UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

**Nanoencapsulação do fármaco miltefosina em micelas poliméricas
de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)**

Johanna Karina Valenzuela Oses

Dissertação para a obtenção do Título
de MESTRE

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carlota de
Oliveira Rangel Yagui.

SÃO PAULO
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

**Nanoencapsulação do fármaco miltefosina em micelas poliméricas
de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)**

Johanna Karina Valenzuela Oses

Versão Original

Dissertação para a obtenção do grau
de MESTRE

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carlota de
Oliveira Rangel Yagui.

SÃO PAULO
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Valenzuela Oses, Johanna Karina
V161n Nanoencapsulação do fármaco miltefosina em micelas poliméricas
de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) / Johanna
Karina Valenzuela Oses. -- São Paulo, 2016.
95p.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica.

Orientadora: Rangel Yagui, Carlota de Oliveira

1. Tecnologia farmacêutica 2. Nanotecnologia I. T. II. Rangel
Yagui, Carlota de Oliveira, orientadora.

615.4 CDD

Johanna Karina Valenzuela Oses

**Nanoencapsulação do fármaco miltefosina em micelas poliméricas de
poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)**

Versão Original

Comissão Julgadora
da Tese para obtenção do Título de Mestre

1°.Examinador/ Presidente

2°.Examinador

3°.Examinador

São Paulo, ____de _____ de 2016.

Dedicatoria

Con inmenso amor dedico este trabajo:

A Dios por haberme dado la vida y a mis padres, Julio y Alejandrina por acompañarme y enseñarme a vivirla de la mejor manera.

AGRADECIMENTOS

A Dios, mi eterna fuente de luz y fortaleza, por los triunfos y momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A mis padres Julio y Alejandrina por enseñarme el valor de la educación, del sacrificio, de la humildad y del amor incondicional a Dios.

A mi hermana Roxana, por ser mi segunda madre y por haberme apoyado siempre en cada aventura, a mis hermanos Julio y Bryan por la paciencia y el cariño.

A mi orientadora, Carlota de Oliveira Rangel – Yagui, por la oportunidad de realizar este trabajo, por el apoyo y la paciencia.

A los profesores Leandro Barbosa, Iolanda Cuccovia, Felipe Rebello e Daniela Basseres por la ayuda y colaboración en este proyecto.

A los profesores de los cursos de Pós - Graduação em Tecnologia Bioquímico Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP por ser parte de mi formación académica, en especial al profesor João Carlos Monteiro de Carvalho por haber sido mi guía profesional desde que llegué a Brasil y porque “no final das contas, tudo da certo”

Al programa de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

A Juliana, Mónica e Luciana, por la amistad, ayuda y palabras de ánimo.

A mis compañeros de laboratorio por el trabajo em equipo.

A Susan, por haber estado siempre ahí cuando más la necesité, mil gracias por las palabras de ánimo.

A Raúl y Liuba, mis hermanos por elección, por la amistad que permanece intacta a pesar de la distancia.

A mis colombianas queridas, Lina, Lauris y Camila, por haberse tornado mi familia aquí en Brasil.

A todas aquellas personas que estuvieron conmigo a lo largo de este tiempo, mi sincero agradecimiento.

*“ Procure ser um homem de valor, em vez de ser um
homem de sucesso ”*

Albert Einstein

RESUMO

VALENZUELA-OSES, J.K. **Nanoencapsulação do fármaco miltefosina em micelas poliméricas de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno).**2016. 100f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Miltefosina é uma alquilfosfocolina com atividade antineoplásica. No entanto sua utilização miