et al.*, 2014; SIMUNEK *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2014). Já o PTX é um agente de estabilização de microtúbulos, o qual atua mediante a ligação à subunidade beta ( $\beta$ ) da tubulina interferindo com os processos de divisão celular, induzindo a apoptose (BAKRANIA, VARIYA e PATEL, 2016; ELOY *et al.*, 2016; NĚMCOVÁ-FŮRSTOVÁ *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2014). Ao encapsular PTX e DXR como combinação de substâncias bioativas em uma única formulação lipossomal (LFCP-PTX/DXR), os dois agentes não mais são metabolizados e eliminados independentemente e sim como uma unidade, ditado pelas características do carreador (**Figura 2**) (HARASYM *et al.*, 2007; TARDI *et al.*, 2007). Logo, a co-encapsulação de PTX e DXR em lipossomas tem o potencial de oferecer vantagens farmacocinéticas e farmacodinâmicas, proporcionando a entrega de ambos os fármacos no local do tumor, na razão requerida para um sinergismo resultando em uma maior atividade anticancerígena (BAABUR-COHEN *et al.*, 2016; RIVIERE *et al.*, 2011; ROQUE, 2017).

**Figura 1: Estruturas químicas dos fármacos paclitaxel e doxorrubicina**



**A: Estrutura química da doxorrubicina; B: Estrutura química do paclitaxel**

**Figura 2: Administração de combinação de substâncias bioativas em sua razão sinérgica na forma livre ou co-encapsuladas em nanosistema**



No painel “A”, (1) paciente recebe o coquetel das substâncias bioativas A e B em sua forma livre, na razão de 2:1, previamente detectada como razão sinérgica. Essa razão é rapidamente perdida após administração devido aos diferentes processos de distribuição, metabolismo e excreção de cada uma das substâncias bioativas. (2) As substâncias bioativas se distribuem em diferentes razões molares nos diferentes tecidos. (3) A razão das substâncias bioativas que atinge o tumor é modificada para 1:2. No painel “B”, (4) paciente recebe a formulação com as substâncias bioativas A e B co-encapsuladas em nanocarreador na razão sinérgica 2:1. O nanocarreador garante a manutenção da razão sinérgica após administração. (5) Devido ao efeito de permeabilidade e retenção aumentadas, uma melhor seletividade ao sítio tumoral pode ser observada, garantindo maior concentração das substâncias bioativas nessa região e poupando tecidos normais. Essa estratégia foca em melhorar a eficácia e segurança da quimioterapia combinada.

---

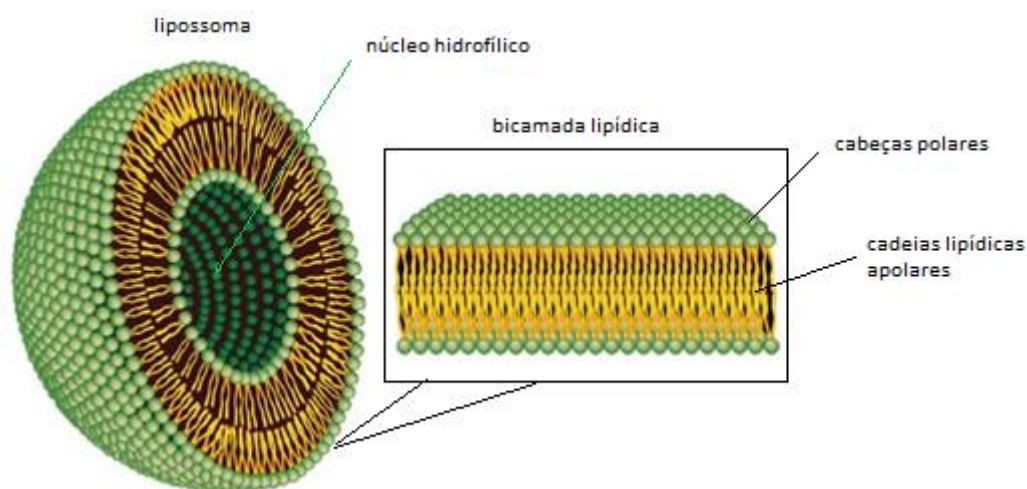
Adaptado de Franco e Oliveira (2017).

Estruturalmente, os lipossomas são nanocarreadores coloidais compostos por bicamadas concêntricas única ou múltiplas encapsulando um compartimento aquoso e assemelham-se a membranas lipídicas de células vivas (**Figura 3**) (BOZZUTO e MOLINARI, 2015; MARÍN *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2014). Já foi demonstrado na literatura, que os lipossomas são capazes de manter a combinação dos fármacos encapsulados na proporção de razão estabelecida cerca de vinte e quatro horas após administração sistêmica em camundongos (RIVIERE *et al.*, 2011; ROQUE, 2017). Além disso, dentre a gama de nanossistemas possíveis, os lipossomas têm demonstrado uma capacidade



superior para co-encapsular múltiplos fármacos com diferentes naturezas químicas para o mesmo local de ação (LIU *et al.*, 2014), além de permitirem uma maior janela terapêutica e ausência ou redução de efeitos secundários (FAN e ZHANG, 2013; JABIR *et al.*, 2012; RINK *et al.*, 2013; ZAMBONI *et al.*, 2012).

**Figura 3: Representação esquemática de um lipossoma**



Representação da organização espacial de um lipossoma e sua bicamada lipídica. Sua região apolar localiza-se na área das cadeias lipídicas da bicamada e a polaridade do seu núcleo é conferida pelas cabeças polares dos lípides.

---

Adaptado de BOZZUTO, 2015.

Os lipossomas compostos de DOPE:CHEMS ainda são superiores aos lipossomas convencionais, uma vez que são internalizados pelas células de forma mais eficaz, sendo também denominados lipossomas fusogênicos. Esse fenômeno pode ser explicado pela sua elevada afinidade por membranas celulares, devido a sua região polar que ocupa um volume pequeno e possui pequena capacidade de hidratação, o que resulta em agregação dessas membranas (LIU, X.; HUANG, 2013).

Estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Mônica Cristina de Oliveira demonstraram que lipossomas constituídos por dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), hemisuccinato de colesterila (CHEMS) e diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG<sub>2000</sub>) e co-encapsulando PTX e DXR na razão molar 1:10 (LFCP-PTX/DXR) apresentam potencial terapêutico. Os testes de atividade antitumoral *in vitro* dos LFCP-PTX/DXR contra células de câncer de mama da linhagem murina 4T1 mostraram inibição do crescimento tumoral próximo a 100% (ROQUE *et al.*, 2019). Além disso, estudo de atividade antitumoral e toxicidade *in vivo* em modelo de camundongos Balb/c portando tumor de mama da linhagem 4T1 confirmaram melhor eficácia antitumoral dos LFCP-PTX/DXR frente a mistura dos fármacos livres e também menor perfil de toxicidade, com perda de peso menos pronunciada e sem sinais de toxicidade cardíaca. Nos animais tratados com a mistura de fármacos livres a degeneração cardíaca se mostrou presente (FRANCO *et al.*, 2019; FRANCO, ROQUE e OLIVEIRA, 2019).

## 2.2 Toxicidade intrínseca de DXR e PTX

Como qualquer outro agente antitumoral, o uso clínico de DXR é dificultado por seus efeitos colaterais tóxicos agudos e crônicos, especialmente a indução de cardiotoxicidade dose-dependente grave, notadamente na forma de cardiomiopatia crônica e insuficiência cardíaca congestiva. Para evitar isso, a dose cumulativa máxima recomendada de DXR foi estabelecida em 450-600 mg/m<sup>2</sup> (LIU *et al.*, 2020; PUGAZHENDHI *et al.*, 2018; RAWAT *et al.*, 2021; SRITHARAN e SIVALINGAM, 2021). O efeito colateral que limita o uso de PTX está relacionado à neuropatia periférica induzida (DE IULIIS *et al.*, 2015; NONAKA, HOSODA e UEZONO, 2021; RIEDEL *et al.*, 2021).

Há evidências de que a combinação de DXR com PTX é mais tóxica do que os fármacos isoladamente. Os taxanos aumentam a conversão de DXR no metabólito mais tóxico doxorubicinol por aldo-/ceto- ou carbonil redutases dependentes de NADPH, o que pode contribuir para o aumento dos efeitos

cardiotóxicos da antraciclina. A produção de doxorubicinol, entre outros, leva a uma alta incidência de insuficiência cardíaca congestiva (COLOMBO *et al.*, 1999; GIANNI *et al.*, 1995; GIANNI *et al.*, 1997; PIENIAZEK *et al.*, 2013). Também foi relatado que DXR e seu metabólito doxorubicinol induzem disfunção cardíaca ao se ligar e alterar a funcionalidade da enzima  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase no retículo endoplasmático (SERCA2A) e reduzir os grupos tiol do receptor de rianodina (RyR2) (HANNA *et al.*, 2014; SRITHARAN e SIVALINGAM, 2021). A toxicidade da administração conjunta desses fármacos deve, portanto, ser avaliada *in vivo* para garantir a segurança do tratamento.

### 2.3 Estudos de toxicidade aguda

Modelos animais roedores têm sido amplamente utilizados para estes estudos, uma vez que com eles são obtidos resultados que consideram a farmacocinética e farmacodinâmica em organismos vivos, sendo imprescindíveis para avaliação do real potencial terapêutico ou tóxico de um novo fármaco ou sistema de liberação de fármacos (LIU *et al.*, 2010; LIU, CHANG e LEE, 2014). Alguns sinais que devem ser observados e registrados durante o teste de toxicidade aguda incluem: analgesia, tremores, aumento da atividade motora, anestesia, hipertonia muscular, lacrimejamento, arqueamento e rolamento, salivação, convulsões, espasmo muscular, perda do reflexo de endireitamento, contorções, hiperestesia, ataxia, depressão, sedação, estimulação, hipnose e cianose (ERHIRHIE, IHEKWEREME e ILODIGWE, 2018).

A *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) incorporou o teste LD<sub>50</sub> (dose letal para 50% dos animais) em suas diretrizes para estudo de toxicidade de fármacos administrados por via oral. Para sua realização, podem ser utilizados até no máximo 6 animais para cada nível de dose. Um limite máximo de dose também foi introduzido (5.000 mg/kg). Substâncias cujos valores de LD<sub>50</sub> excedem 5.000 mg/kg, terão sua LD<sub>50</sub> estimada como

superior a esse valor, não sendo necessários novos testes de toxicidade aguda. Diretrizes similares também foram publicadas para toxicidade dérmica e por inalação. O documento com essas informações encontra-se no **anexo** (OECD, 2001).

Além disso, com o aumento do uso de nanossistemas, um novo campo da toxicologia, chamado nanotoxicologia, tem surgido. No entanto, devido à falta de regulamentação específica para essas novas formulações farmacêuticas, os estudos de nanotoxicidade ainda são controversos quanto a padronização e resultados. Entretanto, a nanotoxicologia tem ganhado interesse nos órgãos regulatórios, como o Food and Drug Administration (FDA), que recomendou o estudo de toxicidade para sistemas lipossomais utilizando a forma encapsulada, o fármaco livre e o nanocarreador puro (FDA, 2018).

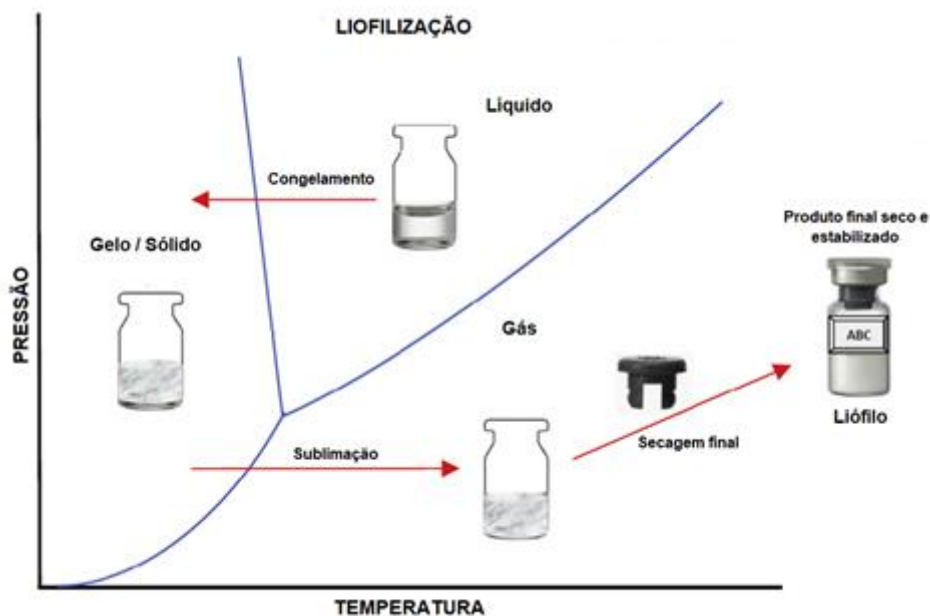
## 2.4 Liofilização

A liofilização conduz a um processo de desidratação, o qual pode ser realizado sob baixas temperaturas, evitando possíveis danos às moléculas que, na maioria dos casos, são altamente sensíveis ao calor (FONTE, REIS e SARMENTO, 2016; PISANO *et al.*, 2013). Assim, a água é removida das formulações por sublimação de gelo e dessorção sob vácuo. Como já mencionado, a técnica consiste nas etapas de congelamento, secagem primária e secagem secundária, sendo a primeira o passo limitante da velocidade da liofilização (CHEN *et al.*, 2015; FONTE, REIS e SARMENTO, 2016). A **Figura 4** mostra o diagrama de fases clássico usado para obter a liofilização por transição de fase para sistemas aquosos sob condições controladas.

Apesar dessa técnica de secagem ser usada para promover maior estabilidade à dispersão lipossomal, seu efeito desestabilizador também é relatado e por esse motivo existe a necessidade de investigar todos os fatores que afetam o

processo como um todo. Dentre eles podemos citar a seleção de crioprotetores, a composição da bicamada lipídica e os protocolos de liofilização, que precisam ser otimizados para obter um líofilo aceitável (CHEN *et al.*, 2010; MARÍN *et al.*, 2018; STARK, PABST e PRASSL, 2010). Uma maior ênfase é dada em medidas que protegem a integridade da membrana lipídica durante a liofilização. Essas medidas focam principalmente na proteção das bicamadas lipídicas contra danos causados por cristais de gelo durante o congelamento, inibição da fusão/agregação de vesículas após a desidratação e a prevenção da ocorrência de uma transição de fase durante a reidratação. Esses problemas estão intimamente relacionados com a escolha da formulação e parâmetros tecnológicos estabelecidos para o processo (CHEN *et al.*, 2010).

**Figura 4: Diagrama de transição de fases durante liofilização com transferência de calor e massa**



Adaptado de Wang e Grainger, 2019.

## 2.5 Parâmetros da liofilização

Um ciclo ótimo de liofilização depende da seleção apropriada dos parâmetros do processo, tais como a temperatura da prateleira, taxa e temperatura de congelamento, pressão da câmara, tempo de secagem primária e secundária, nível de água residual e composição da bicamada lipídica (GLAVAS-DODOV *et al.*, 2005; MUJAT *et al.*, 2012; VAN WINDEN e CROMMELIN, 1999). Para manter a mesma distribuição de tamanho de partículas e evitar a liberação dos fármacos contidos nos lipossomas após o ciclo de liofilização/reidratação, um crioprotetor adequado também precisa ser adicionado à formulação (GLAVAS-DODOV *et al.*, 2005).

Um parâmetro crítico do processo de liofilização é a temperatura à qual o produto sofre colapso estrutural durante a secagem primária, tal temperatura é chamada de temperatura de colapso ( $T_c$ ). Para garantir uma aparência elegante, um baixo conteúdo de água residual, boa estabilidade de armazenamento e boa capacidade de reconstituição do líófilo, o processo de liofilização precisa acontecer abaixo da  $T_c$ . Portanto, a medição precisa do colapso é fundamental para o desenvolvimento de um processo de liofilização eficiente (GLAVAS-DODOV *et al.*, 2005; MUJAT *et al.*, 2012; VAN WINDEN e CROMMELIN, 1999).

Os parâmetros de liofilização têm uma grande influência no processo inclusive relacionados ao tempo e custo de execução. Como exemplo, um aumento de temperatura em 1°C durante a secagem primária pode resultar numa redução de 13% do tempo dessa etapa, o que poderia reduzir o processo de liofilização em escala de produção em vários dias, resultando em economia significativa de custos operacionais e, conseqüentemente, custos mais baixos dos medicamentos liofilizados (MUJAT *et al.*, 2012; PANSARE e PATEL, 2019).

### 2.5.1 Congelamento

O processo de congelamento envolve primeiro o resfriamento da solução até que ocorra a nucleação do gelo. Os cristais de gelo começam a crescer a certa velocidade, o que pode resultar em sólidos cristalinos e amorfos, ou em misturas. Em geral, o congelamento é definido como o processo de cristalização do gelo a partir de água super-resfriada (KASPER e FRIESS, 2011; PETZOLD e AGUILERA, 2009). Quando a água pura é resfriada à pressão atmosférica, ela não congela espontaneamente no ponto de congelamento de equilíbrio (0 °C) (NAIL *et al.*, 2002). A retenção do estado líquido abaixo do ponto de congelamento de equilíbrio da solução é denominada “super-resfriamento” (SCHWEGMAN, CARPENTER e NAIL, 2009).

A distinção entre taxa de resfriamento e taxa de congelamento deve ser enfatizada. A taxa de resfriamento é definida como a taxa na qual uma solução é resfriada. A taxa de congelamento é a taxa de crescimento de cristais de gelo pós-nucleação, que é largamente determinada pela quantidade de super-resfriamento antes da nucleação (BHATNAGAR, BOGNER e PIKAL, 2007; SCHWEGMAN, CARPENTER e NAIL, 2009). Portanto, a taxa de congelamento de uma formulação não está necessariamente relacionada à sua taxa de resfriamento (BHATNAGAR, BOGNER e PIKAL, 2007; KASPER e FRIESS, 2011; SCHWEGMAN, CARPENTER e NAIL, 2009).

Em todas as dispersões moleculares e mesmo em água filtrada estéril para injeção, a nucleação observada é a “nucleação heterogênea”. Isso significa que aglomerados parecidos com gelo são formados mediante a adsorção de camadas de água em “impurezas” (FRANKS e AUFFRET, 2007; KASPER e FRIESS, 2011; PIKAL, RAMBHATLA e RAMOT, 2002). Tais “impurezas” podem ser a superfície do frasco, contaminantes particulados presentes na água, ou até mesmo sítios em moléculas grandes, como proteínas (BLOND, 1988; KASPER e FRIESS, 2011; WILSON, HENEGHAN e HAYMET, 2003).

Devido às flutuações relacionadas ao movimento Browniano na água líquida super-resfriada, moléculas de água formam aglomerados com ligações de hidrogênio relativamente duradouras e com arranjos moleculares semelhantes aos dos cristais de gelo (MATSUMOTO, SAITO e OHMINE, 2002). Como esse processo é energeticamente desfavorável, esses núcleos se dividem rapidamente. A probabilidade desses núcleos crescerem em número e tamanho é mais pronunciada a baixas temperaturas. Uma vez que a massa crítica de núcleos é atingida, a cristalização da água ocorre rapidamente em todo o sistema (KASPER e FRIESS, 2011; PETZOLD e AGUILERA, 2009).

O número de núcleos de gelo formados, a taxa de crescimento do gelo e o tamanho dos cristais do gelo dependem do grau de super-resfriamento (RAMBHATLA *et al.*, 2004; SEARLES, CARPENTER e RANDOLPH, 2001). Quanto maior o grau de super-resfriamento, maior a taxa de nucleação e mais rápida a taxa efetiva do congelamento. Isso resulta em um grande número de pequenos cristais de gelo. Em contraste, em um menor grau de super-resfriamento, observa-se um número maior de cristais de gelo grandes (KASPER e FRIESS, 2011).

No entanto, é preciso distinguir entre os dois mecanismos básicos de congelamento: resfriamento global e solidificação direcional. Quando o resfriamento global ocorre, o que é tipicamente o caso do congelamento em rampa de prateleira, todo o volume do líquido alcança um nível similar de resfriamento e a solidificação progride por meio do volume já nucleado. Em contraste, a solidificação direcional ocorre quando um pequeno volume é resfriado, o que é o caso de altas taxas de resfriamento, por exemplo, como a imersão em nitrogênio. Nesse caso, uma taxa de resfriamento mais rápida levará a uma taxa de congelamento mais rápida (KASPER e FRIESS, 2011; SEARLES, CARPENTER e RANDOLPH, 2001).

O congelamento em prateleira é uma condição convencional de congelamento que é mais frequentemente empregada na liofilização. Aqui, os frascos cheios são colocados nas prateleiras do liofilizador, e a temperatura da prateleira é então diminuída linearmente com o tempo (COCHRAN e NAIL, 2009; KASPER e FRIESS, 2011; RANDOLPH e SEARLES, 2002). A condutividade térmica



entre frascos e prateleira é limitada; assim, a taxa de resfriamento em rampa de prateleira é lenta. Para garantir a solidificação completa das amostras, elas devem ser resfriadas abaixo da temperatura de transição vítrea ( $T_g'$ ) para material amorfo e, respectivamente, abaixo da temperatura eutética ( $T_{eu}$ ) para material cristalino. O tempo para a solidificação completa geralmente depende do volume de preenchimento do frasco. Quanto maior o volume de enchimento, mais tempo é necessário para uma solidificação completa (FRANKS e AUFFRET, 2007; KASPER e FRIESS, 2011).

Outra forma de congelamento é por imersão dos frascos em nitrogênio líquido, em tempo suficiente para uma completa solidificação. Neste caso, a formação de cristais de gelo começa na parede e no fundo do frasco, onde ocorre a transferência de calor por contato (BHATNAGAR, BOGNER e PIKAL, 2007). Nesse método de congelamento a temperatura da amostra diminui rapidamente e pequenos cristais de gelo são formados (RANDOLPH e SEARLES, 2002). Embora seja relatado que o congelamento por imersão em nitrogênio líquido possa ser vantajoso para algumas aplicações, este método de congelamento não controlado promove a formação de cristais de gelo heterogêneos (KASPER e FRIESS, 2011; SEARLES, CARPENTER e RANDOLPH, 2001).

A estrutura hexagonal do gelo é de grande importância na liofilização de formulações farmacêuticas, uma vez que a maioria dos solutos não pode se encaixar nessa estrutura que se forma (JENNINGS, 1999). Conseqüentemente, a concentração dos constituintes do soluto da formulação é aumentada na região intersticial entre os cristais de gelo em crescimento, o que é conhecido por “crioconcentração”. Após arrefecimento adicional, a solução aumentará para uma concentração crítica, acima da qual a solução concentrada será submetida a um congelamento eutético ou vitrificação (KASPER e FRIESS, 2011).

A água continua a congelar para além da temperatura de fusão eutética, e a solução torna-se cada vez mais supersaturada e viscosa. A viscosidade crescente diminui a cristalização do gelo até que em alguma temperatura característica não ocorra congelamento adicional. Isso é chamado de

vitrificação. A temperatura a que ocorre a máxima crioconcentração é chamada de temperatura de transição vítrea ( $T_g'$ ).  $T_g'$  representa um ponto no qual ocorre uma mudança reversível entre um líquido viscoso, semelhante a borracha, e um sistema rígido semelhante ao vidro (KASPER e FRIESS, 2011).

Uma mistura eutética é formada pela simples cristalização de solutos a partir da solução crio-concentrada. A temperatura mais baixa na qual o soluto permanece líquido é a temperatura de fusão eutética ( $T_{eu}$ ). Uma regra geral para sistemas multicomponentes é que a cristalização de qualquer componente é influenciada, isto é, dificultada por outros componentes. Apenas abaixo da  $T_{eu}$ , o sistema pode ser completamente solidificado (KASPER e FRIESS, 2011).

Enquanto alguns solutos não terão quase nenhum efeito na estrutura do gelo, outros solutos podem afetar não apenas a estrutura do gelo, mas também suas propriedades físicas (NAIL *et al.*, 2002). Com base na Lei de Raoult, a presença de solutos em altas concentrações resultará em uma depressão do ponto de congelamento da solução e em uma nucleação de gelo mais rápida, devido à promoção da nucleação heterogênea. Isso leva a um grau reduzido de super-resfriamento (AKYURT, ZAKI e HABEEBULLAH, 2002).

A diferença importante entre a cristalização eutética e a vitrificação é que o interstício entre as matrizes de cristais de gelo é diferente. Nos materiais cristalinos ele é constituído por uma mistura íntima de pequenos cristais de gelo e soluto, enquanto que a região intersticial em substâncias amorfas consiste em gelo e água descongelada. Portanto, em material cristalino, quase toda a água é congelada e pode ser facilmente removida durante a secagem primária, sem a necessidade de secagem secundária. No entanto, em solutos amorfos, cerca de 20% da água não congelada está associada à solução sólida, que deve ser removida por um processo de difusão durante a secagem secundária (NAIL *et al.*, 2002).

Portanto, a natureza da nucleação de gelo representa um grande desafio para o controle do processo durante a liofilização. Isso destaca a importância de um processo de congelamento controlado, reprodutível e homogêneo. A etapa de congelamento pode ser otimizada mediante modificação da taxa de

resfriamento que irá influenciar a nucleação do gelo assim como pelo aumento da temperatura média de nucleação (KASPER e FRIESS, 2011).

### **2.5.2 Annealing**

Como uma etapa opcional, o procedimento de *annealing* pode ser adotado após o congelamento convencional para cristalizar totalmente os excipientes presentes na amostra, reduzir a heterogeneidade entre os frascos e as taxas de secagem (HORN, SCHANDA e FRIESS, 2018; KASPER e FRIESS, 2011; LIM *et al.*, 2018). Esse processo faz parte da etapa de congelamento, no qual a formulação já congelada é mantida acima da temperatura final de congelamento por um tempo definido. A temperatura da etapa de *annealing* precisa estar entre a temperatura de fusão do gelo e  $T_g'$ , e os tempos de espera podem variar dependendo da formulação e da taxa de aquecimento (KASPER e FRIESS, 2011; LIM *et al.*, 2018). Durante o *annealing* os cristais de gelo servem como locais de nucleação para cristalização de adição das pequenas porções de água recentemente descongeladas e o raio médio dos cristais de gelo aumentam com o tempo (KASPER e FRIESS, 2011).

O *annealing* é um dos métodos mais eficazes que podem aumentar o tamanho do cristal de gelo (HOTTOT, VESSOT e ANDRIEU, 2007; LIM *et al.*, 2018; PATIL *et al.*, 2010), e recentemente muitos pesquisadores relataram que o processo permite aumentar a taxa de secagem durante a liofilização (SHI *et al.*, 2012). Isso ocorre devido ao aumento da taxa de transferência de calor e massa os quais são controlados pelo fluxo de transferência de calor entre a prateleira, o ambiente e a frente de sublimação de gelo dentro do frasco (LIM *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2012). O processo leva a formação de poros de maior diâmetro nos liófilos que permitem maior passagem do vapor desprendido durante a secagem. A redução da variabilidade inter-frascos também é propiciada uma vez que as estruturas de gelo formadas (tamanho dos cristais) resultam em liófilos mais homogêneos dentro de um mesmo lote

(ABDELWAHED, DEGOBERT e FESSI, 2006; HORN, SCHANDA e FRIESS, 2018; LIM *et al.*, 2018).

### **2.5.3 Congelamento com uso de crioprotetores**

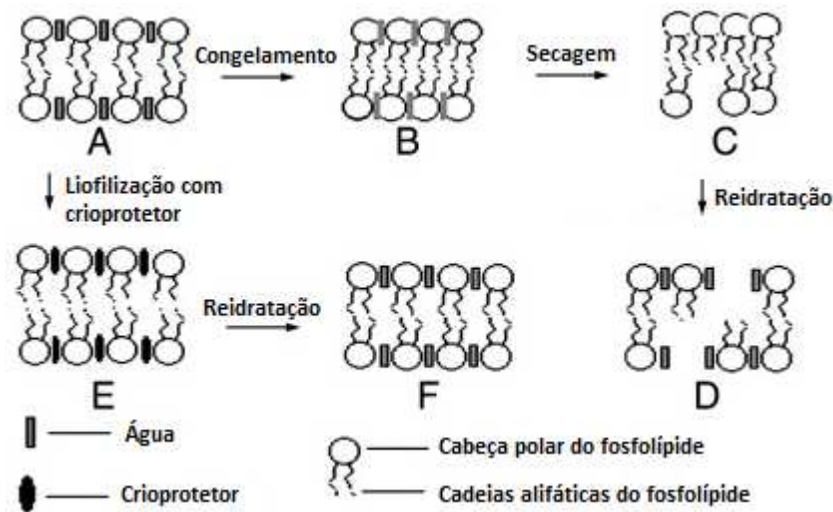
A liofilização de lipossomas sem adição de crioprotetores provoca sua coalescência e agregação (GHARIB *et al.*, 2019). Esse processo pode gerar muitas tensões que podem desestabilizar a dispersão coloidal, especialmente o estresse de congelamento e desidratação. Como já dito, durante o congelamento de uma amostra existe uma separação de fases entre gelo e solução crioconcentrada. No caso de dispersão coloidal, a fase crioconcentrada é composta pelo nanossistema e os outros componentes da formulação como surfactantes livres, tampões e fármacos não encapsulados. Essa alta concentração de sistema particulado pode induzir agregação e, em alguns casos, fusão irreversível dos nanocarreadores. Além disso, a cristalização do gelo pode exercer um estresse mecânico sobre os nanossistemas levando à sua desestabilização. Por essas razões, excipientes especiais, como os crioprotetores, devem ser adicionados à tais dispersões antes do congelamento para proteger esses sistemas frágeis. Os crioprotetores típicos são materiais solúveis em água, tais como açúcares (por exemplo, sacarose e lactose), álcoois de açúcar (por exemplo, manitol e sorbitol) e polímeros (por exemplo, PVP, álcool polivinílico, polietilenoglicol) (DATE, SAMAD e DEVARAJAN, 2010; YUE *et al.*, 2014). Para liofilização, dissacarídeos como sacarose ou trealose são relatados como sendo os mais eficazes, já que mostram uma viscosidade muito alta, uma baixa mobilidade molecular após a secagem e formam uma matriz vítrea amorfa (HUA *et al.*, 2003; STARK, PABST e PRASSL, 2010; SYLVESTER *et al.*, 2018).

Em geral, o tipo de crioprotetor deve ser selecionado e a sua concentração deve ser otimizada para assegurar uma estabilização máxima dos nanocarreadores. Normalmente, um estudo de congelamento e

descongelamento deve ser realizado antes da liofilização para selecionar o melhor crioprotetor, o qual será capaz de conservar as propriedades dos nanossistemas (ABDELWAHED *et al.*, 2006). O estudo de congelamento e descongelamento é curto e rápido em comparação com a liofilização e, portanto, pode ser utilizado como um pré-teste para o rastreamento do tipo e concentração de crioprotetores utilizados no processo. Esse estudo baseia-se no princípio de que, se o crioprotetor de escolha não puder proteger os nanocarreadores durante o primeiro passo de congelamento, durante a liofilização é provável que não seja eficaz (DATE, SAMAD e DEVARAJAN, 2010; VARSHOSAZ, ESKANDARI e TABBAKHIAN, 2012).

Até o momento, os mecanismos precisos pelos quais os açúcares agem para estabilizar os sistemas biológicos durante a liofilização continuam a ser objeto de debate. Contudo, no campo dos lipossomas liofilizados, foram propostas duas hipóteses baseadas em dissacarídeos, uma é o modelo da substituição de água e o outro é o modelo da vitrificação. Segundo a hipótese de substituição da água (**Figura 5**), as interações entre os açúcares e os grupamentos polares dos fosfolípides reduzem a temperatura de transição de fase ( $T_m$ ) da bicamada lipídica, no estado seco, porque os açúcares mantêm o espaçamento entre os grupamentos polares diminuindo as interações de Van der Waals entre as cadeias alifáticas dos fosfolípides. Ao fazer isso, os açúcares minimizam as interações entre a água e os fosfolípides e, em seguida, substituem a água. As ligações de hidrogênio múltiplas entre os açúcares e os lípides são formadas na superfície da bicamada e os açúcares podem interagir com até três lípidos diferentes simultaneamente. O grupamento fosfato é o local mais provável das bicamadas lipídicas com o qual os açúcares interagem (CHEN *et al.*, 2010; GUAN *et al.*, 2015; STARK, PABST e PRASSL, 2010).

**Figura 5: Mecanismo de substituição da água durante a liofilização e reidratação**



As bicamadas lipídicas dos lipossomas estão em estado fluido (A) em excesso de água e atingem um estado mais rígido (B) após o congelamento e, após secagem, tornam-se compactas, mas com possíveis defeitos de empacotamento (C) devido à ausência de crioprotetor. Por fim, tornam-se permeáveis à reidratação (D). Em contraste, na presença de crioprotetor, as moléculas de água são gradualmente substituídas por esse excipiente e as interações entre os crioprotetores e fosfolípidos mantêm o espaçamento dos grupamentos polares do fosfolípide e reduzem as interações de Van der Waals entre as cadeias alifáticas no estado seco (E), e as interações levam a uma redução da  $T_m$ .

Adaptado de CHEN, 2010.

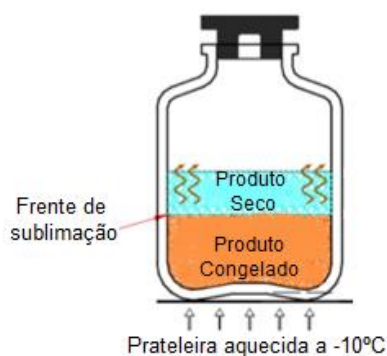
O outro mecanismo crioprotetor é o modelo de vitrificação no qual a solução de açúcar torna-se concentrada por congelamento formando um corpo estável e, finalmente, as porções liofilizadas são aprisionadas na matriz vitrificada de açúcar após a remoção de água. É possível que a matriz vitrificada, com alta viscosidade e baixa mobilidade, evite a fusão/agregação de lipossomas e proteja as bicamadas lipídicas de danos causados por cristais de gelo. A vitrificação do açúcar também inibe as mudanças conformacionais associadas à transição de fase lipídica. Duas propriedades desempenham um papel importante durante a vitrificação, como a capacidade dos crioprotetores de permanecerem nas proximidades das bicamadas lipídicas e o efeito osmótico que está relacionado principalmente ao número e volume das moléculas. Estes dois efeitos reduzem o estresse mecânico quando as membranas se aproximam, porque impedem qualquer contato entre as

bicamadas adjacentes (CHEN *et al.*, 2010). No nível macroscópico, as partículas lipossomais são compactadas em um estado seco separado por uma matriz de açúcar. Após a reidratação, os processos de fusão são evitados, uma vez que os lipossomas não têm contato direto um com o outro (STARK, PABST e PRASSL, 2010).

#### **2.5.4 Secagem primária**

Durante a secagem primária, os cristais de gelo oriundos da etapa de congelamento, são sublimados por um longo período (**Figura 6**). Embora o tempo necessário para a secagem primária pode ser encurtado por meio da adição de calor aos frascos com as amostras, o excesso de calor fornecido pode aumentar a temperatura do produto de maneira crítica. No processo de liofilização clássico, a  $T_{eu}$  para material cristalino e a  $T_g'$  e  $T_c$ , para material amorfo definem a temperatura máxima permitida do produto durante a secagem primária e são utilizadas para definir com precisão a temperatura na qual ocorre a perda estrutural do produto. Isso se baseia na teoria de que se a temperatura do produto exceder a temperatura crítica ( $T_c$ ) ocorrerá fusão cristalina ou colapso amorfo. Esta perda de estrutura nos produtos liofilizados denomina-se “colapso do líofilo” (OHORI e YAMASHITA, 2017; PANSARE e PATEL, 2019).

**Figura 6: Frente de sublimação durante secagem primária**




---

Adaptado de Christ, 2012.

O colapso é caracterizado pela perda da estrutura na região de interface de vapor e gelo, ocasionada pela transição vítrea do produto amorfo. Um aumento da temperatura do produto acima da temperatura de colapso resulta num gel viscoso e, conseqüentemente, na perda da estrutura dos poros. Além disso, o produto colapsado tem uma menor área de superfície específica e, conseqüentemente, uma secagem secundária mais lenta, o que resulta ainda em teor de água residual elevado. Tudo isso ocasiona a produção de um líofilo mais instável e também em um aumento no tempo de reconstituição do mesmo (OHORI e YAMASHITA, 2017).

Dessa forma, na secagem convencional a temperatura do produto durante a secagem primária deve ser mantida de 2 °C a 3 °C abaixo da  $T_g'$  para evitar macrocolapso e para manter a estabilidade física dos produtos. Atualmente foi demonstrado que a secagem acima de  $T_g'$ , ou mesmo acima da  $T_c$ , o que é descrito como secagem agressiva, não é necessariamente prejudicial à estabilidade dos produtos biofarmacêuticos. Isto pode proporcionar uma opção atrativa para otimização do ciclo de liofilização (BJELOŠEVIĆ *et al.*, 2018; DEPAZ, PANSARE e PATEL, 2016; LEWIS *et al.*, 2010).

Freqüentemente, o ponto final da secagem primária é determinado a partir dos termopares inseridos em frascos do produto, mas as amostras contendo sensores de temperatura não são representativas de todo o lote. Os frascos



que contêm termopares possuem a nucleação durante o congelamento a temperaturas mais elevadas (menor grau de super-resfriamento) do que os frascos sem termopares. Consequentemente, qualquer frasco contendo termopar terá o líofilo seco mais rapidamente devido à menor resistência do produto. O momento em que a temperatura do produto se aproxima da temperatura de prateleira marca efetivamente o fim da secagem primária para os frascos contendo termopares, mas não necessariamente para o restante do lote. Além disso, os termopares não são compatíveis com o sistema de carregamento automático e geralmente são colocados nos frascos da fila dianteira, voltados para a porta do liofilizador, os quais estão expostos a maior transferência de calor devido a efeitos de radiação atípicos. A fim de estabelecer o ponto final de secagem utilizando esse método, é frequentemente sugerido um tempo de secagem primária adicional de 10-30% devido às diferenças de comportamento de secagem entre frascos contendo termopar e os que não contêm (PATEL, DOEN e PIKAL, 2010).

### **2.5.5 Secagem secundária**

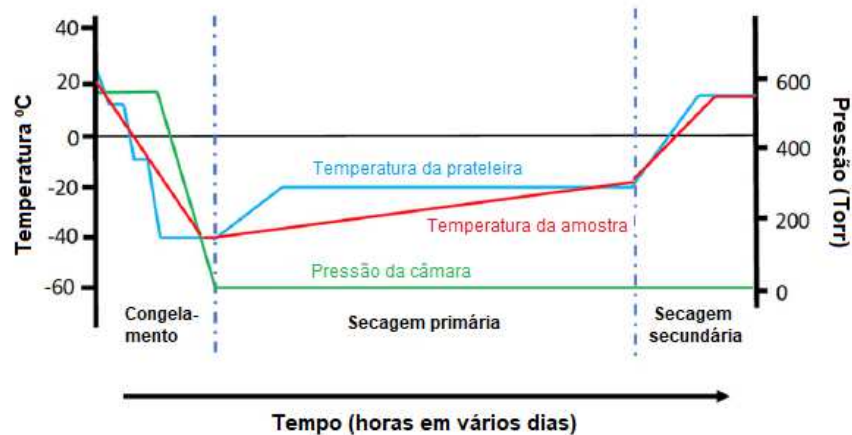
Durante a etapa de congelamento, apenas uma parte da água congela e fica disponível para sublimação durante a secagem primária. A parte restante encontra-se incorporada na matriz do soluto e é removida apenas via dessorção durante a secagem secundária. Tipicamente, a secagem secundária é realizada a uma temperatura de prateleira mais elevada do que a secagem primária, e tem de ser dada atenção para aumentar gradualmente a temperatura da prateleira de modo a evitar qualquer dano ao produto liofilizado, tal como retração e/ ou colapso (LIETTA *et al.*, 2019; ODDONE, BARRESI e PISANO, 2017; PISANO *et al.*, 2013).

O objetivo da secagem secundária é reduzir o teor de umidade para um nível ótimo de estabilidade do produto e para muitas formulações, é benéfico reduzir o máximo possível o nível residual final de umidade, normalmente abaixo de

1% (MORAIS *et al.*, 2016). No entanto, estudos recentes demonstraram que algumas moléculas biológicas apresentam uma estabilidade ótima em teores intermediários de umidade entre 1% e 3% (SCHNEID *et al.*, 2011).

O ciclo completo de liofilização pode ser monitorado *in situ* em tempo real para formulações de lipossomas visando uma otimização dos processos de secagem. A **Figura 7** representa um esquema de um ciclo completo típico de liofilização de produtos farmacêuticos: congelamento, secagem primária e secagem secundária ao longo do tempo sob temperatura e pressão determinados (WANG e GRAINGER, 2019).

**Figura 7: Parâmetros envolvidos em um ciclo completo de liofilização**



Adaptado de Wang e Grainger, 2019.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar a toxicidade aguda, por meio de estudos *in vivo*, de uma formulação de lipossomas fusogênicos de circulação prolongada co-encapsulando PTX e DXR na razão molar de 1:10 e desenvolver um ciclo de liofilização adequado que garanta a manutenção das suas características físico-químicas após reconstituição do pó.

#### 3.2 Objetivos específicos

##### 3.2.1 Capítulo 1: Estudo de toxicidade aguda de LFCP-PTX/DXR

- Determinar a LD<sub>50</sub> dos LFCP-PTX/DXR em camundongos fêmea Balb/c;
- Avaliar a toxicidade dos LFCP-PTX/DXR após administração intravenosa única em camundongos fêmea Balb/c sadias por meio de:
  - Exames hematológicos para identificar alterações nos componentes sanguíneos (eritrócitos, linfócitos e plaquetas);
  - Exames bioquímicos para determinar alterações nos marcadores específicos de lesão tecidual (ALT, AST, ureia, creatinina e CK-MB);
  - Eletrocardiogramas para identificar possíveis alterações nos sinais elétricos e batimentos cardíacos dos animais;
  - Investigação da histologia para determinação de possíveis danos aos tecidos do coração, rins, fígado, baço, esterno e pulmões.

### **3.2.2 Capítulo 2: Estudo dos parâmetros de liofilização dos LFCP-PTX/DXR**

- Determinar um ciclo de liofilização adequado para os LFCP-PTX/DXR de maneira a permitir a manutenção das características químicas e físico-químicas das vesículas após reconstituição do pó:

- Testes de congelamento e descongelamento para avaliar a temperatura e tempo de congelamento dos LFCP-PTX/DXR, definir o melhor crioprotetor para o processo de liofilização e sua proporção em relação aos fosfolípides da formulação, além de definir as melhores taxas de resfriamento;
- Determinação das temperaturas de transição vítrea dos LFCP-PTX/DXR adicionados de crioprotetor utilizando o método de calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Determinação das temperaturas de colapso dos LFCP-PTX/DXR adicionados de crioprotetor mediante o uso de microscopia de liofilização;
- Desenvolvimento dos ciclos de liofilização baseado nas informações e resultados obtidos após os testes anteriormente citados;
- Avaliação macroscópica dos liófilos após ciclos de liofilização completos e determinação dos seus tempos de reconstituição;
- Avaliação química e físico-química dos liófilos pós-reconstituição incluindo análise de quantidade de partículas presentes na dispersão (análise de rastreamento de nanopartículas – NTA) e também avaliação morfológica por criomicroscopia.

## **4 MATERIAL**

1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) e 1,2 distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino (polietilenoglicol) 2000 (DSPE-PEG2000) foram fornecidos pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen Alemanha). O hemisuccinato de

colesterila (CHEMS), doxorubicina (DXR), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico (HEPES), cloreto de sódio, hidróxido de sódio e Cremophor EL foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. , EUA). O paclitaxel (PTX) foi fornecido pela Quiral Química do Brasil S.A (Juiz de Fora, Brasil). A trealose, glicose e sacarose foram adquiridas da VETEC Química Fina LTDA (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os outros produtos químicos utilizados neste estudo foram de grau analítico. Os camundongos Balb /c fêmeas foram obtidos no Centro de Bioterismo - CEBIO/UFMG (Belo Horizonte, Brasil) e os tratamentos aos quais foram submetidos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFMG (Belo Horizonte, Brasil) sob o número de protocolo 39/2019.

**CAPÍTULO 1:**  
**Estudo de toxicidade aguda de LFCP-PTX/DXR**

## 1 MÉTODOS

### 1.1 Preparação dos LFCP-PTX/DXR

Os LFCP-PTX/DXR foram preparados pela técnica de hidratação do filme lipídico usando um evaporador rotativo Buchi Labortechnik AG CH-9233, modelo R-210, acoplado a uma bomba de vácuo V-700 da mesma marca (Flawil, Suíça). Para tal, alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-PEG<sub>2000</sub> (concentração lipídica total igual a 10 mM, proporções molares iguais a 5,7: 3,8: 0,5, respectivamente) e PTX (concentração igual a 0,25 mg/mL) foram transferidos para um balão de fundo redondo e submetidos a evaporação em banho-maria a 50 °C para remover o solvente. O filme lipídico obtido foi então mantido por 1 h sob uma atmosfera de clorofórmio para melhor dispersão do PTX nos lipídios, de acordo com a técnica conhecida como *annealing* (RASCH *et al.*, 2013).

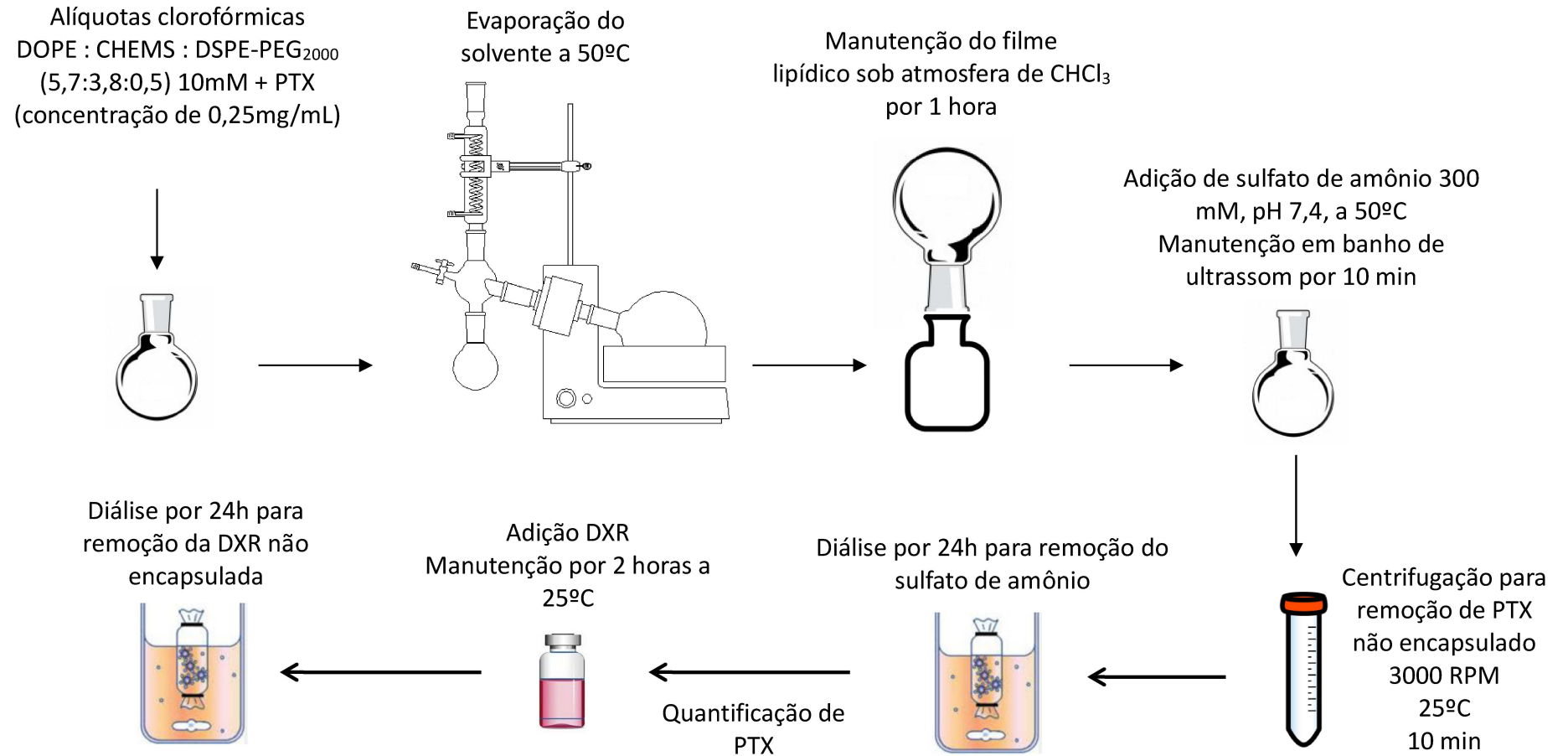
Sobre o filme foi adicionada uma alíquota da solução de NaOH 0,1 M para promover a ionização completa das moléculas de CHEMS e a subsequente formação de uma estrutura lamelar. O filme lipídico foi hidratado com uma solução de sulfato de amônio (300 mM, pH 7,4) pré-aquecida em banho-maria a 50 °C. A mistura foi mantida no banho ultrassônico por 10 min para hidratação do filme lipídico. O PTX não encapsulado foi então separado dos lipossomas por centrifugação a 3000 rpm, 25 °C, por 10 min (centrífuga Heraeus Multifuge X1R, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA). Para remover o sulfato de amônio não retido, os lipossomas foram mantidos em diálise por 24 h contra solução salina tamponada com HEPES (HBS), pH 7,4. A concentração de PTX nesses lipossomas foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Após determinação da concentração de PTX, a DXR foi incubada com os lipossomas para obter uma razão molar de 1:10 de PTX e DXR respectivamente. O encapsulamento de DXR foi realizado por um gradiente de sulfato de amônio transmembranar. O encapsulamento ativo auxilia no ajuste

fino da quantidade de DXR encapsulada (SILVA *et al.*, 2018). Os lipossomas contendo PTX foram mantidos em contato com DXR por 2 horas a 25 °C e depois dialisados contra solução salina tamponada com HEPES (HBS), pH 7,4, por 24 h, para remoção de DXR não encapsulada (ROQUE, 2017; ROQUE *et al.*, 2019). Todo o processo de preparação dos LFCP-PTX/DXR está esquematizado na **Figura 8**.



**Figura 8: Esquema da preparação dos lipossomas fusogênicos de circulação prolongada co-encapsulando PTX e DXR na razão molar de 1:10**



## 1.2 Determinação de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta dos LFCP-PTX/DXR

O diâmetro das vesículas e o índice de polidispersão (IP) foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS). As medições foram realizadas a uma temperatura de 25 °C, utilizando um ângulo de incidência de laser de 90 °C. O potencial zeta (PZ) das vesículas foi determinado pelo DLS associado à mobilidade eletroforética. Para realizar as duas medições, 30 µL de lipossomas foram diluídos em 1 mL de HBS, pH 7,4, e avaliados no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Inglaterra).

## 1.3 Determinação da encapsulação dos fármacos nos LFCP-PTX/DXR

Para determinar a porcentagem de encapsulação dos fármacos nos LFCP-PTX/DXR recém-preparados, métodos de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria foram utilizados. A concentração de PTX foi avaliada com auxílio do cromatógrafo composto por uma bomba Modelo 515, um autoinjeter Modelo 717 Plus e um detector DAD Modelo 2996 (Waters Instruments, Milford, EUA), controlado pelo software Empower, versão 2.0. Para análise, foi utilizada uma coluna Hibar 250-4 LiChrospher 100RP-18, 25 cm x 4 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemanha). O sistema eluente consistiu em acetonitrila:água (55:45) em um fluxo igual a 1,2 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL e o tempo de cada corrida foi de 8 minutos. O eluato foi detectado em um comprimento de onda igual a 227 nm à temperatura ambiente (MONTEIRO, L. O. F. *et al.*, 2018). A porcentagem de encapsulação (PE) de PTX foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$PE = \frac{\text{concentração de PTX em lipossomas purificados}}{\text{concentração de PTX em lipossomas não purificados}} \times 100$$

A espectrofotometria UV-VIS (espectrofotômetro visível UV Thermo evolution 201) foi usada como método para quantificação de DXR em lipossomas. As análises

foram realizadas avaliando a absorvância em um comprimento de onda igual a 480 nm (OLIVEIRA *et al.*, 2016). A equação de regressão e linearidade ( $r^2$ ) foram  $y = 0,01814x + 0,01119$  e 0,997, respectivamente. A precisão foi encontrada entre 98 e 104% ( $n=3$ ) e as amostras de lipossomas brancos não apresentaram absorvância no comprimento de onda usado. Inicialmente, as vesículas foram abertas com álcool isopropílico na proporção de 1:2, respectivamente, e depois as preparações foram diluídas em solução salina tamponada com HEPES (HBS), pH 7,4. A PE de DXR foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$PE = \frac{[\text{concentração de DXR em lipossomas purificados}] \times 100}{\text{concentração de DXR em lipossomas não purificados}}$$

#### 1.4 Toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda *in vivo* foi realizada segundo as recomendações da OECD 423 de 2001, adaptada para formulações de uso parenteral. Por meio desse estudo, a  $LD_{50}$  é estimada em um intervalo de doses. Vale ressaltar, que as normas da OECD foram estabelecidas para um estudo de toxicidade aguda após a administração das substâncias por via oral, sendo as doses preconizadas iguais a 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. Considerando a via de administração intravenosa, em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa avaliou que a dose máxima tolerada de DXR encapsulada em lipossomas compostos por DOPE, CHEMS e DSPE-PEG<sub>2000</sub> (5,8: 3,7: 0,5 razão molar, respectivamente) era superior a 15 mg/kg (SILVA *et al.*, 2018). Portanto, com base neste estudo, optamos por usar 18 mg/kg de DXR e 2,8 mg/kg de PTX para obter uma razão molar de 1:10, respectivamente. Dessa forma, a dose inicial proposta nesse trabalho foi de 20,8 mg/kg do total de fármacos administrados.

Os parâmetros avaliados para a determinação da toxicidade aguda foram observação comportamental, peso corporal, consumo de água e ração, mortalidade, análises bioquímicas e análises hematológicas. O modelo experimental adotado foram fêmeas de camundongos Balb/c sadios com idade entre 8 e 9 semanas e peso aproximado de 20g. Os animais foram divididos em 8 grupos e os tratamentos recebidos foram: solução NaCl 0,9% p/v (salina), PTX/DXR livres e LFCP-PTX/DXR em diferentes dosagens, conforme constam na **Tabela 1**.

**Tabela 1: Grupos experimentais avaliados nos estudos de toxicidade aguda para os parâmetros bioquímicos, hematológicos e observações de mortalidade e morbidade**

Formulação	Grupos Avaliados	Dose por Fármaco (mg/kg)		Dose total de Fármacos (mg/kg)	Número Total de Animais
		PTX	DXR		
PTX/DXR livres	1	2,8	18	20,8	6
	2	3,1	20	23,1	3
	3	2,8	18	20,8	6
LFCP-PTX/DXR	4	3,1	20	23,1	6
	5	3,4	22	25,4	6
	6	3,9	25	28,9	6
	7	4,7	30	34,7	3
Salina	8	-	-	-	6

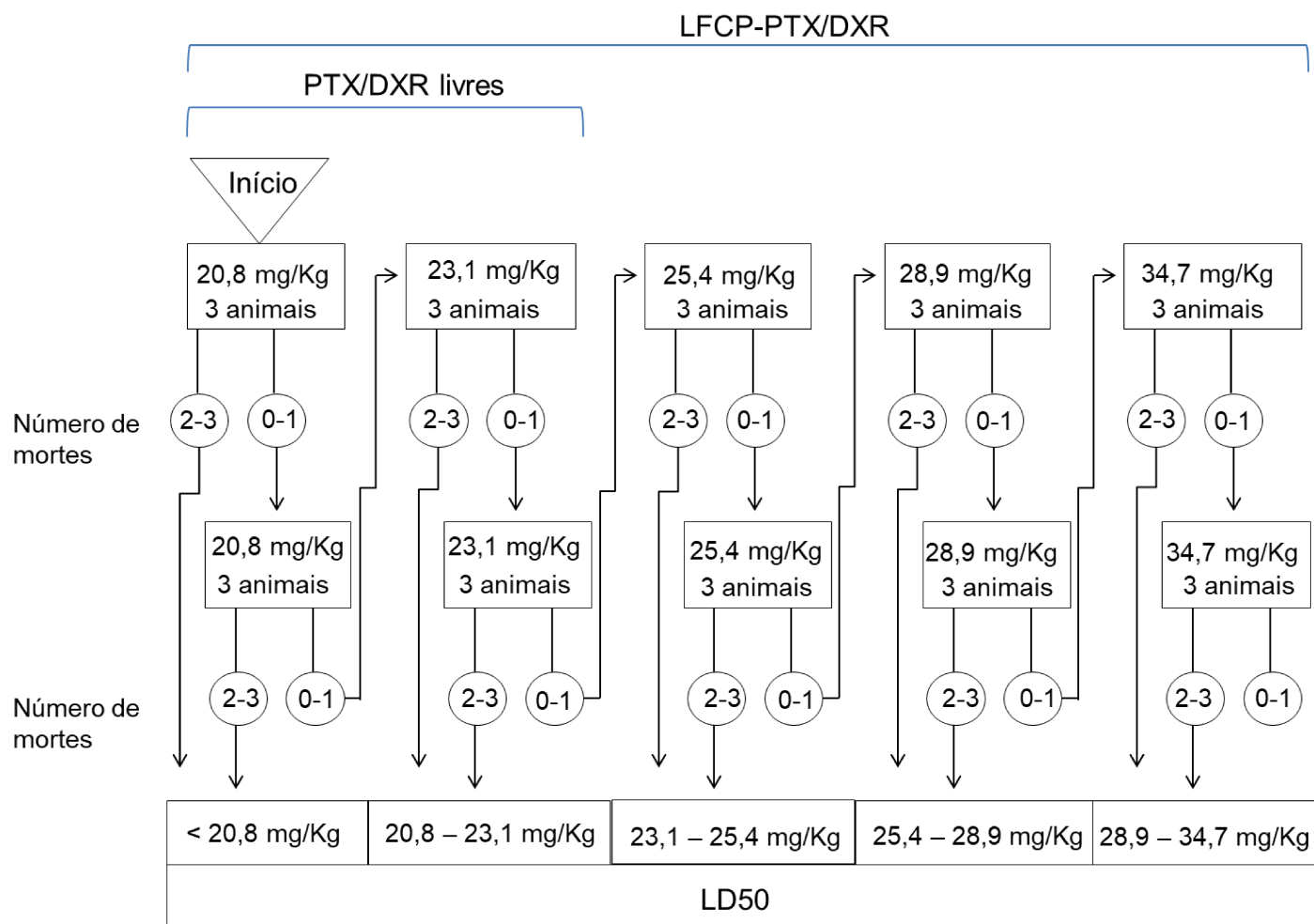
Em todos os grupos, as formulações foram administradas em dose única por via endovenosa (veia da cauda). Para a administração da combinação dos fármacos livres, o PTX foi solubilizado em uma solução contendo Cremophor® (óleo de rícino polietoxilado) e etanol 1:1 (v/v). A DXR foi solubilizada em salina 0,9%. No momento da administração nos camundongo, as duas soluções foram misturadas e aplicadas na veia da cauda dos animais. Já os LFCP-PTX/DXR precisaram ser concentrados para atingir as altas concentrações de fármacos propostas no estudo. Para isso, no momento do preparo da

formulação lipossomal, durante a etapa de hidratação do filme lipídico, foi adicionada metade do volume necessário da solução de sulfato de amônio.

Após os tratamentos, os animais foram observados diariamente durante um período de 14 dias. Os camundongos foram pesados e seu consumo de água e ração avaliados a cada 3 dias. Após o período de observação, os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) por via intraperitoneal. O sangue foi coletado por punção do plexo braquial para exames hematológicos e bioquímicos.

Inicialmente cada grupo de tratamento foi composto por 3 animais e caso a dose testada fosse capaz de levar a óbito 2 ou mais animais do grupo, durante os 14 dias de observação do estudo, foi considerado que a LD<sub>50</sub> era inferior a dose testada. Portanto, de acordo com a recomendação da OECD, era necessário iniciar novos testes com uma dose inferior. Porém, quando a dose avaliada provocou uma ou nenhuma morte, a recomendação da OECD adotada foi repetir as observações com mais 3 animais usando a mesma dose. Dessa forma, cada grupo passou para um total de 6 animais. Uma vez que os resultados se confirmaram significou que a dose testada não atingiu a LD<sub>50</sub>, e a orientação da OECD é de continuar o estudo com um novo grupo utilizando uma dose superior. A **Figura 9** mostra o esquema de tratamento utilizado para avaliar a toxicidade aguda nesse trabalho.

**Figura 9: Esquema de tratamento dos animais em estudo de toxicidade aguda para determinação de dose máxima tolerada seguindo a OECD adaptada**



### **1.4.1 Hematologia e bioquímica**

Para análise hematológica o sangue dos animais foi coletado em tubos contendo o anticoagulante (EDTA) e inserido no analisador hematológico automatizado HEMOVET 2300 (Hemovet, São Paulo, Brasil). Parâmetros hematológicos referentes ao hematócrito, hemácias e hemoglobina, e também aos glóbulos brancos foram avaliados para cada grupo de tratamento.

Para análise bioquímica, o sangue foi centrifugado (3000 rpm, 15 min) e o plasma obtido foi coletado. Os testes foram realizados no analisador semiautomático Bioplus BIO-2000 (São Paulo, Brasil) utilizando kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, Brasil). A função renal foi avaliada pela dosagem de ureia e creatinina; a função hepática por determinação da atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); e lesão cardíaca, pela dosagem da atividade da creatina quinase isoforma MB (CK-MB).

### **1.4.2 Histologia**

Fígado, rins, esterno, baço, pulmões e coração foram coletados dos animais para análise histopatológica. As amostras foram fixadas em formalina tamponada com fosfato 10% (pH = 7,4) por 24 a 48 h, desidratadas em álcool e incluídas em blocos de parafina. Cortes de 4 µm foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram avaliadas pelo Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali, do Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. As imagens foram capturadas por uma câmera conectada a um microscópio óptico (Olympus BX-40; Olympus, Tóquio, Japão).

### 1.4.3 Análise eletrocardiográfica

Para a realização do ECG, todos os animais foram anestesiados com anestesia inalatória em circuito fechado (VetCase®, Sumaré, São Paulo, Brasil) com isoflurano (Isoflurina® 2,5% para indução e 1,5% para manutenção). O monitoramento do ECG (ECG-PC VET, Tecnologia Eletrônica Brasileira SA - TEB®) foi mantido por 1 min após a estabilização. Os animais foram colocados em decúbito dorsal e os eletrodos posicionados nos membros torácico e pélvico. Frequência cardíaca, duração, amplitude e intervalo das ondas elétricas considerando a derivação DII do eletrocardiograma foram avaliados. Os grupos experimentais avaliados foram os animais tratados com a dose limite inferior da LD<sub>50</sub> da combinação de PTX/DXR livres (20,8 mg/Kg), verificada no estudo de toxicidade aguda anterior. O grupo tratado com a formulação LFCP-PTX/DXR nessa mesma concentração assim como com a dose limite superior da LD<sub>50</sub> (28,9 mg/Kg) também foi examinado. Todos os grupos experimentais utilizados nas análises eletrocardiográficas estão descritos na **Tabela 2** para facilitar a visualização. Os seguintes parâmetros foram analisados: intervalo QT (medido do início do complexo QRS ao final da onda T), intervalo ST (medido do final do complexo QRS ao início da onda T), complexo QRS (medido a partir de do início da onda Q ao final da onda S), e o intervalo RR (intervalo entre duas ondas R sucessivas e utilizado para a determinação da frequência cardíaca ( $FC = 60/RR$ )). O intervalo QT foi corrigido pela frequência cardíaca usando a fórmula de Fridericia ( $QTc = QT/(RR)^{1/3}$ ) (ABERNETHY *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2018).



**Tabela 2: Grupos experimentais avaliados nas análises eletrocardiográficas**

Formulação	Grupos Avaliados	Dose por Fármaco (mg/kg)		Dose Total de Fármacos (mg/kg)	Número Total de Animais
		PTX	DXR		
PTX/DXR livres	1	2,8	18	20,8	6
LFCP-PTX/DXR	2	2,8	18	20,8	6
	3	3,9	25	28,9	6

### 1.5 Análises estatísticas

A normalidade e homocedasticidade das variáveis foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente. Em relação à análise dos tratamentos, foi utilizado o teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey para verificar se as médias dos grupos diferiam significativamente. Caso os dados não fossem normais ou homocedásticos, o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi utilizado para o mesmo propósito. O teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey também foi usado para relacionar duas variáveis independentes diferentes em uma variável dependente. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 9.00, La Jolla, Califórnia, EUA).

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 Preparação e caracterização de LFCP-PTX/DXR

A formulação de LFCP-PTX/DXR, co-encapsulando PTX e DXR na razão molar sinérgica de 1:10, apresentou um diâmetro adequado próximo a 200 nm com baixa polidispersividade, como anteriormente descrito por Roque *et al.* (2019). O diâmetro médio e a distribuição média do diâmetro foram homogêneos e adequados para administração intravenosa (BARUA e MITRAGOTRI, 2014; FRANCO, ROQUE e OLIVEIRA, 2019; ROQUE *et al.*, 2019; SIAFAKA *et al.*, 2016). O potencial zeta foi levemente negativo, mas perto da neutralidade, como esperado para lipossomas revestidos com PEG<sub>2000</sub> (FRANCO, ROQUE e OLIVEIRA, 2019; RAMADASS *et al.*, 2015; ROQUE *et al.*, 2019). Os dados referentes a caracterização físico-química dos LFCP-PTX/DXR podem ser visualizados na **Tabela 3**.

**Tabela 3: Caracterização química e físico-química dos LFCP-PTX/DXR**

[PTX] mg/mL	[DXR] mg/mL	DXR/PTX Razão molar	Diâmetro médio (nm)	IP	Potencial zeta (mV)
0,15 ± 0,02	0,96 ± 0,28	10,10 ± 1,81	211,8 ± 16,3	0,29 ± 0,02	-7,39 ± 2,20

PTX: paclitaxel; DXR: doxorubicina; IP: índice de podispersividade. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão da média (n=10).

## 2.2 Estudo de toxicidade aguda

### 2.2.1 Avaliação da mortalidade e morbidade dos animais

A avaliação da LD<sub>50</sub> da combinação dos fármacos PTX/DXR (razão molar 1:10 respectivamente) iniciou com 20,8 mg/kg (2,8 mg/kg PTX + 18 mg/kg DXR), tanto para a combinação de fármacos livres quanto para a formulação de LFCP-PTX/DXR. Para a associação dos fármacos livres nesta dose, observou-se piloereção acentuada em todos os animais, com presença de sinais de diarreia e ascite em um deles. Para os primeiros 3 camundongos avaliados, houve apenas 1 morte no 9º dia do estudo. Conforme o planejamento experimental apresentado no item 1.4 e (**Figura 9**), essa etapa foi repetida com mais 3 animais, sendo verificada 1 morte no 12º dia de experimento. Assim, de acordo com a diretriz OECD 423, uma dose maior da associação de fármacos livres deveria ser testada. Logo, a dose de 23,1 mg/kg (3,1 mg/kg PTX + 20 mg/kg DXR) foi administrada nos camundongos. Após 3 dias de aplicação dos fármacos, observou-se piloereção e letargia dos animais, resultando em 2 óbitos no 7º dia de estudo. Portanto, segundo as regras da OECD 423, a LD<sub>50</sub> para o tratamento PTX/DXR livres na proporção molar de 1:10 é o intervalo de 20,8 - 23,1 mg/kg para este modelo experimental. Dessa forma, 23,1 mg/kg foi a última dose testada para a associação de fármacos livres.

Os estudos com LFCP-PTX/DXR também iniciaram com dose de 20,8 mg/kg e, devido à ausência de óbitos ou morbidades, evoluíram com maior número de doses testadas, conforme **Tabela 1** e **Figura 9**. Para este tratamento, até a dose testada de 28,9 mg/kg (3,9 mg/kg PTX + 25 mg/kg DXR) nenhuma morte foi observada. Entretanto, para as doses de 25,4 mg/kg (3,4 mg/kg PTX + 22 mg/kg DXR) e 28,9 mg/kg (3,9 mg/kg PTX + 25 mg/kg DXR) houve perda de peso dos animais variando entre 8 a 10% nos primeiros 3 dias após a administração dos LFCP-PTX/DXR, seguida de recuperação nos próximos dias. Para a dose de 28,9 mg/kg, piloereção leve e a formação de ascite leve a moderada foram observadas na maioria dos animais.

Em vista desses resultados, repetimos os experimentos para cada grupo tratado com LFCP-PTX/DXR nas doses de 20,8; 23,1; 25,4 e 28,9 mg/kg usando mais 3 animais por tratamento, e as observações foram confirmadas. Concluiu-se que o tratamento com doses superiores a 20,8 mg/kg da combinação dos fármacos PTX/DXR só foi possível com o uso de lipossomas, uma vez que não foi observada morbimortalidade nos camundongos.

Seguimos o estudo de toxicidade aguda para o tratamento com LFCP-PTX/DXR aumentando a dose para 34,7 mg/kg (4,7 mg/kg PTX + 30 mg/kg DXR). Nesse caso foi necessário interromper o estudo e sacrificar os animais no 4º dia após a administração intravenosa da formulação. Foram detectados sinais graves de morbidade, como perda de peso intensa chegando a 15%, piloereção, sinais de diarreia e cauda cianótica. Após a dessecação desses animais, os intestinos foram encontrados dilatados com acúmulo de fezes. Assim, a LD<sub>50</sub> para tratamento com LFCP-PTX/DXR foi o intervalo de doses equivalente a 28,9 – 34,7 mg/kg dos fármacos.

Dada a possibilidade de administração de PTX/DXR livres apenas na dose mais baixa do estudo, devido à mortalidade precoce de camundongos quando expostos a uma dose superior (23,1 mg/kg), a comprovação de efeitos tóxicos em órgãos e tecidos dos animais foram dificultados para este grupo de tratamento. A visualização desses efeitos foi viável apenas nas doses mais altas dos fármacos, com a administração dos lipossomas. Embora com leves sinais de toxicidade aparente, os animais que receberam as maiores doses de LFCP-PTX/DXR permaneceram vivos e sem morbidades.

O benefício terapêutico da formulação lipossomal foi consolidado na redução da toxicidade com conseqüente aumento da LD<sub>50</sub>. Isso ocorre devido ao diferente perfil de biodistribuição dos lipossomas quando comparados aos fármacos livres (WANG e GRAINGER, 2019). As propriedades intrínsecas dos lipossomas como tamanho de partícula, carga e composição lipídica, podem produzir alterações na biodistribuição de fármacos, deixando-os mais disponíveis a determinados órgãos ou tecidos. Além disso, as bicamadas

lipídicas alteram o transporte, a captação de células e tecidos e o processamento intracelular dos nanossistemas (HUA e WU, 2013; MONTEIRO *et al.*, 2014; WANG e GRAINGER, 2019).

### **2.2.2 Análises hematológicas**

Os resultados dos exames hematológicos encontram-se na **Tabela 4**. Os exames hematológicos não revelaram alterações na distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW). No entanto, o hematócrito (HCT), a quantidade de hemoglobina por volume de sangue (HGB) e o número de glóbulos vermelhos (RBC) mostraram uma ligeira redução para grupos tratados com maiores concentrações de fármacos nos lipossomas (23,1; 25,6 e 28,9 mg/kg).

A avaliação dos leucócitos indicou que a quantidade de granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) também aumentou no grupo tratado com LFCP-PTX/DXR com as doses mais altas (23,1; 25,6 e 28,9 mg/kg). No entanto, a quantidade de agranulócitos (linfócitos e monócitos) diminuiu nesses mesmos grupos, quando comparados ao grupo controle. A presença dessa leve citopenia após administração de doses maiores de LFCP-PTX/DXR pode ser decorrente da presença de DXR que promove essa condição clínica (SILVA *et al.*, 2018; KHIAMI *et al.*, 2019). No entanto, este comportamento oposto de aumento de granulócitos e redução de agranulócitos resultou na manutenção da contagem total de leucócitos (WBC) igual ao grupo controle. Os outros grupos avaliados como PTX/DXR livre e LFCP-PTX/DXR (20,8 e 23,12 mg/kg) não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle para os valores de leucócitos.

A quantidade de plaquetas (PLT) aumentou significativamente com o aumento da dosagem do tratamento com LFCP-PTX/DXR administrado aos camundongos. Esse aumento parece ser o resultado de uma trombocitose reativa, um distúrbio clínico que estimula a medula óssea a produzir plaquetas em excesso. Mais uma vez, esses achados podem estar relacionados a

presença de DXR, a qual é conhecida por interromper a produção de hemácias e causar distúrbios de coagulação sanguínea (SILVA *et al.*, 2018; KHIAMI *et al.*, 2019).

**Tabela 4: Parâmetros hematológicos para camundongos Balb/c tratados com diferentes doses de LFCP-PTX/DXR e uma combinação de PTX/DXR livres**

Componentes sanguíneos	Controle	PTX/DXR livres (mg/kg) 20,8	LFCP-PTX/DXR (mg/kg)			
			20,8	23,1	25,4	28,9
WBC (cel mm <sup>3</sup> x 10 <sup>3</sup> )	4,78 ± 1,34 <sup>a</sup>	6,93 ± 1,29 <sup>a</sup>	5,50 ± 1,27 <sup>a</sup>	4,55 ± 2,08 <sup>a</sup>	6,92 ± 1,82 <sup>a</sup>	4,55 ± 1,72 <sup>a</sup>
Não granulócitos (%)	67,53 ± 2,73 <sup>a</sup>	63,73 ± 10,42 <sup>ab</sup>	53,22 ± 8,95 <sup>abc</sup>	51,25 ± 10,68 <sup>bc</sup>	47,58 ± 11,72 <sup>bc</sup>	42,47 ± 6,81 <sup>c</sup>
Granulócitos (%)	32,47 ± 2,73 <sup>a</sup>	36,27 ± 10,42 <sup>ab</sup>	46,78 ± 8,95 <sup>abc</sup>	48,75 ± 10,68 <sup>bc</sup>	52,42 ± 11,72 <sup>bc</sup>	57,53 ± 6,81 <sup>c</sup>
RBC (%)	6,67 ± 0,18 <sup>a</sup>	6,01 ± 0,51 <sup>ab</sup>	6,37 ± 0,28 <sup>ab</sup>	5,86 ± 0,34 <sup>b</sup>	6,01 ± 0,46 <sup>b</sup>	5,83 ± 0,34 <sup>b</sup>
HGB (cel mm <sup>3</sup> x 10 <sup>6</sup> )	12,95 ± 0,45 <sup>a</sup>	11,30 ± 1,45 <sup>ab</sup>	12,02 ± 0,72 <sup>ab</sup>	11,08 ± 0,87 <sup>b</sup>	11,23 ± 1,97 <sup>b</sup>	10,85 ± 0,72 <sup>b</sup>
HCT (%)	32,82 ± 1,45 <sup>a</sup>	30,07 ± 3,11 <sup>ab</sup>	31,53 ± 1,44 <sup>ab</sup>	29,00 ± 1,97 <sup>b</sup>	29,25 ± 2,49 <sup>b</sup>	28,03 ± 1,78 <sup>b</sup>
RDW (%)	14,20 ± 0,39 <sup>a</sup>	14,47 ± 0,40 <sup>a</sup>	14,77 ± 0,48 <sup>a</sup>	14,30 ± 0,17 <sup>a</sup>	14,67 ± 0,60 <sup>a</sup>	14,08 ± 0,39 <sup>a</sup>
PLT (cel mm <sup>3</sup> x 10 <sup>3</sup> )	288,00 ± 27,34 <sup>a</sup>	271,50 ± 43,13 <sup>ac</sup>	448,20 ± 64,40 <sup>b</sup>	566,80 ± 79,68 <sup>d</sup>	478,00 ± 45,66 <sup>bd</sup>	396,60 ± 61,51 <sup>bc</sup>

WBC: glóbulos brancos; RBC: células vermelhas do sangue; HGB: hemoglobina; HCT: hematócrito; RDW: amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos; PLT: plaquetas. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão da média (n=6). Letras diferentes representam diferença significativa entre os parâmetros avaliados ( $p < 0,05$ ). Os dados foram avaliados por One-way ANOVA (pós-teste de Tukey); caso fossem anormais, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

### 2.2.3 Análises Bioquímicas

Os resultados das análises bioquímicas estão apresentados na **Tabela 5** e pode-se observar que as doses de fármacos utilizadas não causaram alterações na função renal. Isso porque não houve diferença significativa na concentração de ureia e creatinina entre todos os grupos tratados quando comparados ao controle. O nível do marcador de cardiotoxicidade, a enzima CK-MB, apresentou-se elevado apenas para o grupo tratado com LFCP-PTX/DXR na dose de 25,4 mg/kg, a qual se destacou dos demais. Logo, houve um indício de baixa ou nenhuma cardiotoxicidade, o que será corroborado adiante com outras avaliações como histologia e eletrocardiogramas.

Níveis séricos aumentados de ALT e AST podem indicar o desenvolvimento de lesão hepática aguda induzida por fármacos em animais (SILVA *et al.*, 2018; RAZAVI-AZARKHIAVI *et al.*, 2016). Neste estudo, os níveis séricos de ALT para todos os grupos tratados com LFCP-PTX/DXR, independentemente da dose administrada (20,8; 23,1; 25,4 ou 28,9 mg/kg), foram iguais ao determinado para o grupo tratado com PTX/DXR na dose equivalente à mais baixa administrada em lipossomas (20,8 mg/kg). Isso significa que a mais alta dose de fármacos quando em lipossomas levou ao mesmo resultado em concentração de ALT nos animais quando comparada a menor dose dos fármacos livres. Uma consequência desse resultado é a sugestão de nenhuma ou baixa toxicidade hepática induzida pela formulação lipossomal, a qual é corroborada pelo fato dos grupos tratados com LFCP-PTX/DXR na maioria das doses testadas, incluindo a mais alta, (23,1; 25,4 e 28,9 mg/kg), apresentaram níveis séricos de ALT equivalentes ao grupo controle.

Por outro lado, os níveis séricos da enzima AST mostraram-se elevados para todos os tratamentos realizados com LFCP-PTX/DXR (20,8, 23,1, 25,4 ou 28,9 mg/kg) em relação ao grupo controle. A tendência de elevação isolada da AST sérica que ocorre nos grupos tratados pode não estar relacionada apenas ao aumento da captação dos nanossistemas pelo sistema fagocítico mononuclear, que inclui o fígado. Além do fígado, o AST é produzido em outros órgãos como



coração, músculo esquelético, rim, cérebro, pâncreas, baço, pulmão e eritrócitos (MOHAMMED-ALI *et al.*, 2020; NDREPEPA *et al.*, 2020). A quantidade de AST no sangue está diretamente relacionada aos danos em todos esses tecidos e a elevação no nível de AST é não específica para o fígado (RASOOL *et al.*, 2020). A enzima mais específica para indicar lesão hepática é o ALT já que sua predominância se dá na porção citoplasmática dos hepatócitos (MOHAMMED-ALI *et al.*, 2020) e essa, como dito anteriormente, não foi alterada.

**Tabela 5: Parâmetros bioquímicos para camundongos Balb/c tratados com diferentes doses de LFCP-PTX/DXR e uma combinação de PTX/DXR livres**

Parâmetros bioquímicos	Controle	PTX/DXR livres (mg/kg) 20.8	LFCP-PTX/DXR (mg/kg)			
			20.8	23.1	25.4	28.9
<b>CREATININA (mg/dL)</b>	0,36 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,08 <sup>a</sup>
<b>UREIA (mg/dL)</b>	48,16 ± 4,65 <sup>a</sup>	49,47 ± 2,64 <sup>ab</sup>	46,11 ± 2,52 <sup>ab</sup>	36,03 ± 5,20 <sup>b</sup>	42,67 ± 6,24 <sup>ab</sup>	53,19 ± 10,08 <sup>a</sup>
<b>ALT (U/L)</b>	28,64 ± 2,79 <sup>a</sup>	32,88 ± 2,19 <sup>ab</sup>	57,10 ± 18,85 <sup>b</sup>	49,06 ± 14,83 <sup>ab</sup>	47,00 ± 16,81 <sup>ab</sup>	46,97 ± 12,04 <sup>ab</sup>
<b>AST (U/L)</b>	36,14 ± 7,90 <sup>a</sup>	67,22 ± 36,23 <sup>ac</sup>	126,90 ± 21,99 <sup>b</sup>	125,00 ± 28,96 <sup>b</sup>	105,50 ± 29,83 <sup>bc</sup>	91,23 ± 12,23 <sup>bc</sup>
<b>CK-MB (U/L)</b>	37,25 ± 9,33 <sup>a</sup>	53,58 ± 2,95 <sup>ab</sup>	45,55 ± 1,40 <sup>ab</sup>	55,64 ± 14,89 <sup>ab</sup>	70,01 ± 18,83 <sup>b</sup>	50,24 ± 17,27 <sup>ab</sup>

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; CK-MB: isoforma MB da creatina quinase. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão da média (n=6). Letras diferentes representam diferença significativa entre os parâmetros avaliados ( $p < 0,05$ ). Os dados foram avaliados por One-way ANOVA (pós-teste de Tukey); caso fossem anormais, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

#### 2.2.4 Histologia

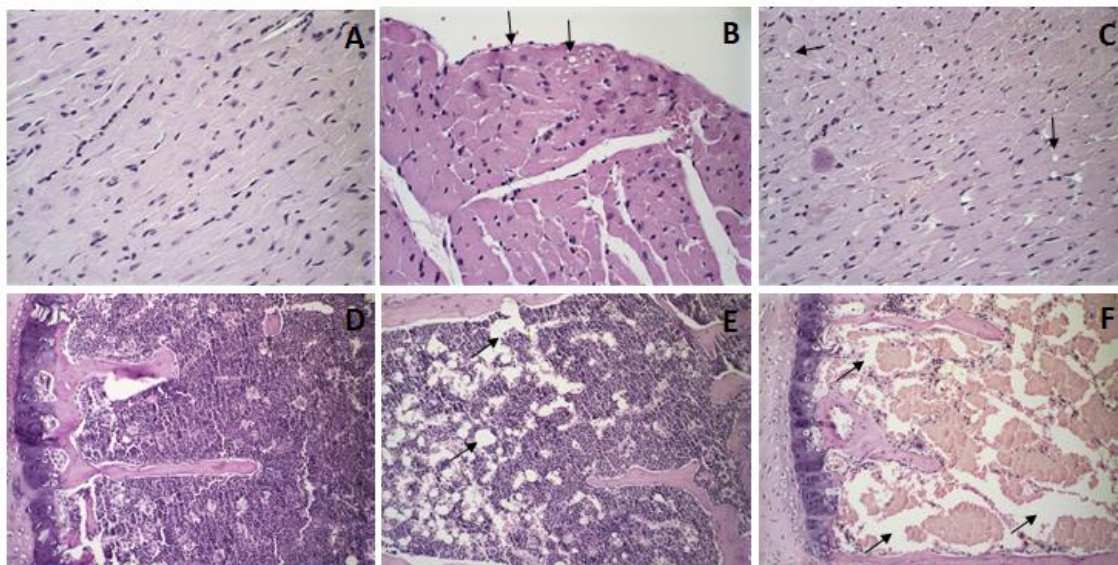
Análises histológicas foram realizadas com todos os grupos avaliados nos testes hematológicos e bioquímicos citados anteriormente, incluindo indivíduos

que foram tratados com as doses máximas testadas para os tratamentos com a combinação de fármacos livres e em lipossomas. Assim, os grupos tratados com a combinação de PTX/DXR livre na dose total de 23,1 mg/kg e o grupo tratado com LFCP-PTX/DXR na dose total de 34,7 mg/kg foram incluídos, dessecados e tiveram os órgãos e tecidos avaliados. Durante o estudo, não houve alterações nos pulmões e rins em quaisquer animais tratados quando comparados ao grupo controle (dados não mostrados).

A cardiotoxicidade é o efeito adverso mais conhecido do uso de DXR, que pode se tornar sério e debilitante para os pacientes. A análise dos tecidos cardíacos revelou que para os tratamentos com fármacos livres na dose 20,8 mg/kg e em dose maior 23,1 mg/kg houve início da vacuolização dos cardiomiócitos, indicando degeneração multifocal discreta, que não foi observada para tratamentos envolvendo LFCP-PTX/DXR em qualquer uma das doses testadas. Dessa forma, a administração de LFCP-PTX/DXR não levou ao aparecimento de cardiotoxicidade. Não houve alteração estrutural dos tecidos cardíacos, como vacuolização ou hialinização dos cardiomiócitos para esses grupos, o que corrobora com a manutenção dos níveis da enzima CK-MB, como mostrado anteriormente. Fotomicrografias representativas do coração podem ser vistas na **Figura 10(A-C)**. Da esquerda para a direita, imagens representativas do grupo controle **(A)** foram colocadas, seguidas de tratamentos PTX/DXR livres nas doses de 20,8 **(B)** e 23,1 **(C)** mg/kg, nas quais as setas indicam a presença de pequenos vacúolos citoplasmáticos nos cardiomiócitos.

A análise da medula óssea mostrou alterações para as doses mais elevadas de LFCP-PTX/DXR administrados (28,9 e 34,7 mg/kg), cujas fotomicrografias são apresentadas na **Figura 10(D-F)**. A foto **(D)** é representativa do grupo controle, sem alterações histológicas. Para a dose de 28,9 mg/kg, houve redução da celularidade **(E)** que evoluiu para hipocelularidade grave na maior dose de 34,7 mg/kg **(F)**. Essa mielotoxicidade identificada pode afetar a produção das células sanguíneas dos animais.

**Figura 10: Cortes histológicos do coração e da medula óssea de camundongos Balb / c fêmeas**



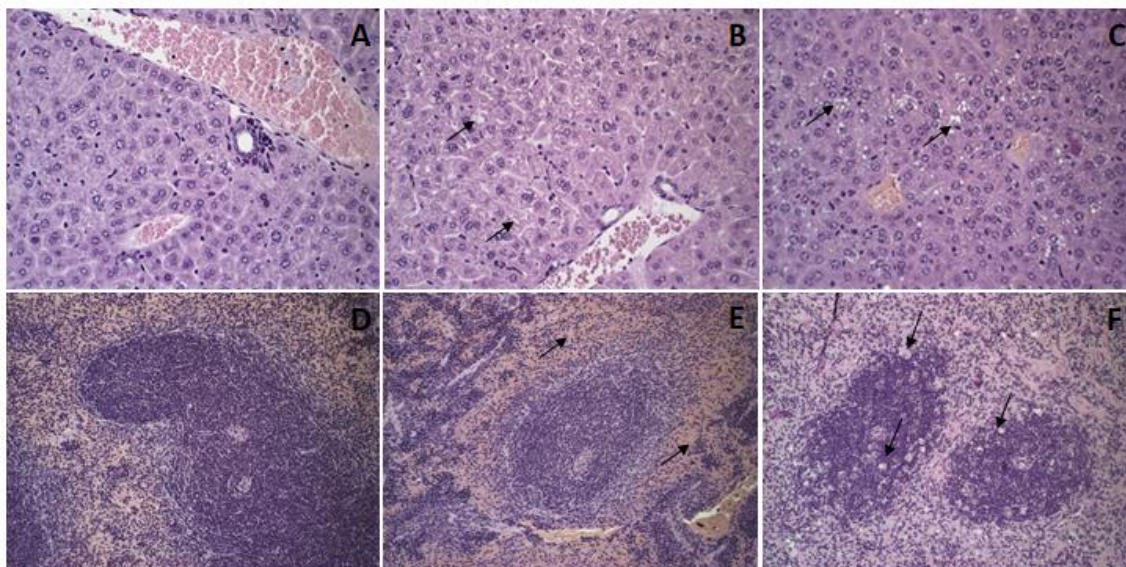
(A-C) Fotomicrografias do coração. (A) Representa o grupo controle e os grupos tratados com todas as doses testadas de LFCP-PTX/DXR (20,8; 23,1; 25,4; 28,9 e 34,7 mg/kg). Fibras cardíacas e cardiomiócitos sem alterações histológicas. B e C representam os grupos tratados com a combinação de PTX/DXR livres nas doses de 20,8 e 23,1 mg/kg, respectivamente. As setas indicam as regiões de vacuolização de cardiomiócitos e degeneração multifocal discreta. (D-F) Fotomicrografias de medula óssea. D representa o grupo controle e os grupos tratados com todas as doses testadas de PTX/DXR livres (20,8 e 23,1 mg/kg) e os grupos tratados com LFCP-PTX/DXR (20,8; 23,1 e 25,4 mg/kg). As células presentes na medula óssea não apresentam alterações histológicas. (E) representa o grupo tratado com LFCP-PTX/DXR na dose de 28,9 mg/kg. As setas indicam redução da celularidade na região. (F) mostra a medula óssea de camundongos tratados com LFCP-PTX/DXR na dose mais alta (34,7 mg/kg). A redução da celularidade indicada pelas setas é ainda mais drástica.

Além da eliminação renal, DXR e PTX são eliminados principalmente por via hepatobiliar; portanto, o fígado é um alvo importante para lesões (ASHRAFIZADEH *et al.*, 2021; SRITHARAN e SIVALINGAM, 2021; SU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2016). O fígado em todos os tratamentos apresentou degeneração hidrópica difusa leve que evoluiu para esteatose difusa leve apenas na maior dose do tratamento com LFCP-PTX/DXR (34,7 mg/kg). A **Figura 11(A-C)** ilustra esses achados, onde (A) representa o grupo controle que é sucedido por uma foto representativa dos grupos que receberam PTX/DXR livres (B). As setas indicam locais com aparente degeneração

hidrópica. A foto **(C)** representa o tratamento com LFCP-PTX/DXR na dose de 34,7 mg/kg, em que as setas mostram a presença de esteatose.

Por fim, as fotomicrografias de baço de animais estão disponíveis na **Figura 11(D-F)**, começando com o grupo de controle **(D)**. A imagem **(E)** representa o baço de camundongos tratados com fármacos livres na dose equivalente a 23,1 mg/kg, e a ocorrência de congestão foi observada uma vez que a polpa vermelha estava aumentada devido à grande presença de hemácias conforme indicado pela seta. A imagem **(F)** mostra o baço de camundongos tratados com LFCP-PTX/DXR (34,7 mg/kg). Presença de corpúsculos apoptóticos na polpa branca do baço, com aparência de “céu estrelado”, e alguns corpúsculos são identificados por setas. As lesões evidenciadas por essas áreas de apoptose na polpa branca, que é uma zona de produção de linfócitos, podem ter contribuição na leve citopenia encontrada.

**Figura 11: Cortes histológicos de fígado e baço de camundongos Balb/c fêmeas**



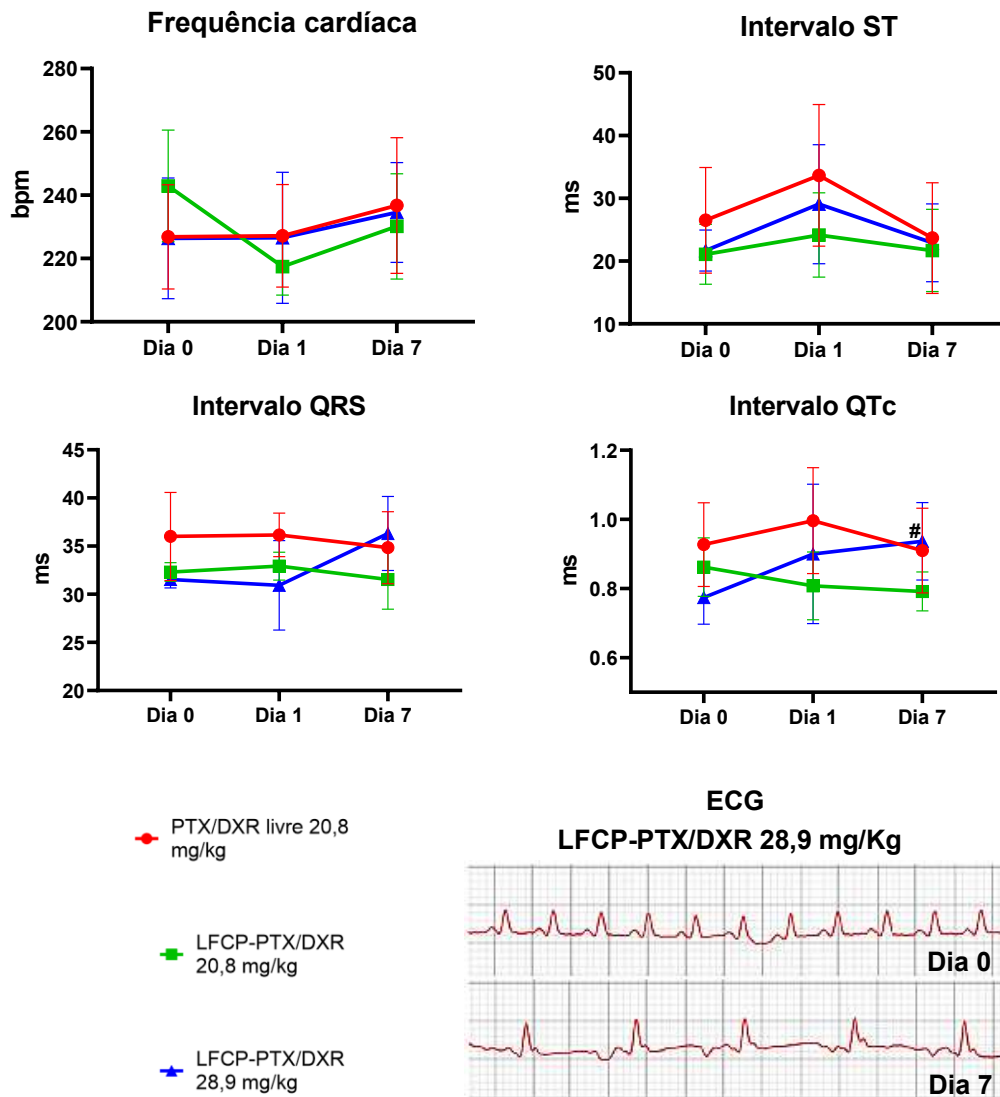
(A-C) fotomicrografias de fígado. (A) representa o grupo controle sem alterações histológicas nos hepatócitos. (B) representa todos os tratamentos com PTX/DXR livres (20,8 e 23,1 mg/kg) e também tratamentos com LFCP-PTX/DXR nas doses de 20,8; 23,1; 25,4 e 28,9 mg/kg. Esses tratamentos levaram à degeneração hidrópica difusa discreta indicada pelas setas. (C) representa o grupo tratado com a maior dose de LFCP-PTX/DXR (34,7 mg/kg). Nesse grupo específico, iniciou-se a esteatose multifocal, conforme pode ser observado nas regiões indicadas pelas setas. (D-F) contém as fotomicrografias do baço. (D) representa o grupo controle sem alterações histológicas. (E) representa o grupo que recebeu tratamento com PTX/DXR livres na maior dose (23,1 mg/kg). Há aumento da polpa vermelha indicada pelas setas, com aglomeração de hemácias. (F) representa o grupo que recebeu a maior dose de LFCP-PTX/DXR (34,7 mg/kg). A formação de corpúsculos apoptóticos pode ser observada conforme indicado pela seta e é conhecida como "céu estrelado".

### **2.2.5 Análises eletrocardiográficas**

Devido à morte de parte dos animais no 14<sup>o</sup> dia de experimento, a análise da influência dos tratamentos e do tempo nos parâmetros frequência cardíaca e intervalos ST, QRS e QTc foi avaliada apenas até o 7<sup>o</sup> dia. Os eletrocardiogramas realizados no dia 0 foram considerados como estado basal dos animais, já que os exames foram realizados antes dos tratamentos. A **Figura 12** mostra que o intervalo de tempo influenciou apenas o tratamento

com LFCP-PTX/DXR na dose de 28,9 mg/kg, que foi diferente entre os dias 0 e 7 ( $p = 0,0222$ ) para o intervalo QTc, mostrando seu aumento neste período de  $106,15 \pm 10,85$  ms no dia 0 a  $125,31 \pm 19,55$  ms no dia 7. O prolongamento do intervalo QT pode ser visto nos sinais elétricos de ECG também presentes na **Figura 12**. Outra diferença estatística observada foi entre os tratamentos PTX/DXR livre na dose de 20,8 mg/kg e o tratamento LFCP-PTX/DXR na dose de 28,9 mg/kg para o mesmo parâmetro no dia 0 ( $p = 0,0208$ ). A alteração do intervalo QTc percebida no dia 7 pode ser um indicador precoce de cardiotoxicidade induzida por DXR. O intervalo QT é um marcador clássico para avaliar o potencial de arritmias ventriculares para candidatos a fármacos durante a avaliação pré-clínica (RABKIN, SZEFER e THOMPSON, 2017; XIA *et al.*, 2019).

**Figura 12: Determinação de parâmetros eletrocardiográficos para camundongos Balb/c fêmeas após 7 dias de tratamento com LFCP-PTX/DXR e PTX/DXR livres**

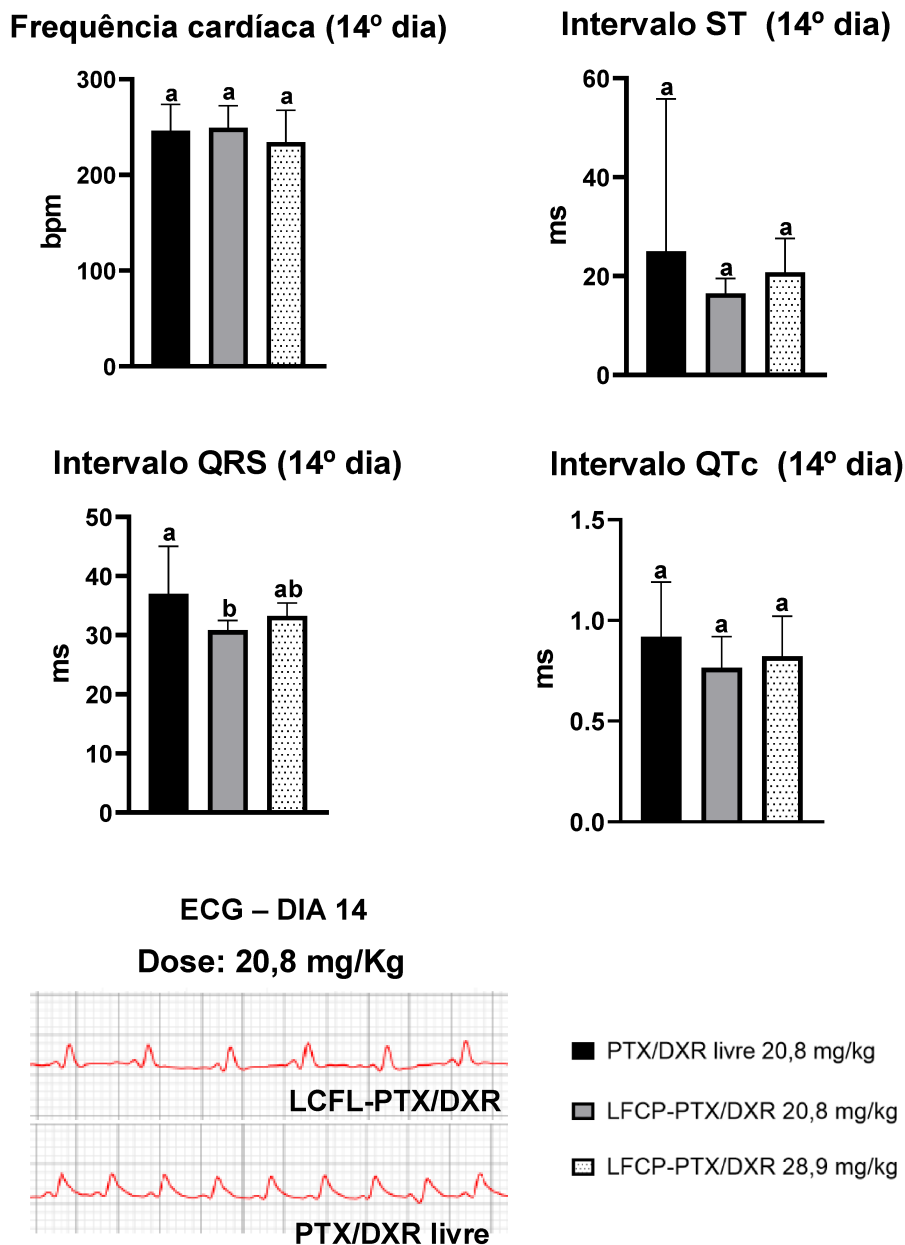


Os resultados são apresentados como média  $\pm$  IC. Os dados foram avaliados pelo teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%. # indica uma diferença estatisticamente significativa para o tratamento LFCP-PTX/DXR na dose de 28,9 mg/kg entre os dias 0 e 7. ° indica uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos PTX/DXR livre na dose de 20,8 mg/kg e LFCP-PTX/DXR na dose de 28,9 mg/kg no dia 0.



Ao comparar a influência dos tratamentos sobre os mesmos parâmetros citados no 14º dia (**Figura 13**), foi possível observar que houve diferença estatística apenas para o intervalo QRS entre os tratamentos PTX/DXR livre na dose de 20,8 mg/kg e LFCP-PTX/DXR na mesma dose ( $37,00 \pm 5,01$  ms e  $30,83 \pm 2,62$  ms, respectivamente;  $p=0,0177$ ). Nesse caso, o prolongamento do intervalo QRS pode ser observado nos sinais elétricos do ECG presentes também na **Figura 13**. A extensão do complexo QRS após administração de DXR é comum no ECG (KHALILZADEH *et al.*, 2018). Vários relatos revelaram que o prolongamento de QT e QRS que ocorre com o tratamento DXR é devido ao alongamento dos potenciais de ação dos cardiomiócitos ventriculares e está correlacionado com a gravidade das lesões histológicas do coração (KHALILZADEH *et al.*, 2018; KINOSHITA *et al.*, 2021; MOHAMMED *et al.*, 2020).

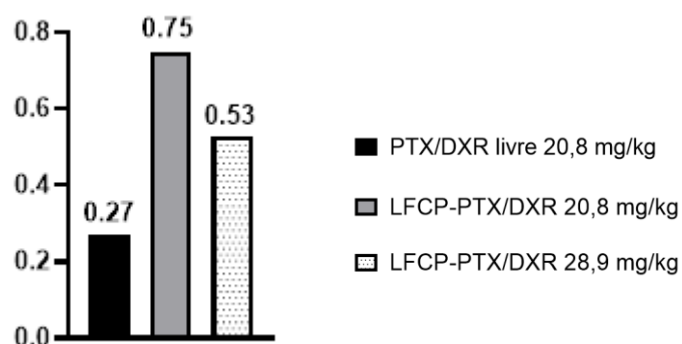
**Figura 13: Determinação de parâmetros eletrocardiográficos para camundongos Balb/c fêmeas após 14 dias de tratamento com LFCP-PTX/DXR e PTX/DXR livres**



Os resultados são apresentados como média  $\pm$  IC. Os dados foram avaliados pelo teste ANOVA One-way seguido do pós-teste de Tukey para a variável frequência cardíaca; e para as variáveis QRS, ST e QT, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5%. Letras diferentes indicam uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

A **Figura 14** mostra a razão entre os animais vivos no final do experimento e o número total de animais usados no início. É notável como o tratamento com PTX/DXR livres impactou na sobrevivência dos animais, resultando em um maior número de óbitos quando comparado com a formulação lipossomal, para ambas as concentrações de 20,8 e 28,9 mg/kg. O número de mortes de indivíduos que recebe a combinação de fármacos livres é de 2 a 3 vezes maior quando comparado aos lipossomas, mesmo quando a dose dos LFCP-PTX/DXR ultrapassa em 8,1 mg/kg a dose administrada dos fármacos livres.

**Figura 14: Determinação da proporção de animais vivos no final do estudo de toxicidade aguda**



A proporção de animais vivos no final do estudo de toxicidade aguda foi calculada dividindo o número de animais vivos no final do experimento pelo número total de animais no início do experimento para cada tratamento separadamente.

### 3 CONCLUSÃO

Ao final do nosso estudo, foi estabelecido que a toxicidade de LFCP-PTX/DXR ( $LD_{50} = 28.9 - 34.7$  mg/kg) é menor do que a combinação de PTX/DXR livres ( $LD_{50} = 20.8 - 23.1$  mg/kg), provando que os lipossomas permitem a administração de doses mais altas dos fármacos sem causar danos importantes aos órgãos e tecidos e com efeitos adversos atenuados. Isso se

refletiu no aumento significativo da sobrevivência dos animais tratados com LFCP-PTX/DXR. Assim, no que diz respeito à toxicidade, esses nanossistemas apresentam vantagens significativas em relação à combinação dos fármacos livres e se mostraram uma plataforma terapêutica promissora para a quimioterapia contra o câncer de mama. Os dados do capítulo 1 foram publicados no periódico *Biomedicine & Pharmacotherapy*, com o título de *Preclinical toxicological study of long-circulating and fusogenic liposomes co-encapsulating paclitaxel and doxorubicin in synergic ratio*, conforme **anexo**.

**CAPÍTULO 2:**  
**Desenvolvimento de ciclo de liofilização para os**  
**LFCP-PTX/DXR**

## **1 MÉTODOS**

### **1.1 Preparação e caracterização química e físico-química dos LFCP-PTX/DXR usados nos estudos de liofilização**

Os LFCP-PTX/DXR foram preparados e caracterizados físico-quimicamente para determinação do teor dos fármacos PTX e DXR, avaliação do diâmetro médio das vesículas, índice de polidispersão e potencial zeta conforme já descrito anteriormente na seção de métodos do capítulo 1 desse trabalho, nos itens 1.2 e 1.3.

### **1.2 Estudos preliminares para o desenvolvimento de um ciclo de liofilização**

#### ***1.2.1 Estudo de congelamento/descongelamento***

Os açúcares sacarose, trealose, e glicose foram testados quanto à sua capacidade crioprotetora quando adicionadas ao meio externo da formulação de LFCP-PTX/DXR. A influência da presença dessas substâncias, utilizadas separadamente nas formulações, sobre o teor de encapsulação, diâmetro e potencial zeta, após os processos de congelamento/descongelamento foi avaliada. As concentrações escolhidas para os testes se basearam na relação de peso (p/p) entre os crioprotetores e os fosfolípides presentes na formulação. No estudo de congelamento/descongelamento, para cada 1 mL da formulação de LCFL-PTX/DXR foram adicionados os crioprotetores sacarose, glicose ou trealose nas razões (p/p) entre o crioprotetor e os lípides de 2:1 e 3:1. Apenas para amostras contendo trealose também foram realizados os testes com as concentrações de 5:1 e 9:1. Para a concentração intermediária de trealose 5:1, foi avaliada uma nova maneira de se adicionar o crioprotetor na formulação. O açúcar foi adicionado no momento da hidratação do filme lipídico junto a solução de sulfato de amônio.

Os lipossomas foram congelados mediante o uso de métodos de resfriamento rápido como a imersão em nitrogênio líquido por 15 minutos e lento por resfriamento gradual em liofilizador (LyoLog plus Beta 1-8 LSC, Martin Christ Osterode Harz, Alemanha) a uma taxa de resfriamento de 0,39 °C/min. Para as amostras congeladas na prateleira do liofilizador, o ponto de congelamento foi verificado com auxílio de sensores de resistividade elétrica. A resistência elétrica de um produto que está sendo congelado aumenta significativamente com a mudança do estado líquido para o sólido, devido a redução da mobilidade dos íons. Esse valor de resistividade é dado em porcentagem, e quando próximo de 100% indica que o produto está completamente sólido, ou seja, congelado (CHRIST, 2012).

Logo após o congelamento, todas as amostras foram descongeladas em banho-maria a 30°C por 15 minutos. Em seguida, cada uma delas teve o conteúdo dividido em 2 partes, sendo o primeiro volume dialisado contra HBS, pH 7,4, por 24 h, e o segundo centrifugado a 3000 rpm, 25°C, por 10 min (Heraeus Multifuge X1R centrifuge, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA). Nas amostras dialisadas foi realizado o doseamento do teor de DXR retido nas vesículas, já na amostra centrifugada foi avaliado o teor de PTX retido nos lipossomas, além do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta conforme já descrito nos métodos, itens 1.2 e 1.3 do capítulo 1.

### ***1.2.3 Determinação da temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>)***

As análises calorimétricas foram realizadas no instrumento DSC Mettler Toledo (Schwerzenbach, Suíça) e balança micro analítica Mettler Toledo MX5 (Schwerzenbach, Suíça). Alíquotas das amostras recém preparadas, 40 µL, foram colocadas em cadinho de alumínio, os quais foram fechados com a tampa apropriada. Para a análise, o equipamento foi previamente estabilizado a 25 °C durante 5 minutos. Em seguida, a amostra foi resfriada a uma taxa de 10 °C/min até alcançar uma temperatura de -80 °C. Foi realizada uma nova estabilização do equipamento a -80 °C por 5 minutos. Por fim, houve o aquecimento a uma taxa de 5 °C/min até a temperatura ambiente. Os dados

obtidos foram analisados pelo software de isotermas do próprio equipamento. As temperaturas de transição vítrea foram definidas pela posição dos picos nas curvas de DSC.

#### **1.2.4 Determinação da temperatura de colapso ( $T_c$ )**

A avaliação da  $T_c$  ocorreu por análises de microscopia de liofilização em microscópio acoplado a módulo de liofilização, Lyostat 2, modelo FDCS 196 (Linkam Instruments, Surrey, Reino Unido), equipado com sistema de congelamento por nitrogênio líquido (LNP94/2) e controlador de temperatura programável (TMS94, Linkam). A pressão foi monitorada por uma válvula de Pirani. O equipamento foi calibrado com solução aquosa de NaCl (temperatura eutética de  $-21,1^\circ\text{C}$ ). A observação direta do congelamento e liofilização foi feita por microscópio de luz polarizada Nikon, modelo Elipse E600 (Nikon, Japão). A rampa de resfriamento foi de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  até  $-60^\circ\text{C}$  e ao alcançar essa temperatura permaneceu por 1 min. Logo em seguida, foi feito o aquecimento na taxa de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  até a temperatura de  $-30^\circ\text{C}$ , na qual permaneceu por 2 min. Outra rampa de resfriamento de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  até  $-60^\circ\text{C}$  foi realizada. Novamente uma estabilização durante 1 min foi realizada. Por fim, efetuou-se o aquecimento até  $0^\circ\text{C}$  em taxa de  $3^\circ\text{C}/\text{min}$ . A pressão utilizada durante o processo foi igual a  $0,1\text{ mTorr}$ . Os dados foram analisados pelo software Linksys 32.

### **1.3 Liofilização**

Após avaliação dos resultados obtidos com os estudos dos parâmetros de liofilização apresentados anteriormente, definiu-se os parâmetros que foram aplicados nos ciclos de liofilização, com o objetivo de aperfeiçoar o processo. A liofilização das amostras foi realizada em liofilizador (Lyo Log Plus Epsilon 2-4, Christ, Alemanha). As razões de massa (p/p) entre crioprotetor e fosfolípidos



escolhidas para os ciclos de liofilização completa foram 5:1 e 9:1. Para o congelamento, amostras de 1 mL dos lipossomas foram inseridas em frascos de vidro âmbar adequados a liofilização e submetidas ao congelamento em bandeja no liofilizador. O congelamento seguiu com uma taxa de resfriamento igual a 0,39 °C/min. Foram avaliados parâmetros do ciclo de liofilização, como temperatura, tempo e pressão, com auxílio do software do equipamento além de termopares e sensores de resistividade elétrica.

Como uma etapa adicional do congelamento, em alguns ciclos completos de liofilização, o procedimento de *annealing* foi adotado após o congelamento convencional. O *annealing* foi usado para cristalizar totalmente os excipientes presentes na amostra, facilitando a secagem e reduzindo a variabilidade interfrascos (LIM *et al.*, 2018). Para isso, após o congelamento convencional, as amostras seguiram para essa etapa adicional e permaneceram entre 2 e 3 horas em temperatura 10 °C acima da temperatura do congelamento. A etapa seguinte ao *annealing* consistiu na secagem primária da formulação de LFCP-PTX/DXR com consequente redução da pressão da câmara. A temperatura da bandeja foi elevada para fornecer energia ao processo de sublimação. A secagem secundária foi adotada como próxima fase para reduzir o teor de umidade do liófilo.

#### **1.4 Determinação do teor de umidade residual do liófilo**

A umidade residual das amostras liofilizadas foi determinada usando um analisador termogravimétrico (TGA, modelo TGA-50M, Shimadzu, Kyoto, Japão). A pesagem das amostras foi realizada em porta-amostras de alumínio colocados sobre balança microanalítica (Mettler Toledo, modelo MX5, Schwerzenbach, Suíça). As amostras foram aquecidas de 25 a 150 °C a uma taxa de 10 °C/min.

### **1.5 Análise macroscópica do tempo de reidratação do liófilo**

Os lipossomas liofilizados foram reidratados, à temperatura ambiente, com 1 mL de água ultrapura, volume similar ao que foi retirado da amostra durante a liofilização. A reidratação foi realizada delicadamente e com o auxílio de um agitador de tubos, para assegurar a total ressuspensão do liófilo. O tempo necessário para completa dispersão do pó foi determinado sob inspeção visual direta.

### **1.6 Avaliação química e físico-química dos LFCP-PTX/DXR após liofilização seguida de reidratação dos liófilos**

O teor dos fármacos nos lipossomas foi determinado após os processos de liofilização/reidratação e os valores comparados aos dosados nas dispersões coloidais dos lipossomas recém-preparados. Essa etapa é realizada para avaliar se durante o processo de liofilização houve alguma desestabilização das vesículas que permitiu a expulsão dos fármacos. Para as análises seguintes cada amostra foi dividida em duas partes.

Uma das partes passou por centrifugação (centrífuga HeraeusMultifuge X1R, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) a 3000 rpm, 10 min, 25°C para retirada do PTX liberado das vesículas pós liofilização. Em seguida, foi realizado o doseamento do fármaco utilizando a técnica de CLAE conforme já descrito no item. Essas amostras usadas no doseamento de PTX também passaram pela técnica de DLS para determinação do tamanho médio das vesículas, IP e ZT.

A outra parte separada das amostras foi usada para o doseamento de DXR, sendo que as formulações inicialmente foram dialisadas durante 24 h, contra tampão HEPES, para remoção da DXR que porventura foi liberada para o meio

externo da dispersão. O doseamento foi realizado por espectrofotometria de acordo com o exposto no item 1.3 do capítulo 1.

### **1.7 Análise de rastreamento de nanopartículas após liofilização /reidratação**

As medições da análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) foram realizadas usando um instrumento NanoSight NS500 (Salisbury, Reino Unido) equipado com uma câmera de dispositivo acoplado a carga (CCD) que permite visualizar e rastrear o movimento browniano de partículas iluminadas a laser em suspensão. As medições foram feitas à temperatura ambiente e cada sequência de vídeo foi capturada ao longo de 60 s com obturador manual e ajustes de ganho. As amostras foram diluídas 100.000 vezes com água ultrapura e depois injetadas no sistema (pelo menos três repetições para cada formulação).

### **1.8 Criomicroscopia**

A avaliação do tamanho, morfologia e lamelaridade das vesículas antes e após a liofilização e reidratação foram feitas mediante o emprego de criomicroscopia. As análises foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1400, a 120 kV, no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras foram preparadas por congelamento rápido em etano líquido no equipamento Vibrobot (ThermoFisher Scientific FEI, Hillsboro, EUA). Para cada amostra, um volume de 3 uL foi pipetado e depositado sobre a superfície do filme de carbono com grades de cobre (300 mesh) do tipo ultra-thin Lacey-carbon (EMS), previamente ionizadas por plasma de oxigênio (*glow discharge*). Imediatamente antes do congelamento rápido da amostra por mergulho em etano líquido, o excesso de amostra foi removido de modo automatizado por meio do contato da grade com papel absorvente de modo a deixar um filme da

solução sobre a superfície do filme de carbono. Após o congelamento rápido da amostra, a grade foi armazenada em nitrogênio líquido, e mantida congelada durante a análise por criomicroscopia.

## **2 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.1 Estudos preliminares para o desenvolvimento de um ciclo de liofilização**

#### ***2.1.2 Estudo de congelamento-descongelamento***

O estudo de congelamento/descongelamento é curto e rápido em comparação com a liofilização e, portanto, pode ser usado como um pré-teste para a triagem do tipo e concentração de crioprotetores usados na liofilização. Este estudo é baseado no princípio de que se o crioprotetor de escolha não puder proteger os lipossomas durante a primeira etapa de congelamento, durante a liofilização ele provavelmente será ineficaz (DATE, SAMAD e DEVARAJAN, 2010; VARSHOSAZ, ESKANDARI e TABBAKHIAN, 2012).

Os resultados referentes às análises químicas e físico-químicas das amostras que passaram por congelamento-descongelamento com resfriamento lento são apresentados na **Tabela 6**. Os valores referentes ao IP e PZ não foram significativamente afetados por esta etapa, tampouco pela adição de diferentes crioprotetores e concentrações. Os valores do ponto de congelamento para todas as amostras testadas com as concentrações de crioprotetores em relação aos fosfolipídios iguais a 2:1 e 3:1 p/p mostraram-se próximos. O aumento da concentração de trealose para 5:1 e 9:1 p/p levou ao abaixamento do ponto de congelamento, como já era esperado em ocasiões em que há aumento de solutos na dispersão.

A retenção de PTX nos LFCP-PTX/DXR após congelamento-descongelamento é superior para as amostras adicionadas dos crioprotetores glicose, na concentração 2:1 e 3:1 e trealose 3:1 e 5:1 p/p quando comparado com a amostra que não os contém. Quando a glicose é observada nessas concentrações, não há diferença na retenção de PTX nas vesículas lipossomais. Já para a trealose, a maior retenção de PTX ocorre para a concentração de 5:1 p/p do açúcar.

A retenção de DXR após o congelamento-descongelamento das amostras adicionadas de crioprotetor é superior em todas elas, em relação à ausência dos sacarídeos, exceto para glicose na concentração 2:1 p/p. Porém, não há diferença estatística entre os valores de retenção encontrados entre as amostras adicionadas de crioprotetor. A razão molar entre PTX e DXR nas formulações está mais próxima do valor original de 1:10 para LFCP-PTX/DXR na ausência de açúcar e para lipossomas adicionados com trealose em concentrações de 5:1 e 9:1 p/p. Em relação ao tamanho médio das vesículas, o congelamento como etapa isolada do ciclo de liofilização não influenciou de forma incisiva. Mesmo assim, comparada à formulação que não foi adicionada de crioprotetor, a formulação com trealose na concentração 5:1 % p/p apresentou o menor diâmetro para as vesículas lipossomais.

**Tabela 6: Caracterização química e físico-química de LFCP-PTX/DXR submetido a congelamento/descongelamento com taxa de resfriamento lenta\***

Razão de crioprotetores/ fosfolípides (p/p)	Crioprotetores	Retenção de PTX (%)	Retenção de DXR (%)	RM	Diâmetro (nm)	IP	PZ (mV)	PC (°C)
2:1	Sacarose	63,2 ± 1,0 <sup>abd</sup>	65,5 ± 1,1 <sup>abc</sup>	1:13	175,9 ± 1,9 <sup>ac</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	-3,66 ± 0,66 <sup>a</sup>	-38,1
	Trealose	59,0 ± 0,6 <sup>ad</sup>	68,4 ± 1,3 <sup>ac</sup>	1:15	172,3 ± 2,5 <sup>ab</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	-4,51 ± 0,29 <sup>a</sup>	-38,0
	Glicose	64,3 ± 2,2 <sup>ab</sup>	61,5 ± 2,2 <sup>bcd</sup>	1:12	178,8 ± 5,4 <sup>ac</sup>	0,26 ± 0,05 <sup>a</sup>	-4,49 ± 0,12 <sup>a</sup>	-38,4
3:1	Sacarose	60,4 ± 3,0 <sup>abd</sup>	67,3 ± 2,4 <sup>abc</sup>	1:14	169,2 ± 5,4 <sup>ab</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	-4,91 ± 0,95 <sup>a</sup>	-36,3
	Trealose	65,9 ± 1,3 <sup>b</sup>	68,9 ± 2,8 <sup>ac</sup>	1:14	177,3 ± 3,8 <sup>ac</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	-4,02 ± 0,31 <sup>a</sup>	-37,5
	Glicose	64,1 ± 2,7 <sup>ab</sup>	69,1 ± 2,3 <sup>ac</sup>	1:13	175,2 ± 1,5 <sup>ac</sup>	0,21 ± 0,03 <sup>a</sup>	-3,87 ± 0,60 <sup>a</sup>	-39,3
5:1	Trealose	72,9 ± 1,9 <sup>c</sup>	69,7 ± 2,0 <sup>a</sup>	1:8	161,1 ± 1,3 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>a</sup>	-5,30 ± 1,04 <sup>a</sup>	-32,9
9:1	Trealose	62,3 ± 1,6 <sup>abd</sup>	62,7 ± 4,0 <sup>c</sup>	1:9	185,9 ± 6,6 <sup>c</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>a</sup>	-5,96 ± 1,97 <sup>a</sup>	-31,8
Ausência de crioprotetor		57,6 ± 2,4 <sup>d</sup>	55,3 ± 2,4 <sup>d</sup>	1:9	186,2 ± 3,3 <sup>c</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>a</sup>	-4,88 ± 0,62 <sup>a</sup>	-37,9

\*Taxa de resfriamento igual a 0,39°C/min. PTX: paclitaxel; DXR: doxorubicina; RM: razão molar entre PTX e DXR; IP: índice de polidispersão; PZ: potencial zeta; PC: ponto de congelamento. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). Os dados foram avaliados pelo teste ANOVA One-way seguido do pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%. Letras diferentes representam diferença estatística.

Os resultados referentes às análises físico-químicas das amostras que foram congeladas-descongeladas em taxa de resfriamento rápido são apresentados na **Tabela 7**. Os desvios padrão encontrados para os parâmetros avaliados foram maiores quando comparados às amostras resfriadas mais lentamente, principalmente para retenção dos fármacos. Entre todas as amostras testadas com crioprotetores, não foram encontradas diferenças significativas para o tamanho médio das vesículas, valores de IP e ZT quando comparadas às amostras na ausência dos açúcares. Os maiores valores de retenção de DXR nos lipossomas foram encontrados para amostras contendo trealose nas concentrações 5:1 e 9:1 p/p quando comparados àquele obtido na ausência de crioprotetor. Já os valores de retenção de PTX se mantiveram invariáveis. Para a taxa de resfriamento rápido, a razão molar entre PTX e DXR permaneceu mais próxima do valor original de 1:10 em todas as amostras avaliadas.

**Tabela 7: Caracterização química e físico-química de LFCP-PTX/DXR submetido a congelamento/descongelamento com taxa de resfriamento rápida**

Razão de crioprotetores/ fosfolípides (p/p)	Crioprotetores	Retenção de PTX (%)	Retenção de DXR (%)	RM	Diâmetro (nm)	IP	PZ (mV)
2:1	Sacarose	67,9 ± 10,2 <sup>a</sup>	68,4 ± 1,3 <sup>ab</sup>	1:11	177,5 ± 3,2 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,03 <sup>a</sup>	-3,21 ± 0,47 <sup>a</sup>
	Trealose	72,0 ± 6,1 <sup>a</sup>	70,0 ± 2,1 <sup>ab</sup>	1:11	177,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,04 <sup>a</sup>	-3,67 ± 1,37 <sup>ab</sup>
	Glicose	70,0 ± 8,1 <sup>a</sup>	64,1 ± 1,4 <sup>abc</sup>	1:10	176,1 ± 3,0 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>a</sup>	-3,34 ± 1,37 <sup>a</sup>
3:1	Sacarose	68,2 ± 10,6 <sup>a</sup>	68,3 ± 0,9 <sup>ab</sup>	1:11	177,0 ± 4,2 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,06 <sup>a</sup>	-3,67 ± 1,67 <sup>ab</sup>
	Trealose	69,4 ± 2,5 <sup>a</sup>	70,1 ± 2,4 <sup>ab</sup>	1:12	178,4 ± 2,5 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,03 <sup>a</sup>	-3,23 ± 1,10 <sup>a</sup>
	Glicose	71,4 ± 1,9 <sup>a</sup>	62,4 ± 0,7 <sup>bc</sup>	1:10	179,2 ± 1,6 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,06 <sup>a</sup>	-3,33 ± 0,95 <sup>a</sup>
5:1	Trealose	63,5 ± 2,2 <sup>a</sup>	72,3 ± 4,4 <sup>a</sup>	1:9	194,6 ± 2,3 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,05 <sup>a</sup>	-6,55 ± 0,44 <sup>b</sup>
9:1	Trealose	65,0 ± 1,6 <sup>a</sup>	73,4 ± 4,8 <sup>a</sup>	1:11	183,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	-5,67 ± 0,27 <sup>ab</sup>
Ausência de crioprotetor		58,5 ± 4,0 <sup>a</sup>	57,4 ± 6,7 <sup>c</sup>	1:8	179,5 ± 3,9 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,03 <sup>a</sup>	-5,65 ± 0,49 <sup>ab</sup>

PTX: paclitaxel; DXR: doxorubicina; RM: razão molar entre PTX e DXR; IP: índice de polidispersão; PZ: potencial zeta. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3). Os dados foram avaliados pelo teste ANOVA One-way seguido do pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%. Letras diferentes representam diferença estatística.



As amostras submetidas ao congelamento rápido apresentaram comportamento muito semelhante às aquelas submetidas ao congelamento lento, o que indica que as taxas de resfriamento testadas também pouco influenciaram no conteúdo e na estrutura dos lipossomas. Diante disso e considerando que um processo contínuo, inteiramente realizado dentro do liofilizador, facilita a produção e o trabalho, o congelamento em liofilizador foi priorizado para as etapas seguintes.

Neste trabalho, também verificamos que a natureza química do carboidrato desempenhou um papel menor, uma vez que nenhum açúcar investigado apresentou uma melhor propriedade crioprotetora (STARK, PABST e PRASSL, 2010). Isso porque o percentual de retenção dos fármacos nos lipossomas mostrou poucas alterações com os diferentes crioprotetores investigados. Apesar da limitada melhora nas características físico-químicas das formulações adicionadas com crioprotetor quando comparadas às aquelas na ausência dos açúcares, deve-se considerar que o congelamento e secagem dos lipossomas afetam fortemente a estabilidade das vesículas devido ao estresse mecânico causado pela formação de gelo durante o congelamento. Além disso, o aumento da concentração de soluto durante o congelamento e a secagem pode levar à degradação química das vesículas. Por esse motivo, a adição de crioprotetores é essencial à formulação lipossomal, devido ao seu caráter não eutético e à formação de uma matriz amorfa que a protege.

Estudos mostram que o PEG revestindo a superfície dos lipossomas pode contribuir sinergicamente para inibir a formação de cristais de gelo durante o congelamento, controlando a formação da camada de hidratação da vesícula para reduzir a nucleação do gelo (STARK, PABST e PRASSL, 2010; WANG e GRAINGER, 2019). No entanto, essas modificações da bicamada dos lipossomas não são fortes o suficiente para protegê-los durante o processo de liofilização. Apesar das mudanças na superfície promovidas pelo PEG, as dispersões de lipossomas ainda requerem crioprotetores adicionais para liofilização, para evitar agregação ou fusão (WANG e GRAINGER, 2019).

Apesar das semelhanças dos resultados com o uso das taxas de congelamento lento e rápido sobre as amostras, algumas vantagens foram observadas nestes estudos de congelamento/descongelamento, que levaram à escolha de amostras contendo trealose nas concentrações 5:1 e 9:1 p/p para prosseguir

com as próximas análises. Com o emprego da taxa de congelamento rápida houve maior retenção de DXR nas vesículas lipossomais e no resfriamento lento, a trealose em ambas concentrações também foi importante para maior retenção de PTX nas vesículas, o que permitiu que a razão molar entre os fármacos se aproximasse do valor original (1:10). Com base nesses dados e na literatura, decidimos seguir os experimentos usando apenas trealose como crioprotetor.

A literatura afirma que dissacarídeos, como sacarose e trealose, são mais eficazes na proteção de lipossomas durante a liofilização, armazenamento e reidratação (LESLIE *et al.*, 1995; WANG e GRAINGER, 2019). Isso ocorre porque eles exibem higroscopicidade reduzida, baixa reatividade química e maior Tg' da fração máxima concentrada por congelamento (CROWE *et al.*, 1997; PRAMANICK, SINGODIA e CHANDEL, 2013; STARK, PABST e PRASSL, 2010; WANG e GRAINGER, 2019). Porém, a Tg' da trealose seca é muito maior que a da sacarose e permanece maior mesmo quando esse açúcar é parcialmente reidratado, expondo-o ao vapor d'água. A capacidade da trealose de permanecer vitrificada e formar diidratos após a absorção de água parece ser a responsável por esse notável efeito, estabilizando melhor os biomateriais, o que a torna superior na preservação das estruturas dos lipossomas sob a forma liofilizada (CHEN *et al.*, 2010; CROWE e REID, 1996; LESLIE *et al.*, 1995; STARK, PABST e PRASSL, 2010; URITANI, TAKAI e YOSHINAGA, 1995; WANG e GRAINGER, 2019).

Após selecionar a trealose como crioprotetor, mantivemos as concentrações 5:1 e 9:1 p/p também usuais na literatura, já que é necessário um mínimo de 3% em massa dos sólidos totais nos frascos para se obter um liófilo adequado (KUMAR, MALLIK e SARKAR, 2017; LI *et al.*, 2011; MATTHEOLABAKIS *et al.*, 2012).

Com o crioprotetor e sua concentração determinados avaliou-se a nova modalidade de adição do mesmo à amostra. Nesse novo teste, a trealose foi adicionada à amostra no momento da hidratação do filme lipídico. O único grande ganho observado foi a redução do tempo de congelamento em torno de 50% (dados não mostrados). Essa redução pode ser decorrente de um maior encapsulamento da trealose, que resultou na nucleação mais rápida do gelo na fase externa, levando a um congelamento mais rápido. Por outro lado, a inclusão

de maior parte da trealose na cavidade aquosa do lipossoma favoreceu o aumento do tamanho das vesículas.

A formulação que teve o filme hidratado com trealose 5:1 p/p e foi submetida ao congelamento com o emprego de taxa lenta de resfriamento apresentou menor teor de retenção de DXR e PTX nas vesículas lipossomais quando comparada à mesma formulação congelada com  $N_{2(l)}$ , o que também interferiu na razão molar entre os fármacos retidos, levando ao distanciamento do valor pré-estabelecido de 1:10 (**Tabela 8**). No entanto, a formulação que teve uma taxa rápida de congelamento com a adição do crioprotetor durante a hidratação do filme lipídico não diferiu estatisticamente dos teores de encapsulação para ambos os fármacos, PTX e DXR, quando comparada à formulação que teve o crioprotetor solubilizado após sua preparação. O aumento do diâmetro das vesículas e a falta de vantagens na retenção dos fármacos levaram à exclusão desse método de preparo para análises futuras.

**Tabela 8: Caracterização química e físico-química de LFPC-PTX/DXR adicionado de trealose 5:1 (p/p) durante a hidratação do filme lipídico e submetido a congelamento-descongelamento**

Razão de crioprotetor/ fosfolípide (p/p)	Crioprotetor	Taxa de resfriamento	Retenção de PTX (%)	Retenção de DXR (%)	RM	Diâmetro (nm)	IP	PZ (mV)
5:1	Trealose	Lenta	64,6 ± 4,3	43,5 ± 2,7	1:14	183,1 ± 1,5	0,26 ± 0,01	-2,78 ± 0,07
		Rápida	77,9 ± 0,9 *	71,9 ± 5,1 *	1:8	216,6 ± 2,8 *	0,31 ± 0,04	-3,70 ± 0,21*

PTX: paclitaxel; DXR: doxorubicina; RM: razão molar entre PTX e DXR; IP: índice de polidispersão; PZ: potencial zeta. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão da média (n=3). Taxa de resfriamento lento = 0,39 °C/min; Taxa de resfriamento rápido: imersão em N<sub>2(l)</sub>. Os dados foram avaliados pelo teste T-Student com nível de significância de 5%. \* Indica uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

### 2.1.3 Determinação da temperatura de transição vítrea e de colapso

A  $T_g'$  e a  $T_c$  dos LFCP-PTX/DXR foi verificada de forma padrão e também simulando uma etapa de *annealing*, com objetivo de avaliar possíveis melhorias no comportamento térmico da formulação com a adição desta etapa ao congelamento das amostras. Os resultados são mostrados na **Tabela 9**. Embora a adição de crioprotetores torne o processo de liofilização para LFCP-PTX/DXR mais difícil do ponto de vista térmico, pois reduzem a  $T_g'$  e a  $T_c$  das amostras, ela é necessária.

**Tabela 9: Temperaturas de transição vítrea e de colapso de LFCP-PTX/DXR em diferentes concentrações de trealose**

	Temperaturas padrão (°C)			Com <i>annealing</i> (°C)	
	Ø	5:1	9:1	5:1	9:1
<b>Transição vítrea</b>	-24,14	-53,30	-40,38	-50,98	-39,70
<b>Microcolapso</b>	-28,10	-51,50	-50,40	-47,10	-45,50
<b>Colapso</b>	-26,00	-50,00	-47,60	-43,80	-42,20

**Padrão:** congelamento sem a etapa de *annealing*; **Com *annealing*:** congelamento com a etapa de *annealing*. Ø = sem trealose. Temperatura de transição vítrea da trealose (referência)= -27,06 °C.

Dentre as amostras avaliadas contendo trealose nas concentrações 5:1 e 9:1 p/p, aquela com maior concentração de crioprotetor apresentou maiores valores de  $T_g'$  e  $T_c$  para ambos os casos testados, presença ou ausência do *annealing*. Logo, essa amostra tornou-se mais vantajosa para prosseguir para a etapa de liofilização completa, pois permite o uso de temperaturas de secagem não tão baixas.

A  $T_g'$  dos lipossomas contendo trealose 9:1 p/p em relação aos fosfolipídios foi 12,92 °C maior do que a formulação adicionada de trealose 5:1 p/p no processo convencional. Ao adicionar a etapa de *annealing* é possível observar que o valor de  $T_g'$  se eleva um pouco mais para formulações com ambas as concentrações de trealose, favorecendo a futura etapa de secagem durante a liofilização. Isso ocorre porque a inserção de maiores concentrações de trealose entre as cadeias lipídicas pode causar a redução das interações intermoleculares, com consequente aumento da mobilidade molecular e afastamento dessas cadeias. Isso reduz o nível de energia necessário para permitir a mobilidade, reduzindo assim o valor de  $T_g'$  dos lípides.

Convencionalmente, a temperatura de secagem primária deve ser ajustada de 5 a 10 °C abaixo da  $T_c$  ou  $T_g'$  da formulação (CHEN *et al.*, 2010; WANG e GRAINGER, 2019). As formulações lipossomais apresentam valores de  $T_g'$  muito baixos devido aos crioprotetores adicionados (BAHETI, KUMAR e BANSAL, 2010; MEHMOOD e FAROOQ, 2015; WANG e GRAINGER, 2019). Portanto, seguindo essas regras convencionais, o tempo de secagem primária será muito longo e, portanto, caro. Apesar disso, muitos estudos têm demonstrado que as dispersões lipossomais liofilizadas podem ser secas principalmente em temperaturas muito superiores a sua  $T_g'$ , sem apresentar nenhum dano às características físicas e químicas dos produtos, a chamada secagem agressiva. O mecanismo proposto aplicável aos lipossomas é que ao secar a uma temperatura acima de  $T_g'$ , a alta taxa de sublimação é rápida o suficiente para completar a secagem do produto antes de ocorrer mudanças estruturais significativas nas bicamadas lipídicas (mudanças de fase) (WANG e GRAINGER, 2019).

## 2.2 Desenvolvimento do ciclo de liofilização

Para determinar a temperatura da prateleira durante o congelamento da amostra, para o primeiro ciclo de teste (ciclo 1) mostrado na **Tabela 10**, foi escolhida a temperatura de -50 °C. Esta temperatura, além de estar abaixo da temperatura de congelamento obtida para todas as amostras durante o teste de

congelamento/descongelamento, também está abaixo da  $T_g'$  determinada para a grande maioria das amostras. Portanto, a probabilidade de ocorrer congelamento em todo o conteúdo do frasco seria grande. O tempo de congelamento de 6 h foi escolhido de acordo com os testes de congelamento/descongelamento, observando-se a resistividade elétrica sempre acima de 90%.

Após o congelamento, algumas amostras seguiram diretamente para a secagem primária (ciclo 1 sem *annealing*), enquanto outras tiveram a etapa adicional, o *annealing* (ciclo 1 com *annealing*). Para determinar os parâmetros da etapa de *annealing*, foi necessário selecionar uma temperatura acima da  $T_g'$ . Assim, no ciclo 1, a temperatura de prateleira escolhida para esta etapa foi de -40 °C por 2 h. Seguindo para a secagem primária, a temperatura da prateleira subiu para -20 °C por 48 h, fornecendo energia para que ocorresse o processo de sublimação. Enquanto isso, a pressão da câmara foi reduzida para 0,1 mBarr. A pressão determinada de 0,1 mBarr, quando avaliada na curva de pressão de vapor da água e temperatura, é equivalente a uma temperatura de -42 °C. Portanto, mesmo a prateleira acima de  $T_g'$  e  $T_c$ , o produto em teoria ainda estaria com temperatura abaixo destes. A pressão reduzida tem uma influência maior na manutenção da baixa temperatura da amostra do que a temperatura da própria bandeja na câmara do liofilizador.

Ao iniciar a secagem secundária, a temperatura da prateleira foi elevada a 20°C para permitir a dessorção da água e a pressão foi mantida a 0,1 mBarr por 17 h. A **Tabela 10** mostra todos os parâmetros de liofilização usados no ciclo 1.

**Tabela 10: Parâmetros utilizados no ciclo 1 da liofilização de LCFL-PTX/DXR com a inclusão da etapa de *annealing***

Etapa	Rampa (°C/min)	Temperatura de prateleira (°C)	Pressão (mbar)	Tempo (h)
Congelamento 1	0,39	-50	-	3
<i>Annealing</i>	0,34	-40	-	2
Secagem primária	0,34	-20	0,1	48
Secagem secundária	0,34	20	0,1	15

**Tempo total do processo: 74 h**

Com o objetivo de otimizar o ciclo de liofilização dos LFCP-PTX/DXR e seguir a linha convencional de secagem primária, outro ciclo de liofilização, denominado ciclo 2, também foi avaliado, utilizando a amostra mais promissora encontrada no ciclo 1 (LFCP-PTX/DXR adicionado de trealose 9:1 p/p). No ciclo de liofilização 2, o objetivo principal seria reduzir a temperatura da prateleira durante a secagem primária para -60 °C, bem como reduzir a pressão para 0,01 mBarr, a fim de alcançar uma secagem mais eficaz, a temperaturas significativamente abaixo de T<sub>c</sub>. Para isso, a temperatura da prateleira durante o congelamento também teve que ser reduzida para -60 °C.

A duração de algumas etapas do processo de liofilização foi reajustada, sendo estabelecido o seguinte: congelamento 8 h, *annealing* 3 h e secagem secundária 30 h. A secagem primária continuou sendo realizada por 48 h. No final, as mudanças levaram ao aumento da duração do ciclo 2 em comparação com o ciclo 1 por 16 h. A **Tabela 11** exhibe os parâmetros de liofilização usados no ciclo 2. A **Figura 15** mostra o gráfico com as informações da amostra de LFCP-PTX/DXR adicionada de trealose 9:1 p/p ao passar pelo ciclo de liofilização 1 e 2 com *annealing*.



**Tabela 11: Parâmetros utilizados no ciclo 2 da liofilização de LCFL-PTX/DXR com a inclusão da etapa de *annealing***

<b>Etapa</b>	<b>Rampa (°C/min)</b>	<b>Temperatura de prateleira (°C)</b>	<b>Pressão (mbar)</b>	<b>Tempo (h)</b>
Congelamento 1	0.45	-60	-	5
<i>Annealing</i>	0.67	-40	-	2
Congelamento 2	0.34	-60	-	2
Secagem primária	0.34	-60	0.01	48
Secagem secundária	0.39	20	0.01	27

**Tempo total do processo: 90 h**

**Figura 15: Gráfico do processo de liofilização completo para LFCP-PTX/DXR para os ciclos 1 e 2**

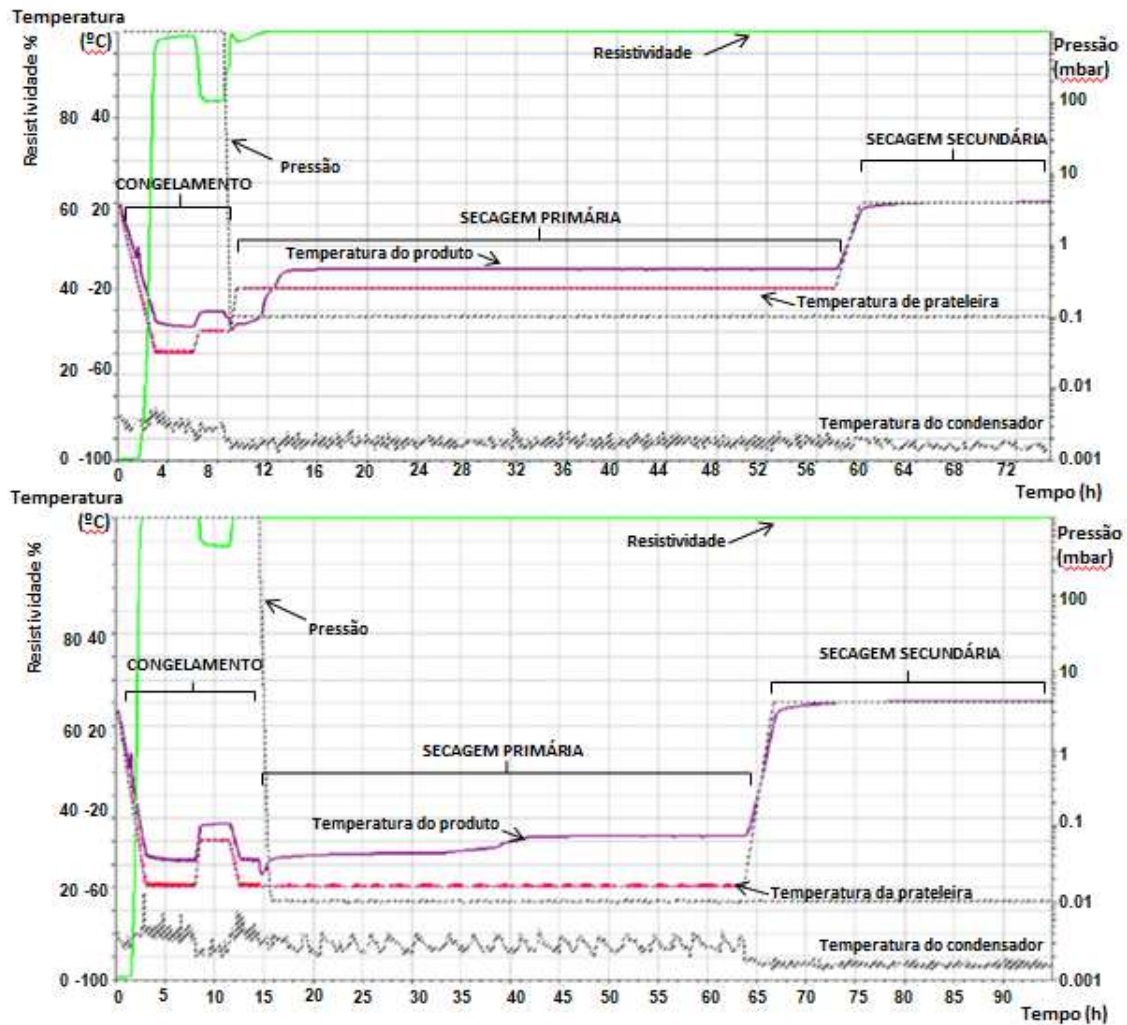


Gráfico de liofilização de LFCP-PTX/DXR com adição de trealose 9:1 p/p em relação aos fosfolípides. Ciclo 1 com duração de 74 h e ciclo 2 com duração de 90 h.

## 2.3 Caracterização do produto liofilizado e reidratado

### 2.3.1 Avaliação macroscópica de produtos liofilizados após ciclos completos de liofilização, determinação de umidade e tempos de reconstituição

As características desejadas para produtos liofilizados aceitáveis incluem sua aparência elegante e curto tempo de reconstituição (WANG e GRAINGER, 2019). Todos os produtos secos analisados demonstraram facilidade e rapidez na etapa de reidratação, não ultrapassando o tempo de 30 s. O padrão visual do pó variou de acordo com a concentração do crioprotetor adicionado à amostra. Para todas as amostras que continham trealose na proporção 5:1 p/p de açúcar em relação aos fosfolípides, os produtos liofilizados foram colapsados, independente do tipo de ciclo de liofilização, mesmo havendo ou não a etapa de *annealing*. Os líofilos apresentaram um volume inferior ao volume da dispersão líquida inicial, perda de estrutura com o aparecimento de sulcos na superfície e aparente encolhimento da pastilha formada.

Os produtos liofilizados resultantes de amostras de LFCP-PTX/DXR adicionadas com trealose 9:1 p/p foram elegantes, também independentes do tipo de ciclo de liofilização aplicados. Tais amostras liofilizadas com o ciclo 2 não apresentaram sinais de colapso. Essas amostras apresentaram superfície homogênea e manutenção do volume inicial. A aparência dos produtos liofilizados pode ser observada na **Figura 16**.

**Figura 16: Produtos liofilizados resultantes dos ciclos de liofilização 1 e 2**



LFCP-PTX/DXR liofilizado resultante da aplicação dos ciclos 1 e 2. LFCP-PTX/DXR liofilizado contendo trealose 9:1 p/p mantiveram a estrutura e o volume durante o processo de liofilização, formando uma pastilha elegante. LFCP-PTX/DXR liofilizado contendo trealose 5:1 p/p sofreu colapso, alteração de estrutura, retração e alteração de volume durante o processo.

O teor de umidade residual é outro indicador da qualidade dos produtos liofilizados, um teor de umidade reduzido é desejado para maior estabilidade. Os fatores mais importantes que influenciam o teor de umidade residual são o tipo e a concentração do crioprotetor e os parâmetros do processo de liofilização (PORFIRE *et al.*, 2017). Os produtos liofilizados com a etapa de *annealing* adicional durante o congelamento foram avaliados quanto à umidade final do pó. As amostras adicionadas com trealose 5:1 e 9:1 p/p no ciclo 1, apresentaram  $6,8 \pm 0,9$  e  $6,9 \pm 1,3\%$  de umidade, respectivamente. Já a amostra liofilizada do ciclo 2 obteve redução da umidade atingindo o valor de  $5,0 \pm 1,1\%$ .

Os valores de umidade encontrados para as amostras ainda estão acima dos que são normalmente considerados na literatura para lipossomas liofilizados. Como por exemplo a formulação patenteada de lipossomas contendo PTX, chamada LEP-ETU, possui 0,95% de umidade (ZHANG, J. A. *et al.*, 2005) e lipossomas carreando iopromida após liofilização mostraram umidade variando entre 0,12 e 0,18% (ZINGEL *et al.*, 1996).

### **2.3.2 Análise química físico-química de produtos liofilizados após reconstituição**

As dispersões reconstituídas devem preservar todas as características da formulação original, que garantam a proteção dos lipossomas durante o processo de liofilização: tamanho de partícula, PZ e eficiência de encapsulação (WANG e GRAINGER, 2019). As variações na retenção de PTX frente às diferentes concentrações do crioprotetor e a exposição aos diferentes processos resultaram na oscilação das relações molares entre os fármacos PTX/DXR. O índice de polidispersão dos lipossomas permaneceu próximo a 0,3 e não diferiu entre as amostras e processos.

A adição de crioprotetor favoreceu a retenção de PTX, que é bastante superior para todas as amostras contendo trealose quando comparada à formulação sem a presença do açúcar (**Tabela 12**). Em relação à inclusão da etapa de *annealing* no ciclo 1, pôde-se observar um maior teor de retenção de PTX nos lipossomas para a amostra contendo trealose 9:1 p/p. No ciclo 2, a percentagem de retenção de PTX nas vesículas lipossomais utilizando o processo de *annealing* e trealose 9:1 p/p foi similar àquele obtido no ciclo 1 com o uso dessas mesmas condições. No entanto, os valores de potencial zeta e diâmetro das vesículas foram menores e mais próximos daqueles apresentados pela formulação de LFPC-PTX/DXR antes da liofilização.

A adição de trealose como crioprotetor e a inclusão do processo de *annealing* não tiveram influência sobre a percentagem de retenção de DXR nos lipossomas. As variações dos valores de retenção de PTX obtidas para os produtos liofilizados com o uso de diferentes concentrações do crioprotetor e de diferentes processos levou à oscilações da razão molar PTX:DXR. Os valores de IP das amostras de LFPC-PTX/DXR após liofilização e reidratação permaneceram próximos a 0,3.

Durante a liofilização, ainda que os crioprotetores previnam a fusão das vesículas lipossomais e mantenham os diâmetros adequados à aplicação intravenosa, o parâmetro mais eficaz para avaliar seu efeito protetor é o teor de retenção das substâncias bioativas encapsuladas (HUA *et al.*, 2003). O escape

dos fármacos é um dos fatores que limitam o desenvolvimento de formulações comerciais de lipossomas (PORFIRE *et al.*, 2017). As características de solubilidade e partição dos fármacos determinam se é fácil para os mesmos permearem a bicamada lipídica levando ao seu extravasamento das vesículas ou não. Fármacos altamente lipofílicos como o PTX apresentam maior facilidade em ser retidos nos lipossomas em comparação aos fármacos anfifílicos e aos fármacos altamente hidrofílicos como a DXR, devido à sua baixa solubilidade em água após a reidratação. No entanto, muitos estudos têm mostrado que vários fármacos, incluindo os altamente hidrofílicos, altamente lipofílicos e anfifílicos, podem atingir teores de retenção aceitáveis após a liofilização (CHEN *et al.*, 2010). No caso dos LFCP-PTX/DXR, a modificação da superfície lipossomal pelo PEG também pode afetar o extravasamento dos fármacos, devido às possíveis interações entre estas moléculas e os crioprotetores (PORFIRE *et al.*, 2017).

**Tabela 12: Caracterização química e físico-química de LFCP-PTX/DXR após liofilização/reidratação sob diferentes condições**

Ciclo		Retenção PTX (%)	Retenção DXR (%)	RM	Diâmetro (nm)	IP	PZ (mV)
1	Ausência de crioprotetor	7,1 ± 1,5 <sup>a</sup>	23,5 ± 15,5 <sup>a</sup>	1:37	326,9 ± 24,8 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,03 <sup>a</sup>	-2,38 ± 0,15 <sup>a</sup>
	T5:1 Padrão	26,6 ± 2,2 <sup>b</sup>	27,3 ± 2,7 <sup>a</sup>	1:9	262,4 ± 2,6 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,01 <sup>a</sup>	-2,29 ± 0,29 <sup>a</sup>
	T5:1 Annealing	31,2 ± 4,3 <sup>b</sup>	35,2 ± 4,8 <sup>a</sup>	1:10	244,8 ± 9,4 <sup>ab</sup>	0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	-2,45 ± 0,72 <sup>a</sup>
	T9:1 Padrão	44,2 ± 2,6 <sup>c</sup>	31,3 ± 2,6 <sup>a</sup>	1:7	213,4 ± 5,5 <sup>ab</sup>	0,37 ± 0,02 <sup>a</sup>	-2,88 ± 0,13 <sup>a</sup>
	T9:1 Annealing	56,9 ± 2,5 <sup>d</sup>	34,9 ± 2,8 <sup>a</sup>	1:5	240,1 ± 3,2 <sup>ab</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	-6,46 ± 0,92 <sup>b</sup>
2	T9:1 Annealing	51,8 ± 4,3 <sup>cd</sup>	24,6 ± 5,2 <sup>a</sup>	1:4	204,7 ± 8,3 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,04 <sup>a</sup>	-2,60 ± 0,13 <sup>a</sup>

PTX: paclitaxel; DXR: doxorubicina; T5:1 = proporção de trealose para fosfolípide 5:1 p/p; T9:1 = proporção de trealose para fosfolípide 9:1 p/p; Padrão: congelamento sem a etapa de *annealing*; *Annealing*: congelamento com etapa de *annealing*; RM = razão molar entre os fármacos PTX e DXR; IP = índice de polidispersão; PZ = potencial zeta. Os teores de retenção dos fármacos, diâmetro, IP e PZ são apresentados como média ± desvio padrão da média. As porcentagens de retenção de PTX e DXR e PZ foram avaliadas pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%. Para a análise das variáveis diâmetro e IP, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, também com nível de significância de 5%. Letras distintas representam diferença estatística.

### 2.3.3 Análise de rastreamento de nanopartículas

A NTA permite a determinação simultânea do tamanho e da concentração de nanopartículas em uma amostra (FILIPE, HAWE e JISKOOT, 2010; ROZO *et al.*, 2020; USFOOR *et al.*, 2020; WIBROE *et al.*, 2016). A NTA realizada com a formulação de LFCP-PTX/DXR recém-preparada e a formulação após liofilização com trealose 9:1 p/p com o emprego dos parâmetros do ciclo 2 mostrou que não houve diferença significativa entre o número de vesículas lipossomais presentes nas amostras. Além disso, também não houve diferença significativa entre os tamanhos médios das vesículas e entre as distribuições de tamanho, os respectivos D10, D50 e D90. Todos os resultados são mostrados na **Tabela 13**. A manutenção do número e do diâmetro médio das vesículas após liofilização é um indicativo de que esse processo de secagem não rompeu ou desestruturou os LFCP-PTX/DXR.

**Tabela 13: Caracterização de LFCP-PTX/DXR usando análise de rastreamento de nanopartículas**

Parâmetros analisados	Recém-preparados	Depois de liofilização/reidratação
D10 (nm)	89,6 ± 5,6	90,0 ± 7,6
D50 (nm)	121,4 ± 9,0	123,7 ± 16,4
D90 (nm)	205,1 ± 6,5	217,0 ± 22,4
Diâmetro médio (nm)	105,1 ± 15,8	109,2 ± 11,9
Concentração de partículas/mL	$2,5 \times 10^{13} \pm 1,0 \times 10^{13}$	$2,2 \times 10^{13} \pm 7,4 \times 10^{12}$

**D10:** a parcela de partículas com diâmetros menores que este valor é de 10%. **D50:** a porção de partículas com diâmetros menores e maiores que este valor é 50%. **D90:** a parcela de partículas com diâmetros abaixo desse valor é de 90%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão da média (n=3). Os dados foram avaliados pelo teste T-Student com nível de significância de 5%.



### 2.3.4 Criomicroscopia

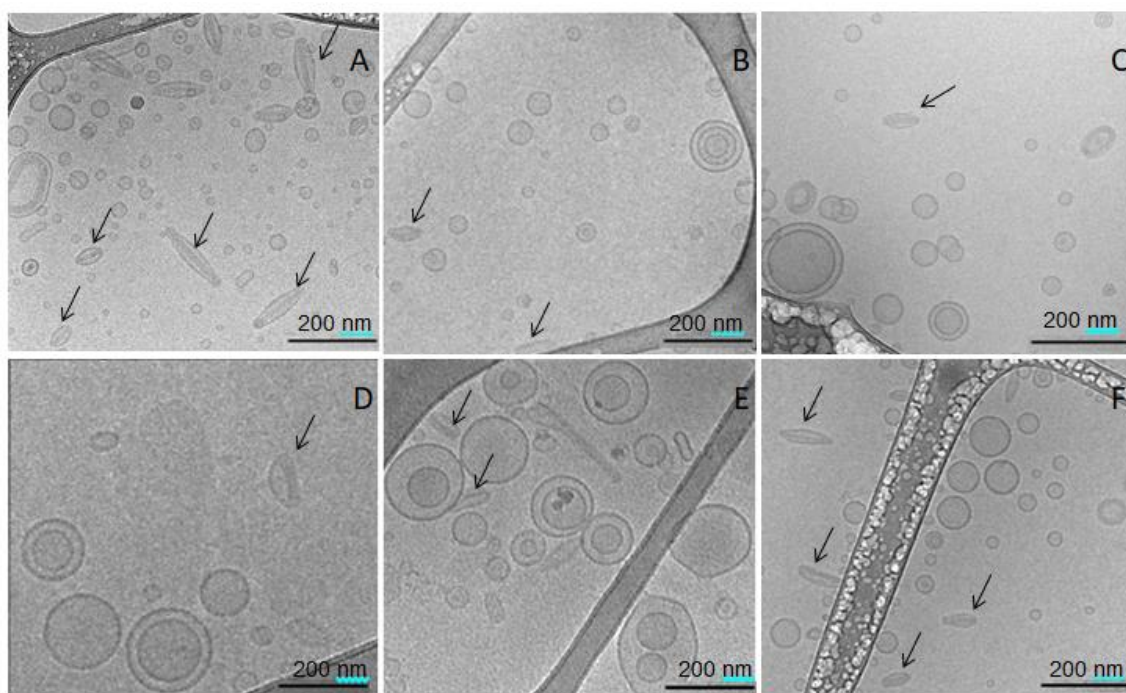
A criomicroscopia foi utilizada para investigar as características morfológicas dos LFCP-PTX/DXR que passaram pelos processos de congelamento/descongelamento e também liofilização. O objetivo principal foi identificar qual estágio teria maior influência nas características morfológicas e integridade das vesículas, congelamento ou secagem. Os LFCP-PTX/DXR recém-preparados foram submetidos à criomicroscopia e constituíram o grupo controle representado na **Figura 17A**.

As amostras que passaram apenas pelo estágio de congelamento, seguido de descongelamento foram: LFCP-PTX/DXR adicionados de trealose 5:1 p/p, na qual o açúcar foi adicionado durante a formação do filme lipídico (**Figura 17B**) e também adicionado à formulação final (**Figura 17C**). Do mesmo modo, a amostra de LFCP-PTX/DXR adicionada de trealose 9:1 p/p solubilizada à formulação final foi avaliada (**Figura 17D**). Foi também avaliada a influência do emprego do método de congelamento rápido de LFCP-PTX/DXR utilizando  $N_{2(l)}$  (**Figura 17E**). Finalmente, a criomicroscopia da amostra de LFCP-PTX/DXR adicionada de trealose 9:1 p/p foi realizada após o ciclo completo de liofilização com o emprego do ciclo 2 (**Figura 17F**).

Em geral, as imagens revelaram que a população vesicular é heterodispersa em termos de forma e tamanho, porém sem agregação ou fusão. A heterogeneidade entre as vesículas observada pela criomicroscopia já havia sido observada pela avaliação do IP e NTA das amostras dos LFCP-PTX/DXR, inclusive para a formulação controle, que não passou pelas etapas de liofilização. Os valores referentes ao IP foram próximos ou superiores a 0,3, indicando uma formulação heterodispersa (RAMADASS *et al.*, 2015). No entanto, o diâmetro das vesículas dos LFCP-PTX/DXR adicionados com trealose 9:1 p/p e que foram liofilizadas pelo ciclo 2 é muito próximo a 200 nm, um valor adequado para administração intravenosa em terapias antineoplásicas (BARUA e MITRAGOTRI, 2014; SIAFAKA *et al.*, 2016). A maioria dos lipossomas tem formato esférico, em alguns casos as vesículas são alongadas, sendo em sua maioria unilamelares.

Na primeira imagem (**17A**), referente à amostra recém-preparada, a quantidade de vesículas com formato elipsoidal e esférico prolatado é maior. Essas vesículas apresentam no seu interior estruturas na forma de agulha elétron-densa, supostamente representando moléculas de DXR empilhadas, indicadas pelas setas. As demais imagens de criomicroscopia também mostraram a presença dessas estruturas, em menor número, além de vesículas esféricas maiores e com menor contraste.

**Figura 17: Imagens de criomicroscopia dos LFCP-PTX/DXR após processos de congelamento/descongelamento e liofilização**



**A:** LFCP-PTX/DXR recém-preparados. **B e C:** LFCP-PTX/DXR congelados e descongelados com trealose 5:1 p/p adicionada durante a formação do filme lipídico e na formulação final, respectivamente. **D e E:** LFCP-PTX/DXR congelados e descongelados com trealose 9:1 p/p à formulação final. Em D, o congelamento/descongelamento foi realizado na prateleira do liofilizador e em E feito com  $N_2(l)$ . **F:** LFCP-PTX/DXR liofilizados e reidratados na presença de trealose 9:1 p/p adicionada na formulação final.

### 3 CONCLUSÃO

Os estudos realizados para otimização de um processo de liofilização de LFCP-PTX/DXR mostraram que o uso de trealose 9:1 p/p em relação aos fosfolípides e o emprego dos parâmetros de liofilização estabelecidos no ciclo 2 permitiram a preservação da integridade das vesículas, mantendo seu tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta adequados. O processo geral resultou em um produto seco elegante e de fácil ressuspensão. No entanto, o extravasamento de ambos os fármacos encapsulados, principalmente a DXR, ocorreu durante a liofilização. Além disso, condições de secagem drásticas, como o emprego de temperaturas e pressões muito baixas, comprometem o escalonamento da liofilização na indústria. Portanto, outros processos de secagem para os LFCP-PTX/DXR, como spray-drying, precisam ser investigados para se obter uma melhor retenção dos fármacos e uma possibilidade real de produção em larga escala.

### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A grande vantagem do uso dos LFCP-PTX/DXR frente ao uso da combinação dos fármacos livres é a redução da toxicidade, comprovada pelos estudos de toxicidade aguda aqui desenvolvidos, a qual pode levar a uma melhora na qualidade de vida dos pacientes em tratamento. Essa vantagem já foi observada inclusive para o Doxil® (Janssen Biotech, Inc; Johnson & Johnson, EUA), primeira formulação lipossomal aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso clínico no tratamento do câncer (BARENHOLZ, 2012; SCHÜTZ *et al.*, 2013). Essa formulação lipossomal exclusivamente composta pelo fármaco DXR, reduziu os principais efeitos adversos provocados pelo fármaco como cardiotoxicidade, mielossupressão, náuseas e vômitos (O'BRIEN *et al.*, 2004). Entretanto, os LFCP-PTX/DXR ainda podem oferecer vantagem adicional na eficácia antitumoral devido ao efeito sinérgico da combinação dos fármacos. Confirmar a possibilidade de uso dos dois fármacos, PTX e DXR, simultaneamente no mesmo nanocarreador, e ainda garantir uma menor toxicidade frente a combinação dos fármacos livres abre

possibilidades para expansão futura dos estudos “*in vivo*” e estudos clínicos com esses lipossomas para o tratamento do câncer de mama.

Por outro lado, melhorar a estabilidade e conseqüentemente aumentar o tempo de prateleira para os LFCP-PTX/DXR ainda é um desafio e os processos de secagem devem continuar sendo investigados. Entretanto, no que se trata de liofilização, esse trabalho já esclarece pontos fundamentais para permitir o aprofundamento dos estudos referentes a esse processo nos LFCP-PTX/DXR, como sua caracterização térmica e comportamento frente a diferentes tipos e concentrações de crioprotetores.

## **5 PERSPECTIVAS**

*Como* perspectivas para a continuidade de estudos de pré-formulação de LFCP-PTX/DXR, pode-se citar a realização dos estudos de toxicidade de doses repetidas. Esse estudo complementar as informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos na fisiologia do animal, possíveis alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas, além de informações sobre a indicação dos níveis de efeitos não observados (NOEL) e níveis de efeitos adversos não observados (NOAEL). A obtenção de LFCP-PTX/DXR sob a forma de pó com o emprego de outra técnica de secagem, como por exemplo o spray-drying, deverá ser considerada.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, Wassim *et al.* Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 58, n. 15, p. 1688–1713, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>

ABDELWAHED, Wassim; DEGOBERT, Ghania; FESSI, Hatem. Freeze-drying of nanocapsules: Impact of annealing on the drying process. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 324, n. 1, p. 74–82, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.06.047>

ABERNETHY, Darrell R. *et al.* Stereoselective halofantrine disposition and effect: Concentration-related QTc prolongation. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 231–237, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2001.00351.x>

AKUTSU, M. *et al.* Schedule-dependent interaction between paclitaxel and doxorubicin in human cancer cell lines in vitro. **European Journal of Cancer**, [s. l.], v. 31, n. 13–14, p. 2341–2346, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)00448-3](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00448-3)

AKYURT, M.; ZAKI, G.; HABEEBULLAH, B. Freezing phenomena in ice-water systems. **Energy Conversion and Management**, [s. l.], v. 43, n. 14, p. 1773–1789, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0196-8904\(01\)00129-7](https://doi.org/10.1016/S0196-8904(01)00129-7)

ANAMPA, Jesus; MAKOWER, Della; SPARANO, Joseph A. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: An overview. **BMC Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–13, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0439-8>

ASHRAFIZADEH, Milad *et al.* New insight towards development of paclitaxel and docetaxel resistance in cancer cells: EMT as a novel molecular mechanism and therapeutic possibilities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 141, p. 111824, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111824>

BAABUR-COHEN, Hemda *et al.* In vivo comparative study of distinct polymeric

architectures bearing a combination of paclitaxel and doxorubicin at a synergistic ratio. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 257, p. 118–131, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.037>

BAHETI, Ankit; KUMAR, Lokesh; BANSAL, Arvind K. Excipients used in lyophilization of small molecules. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 41–54, 2010.

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, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.023>

BARENHOLZ, Yechezkel. Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 160, n. 2, p. 117–134, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>

BARUA, Sutapa; MITRAGOTRI, Samir. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. **Nano Today**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 223–243, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.04.008>

BHATNAGAR, Bakul S; BOGNER, Robin H; PIKAL, Michael J. Protein Stability During Freezing: Separation of Stresses and Mechanisms of Protein Stabilization. **Pharmaceutical Development and Technology**, [s. l.], v. 12, p. 505–523, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10837450701481157>

BHATNAGAR, Shubhmita *et al.* Dissolvable microneedle patch containing doxorubicin and docetaxel is effective in 4T1 xenografted breast cancer mouse model. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 556, n. December 2018, p. 263–275, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.022>

BINES, José *et al.* Anthracyclines and taxanes in the neo/adjuvant treatment of breast cancer: Does the sequence matter? **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1079–1085, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu007>

BJELOŠEVIĆ, Maja *et al.* Aggressive conditions during primary drying as a

contemporary approach to optimise freeze-drying cycles of biopharmaceuticals. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 122, n. May, p. 292–302, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.016>

BLOND, G. Velocity of linear crystallization of ice in macromolecular systems. **Cryobiology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 61–66, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(88\)90021-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(88)90021-1)

BOZZUTO, Giuseppina; MOLINARI, Agnese. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 10, p. 975–999, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21492>

CHAPMAN, Kathryn *et al.* The value of acute toxicity studies to support the clinical management of overdose and poisoning: A cross-discipline consensus. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 354–359, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.07.003>

CHEN, Chengjun *et al.* An overview of liposome lyophilization and its future potential. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 142, n. 3, p. 299–311, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.024>

CHEN, Xiaodong *et al.* Finite Element Method (FEM) Modeling of Freeze-drying: Monitoring Pharmaceutical Product Robustness During Lyophilization. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 1317–1326, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0318-9>

CHOU, Ting-Chao; MARTIN, Nick. **CompuSyn for Drug Combinations and for General Dose-Effect Analysis User's Guide**. Versão 5.20.2010. [S. l.]: ComboSyn, Inc., 2005. Disponível em: [www.combosyn.com](http://www.combosyn.com) with

CHOU, Ting Chao. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 621–681, 2006. Disponível em:

<https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>

CHRIST, Martin. **Liofilização: Princípios básicos, procedimentos e aplicações**. São Paulo: [s. n.], 2012.

COATES, A S *et al.* Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015 . **Annals of Oncology Advance**, [s. l.], p. 1–38, 2015.

COCHRAN, T; NAIL, SL. Ice Nucleation Temperature Influences Recovery of Activity of a Model Protein after Freeze Drying. **Journal of pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 98, n. 9, p. 3495–3498, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.21815>

COLOMBO, T. *et al.* Pharmacokinetic interactions of paclitaxel, docetaxel and their vehicles with doxorubicin. **Annals of Operations Research**, [s. l.], v. 10, p. 391–395, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A>

CROWE, John H. *et al.* Stabilization of Dry Membranes by Mixtures of Hydroxyethyl Starch and Glucose: The Role of Vitrification. **Cryobiology**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 20–30, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2020>

CROWE, Lois M.; REID, David S.; CROWE, John H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 2087–2093, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79407-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79407-9)

DATE, Praveen V.; SAMAD, Abdul; DEVARAJAN, Padma V. Freeze thaw: A simple approach for prediction of optimal cryoprotectant for freeze drying. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 304–313, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9382-3>

DE IULIIS, Francesca *et al.* Taxane induced neuropathy in patients affected by breast cancer: Literature review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 34–45, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.04.011>



DE OLIVEIRA SILVA, Juliana *et al.* Toxicological study of a new doxorubicin-loaded pH-sensitive liposome: A preclinical approach. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 352, n. May, p. 162–169, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.037>

DEPAZ, Roberto A.; PANSARE, Swapnil; PATEL, Sajal Manubhai. Freeze-Drying above the Glass Transition Temperature in Amorphous Protein Formulations while Maintaining Product Quality and Improving Process Efficiency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 40–49, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.24705>

ELOY, Josimar O. *et al.* Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 141, p. 74–82, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.032>

ERHIRHIE, Earnest Oghenesuvwe; IHEKWEREME, Chibueze Peter; ILODIGWE, Emmanuel Emeka. Advances in acute toxicity testing: Strengths, weaknesses and regulatory acceptance. **Interdisciplinary Toxicology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 5–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/intox-2018-0001>

FAN, Yuchen; ZHANG, Qiang. Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 81–87, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.010>

FDA. Introduction to the guidance for industry on liposome drug products: chemistry, manufacturing, and controls; human pharmacokinetics and bioavailability; and labeling documentation issued by FDA. [s. l.], v. 27, n. 16, p. 1835–1840, 2018.

FENG, Chunlai *et al.* Ratiometric co-encapsulation and co-delivery of doxorubicin and paclitaxel by tumor-targeted lipodisks for combination therapy of breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 560, n. February, p. 191–204, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.009>

FILIPE, Vasco; HAWE, Andrea; JISKOOT, Wim. Critical evaluation of

nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 796–810, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>

FONTE, Pedro; REIS, Salette; SARMENTO, Bruno. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 225, p. 75–86, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.034>

FRAGUAS-SÁNCHEZ, A. I. *et al.* CBD loaded microparticles as a potential formulation to improve paclitaxel and doxorubicin-based chemotherapy in breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 574, n. December 2019, p. 118916, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118916>

FRANCO, Marina S.; OLIVEIRA, Mônica C. Liposomes Co- encapsulating Anticancer Drugs in Synergistic Ratios as an Approach to Promote Increased Efficacy and Greater Safety. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 17–28, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1871520618666180420170124>

FRANCO, Marina Santiago *et al.* Investigation of the antitumor activity and toxicity of long-circulating and fusogenic liposomes co-encapsulating paclitaxel and doxorubicin in a murine breast cancer animal model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 109, n. November 2018, p. 1728–1739, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.011>

FRANCO, Marina Santiago; OLIVEIRA, Mônica Cristina. Ratiometric drug delivery using non-liposomal nanocarriers as an approach to increase efficacy and safety of combination chemotherapy. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 96, n. October, p. 584–595, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.009>

FRANCO, Marina Santiago; ROQUE, Marjorie Coimbra; OLIVEIRA, Mônica Cristina. Short and long-term effects of the exposure of breast cancer cell lines to different ratios of free or co-encapsulated liposomal paclitaxel and doxorubicin. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 4, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040178>

FRANKS, F; AUFFRET, T. **Freeze-Drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**. Cambridge: RSC Publishing, 2007.

FRANZÉ, Silvia *et al.* Lyophilization of liposomal formulations: Still necessary, still challenging. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 10, n. 3, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030139>

GE, Yanxiu; MA, Yakun; LI, Lingbing. The application of prodrug-based nano-drug delivery strategy in cancer combination therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 146, p. 482–489, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.06.051>

GHARIB, Riham *et al.* First study on the release of a natural antimicrobial agent, estragole, from freeze-dried delivery systems based on cyclodextrins and liposomes. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 52, n. May, p. 794–802, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.05.032>

GIANNI, Luca *et al.* Paclitaxel by 3-Hour Infusion in Combination With Bolus Doxorubicin in Women With Untreated Metastatic Breast Cancer: High Antitumor Efficacy and Cardiac Effects in a Dose-Finding and Sequence-Finding Study. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 2688–2699, 1995.

GIANNI, L. *et al.* Human pharmacokinetic characterization and in vitro study of the interaction between doxorubicin and paclitaxel in patients with breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 1906–1915, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.5.1906>

GLAVAS-DODOV, M. *et al.* The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 291, n. 1–2, p. 79–86, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.07.045>

GUAN, Peipei *et al.* Solidification of liposomes by freeze-drying: The importance of incorporating gelatin as interior support on enhanced physical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 478, n. 2, p. 655–664, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.016>

GUIMARÃES, Diana *et al.* Protective Effect of Saccharides on Freeze-Dried Liposomes Encapsulating Drugs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 7, n. December, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00424>

HANNA, Amy D. *et al.* Adverse effects of doxorubicin and its metabolic product on cardiac RyR2 and SERCA2A. **Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 86, n. 4, p. 438–449, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/mol.114.093849>

HARASYM, Troy O. *et al.* Increased preclinical efficacy of irinotecan and floxuridine coencapsulated inside liposomes is associated with tumor delivery of synergistic drug ratios. **Oncology Research**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 361–374, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.3727/000000006783980937>

HORN, Jacqueline; SCHANDA, Julia; FRIESS, Wolfgang. Impact of fast and conservative freeze-drying on product quality of protein-mannitol-sucrose-glycerol lyophilizates. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 127, n. January, p. 342–354, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.03.003>

HOTTOT, Aurélie; VESSOT, Séverine; ANDRIEU, Julien. Freeze drying of pharmaceuticals in vials: Influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. **Chemical Engineering and Processing**, [s. l.], v. 46, n. 7, p. 666–674, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.09.003>

HUA, Susan; WU, Sherry Y. The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 4 NOV, n. November, p. 1–7, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00143>

HUA, Ze Zhao *et al.* Freeze-drying of liposomes with cryoprotectants and its effect on retention rate of encapsulated florafur and vitamin A. **Drying Technology**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 1491–1505, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1081/DRT-120024489>

INGVARSSON, Pall Thor *et al.* Stabilization of liposomes during drying. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 375–388, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.553219>

JABIR, Nasimudeen R. *et al.* Nanotechnology-based approaches in anticancer research. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 7, p. 4391–4408, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S33838>

JENNINGS, T. **The freezing process in: Lyophilization, introduction and basic principles**. Englewood, USA: Interpharm Press, 1999.

KASPER, Julia Christina; FRIESS, Wolfgang. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 248–263, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.03.010>

KHALILZADEH, Mina *et al.* Protective effects of magnesium sulfate against doxorubicin induced cardiotoxicity in rats. **Life Sciences**, [s. l.], v. 207, n. February, p. 436–441, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.06.022>

KHIAVI, Monir Moradzadeh *et al.* Assessment of the blood parameters, cardiac and liver enzymes in oral squamous cell carcinoma following treated with injectable doxorubicin-loaded nano-particles. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 1973–1977, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.7.1973>

KINOSHITA, Toshio *et al.* Early electrocardiographic indices for predicting chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 77, n. 4, p. 388–394, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2020.10.007>

KOECHLI, Ossi R. *et al.* Characteristics of the combination paclitaxel plus doxorubicin in breast cancer cell lines analyzed with the ATP-Cell Viability Assay. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 21–27, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00666352>

KUMAR, Krishna N.; MALLIK, Sanku; SARKAR, Kausik. Role of freeze-drying in the presence of mannitol on the echogenicity of echogenic liposomes. **The Journal of the Acoustical Society of America**, [s. l.], v. 142, n. 6, p. 3670–

3676, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1121/1.5017607>

LESLIE, S. B. *et al.* Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 10, p. 3592–3597, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.61.10.3592-3597.1995>

LEWIS, Lavinia M. *et al.* Characterizing the freeze-drying behavior of model protein formulations. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1580–1590, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9530-9>

LI, Xiang *et al.* In vitro and in vivo evaluation of folate receptor-targeting amphiphilic copolymer-modified liposomes loaded with docetaxel. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 6, p. 1167–1184, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/ijn.s21445>

Lietta, Elena *et al.* On the Use of Infrared Thermography for Monitoring a Vial Freeze-Drying Process. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 391–398, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.07.025>

LIM, Jun Yeul *et al.* Effects of annealing on the physical properties of therapeutic proteins during freeze drying process. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 107, n. PartA, p. 730–740, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.041>

LIU, Cun *et al.* Cardiotoxicity of doxorubicin-based cancer treatment: What is the protective cognition that phytochemicals provide us? **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 160, n. June, p. 105062, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105062>

LIU, Chi Mou *et al.* Preliminary evaluation of acute toxicity of <sup>188</sup>Re-BMEDA-liposome in rats. **Journal of Applied Toxicology**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 680–687, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jat.1541>

LIU, Si Yen; CHANG, Chih Hsien; LEE, Te Wei. Single dose acute toxicity testing for N,N-bis(2-mercaptoethyl)-N',N' diethylethylenediamine in beagles. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 217–225, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.04.001>

LIU, Xin; HUANG, Guihua. Formation strategies, mechanism of intracellular delivery and potential clinical applications of pH-sensitive liposomes. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 319–328, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.11.002>

LIU, Yarong *et al.* Codelivery of chemotherapeutics via crosslinked multilamellar liposomal vesicles to overcome multidrug resistance in tumor. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 1–10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110611>

MARÍN, D. *et al.* Encapsulation of food waste compounds in soy phosphatidylcholine liposomes: Effect of freeze-drying, storage stability and functional aptitude. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 223, p. 132–143, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.009>

MATSUMOTO, Masakazu; SAITO, Shinji; OHMINE, Iwao. Molecular dynamics simulation of the ice nucleation and growth process leading to water freezing. **Nature**, [s. l.], v. 416, n. 6879, p. 409–413, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1038/416409<sup>a</sup>](https://doi.org/10.1038/416409a)

MATTHEOLABAKIS, George *et al.* Sterically stabilized liposomes incorporating the novel anticancer agent phospho-ibuprofen (MDC-917): Preparation, characterization, and in vitro/in vivo evaluation. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 1435–1443, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0619-y>

MEHMOOD, Yasir; FAROOQ, Umer. Excipients Use in Parenteral and Lyophilized Formulation Development. **Open Science Journal of Pharmacy and Pharmacology.**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 19–27, 2015.

MEYER, C. *et al.* Factors involved in delaying initiation of adjuvant chemotherapy after breast cancer surgery. **Clinical Breast Cancer**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2021.05.007>

MOHAMMED-ALI, Zahraa *et al.* Defining appropriate utilization of AST testing. **Clinical Biochemistry**, [s. l.], v. 79, n. December 2019, p. 75–77, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.02.006>

MOHAMMED, Haitham S. *et al.* Protective effect of curcumin nanoparticles against cardiotoxicity induced by doxorubicin in rat. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1866, n. 5, p. 165665, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165665>

MONTEIRO, Liziane O.F. *et al.* Paclitaxel-loaded folate-coated long circulating and pH-sensitive liposomes as a potential drug delivery system: A biodistribution study. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 97, n. September 2017, p. 489–495, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.135>

MONTEIRO, Nelson *et al.* Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. **Journal of the Royal Society Interface**, [s. l.], v. 11, n. 101, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0459>

MORAIS, Andreza Rochelle Do Vale *et al.* Freeze-drying of emulsified systems: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 503, n. 1–2, p. 102–114, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.047>

MUJAT, Mircea *et al.* Optical coherence tomography-based freeze-drying microscopy. **Biomedical Optics Express**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 55, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1364/boe.3.000055>

NAIL, Steven L. *et al.* Fundamentals of Freeze-Drying. *In: DEVELOPMENT AND MANUFACTURE OF PROTEIN PHARMACEUTICALS*. New York: Springer, 2002. p. 281–360. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0549-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0549-5_6)

NDREPEPA, Gjin *et al.* Aspartate aminotransferase and mortality in patients with ischemic heart disease. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, [s. l.], v. 30, n. 12, p. 2335–2342, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.07.033>

NĚMCOVÁ-FŮRSTOVÁ, Vlasta *et al.* Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 310, p. 215–228, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.09.020>



NEWELL, D. R. *et al.* The Cancer Research UK experience of pre-clinical toxicology studies to support early clinical trials with novel cancer therapies. **European Journal of Cancer**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 899–906, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2003.12.020>

NONAKA, Miki; HOSODA, Hiroshi; UEZONO, Yasuhito. Cancer treatment-related cardiovascular disease: Current status and future research priorities. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 190, n. March, p. 114599, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114599>

O'BRIEN, Mary E.R. *et al.* Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 440–449, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh097>

ODDONE, Irene; BARRESI, Antonello A.; PISANO, Roberto. Influence of controlled ice nucleation on the freeze-drying of pharmaceutical products: the secondary drying step. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 524, n. 1–2, p. 134–140, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.077>

OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. **Oecd Guideline for Testing of Chemicals**, [s. l.], n. December, p. 1–14, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264071001-em>

OHORI, Ryo; YAMASHITA, Chikamasa. Effects of temperature ramp rate during the primary drying process on the properties of amorphous-based lyophilized cake, Part 1: Cake characterization, collapse temperature and drying behavior. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 39, p. 131–139, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.03.013>

OLIVEIRA, Mariana S. *et al.*  $\alpha$ -Tocopherol succinate improves encapsulation and anticancer activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 140, p. 246–253, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.019>

PANSARE, Swapnil K.; PATEL, Sajal M. Lyophilization Process Design and

Development: A Single-Step Drying Approach. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 4, p. 1423–1433, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.11.021>

PATEL, Sajal M.; DOEN, Takayuki; PIKAL, Michael J. Determination of end point of primary drying in freeze-drying process control. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 73–84, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9362-7>

PATIL, V. V. *et al.* Freeze drying: Potential for powdered nanoparticulate product. **Drying Technology**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 624–635, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07373931003788692>

PETZOLD, G.; AGUILERA, JM. Ice morphology: fundamentals and technological applications in foods. **Food Biophysics**, [s. l.], v. 4, p. 378–396, 2009. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11483-009-9136-5>

PIENIAZEK, A. *et al.* Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. **Advances in Medical Sciences**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 104–111, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/v10039-012-0063-1>

PIKAL, M.J.; RAMBHATLA, S.; RAMOT, R. The impact of the freezing stage in lyophilization: Effects of the ice nucleation temperature on process design and product quality. **American Pharmaceutical Review**, [s. l.], v. 5, p. 48–52, 2002.

PISANO, Roberto *et al.* Quality by design: Scale-up of freeze-drying cycles in pharmaceutical industry. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 1137–1149, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0003-9>

PORFIRE, Alina *et al.* A quality by design approach for the development of lyophilized liposomes with simvastatin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 981–992, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.01.007>

PRAMANICK, Sougata; SINGODIA, Deepak; CHANDEL, Vikas. Excipient selection in parenteral formulation development. **Pharma Times**, [s. l.], v. 45, n.

3, p. 65–77, 2013.

PUGAZHENDHI, Arivalagan *et al.* Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. **Life Sciences**, [s. l.], v. 200, n. October 2017, p. 26–30, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.023>

RABKIN, Simon W.; SZEFER, Elena; THOMPSON, Darby J.S. A New QT Interval Correction Formulae to Adjust for Increases in Heart Rate. **JACC: Clinical Electrophysiology**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 756–766, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jacep.2016.12.005>

RAMADASS, Satiesh Kumar *et al.* Paclitaxel/Epigallocatechin gallate coloaded liposome: A synergistic delivery to control the invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 125, p. 65–72, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.11.005>

RAMBHATLA, Shailaja *et al.* Heat and mass transfer scale-up issues during freeze drying: II. Control and characterization of the degree of supercooling. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 1–9, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/pt050458>

RANDOLPH, TW; SEARLES, JA. Freezing and annealing phenomena in lyophilization: Effects upon primary drying rate, morphology, and heterogeneity. **American Pharmaceutical Review**, [s. l.], v. 5, p. 40–47, 2002.

RASCH, Michael R. *et al.* Chloroform-Enhanced Incorporation of Hydrophobic Gold Nanocrystals into Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) Vesicle Membranes. **Langmuir**, [s. l.], v. 11, n. 28(36), p. 12971–12981, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/la302740j>

RASOOL, Akhtar *et al.* In vitro effects of cobalt nanoparticles on aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities of wistar rats. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 26, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00453>

RAWAT, Pushkar Singh *et al.* Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 139, p. 111708,

2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111708>

RAZAVI-AZARKHIAVI, K. *et al.* The Comparison of Biodistribution, Efficacy and Toxicity of Two PEGylated Liposomal Doxorubicin Formulations in Mice Bearing C - 26 Colon Carcinoma: A Preclinical Study. **Drug Research**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 330–336, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0035-1569447>

RIEDEL, Jennifer *et al.* Paclitaxel and curcumin co-loaded mixed micelles: Improving in vitro efficacy and reducing toxicity against Abraxane®. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 62, n. December 2020, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102343>

RINK, Jonathan S. *et al.* Update on current and potential nanoparticle cancer therapies. **Current Opinion in Oncology**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 646–651, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000012>

RIVIERE, Kareen *et al.* Anti-tumor activity of liposome encapsulated fluoroorotic acid as a single agent and in combination with liposome irinotecan. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 153, n. 3, p. 288–296, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.05.005>

ROQUE, Marjorie Coimbra. **Avaliação da atividade antitumoral de lipossomas fusogênicos de circulação prolongada co-encapsulando paclitaxel e doxorubicina para o tratamento do câncer de mama.** 2017. - Universidade Federal de Minas Gerais, [s. l.], 2017.

ROQUE, Marjorie Coimbra *et al.* Development of Long-Circulating and Fusogenic Liposomes Co-encapsulating Paclitaxel and Doxorubicin in Synergistic Ratio for the Treatment of Breast Cancer. **Current Drug Delivery**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 829–838, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1567201816666191016112717>

ROZO, Annaïg J. *et al.* Biophysical analysis of lipidic nanoparticles. **Methods**, [s. l.], v. 180, n. April, p. 45–55, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.05.001>

SCHNEID, Stefan C. *et al.* Optimization of the secondary drying step in freeze drying using TDLAS technology. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 12, n. 1, p.

379–387, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9600-7>

SCHÜTZ, Catherine A *et al.* Therapeutic nanoparticles in clinics and under clinical evaluation; on behalf of the NanoImpactNet Consortium. **Nanomedicine**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 449–467, 2013.

SCHWEGMAN, J. JEFF; CARPENTER, JOHN F.; NAIL, STEVEN L. Evidence of Partial Unfolding of Proteins at the Ice/Freeze-Concentrate Interface by Infrared Microscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 98, p. 3239–3246, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps>

SEARLES, James A.; CARPENTER, John F.; RANDOLPH, Theodore W. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 90, n. 7, p. 860–871, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.1039>

SEMPKOWSKI, Michelle *et al.* Liposome-based approaches for delivery of mainstream chemotherapeutics: preparation methods, liposome designs, therapeutic efficacy. **Critical Reviews in Oncogenesis**, [s. l.], v. 19, n. 3–4, p. 177–221, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2014011533>

SHI, Ai Min *et al.* The effect of annealing and cryoprotectants on the properties of vacuum-freeze dried starch nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 1334–1341, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.013>

SIAFAKA, Panoraia I. *et al.* Surface modified multifunctional and stimuli responsive nanoparticles for drug targeting: Current status and uses. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 1440, p. 1–40, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms17091440>

SIMUNEK, Tomás *et al.* Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. **Pharmacological Reports**, [s. l.], v. 61, p. 154–171, 2009. Disponível em: [https://doi.org/10.1016 / s1734-1140 \(09\) 70018-0](https://doi.org/10.1016 / s1734-1140 (09) 70018-0)

SRITHARAN, Sruthi; SIVALINGAM, Nageswaran. A comprehensive review on

time-tested anticancer drug doxorubicin. **Life Sciences**, [s. l.], v. 278, n. March, p. 119527, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119527>

STARK, Brigitte; PABST, Georg; PRASSL, Ruth. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 41, n. 3–4, p. 546–555, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.08.010>

SU, Xianwei *et al.* Lipid-polymer nanoparticles encapsulating doxorubicin and 2'-deoxy-5-azacytidine enhance the sensitivity of cancer cells to chemical therapeutics. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1901–1909, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/mp300675c>

SYLVESTER, Bianca *et al.* Formulation Optimization of Freeze-Dried Long-Circulating Liposomes and In-Line Monitoring of the Freeze-Drying Process Using an NIR Spectroscopy Tool. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 139–148, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.05.024>

TAN, Qiu Wen *et al.* Weekly taxane–anthracycline combination regimen versus tri-weekly anthracycline-based regimen for the treatment of locally advanced breast cancer: A randomized controlled trial. **Chinese Journal of Cancer**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1–8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0196-5>

TARDI, Paul G. *et al.* Coencapsulation of irinotecan and floxuridine into low cholesterol-containing liposomes that coordinate drug release in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s. l.], v. 1768, n. 3, p. 678–687, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.11.014>

URITANI, Masahiro; TAKAI, Megumi; YOSHINAGA, Koichi. Protective effect of disaccharides on restriction endonucleases during drying under vacuum. **Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 117, n. 4, p. 774–779, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124775>

USFOOR, Zohair *et al.* Features of sizing and enumeration of silica and polystyrene nanoparticles by nanoparticle tracking analysis (NTA). **Sensors (Switzerland)**, [s. l.], v. 20, n. 22, p. 1–14, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.3390/s20226611>

VAN WINDEN, Ewoud C.A.; CROMMELIN, Daan J.A. Short term stability of freeze-dried, lyoprotected liposomes. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 69–86, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00130-8)

VARSHOSAZ, Jaleh; ESKANDARI, Sharareh; TABBAKHIAN, Majid. Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 1157–1163, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.051>

WANG, Yan *et al.* A synergistic combination therapy with paclitaxel and doxorubicin loaded micellar nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 116, p. 41–48, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.12.051>

WANG, Yingli *et al.* Redox dual-responsive paclitaxel-doxorubicin heterodimeric prodrug self-delivery nanoaggregates for more effective breast cancer synergistic combination chemotherapy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [s. l.], v. 21, p. 102066, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102066>

WANG, Yuwei; GRAINGER, David W. Lyophilized liposome-based parenteral drug development: Reviewing complex product design strategies and current regulatory environments. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 151–152, p. 56–71, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.03.003>

WIBROE, Peter P. *et al.* An integrated assessment of morphology, size, and complement activation of the PEGylated liposomal doxorubicin products Doxil®, Caelyx®, DOXOrubicin, and SinaDoxosome. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 221, p. 1–8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.11.021>

WILSON, P. W.; HENEGHAN, A. F.; HAYMET, A. D.J. Ice nucleation in nature: Supercooling point (SCP) measurements and the role of heterogeneous nucleation. **Cryobiology**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 88–98, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(02\)00182-7](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00182-7)

XIA, Xinchao *et al.* Comparison of different QTc formulae for correction of QT interval in cynomolgus monkeys. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [s. l.], v. 99, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.05.147>

YU, Jiang *et al.* Remote loading paclitaxel–doxorubicin prodrug into liposomes for cancer combination therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1730–1740, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.011>

YUE, Peng Fei *et al.* Study on formability of solid nanosuspensions during solidification: II novel roles of freezing stress and cryoprotectant property. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 475, n. 1–2, p. 35–48, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.041>

ZAMBONI, William C. *et al.* Best practices in cancer nanotechnology: Perspective from NCI nanotechnology alliance. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 3229–3241, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2938>

ZHANG, J. Allen *et al.* Development and characterization of a novel Cremophor® EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 177–187, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.06.009>

ZHANG, Rui Xue *et al.* Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy – Strategies and perspectives. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 240, p. 489–503, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.012>

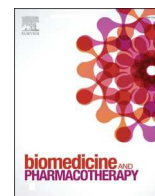
ZINGEL, C. *et al.* Lyophilization and rehydration of iopromide-carrying liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 140, n. 1, p. 13–24, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(96\)04566-8](https://doi.org/10.1016/0378-5173(96)04566-8)



**ANEXO**

**Preclinical toxicological study of long-circulating  
and fusogenic liposomes co-encapsulating  
paclitaxel and doxorubicin in synergic ratio.  
2021.**

**DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112307**



## Preclinical toxicological study of long-circulating and fusogenic liposomes co-encapsulating paclitaxel and doxorubicin in synergic ratio

Marjorie Coimbra Roque<sup>a</sup>, Caroline Dohanik da Silva<sup>a</sup>, Marthin Raboch Lempek<sup>b</sup>,  
Geovanni Dantas Cassali<sup>c</sup>, André Luís Branco de Barros<sup>a</sup>, Marília Martins Melo<sup>b</sup>, Mônica  
Cristina Oliveira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Department of Veterinary Clinic and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Liposomes  
Doxorubicin  
Paclitaxel  
Co-administration  
Acute toxicity  
Breast cancer

### ABSTRACT

Combination therapy between paclitaxel (PTX) and doxorubicin (DXR) is applied as the first-line treatment of breast cancer. Co-administration of drugs at synergistic ratio for treatment is facilitated with the use of nano-carriers, such as liposomes. However, despite the high response rate of solid tumors to this combination, a synergism of cardiotoxicity may limit the use. Thus, the objective of this work was to investigate the toxicity of long-circulating and fusogenic liposomes co-encapsulating PTX and DXR at the synergistic molar ratio (1:10) (LCFL-PTX/DXR). For this, clinical chemistry, histopathological analysis and electrocardiographic exams were performed on female Balb/c mice that received a single intravenous dose of LCFL-PTX/DXR. The results of the study indicated that the LD50 dose range (lethal dose for 50% of animals) of the LCFL-PTX/DXR treatment (28.9–34.7 mg/kg) is much higher than that found for free PTX/DXR treatment (20.8–23.1 mg/kg). In addition, liposomes promoted cardiac protection by not raising CK-MB levels in animals, keeping cardiomyocytes without injury or electrocardiographic changes. After 14 days of treatment, free PTX/DXR caused prolongation of the QRS interval when compared to LCFL-PTX/DXR treatment at the same dose (37.0 ± 5.01 ms and 30.83 ± 2.62 ms, respectively, with  $p = 0.017$ ). The survival rate of animals treated with LCFL-PTX/DXR was three times higher than that of those treated with free drugs. Thus, it was established that the toxicity of LCFL-PTX/DXR is reduced compared to the combination of free PTX/DXR and this platform has advantages for the clinical treatment of breast cancer.

### 1. Introduction

Cancer is one of the major health problems of the 21st century, and breast cancer is the most common malignancy in women. It is estimated that more than 23 million cases will be diagnosed by 2030 [1,2]. Currently, several therapeutic approaches are available, depending on the cancer subtype: surgery, hormonal therapy, radiation therapy, immunotherapy, and chemotherapy [2,3]. In the case of breast cancer chemotherapy, combined treatment with paclitaxel (PTX) and doxorubicin (DXR) is one of the most common approaches. The associated treatment is partly successful due to the synergistic effect between drugs, which presents different mechanisms of action overcoming drug resistance to a certain extent [4–7]. This synergism implies a greater

effect of the combination compared to the effect of the sum of the individual drugs. This approach allows the therapeutic efficacy to be achieved with lower doses of the drugs, which consequently also brings a reduction of the side effects [8–11].

However, the systemic administration of the cocktail of bioactive substances does not guarantee that they reach the target together and in the appropriate concentration for synergism due to their own pharmacokinetics [11,12]. The need to control combinatorial ratios so that the synergistic ratio is reached in the body and delivered to the tumor site has led to the development of nanosystems co-encapsulating drugs in synergistic ratios [10,12,13].

Thinking about this theme, Roque and collaborators (2019) developed and characterized a formulation of long-circulating and fusogenic

\* Correspondence to: Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, P.O. Box: 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail addresses: [itabra2001@yahoo.com.br](mailto:itabra2001@yahoo.com.br), [monicacristina@ufmg.br](mailto:monicacristina@ufmg.br) (M.C. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2021.112307>

Received 15 August 2021; Received in revised form 29 September 2021; Accepted 5 October 2021

Available online 13 October 2021

0753-3322/© 2021 Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

liposomes co-encapsulating PTX and DXR in the molar ratio 1:10 (LCFL-PTX/DXR) for the treatment of breast cancer. The formulation has chemical and physicochemical characteristics suitable for intravenous administration and is capable of co-encapsulating the drugs in the pre-established molar ratios. Besides LCFL-PTX/DXR showed to be stable for 30 days, maintaining their size characteristics ( $244.4 \pm 28.1$  nm), polydispersity index (PI) ( $0.29 \pm 0.01$ ), zeta potential (PZ) ( $-4.97 \pm 0.64$  mV), and drug retention content ( $74.0 \pm 2.0\%$  for PTX and  $89.6 \pm 12.3\%$  for DXR). Thus, in this work we investigated the step of the preclinical evaluation of a new pharmaceutical formulation related to the toxicological study. The lack of data related to the effect of the simultaneous administration of DXR and PTX in healthy individuals led us to develop studies of toxicity of LCFL-PTX/DXR. In addition, toxicity studies are an important step when the aim is to introduce new pharmaceutical products for clinical use [14,15]. Preclinical toxicological tests allow a scientific basis to predict the main side effects and the consequences of an overdose for further escalation in humans [16].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) and 1,2 distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(poly-ethyleneglycol) 2000 (DSPE-PEG<sub>2000</sub>) were supplied by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Cholesterol hemisuccinate (CHEMS), doxorubicin (DXR), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) sodium salt, sodium chloride, sodium hydroxide and Cremophor EL were obtained from Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA). Paclitaxel (PTX) was supplied by Quiral Quimica do Brasil S.A (Juiz de Fora, Brazil). All other chemicals used in this study were of analytical grade. The female Balb/c mice were obtained from Centro de Bioterismo (CEBIO/UFMG, Belo Horizonte, Brazil) and the treatments to which they were submitted were approved by Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ UFMG, Belo Horizonte, Brazil) under the protocol number 39/2019.

### 2.2. Liposome preparation

LCFL-PTX/DXR was prepared by the lipid film hydration technique using a rotary evaporator Buchi Labortechnik AG CH-9233, model R-210, coupled to a V-700 vacuum pump (Flawil, Switzerland). For this, chloroform aliquots of DOPE, CHEMS, and DSPE-PEG<sub>2000</sub> (total lipid concentration equal to 10 mM, molar proportions equal to 5.7: 3.8: 0.5, respectively) and PTX (concentration equal to 0.25 mg/mL) were transferred to a round bottom flask and subjected to evaporation in a water bath at 50 °C to remove the solvent. The lipid film obtained was then kept for 1 h under an atmosphere of chloroform for better dispersion of PTX in the lipids, according to the technique known as annealing [17].

An aliquot of the 0.1 M NaOH solution was added to the film to promote complete ionization of CHEMS, and the subsequent formation of a lamellar structure. The lipid film was hydrated with a solution of ammonium sulfate (300 mM, pH 7.4) preheated in a 50 °C water bath. The mixture was kept in the ultrasonic bath for 10 min to hydrate the lipid film. The non-encapsulated PTX was then separated from the liposomes by centrifugation at 3000 rpm, at 25 °C, for 10 min (Heraeus Multifuge X1R centrifuge, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA). To remove the non-encapsulated ammonium sulfate, the liposomes were kept on dialysis for 24 h against HEPES buffered saline solution (HBS), pH 7.4. The concentration of PTX in these liposomes was determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

After determining the PTX concentration, a super concentrated solution of DXR (34 mg/mL) was incubated with the liposomes to obtain a 1:10 molar ratio of PTX and DXR respectively. DXR encapsulation was performed by remote loading, conducted by a gradient of

transmembrane sulfate. The liposomes containing PTX were kept in contact with DXR for 2 h at 25 °C, and then dialyzed against HEPES buffered saline solution (HBS), pH 7.4, for 24 h, to remove unencapsulated DXR [6].

### 2.3. Determination of the content of PTX and DXR in LCFL-PTX/DXR

To determine the encapsulation percentage of the drugs in LCFL-PTX/DXR, chromatography and spectrometry methods were used. The concentration of PTX was measured using the chromatograph composed of a Model 515 pump, a Model 717 Plus autoinjector, and a Model 2996 DAD detector (Waters Instruments, Milford, USA), controlled by Empower software, version 2.0. The liposomal vesicles were disrupted using isopropyl alcohol in a volume ratio of 1:2 and later diluted in a mixture of acetonitrile:water (55:45 v/v). This dispersion was filtered through a 0.45 µm Millex HV filter (Millipore, Billerica, MA, USA) and injected in the chromatographic apparatus. For analysis, a Hibar 250-4 LiChrospher 100RP-18, 25 cm × 4 mm, 5 µm column (Merck, Darmstadt, Germany) was used. The eluent system consisted of acetonitrile:water (55:45) in a flow equal to 1.2 mL/min. The injection volume was 10 µL and the running time was 8 min. The eluate was detected at a wavelength equal to 227 nm at room temperature [18]. The PTX encapsulation percentage (EP) was calculated according to the following equation:

$$EP = \frac{[\text{amount of PTX in purified liposomes}] \times 100}{[\text{amount of PTX in non - purified liposomes}]}$$

UV-VIS spectrophotometry (Thermo evolution 201 UV visible spectrophotometer) was used as the method for quantification of DXR in the liposomes. The analyzes were performed evaluating the absorbance at a wavelength equal to 480 nm [19]. Regression equation and linearity ( $r^2$ ) were  $y = 0.01814x + 0.01119$  and 0.997, respectively. The accuracy was found to be between 98% and 104% ( $n = 3$ ) and samples of blank liposomes showed no absorbance at the wavelength used [6]. Initially, the vesicles were opened with isopropyl alcohol at a ratio of 1:2, respectively, and then the preparations were diluted in HEPES buffered saline (HBS), pH 7.4. The DXR encapsulation percentage (EP) was calculated according to the following equation:

$$EP = \frac{[\text{amount of DXR in purified liposomes}] \times 100}{[\text{amount of DXR in non - purified liposomes}]}$$

### 2.4. Determination of size, polydispersity index, and zeta potential of LCFL-PTX/DXR

The diameter of the vesicles and the polydispersity index (PI) were determined by dynamic light scattering (DLS). The measurements were performed at a temperature of 25 °C, using a 90° laser incidence angle. The zeta potential ( $\zeta$ ) of the vesicles was determined by DLS associated with electrophoretic mobility. To perform all measurements, 30 µL of liposomes was diluted in 1 mL of HEPES buffered saline (HBS), pH 7.4, and evaluated on the Zetasizer Nano ZS90 equipment (Malvern, England).

### 2.5. Acute toxicity study

The assessment of acute toxicity *in vivo* was carried out according to the recommendations of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 423 [20], adapted for formulations for parenteral use. It is worth mentioning that the OECD standards were established for an acute toxicity study after administration of the substances orally, with the recommended doses equal to 5, 50, 300, and 2000 mg/kg. Considering the intravenous administration route, the initial dose proposed in this study was 20.8 mg/kg of the total drugs (PTX + DXR) administered. In previous studies, our research group found that the maximum tolerated dose of DXR encapsulated in

liposomes composed by DOPE, CHEMS, and DSPE-PEG2000 (5.8: 3.7: 0.5 molar ratio, respectively) was greater than 15 mg/kg [21]. Therefore, based on this study, we chose to use 18 mg/kg of DXR and 2.8 mg/kg of PTX to get a 1:10 molar ratio, respectively.

The parameters evaluated for the determination of toxicity were behavioral observation, body weight, water and feed consumption, mortality, biochemical and hematological analysis, histopathological evaluation, and electrocardiographic analysis. The experimental model adopted was healthy female Balb/c mice aged between 8 and 9 weeks and weighing approximately 20 g. The animals were divided into 8 groups and the treatments received by the groups were NaCl 0.9% (w/v) solution (saline), free PTX/DXR, and LCFL-PTX/DXR in different dosages, as shown in Table 1.

In all groups, the formulations were administered in a single dose intravenously (tail vein) and the animals were observed daily for a period of 14 days. The mice were weighed and the water and feed consumption evaluated every 3 days. After the observation period, the animals were anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) intraperitoneally. The blood was collected by puncture of the brachial plexus for hematological and biochemical exams.

Initially, each group was composed of 3 animals. If the tested dose was able to cause death in 2 or more animals of the group, it was considered that the LD50 by the animals was lower than the tested one. Therefore, it was necessary to start new tests at a lower dose, according to the OECD guidelines. However, when the assessed dose caused one or no death, the recommendation followed was to repeat the observations with 3 animals using the same dose. Thus, each group consisted of 6 animals. Confirmation of the results it meant that the tested dose was not yet the LD50, and the OECD guidance recommends continuing the study with a new group using a higher dose. The figure with the treatment scheme used to assess acute toxicity in this work is in the Appendix A.

## 2.6. Hematology and biochemistry analysis

For hematological analysis, the animal blood was collected in tubes containing the anticoagulant (EDTA 0.1M) and inserted into the automated hematological analyzer HEMOVET 2300 (Hemovet, São Paulo, Brazil). Hematological parameters related to hematocrit, erythrocytes, hemoglobin and also white blood cells were evaluated for each group.

For biochemical analysis, the blood was centrifuged (3000 rpm, 15 min) and the plasma obtained was collected. The tests were carried out on the Bioplus BIO-2000 semiautomatic analyzer (Bioplus, São Paulo, Brazil) using commercial kits (Labtest, Lagoa Santa, Brazil). Renal function was assessed by measuring urea and creatinine; liver function by determining the activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST); and cardiac injury by measuring the creatine kinase activity – (CK-MB).

## 2.7. Histology

Liver, kidneys, sternum, spleen, lungs, and heart were collected for histopathological analysis. Samples were fixed in phosphate-buffered formalin 10% (pH = 7.4) for 24–48 h, dehydrated in alcohol, and included in paraffin blocks. 4 µm sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin. The slides were evaluated by trained pathologists and images were captured by a camera connected to an optical microscope (Olympus BX-40; Olympus, Tokyo, Japan).

**Table 1**  
Physicochemical characteristics of LCFL-PTX/DXR.

[PTX] mg/mL	[DXR] mg/mL	DXR/PTX molar ratio	Mean diameter (nm)	PI	Zeta potential (mV)
0.15 ± 0.02	0.96 ± 0.28	10.10 ± 1.81	211.8 ± 16.3	0.29 ± 0.02	-7.39 ± 2.20

PTX: paclitaxel; DXR: doxorubicin; PI: polydispersity index. The results are presented as mean ± standard deviation from the mean (n = 10).

## 2.8. Electrocardiographic analysis

In order to obtain the electrocardiograms (ECG), all animals were anesthetized with closed loop inhalation anesthesia (VetCase®, Sumare, São Paulo, Brazil) with isoflurane (Isoflurine® 2.5% for induction and 1.5% for maintenance). ECG monitoring (ECG-PC VET, Tecnologia Eletrônica Brasileira SA – TEB®, São Paulo, Brazil) was maintained for 1 min after stabilization. The animals were placed in the supine position and the electrodes were placed on the thoracic and pelvic limbs. Heart rate, duration, amplitude, and interval of electric waves were evaluated. The experimental groups evaluated were animals treated with the LD50 lower limit dose of the combination of free PTX/DXR (20.8 mg/kg), determined in the previous acute toxicity study. As a counterpoint, the group treated with the formulation LCFL-PTX/DXR, at the same concentration, was also evaluated. In addition, the electrocardiograms of mice that received the LD50 lower limit dose for liposomes (28.9 mg/kg) were observed. The following parameters were analyzed: QT interval (measured from the beginning of the QRS complex to the end of the T-wave), ST interval (measured from the end of QRS complex to beginning of T-wave), QRS complex (measured from the beginning of the Q-wave to the end of the S-wave) and the RR interval (interval between two successive R-waves and used for the determination of heart rate  $HR = 60/RR$ ). QT interval was corrected by HR using Fridericia's formula ( $QTc = QT/(RR)^{1/3}$ ) [21,22].

## 3. Statistical analysis

The normality and homoscedasticity of the variables were verified by the Shapiro-Wilk and Brown-Forsythe tests, respectively. Regarding the analysis of the treatments, the One-way ANOVA test with Tukey's post-test was used to verify if the means of the groups differed significantly. If the data were not normal or homoscedastic, the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test was used for the same purpose. The Two-way ANOVA test with Tukey's post-test was also used to relate two different independent variables over one dependent variable. Values of  $p < 0.05$  were considered significant. The analyzes were performed using the Graph-Pad Prism software (version 9.00, La Jolla, California, USA).

## 4. Results

### 4.1. Preparation and characterization of LCFL-PTX/DXR

LCFL-PTX/DXR followed the pattern developed by Roque et al. [6], co-encapsulating PTX and DXR in the 1:10 synergistic molar ratio, maintaining an adequate diameter close to 200 nm with low polydispersity and slightly negative zeta potential, but close to neutrality as shown in Table 2.

### 4.2. Acute toxicity study

#### 4.2.1. Evaluation of animal mortality and morbidity

The evaluation of the LD50 by the animals of the PTX/DXR drug combination (molar ratio 1:10 respectively) started with 20.8 mg/kg (2.8 mg/kg PTX + 18 mg/kg DXR), both for the combination of free drugs and for the LCFL-PTX/DXR formulation. For the combination of free drugs at this dose, marked piloerection was observed in all animals, with the presence of signs of diarrhea and ascites in one of them. For the first 3 mice evaluated, there was only 1 death on the 9th day of the

**Table 2**

Experimental groups evaluated in acute toxicity studies for biochemical, hematological analysis and observations of mortality and morbidity.

Formulation	Groups	Dosage of drug (mg/kg)		Total dose of drugs (mg/kg)
		PTX	DXR	
Free PTX/DXR	1	2.8	18	20.8
	2	3.1	20	23.1
LCFL-PTX/DXR	3	2.8	18	20.8
	4	3.1	20	23.1
	5	3.4	22	25.4
	6	3.9	25	28.9
	7	4.7	30	34.7
Control (saline)	8	–	–	–

study. According to the experimental planning shown in the [Appendix A](#), this step was repeated with three more animals, and we verified one death on the 12th day of the experiment. Thus, according to the OECD 423 guideline, a higher dose of the combination of free drugs should be tested. The dose of 23.1 mg/kg (3.1 mg/kg PTX + 20 mg/kg DXR) was injected in mice. After 3 days of application of the drugs, piloerection and lethargy of the animals were observed, resulting in 2 deaths on the 7th day of the study. Therefore, according to OECD 423 rules, the LD50 for free PTX/DXR treatment in the 1:10 molar ratio is between 20.8 and 23.1 mg/kg for this experimental model. Thus, 23.1 mg/kg was the last dose tested for the combination of free drugs.

The studies with LCFL-PTX/DXR also started with a dose of 20.8 mg/kg and due to the absence of deaths or morbidities, they evolved by a higher number of tested doses, as shown in [Table 1](#) and the diagram in the [Appendix A](#). For this treatment, up to a dose of 28.9 mg/kg (3.9 mg/kg PTX + 25 mg/kg DXR), no death was observed. However, for the doses of 25.4 mg/kg (3.4 mg/kg PTX + 22 mg/kg DXR) and 28.9 mg/kg (3.9 mg/kg PTX + 25 mg/kg DXR) there was loss of weight of the animals varying between 8% and 10% in the first 3 days after administration of LCFL-PTX/DXR. However, in the following days the recovery of the weight occurred. For the dose of 28.9 mg/kg, mild piloerection and the formation of mild to moderate ascites were seen in most of these animals.

According to these results, we repeated the experiments for each group treated with LCFL-PTX/DXR at doses of 20.8, 23.1, 25.4 and 28.9 mg/kg using 3 more animals per treatment, and the observations were confirmed. It was concluded that the treatment with doses higher than 20.8 mg/kg of the drugs PTX and DXR was only possible with the use of liposomes, since no morbidity and mortality were seen in the animals.

We followed the acute toxicity study for LCFL-PTX/DXR treatment, increasing the dose to 34.7 mg/kg (4.7 mg/kg PTX + 30 mg/kg DXR). However, it was necessary to interrupt the study and sacrifice the animals on the 4th day after intravenous administration of the formulation. Severe signs of morbidity were detected, such as intense weight loss

**Table 3**

Hematological parameters for Balb/c mice treated with different doses of LCFL-PTX/DXR and one free combination of PTX and DXR.

Blood components	Control	Free PTX/DXR 20.8 (mg/kg)	LCFL-PTX/DXR (mg/kg)			
			20.8	23.1	25.4	28.9
WBC (cel mm <sup>3</sup> × 10 <sup>3</sup> )	4.78 ± 1.34 <sup>a</sup>	6.93 ± 1.29 <sup>a</sup>	5.50 ± 1.27 <sup>a</sup>	4.55 ± 2.08 <sup>a</sup>	6.92 ± 1.82 <sup>a</sup>	4.55 ± 1.72 <sup>a</sup>
NON GRANULOCYTES (%)	67.53 ± 2.73 <sup>a</sup>	63.73 ± 10.42 <sup>ab</sup>	53.22 ± 8.95 <sup>abc</sup>	51.25 ± 10.68 <sup>bc</sup>	47.58 ± 11.72 <sup>bc</sup>	42.47 ± 6.81 <sup>c</sup>
GRANULOCYTES (%)	32.47 ± 2.73 <sup>a</sup>	36.27 ± 10.42 <sup>ab</sup>	46.78 ± 8.95 <sup>abc</sup>	48.75 ± 10.68 <sup>bc</sup>	52.42 ± 11.72 <sup>bc</sup>	57.53 ± 6.81 <sup>c</sup>
RBC (%)	6.67 ± 0.18 <sup>a</sup>	6.01 ± 0.51 <sup>ab</sup>	6.37 ± 0.28 <sup>ab</sup>	5.86 ± 0.34 <sup>b</sup>	6.01 ± 0.46 <sup>b</sup>	5.83 ± 0.34 <sup>b</sup>
HGB (cel mm <sup>3</sup> × 10 <sup>6</sup> )	12.95 ± 0.45 <sup>a</sup>	11.30 ± 1.45 <sup>ab</sup>	12.02 ± 0.72 <sup>ab</sup>	11.08 ± 0.87 <sup>b</sup>	11.23 ± 1.97 <sup>b</sup>	10.85 ± 0.72 <sup>b</sup>
HCT (%)	32.82 ± 1.45 <sup>a</sup>	30.07 ± 3.11 <sup>ab</sup>	31.53 ± 1.44 <sup>ab</sup>	29.00 ± 1.97 <sup>b</sup>	29.25 ± 2.49 <sup>b</sup>	28.03 ± 1.78 <sup>b</sup>
RDW (%)	14.20 ± 0.39 <sup>a</sup>	14.47 ± 0.40 <sup>a</sup>	14.77 ± 0.48 <sup>a</sup>	14.30 ± 0.17 <sup>a</sup>	14.67 ± 0.60 <sup>a</sup>	14.08 ± 0.39 <sup>a</sup>
PLT (cel mm <sup>3</sup> × 10 <sup>3</sup> )	288.00 ± 27.34 <sup>a</sup>	271.50 ± 43.13 <sup>ac</sup>	448.20 ± 64.40 <sup>b</sup>	566.80 ± 79.68 <sup>d</sup>	478.00 ± 45.66 <sup>bd</sup>	396.60 ± 61.51 <sup>bc</sup>

WBC: means white blood cells; RBC: red blood cells; HGB: hemoglobin; HCT: hematocrit; RDW: red cell distribution width; PLT: platelet. The results are presented as mean ± standard deviation from the mean (n = 6). Different letters represent a significant difference between the parameters evaluated (p < 0.05). Data were evaluated by One-way ANOVA (Tukey's post-test), if they were abnormal, the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test was used.

reaching 15%, piloerection, signs of diarrhea, and cyanotic tail. After desiccation of the animals, the intestines were found dilated with accumulation of feces. Thus, the LD50 for LCFL-PTX/DXR treatment was the doses range equivalent to 28.9–34.7 mg/kg of drugs.

#### 4.2.2. Hematological analysis

The results for the hematological exams are shown in [Table 3](#). The hematological examination revealed no changes in the distribution of red blood cells (RDW). However, hematocrit (HCT), the amount of hemoglobin per blood volume (HGB), and the number of red blood cells (RBC) showed a slight reduction for groups treated with higher concentrations of drugs in liposomes (23.1, 25.6, and 28.9 mg/kg).

The evaluation of white blood cells showed that the amount of granulocytes (neutrophils, eosinophils and basophils) increased the LCFL-PTX/DXR treated group with the highest doses (23.1, 25.6 and 28.9 mg/kg). However, the amount of agranulocytes (lymphocytes and monocytes) decreased in these same groups, when compared to the control group. This opposite behavior resulted in the maintenance of the total white blood cell count (WBC) equal to the control group. The other groups evaluated as free PTX/DXR and LCFL-PTX/DXR (20.8 and 23.12 mg/kg) also had no significant difference in WBC values compared to the control group.

The amount of platelets (PLT) increased significantly with the increase of the dosage of the LCFL-PTX/DXR treatment administered to mice. This increase appears to be the result of a reactive thrombocytosis, a clinical disorder that stimulates the bone marrow to produce excess platelets.

#### 4.2.3. Biochemical analysis

The results for the biochemical analysis are shown in [Table 4](#). It was observed that the doses used did not cause changes in renal function, since there was no significant difference in the concentration of urea and creatinine between the groups when compared to the control.

Increased serum levels of ALT and AST may indicate the development of drug-induced acute liver injury in animals [21,23]. In this study, serum ALT levels for all groups treated with LCFL-PTX/DXR, regardless of the dose administered (20.8, 23.1, 25.4, or 28.9 mg/kg), were equal to those determined for the group treated with free PTX/DXR (20.8 mg/kg) at the dose equivalent to the lowest administered in liposomes. In addition, the groups treated with LCFL-PTX/DXR (23.1, 25.4, and 28.9 mg/kg), including the highest dose tested, had serum ALT levels equivalent to the control group. This confirms that liposomal formulations at the doses cited are not capable of producing sufficient liver toxicity to elevate ALT. On the other hand, the AST enzyme serum levels showed to be high for all treatments performed with LCFL-PTX/DXR (20.8, 23.1, 25.4, or 28.9 mg/kg) compared to the control group. The CK-MB enzyme cardiotoxicity marker level presented elevated only for the group treated with LCFL-PTX/DXR at the dose of 25.4 mg/kg, which stood out from the others.

**Table 4**

Biochemical parameters for Balb/c mice treated with different doses of LCFL-PTX/DXR and one free combination of PTX and DXR.

Biochemical parameters	Control	Free PTX/DXR 20.8 (mg/kg)	LCFL-PTX/DXR (mg/kg)			
			20.8	23.1	25.4	28.9
CREATININE (mg/dL)	0.36 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.08 <sup>a</sup>
UREA (mg/dL)	48.16 ± 4.65 <sup>a</sup>	49.47 ± 2.64 <sup>ab</sup>	46.11 ± 2.52 <sup>ab</sup>	36.03 ± 5.20 <sup>b</sup>	42.67 ± 6.24 <sup>ab</sup>	53.19 ± 10.08 <sup>a</sup>
ALT (U/L)	28.64 ± 2.79 <sup>a</sup>	32.88 ± 2.19 <sup>ab</sup>	57.10 ± 18.85 <sup>b</sup>	49.06 ± 14.83 <sup>ab</sup>	47.00 ± 16.81 <sup>ab</sup>	46.97 ± 12.04 <sup>ab</sup>
AST (U/L)	36.14 ± 7.90 <sup>a</sup>	67.22 ± 36.23 <sup>ac</sup>	126.90 ± 21.99 <sup>b</sup>	125.00 ± 28.96 <sup>b</sup>	105.50 ± 29.83 <sup>bc</sup>	91.23 ± 12.23 <sup>bc</sup>
CK-MB (U/L)	37.25 ± 9.33 <sup>a</sup>	53.58 ± 2.95 <sup>ab</sup>	45.55 ± 1.40 <sup>ab</sup>	55.64 ± 14.89 <sup>ab</sup>	70.01 ± 18.83 <sup>b</sup>	50.24 ± 17.27 <sup>ab</sup>

ALT: means alanine aminotransferase; AST: means aspartate aminotransferase; CK-MB: means creatine kinase MB isoform. The results are presented as mean ± standard deviation from the mean (n = 6). Different letters represent a significant difference between the parameters evaluated ( $p < 0.05$ ). Data were evaluated by One-way ANOVA (Tukey's post-test), if they were abnormal, the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test was used.

#### 4.2.4. Histology

Histological analyses were performed with all groups evaluated in hematological and biochemical tests for both free drug and liposome treatments. Thus, the groups treated with the combination of free PTX/DXR in the total dose of 23.1 mg/kg and the group treated with LCFL-PTX/DXR in the total dose of 34.7 mg/kg were also desiccated and the organs and tissues were evaluated.

The analysis of cardiac tissues revealed that for treatments with free drugs at the (20.8 mg/kg) and at a higher dose (23.1 mg/kg), there was a start of vacuolization of cardiomyocytes, indicating discrete multifocal degeneration, which was not observed for treatments involving liposomes in any of the tested doses. Representative photomicrographs of the heart can be seen in Fig. 1A–C. Representative images of the control group (A) were placed from left to right, followed by free PTX/DXR treatments at doses of 20.8 (B) and 23.1 (C) mg/kg, in which the arrows indicate the presence of small cytoplasmic vacuoles in the cardiomyocytes.

The analysis of bone marrow showed changes only at the highest doses of liposomes administered (28.9 and 34.7 mg/kg), whose photomicrographs are shown in Fig. 1D–F. Photo (D) is representative of the control group, without histological changes. For 28.9 mg/kg, there was a reduction in cellularity (E) that evolved to severe hypocellularity in the higher dose of 34.7 mg/kg (F).

The liver in all treatments presented mild diffuse hydropic degeneration which worsened to mild diffuse steatosis at the highest dose of LCFL-PTX/DXR treatment (34.7 mg/kg). Fig. 2A–C illustrates these findings, where (A) represents the control group, which is succeeded by a photo representative of the groups that received free PTX/DXR (B). The arrows indicate places with apparent hydropic degeneration. Photo

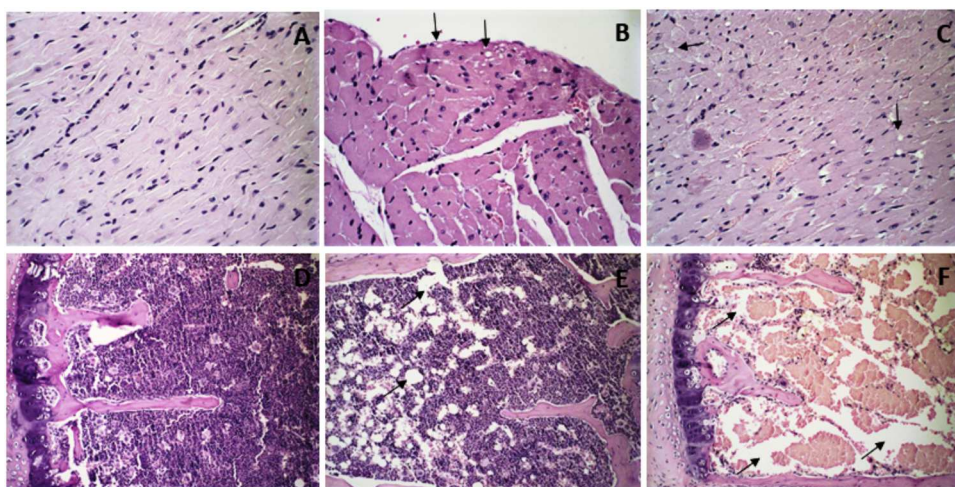
(C) represents the treatment with LCFL-PTX/DXR at the dose of 34.7 mg/kg, in which the arrows show the presence of steatosis.

Animal spleen photomicrographs are available in Fig. 2D–F, starting with the control group (D). The image (E) represents the spleen of mice treated with free drugs (23.1 mg/kg), and the occurrence of congestion was observed since the red pulp was increased due to the large presence of red blood cells as indicated by the arrow. The image (F) shows the spleen of mice treated with free drugs (34.7 mg/kg). The presence of apoptotic corpuscles in the white pulp of the spleen, with the appearance of a “starry sky”, and some corpuscles are identified by arrows. There were no changes in the lungs and kidneys of the animals treated with 20.8 mg/kg of free PTX/DXR or LCFL-PTX/DXR when compared to the control group (data not shown).

#### 4.2.5. Electrocardiographic analysis

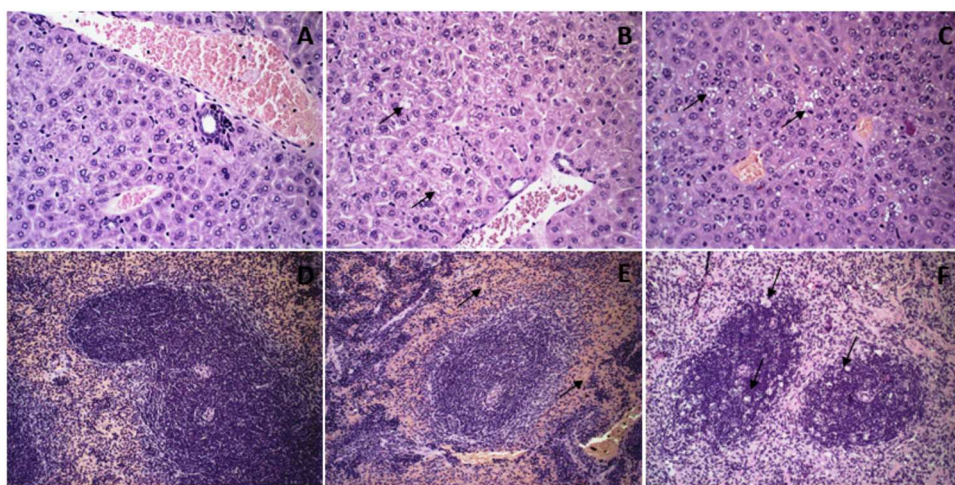
Due to the death of a portion of animals on the 14th day of the experiment, the analysis of the influence of treatments and time on the parameters heart rate and ST, QRS, and QTc intervals was evaluated only until 7th day. Fig. 3 shows that the time interval influenced only the LCFL-PTX/DXR treatment at the dose of 28.9 mg/kg, which was different between day 0 and 7 ( $p = 0.0222$ ) for the QTc interval, showing its increase during this period (from  $106.15 \pm 10.85$  ms on day 0 to  $125.31 \pm 19.55$  ms on day 7). The prolongation of the QT interval can be seen in the electrical ECG signals also present in Fig. 3. Additionally, a statistical difference was observed between the treatments free PTX/DXR at dose of 20.8 mg/kg and LCFL-PTX/DXR treatment at dose of 28.9 mg/kg in this same parameter ( $p = 0.0208$ ).

When comparing the influence of treatments on the same parameters mentioned on the 14th day (Fig. 4), it was possible to observe that there



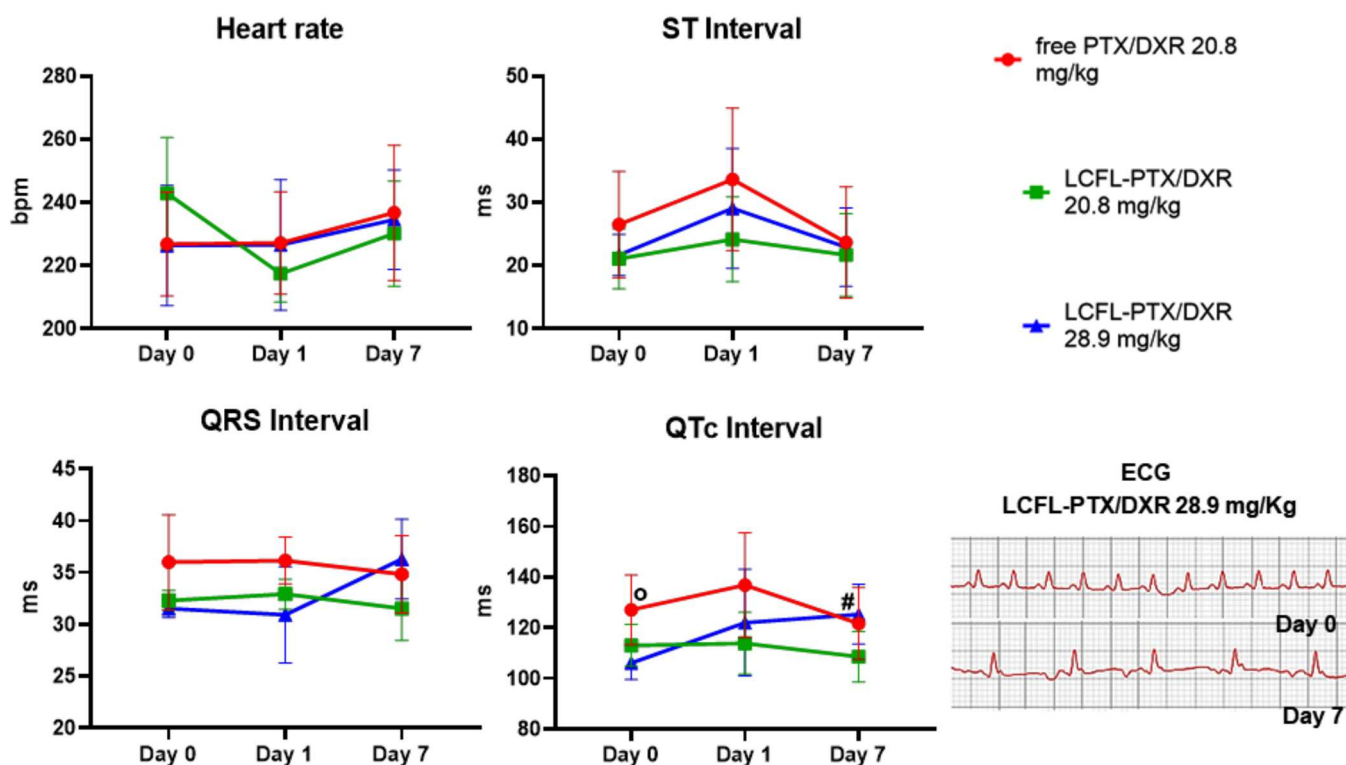
**Fig. 1.** Histological sections of female Balb/c mice heart and bone marrow. (A–C) Photomicrographs of the heart. (A) Represents the control group and the groups treated with all the tested doses of LCFL-PTX/DXR (20.8, 23.1, 25.4, 28.9, and 34.7 mg/kg). Cardiac fibers and cardiomyocytes without histological changes. B and C represent the groups treated with the combination of free PTX/DXR at doses of 20.8 and 23.1 mg/kg respectively. The arrows indicate the regions of cardiomyocyte vacuolization and discrete multifocal degeneration. (D–F) Bone marrow photomicrographs. D represents the control group and the groups treated with all the tested doses of free PTX/DXR (20.8 and 23.1 mg/kg) and the groups treated with LCFL-PTX/DXR (20.8, 23.1, and 25.4 mg/kg). The cells present in the medulla do not present histological changes. (E) represents the group treated with LCFL-PTX/DXR at dose of 28.9 mg/kg. The arrows indicate a reduction of cellularity in the region. (F) shows the bone marrow of mice treated with LCFL-PTX/DXR at

highest dose (34.7 mg/kg). The reduction of the cellularity indicated by the arrows is even more drastic.



**Fig. 2.** Histological sections of female Balb/c mice liver and spleen. (A–C) liver photomicrographs. (A) represents the control group without histological changes in the hepatocytes. (B) represents all treatments with free PTX/DXR (20.8 and 23.1 mg/kg) and also treatments with LCFL-PTX/DXR at doses of 20.8, 23.1, 25.4, and 28.9 mg/kg. These treatments led to discrete diffuse hydropic degeneration indicated by the arrows. (C) represents the group treated with the highest dose of LCFL-PTX/DXR (34.7 mg/kg). In this specific group, multifocal steatosis started, as can be seen in the regions indicated by the arrows. (D–F) contains the spleen photomicrographs. (D) represents the control group without histological changes. (E) represents the group that received treatment with free PTX/DXR in the highest dose (23.1 mg/kg). There is an increase in the red pulp indicated by the arrow, with an agglomeration of red blood cells. (F) represents the group that received the highest dose of LCFL-PTX/DXR (34.7 mg/kg). The formation of

apoptotic corpuscles can be observed as indicated by the arrow and is known as “starry sky.”.



**Fig. 3.** Determination of cardiographic parameters for female balb/c mice after 7 days of treatment with LCFL-PTX/DXR and free PTX/DXR. The results are presented as mean ± CI. The data were evaluated by Two-way ANOVA test followed by Tukey’s post-test at a significance level of 5%. # indicates a statistically significant difference for the treatment LCFL-PTX/DXR at dose of 28.9 mg/Kg between days 0 and 7. ° indicates a statistically significant difference between the groups free PTX/DXR at dose of 20.8 mg/kg and LCFL-PTX/DXR at dose of 28.9 mg/kg on day 0.

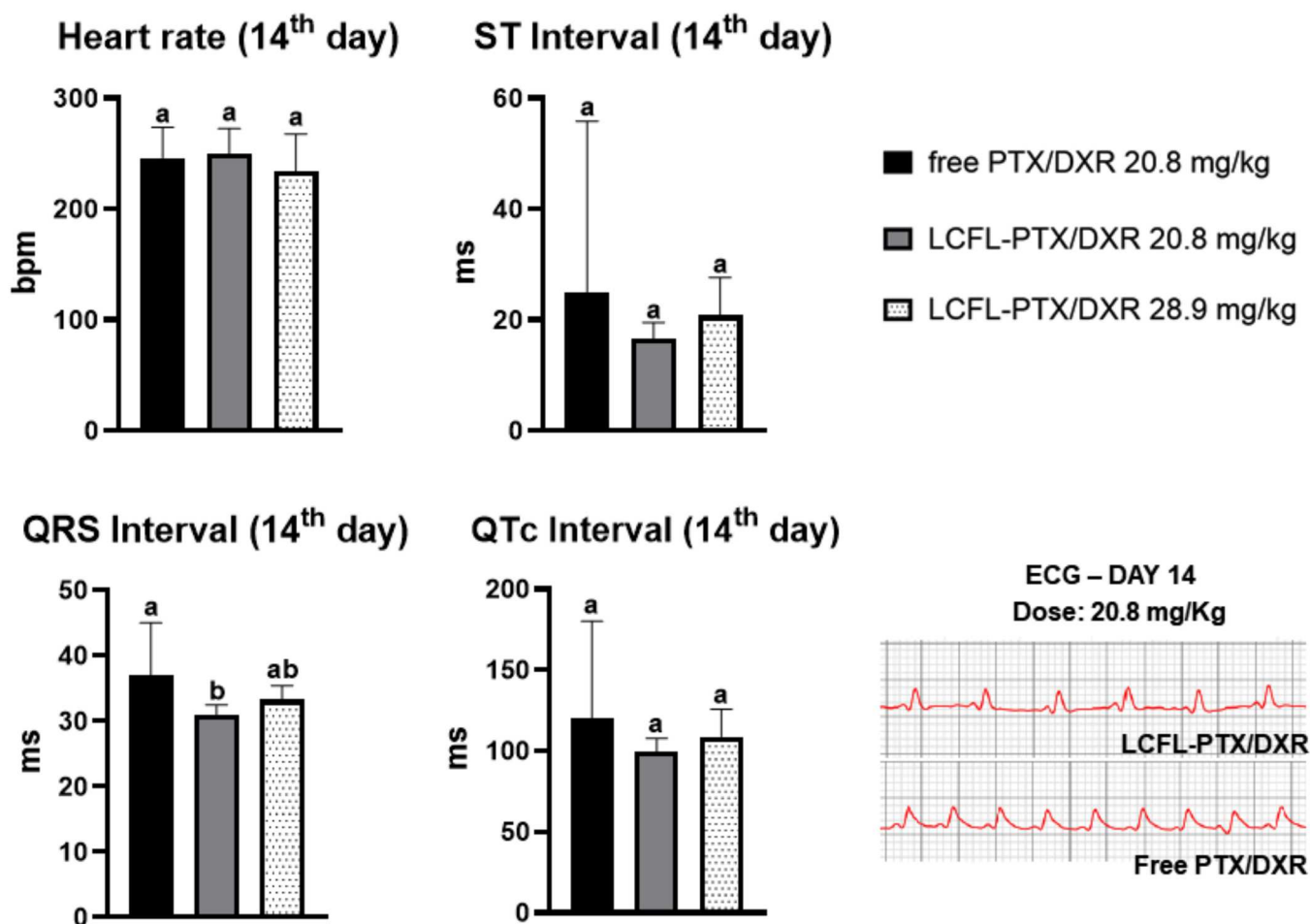
was a statistical difference only for the QRS interval between treatments free PTX/DXR at dose of 20.8 mg/kg and LCFL-PTX/DXR at the same dose ( $37.00 \pm 5.01$  ms and  $30.83 \pm 2.62$  ms, respectively;  $p = 0.0177$ ). In this case, the prolongation of the QRS interval can be seen in the electrical ECG signals present in Fig. 4.

Fig. 5 shows the ratio between live animals at the end of the experiment and the total number of animals used at the beginning of the experiment. It is remarkable how the treatment with free PTX/DXR impacted the animals’ survival, resulting in a higher number of deaths,

when compared with the liposomal formulation for both concentrations of 20.8 and 28.9 mg/kg.

### 5. Discussion

LCFL-PTX/DXR proved to be of medium size and homogeneous average size distribution, being suitable for intravenous administration [6,24–26]. The encapsulation of the drugs PTX and DXR in the molar ratio (1:10) is adequate for breast cancer therapy and the zeta potential



**Fig. 4.** Determination of cardiographic parameters for female balb/c mice after 14 days of treatment with LCFL-PTX/DXR and free PTX/DXR. The results are presented as mean  $\pm$  CI. The data were evaluated by ANOVA One-way test followed by Tukey's post-test for the heart rate variable; and for the variables QRS, ST, and QTc, the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test was used. All tests were performed at a significance level of 5%. Different letters indicate a statistically significant difference between treatments.

close to neutrality is already expected for PEG-coated liposomes [6,26,27]. Thus, the formulation of LCFL-PTX/DXR is suitable for toxicity studies.

The lack of data on the effect of simultaneous administration of DXR and PTX in normal tissue has led us to develop studies of toxicity of LCFL-PTX/DXR. In addition, toxicity studies are an important step when the aim is to introduce new pharmaceutical products for clinical use [14,15]. Preclinical toxicological tests allow a scientific basis to predict the main side effects and the consequences of an overdose for further escalation in humans [16].

Initially, when evaluating only the morbidity and mortality of the animals, it is already clear that the combination of the free PTX/DXR drugs has greater toxicity compared to the liposomal formulation. This fact is true even when the dose of the liposomal formulation exceeds 8.1 mg/kg of the administration of free PTX/DXR drugs. This therapeutic benefit reduced the toxicity with a consequent increase in LD50 range. This occurs due to the different biodistribution profile of liposomes when compared to free drugs [28]. The intrinsic properties of liposomes, such as particle size, charge, and lipid composition, can produce changes in the biodistribution of drugs, leaving them prone to certain organs or tissues. In addition, lipid bilayers facilitate the transport, cell and tissue uptake, and intracellular processing of vesicles [28–30].

Given the possibility of administering free PTX/DXR only in the lowest dose of the study, due to the early mortality of mice when exposed to a dose of (23.1 mg/kg), the proof of toxic effects on organs,

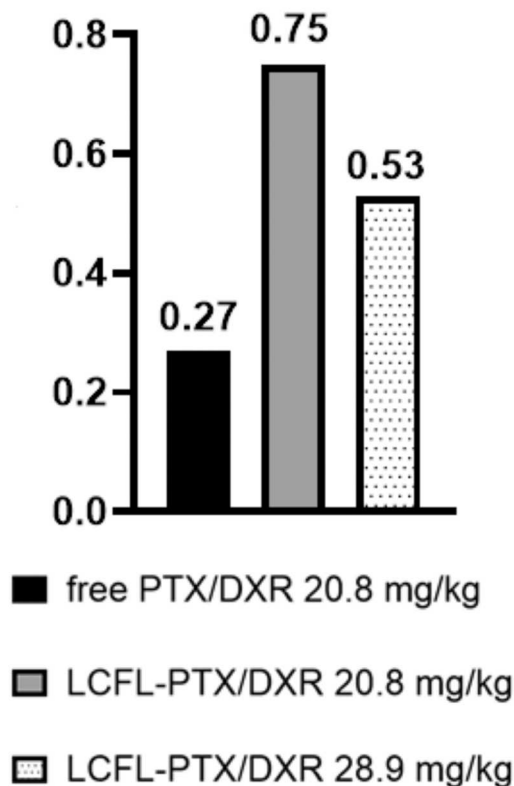
tissues, and systems of mice was made difficult for this group. The visualization of these effects became viable only at the highest doses of drugs, which were possible to administer only through encapsulation in liposomes. Although with slight signs of apparent toxicity, the animals that received the highest doses of LCFL-PTX/DXR remained alive and without morbidities.

Hematological evaluation showed the occurrence of mild cytopenia and an increase in the platelet production after administration of higher doses of LCFL-PTX/DXR. These findings may be due to the presence of DXR, which can interrupt red blood cell production and cause blood clotting disorders and leukopenia [21,31]. This type of toxicity affects the bone marrow, as seen in histology images. From the administration of the higher doses of LCFL-PTX/DXR, hypocellularity was detected in the medulla (sternum), which also affected the production of blood cells. For these doses, the spleen also showed signs of toxicity, evidenced as areas of apoptosis in the white pulp. This region is a zone for the production of lymphocytes, and such lesions may contribute to the cytopenia found.

In addition to renal elimination, DXR and PTX are mostly eliminated via the hepatobiliary route; therefore, the liver is an important target for injury [32–35]. Despite this, the histological analysis of the groups treated in this study, the animals that received treatments with LCFL-PTX/DXR at doses lower than LD50 range showed only small degenerative liver lesions without a significant increase in the activity of serum ALT, which is the most specific enzyme to indicate liver damage, being found predominantly in the cytoplasmic portion of hepatocytes



## Ratio of live animals at the end of the study



**Fig. 5.** Determination of the ratio of live animals at the end of study of acute toxicity. The ratio of live animals at the end of the study of acute toxicity was calculated by dividing the number of live animals at the end of the experiment by the total number of animals at the beginning of the experiment for each treatment separately.

[36]. This combination of results may indicate no or low liver toxicity induced by the liposomal formulation. The process of acute liver injury that progressed to steatosis only occurred after administration of a higher dose of LD50 [21,23]. The trend of isolated serum AST elevation that occurs in treated groups may not only be related to the increased uptake of nanosystems by the mononuclear phagocytic system, which includes the liver. In addition to the liver, AST is produced in other organs such as the heart, skeletal muscle, kidney, brain, pancreas, spleen, lung and erythrocytes [37,38]. The amount of AST in the blood is directly related to tissue damage. The high level of AST up to 300 U/L is considered non-specific [39].

Cardiotoxicity, the most well-known side effect of the use of DXR, can become serious and debilitating for patients. In our study, the administration of LCFL-PTX/DXR did not produce the appearance of cardiotoxicity. There was no structural change in cardiac tissues, such as vacuolization or hyalinization of cardiomyocytes, and the levels of the CK-MB enzyme were maintained. However, the ECG showed a small but significant difference in the QTc interval, 7 days after administration of LCFL-PTX/DXR at the dose of 28.9 mg/kg. The QT interval is a classical marker to evaluate the potential of ventricular arrhythmias for drug candidates during preclinical evaluation [40,41]. The increase in the QTc interval can be an early indicator of DXR-induced cardiotoxicity. However, the clinical consequences of QT prolongation, such as arrhythmias or sudden cardiac death, remain rare [36,42].

Another common ECG change after DXR administration is the

extension of the QRS complex, which was noticed at the end of 14 days for the group that received the combination of free drugs [43]. Several reports have revealed that the QT and QRS prolongation that occurs with DXR treatment is due to the stretching of the action potentials of ventricular cardiomyocytes and is correlated with the severity of histological lesions of the heart [36,42,43]. Thus, the evaluation of the acute toxicity of the LCFL-PTX/DXR treatment allowed verification that its administration at similar doses of the combination of free PTX/DXR led to less toxic effects. Therefore, the liposomal formulation indicated to be safer, showing low or no profile of physiological and tissue changes, morbidity, and mortality, being an alternative to reduce the side effects of the breast cancer treatment.

## 6. Conclusion

The results of our study established that the toxicity of LCFL-PTX/DXR is lower than the combination of free PTX and DXR, proving that liposomes are capable of delivering higher doses of PTX/DXR without causing serious damage to organs and tissues, and with reduced side effects. This was reflected in the increased survival of animals treated with LCFL-PTX/DXR. Thus, regarding the toxicity, these nanosystems have significant advantages over the combination of free drugs and are a promising therapeutic platform for chemotherapy against breast cancer.

## CRedit authorship contribution statement

**Marjorie Coimbra Roque:** Investigation, Writing – original draft. **Caroline Dohanik da Silva:** Formal analysis. **Marthin Raboch Lempek:** Investigation. **Geovanni Dantas Cassali:** Investigation. **André Luís Branco de Barros:** Investigation. **Marília Martins Melo:** Investigation. **Mônica Cristina Oliveira:** Supervision, Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (PPM-00703-18, PPM-00387-17, CDS-APQ-01588-15 and CDS - RED-00007-14- REDE MINEIRA DE PESQUISAS EM NANOBIOLOGIA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Programa CAPES-COFECUB (Processo 88881.370874/2019-01), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (307098/2018-4, 310316/2020-0 and 429703/2018-0) for the financial support. The authors also thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES for supporting Marjorie Coimbra Roque with a scholarship.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.biopha.2021.112307](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112307).

## References

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424, <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [2] A.I. Fraguas-Sánchez, A. Fernández-Carballido, R. Simancas-Herbada, C. Martín-Sabroso, A.I. Torres-Suárez, CBD loaded microparticles as a potential formulation to improve paclitaxel and doxorubicin-based chemotherapy in breast cancer, *Int. J. Pharm.* 574 (2020), 118916, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118916>.
- [3] C. Meyer, C. Bailleux, E. Chamorey, R. Schiappa, Y. Delpech, M. Dejode, Y. Fouché, J. Haudebourg, E. Barranger, Factors involved in delaying initiation of adjuvant

- chemotherapy after breast cancer surgery, *Clin. Breast Cancer* (2021), <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2021.05.007>.
- [4] Y. Wang, J. Wang, L. Yang, W. Wei, B. Sun, K. Na, Y. Song, H. Zhang, Z. He, J. Sun, Y. Wang, Redox dual-responsive paclitaxel-doxorubicin heterodimeric prodrug self-delivery nanoaggregates for more effective breast cancer synergistic combination chemotherapy, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 21 (2019), 102066, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102066>.
- [5] C. Feng, H. Zhang, J. Chen, S. Wang, Y. Xin, Y. Qu, Q. Zhang, W. Ji, F. Yamashita, M. Rui, X. Xu, Ratiometric co-encapsulation and co-delivery of doxorubicin and paclitaxel by tumor-targeted lipodisks for combination therapy of breast cancer, *Int. J. Pharm.* 560 (2019) 191–204, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.009>.
- [6] M.C. Roque, M.S. Franco, J.M.C. Vilela, M.S. Andrade, A.L.B. de Barros, E.A. Leite, M.C. Oliveira, Development of long-circulating and fusogenic liposomes co-encapsulating paclitaxel and doxorubicin in synergistic ratio for the treatment of breast cancer, *Curr. Drug Deliv.* 16 (2019) 829–838, <https://doi.org/10.2174/156720181666619016112717>.
- [7] J. Yu, Y. Wang, S. Zhou, J. Li, J. Wang, D. Chi, X. Wang, G. Lin, Z. He, Y. Wang, Remote loading paclitaxel–doxorubicin prodrug into liposomes for cancer combination therapy, *Acta Pharm. Sin. B* 10 (2020) 1730–1740, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.011>.
- [8] H.-C. Chou, N. Martin, *CompuSyn for Drug Combinations and for General Dose-Effect Analysis User's Guide*, 2005, pp. 1–68. ([www.combosyn.com](http://www.combosyn.com)) with.
- [9] T.C. Chou, Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 621–681, <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>.
- [10] M.S. Franco, M.C. Oliveira, Liposomes co-encapsulating anticancer drugs in synergistic ratios as an approach to promote increased efficacy and greater safety, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 19 (2018) 17–28, <https://doi.org/10.2174/1871520618666180420170124>.
- [11] H. Baabur-Cohen, L.I. Vossen, H.R. Krüger, A. Eldar-boock, E. Yeini, N. Landa-Rouben, G. Tiram, S. Wedepohl, E. Markovskiy, J. Leor, M. Calderón, R. Satchi-Fainaro, In vivo comparative study of distinct polymeric architectures bearing a combination of paclitaxel and doxorubicin at a synergistic ratio, *J. Control. Release* 257 (2016) 118–131, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.037>.
- [12] P.G. Tardi, R.C. Gallagher, S. Johnstone, N. Harasym, M. Webb, M.B. Bally, L. D. Mayer, Coencapsulation of irinotecan and flouxuridine into low cholesterol-containing liposomes that coordinate drug release in vivo, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1768 (2007) 678–687, <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2006.11.014>.
- [13] M.S. Franco, M.C. Oliveira, Ratiometric drug delivery using non-liposomal nanocarriers as an approach to increase efficacy and safety of combination chemotherapy, *Biomed. Pharmacother.* 96 (2017) 584–595, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.009>.
- [14] C.M. Liu, C.H. Chang, Y.J. Chang, C.W. Hsu, L.C. Chen, H.L. Chen, C.L. Ho, C.Y. Yu, T.J. Chang, T.C. Chiang, T.W. Lee, Preliminary evaluation of acute toxicity of 188Re-BMEDA-liposome in rats, *J. Appl. Toxicol.* 30 (2010) 680–687, <https://doi.org/10.1002/jat.1541>.
- [15] S.Y. Liu, C.H. Chang, T.W. Lee, Single dose acute toxicity testing for N,N-bis(2-mercaptoethyl)-N',N' diethylenediamine in beagles, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69 (2014) 217–225, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.04.001>.
- [16] K. Chapman, S. Creton, H. Kupferschmidt, G.R. Bond, M.F. Wilks, S. Robinson, The value of acute toxicity studies to support the clinical management of overdose and poisoning: a cross-discipline consensus, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 58 (2010) 354–359, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.07.003>.
- [17] M.R. Rasch, Y. Yu, C. Bosoy, B.W. Goodfellow, B.A. Korgel, Chloroform-enhanced incorporation of hydrophobic gold nanocrystals into dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) vesicle membranes, *Langmuir* 11 (2013) 12971–12981, <https://doi.org/10.1021/la302740j>.
- [18] L.O.F. Monteiro, R.S. Fernandes, C.M.R. Oda, S.C. Lopes, D.M. Townsend, V. N. Cardoso, M.C. Oliveira, E.A. Leite, D. Rubello, A.L.B. de Barros, Paclitaxel-loaded folate-coated long circulating and pH-sensitive liposomes as a potential drug delivery system: a biodistribution study, *Biomed. Pharmacother.* 97 (2018) 489–495, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.135>.
- [19] M.S. Oliveira, S.V. Mussi, D.A. Gomes, M.I. Yoshida, F. Frezard, V.M. Carregal, L.A. M. Ferreira,  $\alpha$ -Tocopherol succinate improves encapsulation and anticancer activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 140 (2016) 246–253, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.019>.
- [20] OECD, Test No. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, *Oecd Guidel. Test. Chem.*, 2001, pp. 1–14. (<https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>).
- [21] J. de Oliveira Silva, S.E.M. Miranda, E.A. Leite, A. de Paula Sabino, K.B.G. Borges, V.N. Cardoso, G.D. Cassali, A.G. Guimarães, M.C. Oliveira, A.L.B. de Barros, Toxicological study of a new doxorubicin-loaded pH-sensitive liposome: a preclinical approach, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 352 (2018) 162–169, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.037>.
- [22] D.R. Abernethy, D.L. Wesche, J.T. Barbey, C. Ohrt, S. Mohanty, J.C. Pezzullo, B. G. Schuster, Stereoselective halofantrine disposition and effect: concentration-related QTc prolongation, *Br. J. Clin. Pharm.* 51 (2001) 231–237, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2001.00351.x>.
- [23] K. Razavi-Azarkhiavi, A.H. Jafarian, K. Abnous, B.M. Razavi, K. Shirani, M. Zeinali, M.R. Jaafari, G. Karimi, The comparison of biodistribution, efficacy and toxicity of two PEGylated liposomal doxorubicin formulations in mice bearing C-26 colon carcinoma: a preclinical study, *Drug Res.* 66 (2016) 330–336, <https://doi.org/10.1055/s-0035-1569447>.
- [24] S. Barua, S. Mitragotri, Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: a review of current status and future prospects, *Nano Today* 9 (2014) 223–243, <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.04.008>.
- [25] P.I. Sifaka, N. Üstündağ Okur, E. Karavas, D.N. Bikiaris, Surface modified multifunctional and stimuli responsive nanoparticles for drug targeting: current status and uses, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 1–40, <https://doi.org/10.3390/ijms17091440>.
- [26] Y.S. Wang, M.C. Roque, M.C. Oliveira, Short and long-term effects of the exposure of breast cancer cell lines to different ratios of free or co-encapsulated liposomal paclitaxel and doxorubicin, *Pharmaceutics* 11 (2019), <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040178>.
- [27] S.K. Ramadass, N.V. Anantharaman, S. Subramanian, S. Sivasubramanian, B. Madhan, Paclitaxel/epigallocatechin gallate coloaded liposome: a synergistic delivery to control the invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 125 (2015) 65–72, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.11.005>.
- [28] Y. Wang, D.W. Grainger, Lyophilized liposome-based parenteral drug development: reviewing complex product design strategies and current regulatory environments, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 151–152 (2019) 56–71, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.03.003>.
- [29] S. Hua, S.Y. Wu, The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies, *Front. Pharmacol.* 4 (NOV) (2013) 1–7, <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00143>.
- [30] N. Monteiro, A. Martins, R.L. Reis, N.M. Neves, Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine, *J. R. Soc. Interface* 11 (2014), 20140459, <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0459>.
- [31] M.M. Khiavi, E. Anvari, H. Hamishehkar, K. Abdal, Assessment of the blood parameters, cardiac and liver enzymes in oral squamous cell carcinoma following treated with injectable doxorubicin-loaded nano-particles, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 20 (2019) 1973–1977, <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.7.1973>.
- [32] X. Su, Z. Wang, L. Li, M. Zheng, C. Zheng, P. Gong, P. Zhao, Y. Ma, Q. Tao, L. Cai, Lipid-polymer nanoparticles encapsulating doxorubicin and 2'-deoxy-5-azacytidine enhance the sensitivity of cancer cells to chemical therapeutics, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 1901–1909, <https://doi.org/10.1021/mp300675c>.
- [33] R.X. Zhang, H.L. Wong, H.Y. Xue, J.Y. Eoh, X.Y. Wu, Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy – strategies and perspectives, *J. Control. Release* 240 (2016) 489–503, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.012>.
- [34] S. Sriharan, N. Sivalingam, A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin, *Life Sci.* 278 (2021), 119527, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119527>.
- [35] M. Ashrafzadeh, S. Mirzaei, F. Hashemi, A. Zarrabi, A. Zabolian, H. Saleki, S. O. Sharifzadeh, L. Soleymani, S. Daneshi, K. Hushmandi, H. Khan, A.P. Kumar, A. R. Aref, S. Samarghandian, New insight towards development of paclitaxel and docetaxel resistance in cancer cells: EMT as a novel molecular mechanism and therapeutic possibilities, *Biomed. Pharmacother.* 141 (2021), 111824, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111824>.
- [36] H.S. Mohammed, E.N. Hosny, Y.A. Khadrawy, M. Magdy, Y.S. Attia, O.A. Sayed, M. AbdElal, Protective effect of curcumin nanoparticles against cardiotoxicity induced by doxorubicin in rat, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1866 (2020), 165665, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165665>.
- [37] Z. Mohammed-Ali, D. Brinc, V. Kulasingam, R. Selvaratnam, Defining appropriate utilization of AST testing, *Clin. Biochem.* 79 (2020) 75–77, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.02.006>.
- [38] G. Ndrepepa, S. Holdenrieder, S. Cassese, E. Xhepa, M. Fusaro, K.L. Laugwitz, H. Schunkert, A. Kastrati, Aspartate aminotransferase and mortality in patients with ischemic heart disease, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 30 (2020) 2335–2342, <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.07.033>.
- [39] A. Rasool, M. Zulfajri, A. Gulzar, M.M. Hanafiah, S.A. Unnisa, M. Mahboob, In vitro effects of cobalt nanoparticles on aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities of wistar rats, *Biotechnol. Rep.* 26 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00453>.
- [40] X. Xia, R. Wu, S. An, R. Li, S. Mcpherson, Comparison of different QTc formulae for correction of QT interval in cynomolgus monkeys, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 99 (2019), <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.05.147>.
- [41] S.W. Rabkin, E. Szefer, D.J.S. Thompson, A new QT interval correction formulae to adjust for increases in heart rate, *JACC Clin. Electrophysiol.* 3 (2017) 756–766, <https://doi.org/10.1016/j.jacep.2016.12.005>.
- [42] T. Kinoshita, H. Yuzawa, K. Natori, R. Wada, S. Yao, K. Yano, K. Akitsu, H. Koike, M. Shinohara, T. Fujino, H. Shimada, T. Ikeda, Early electrocardiographic indices for predicting chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity, *J. Cardiol.* 77 (2021) 388–394, <https://doi.org/10.1016/j.jcc.2020.10.007>.
- [43] M. Khalilzadeh, A. Abdollahi, F. Abdollahi, A.H. Abdolghaffari, A.R. Dehpour, F. Jazaeri, Protective effects of magnesium sulfate against doxorubicin induced cardiotoxicity in rats, *Life Sci.* 207 (2018) 436–441, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.06.022>.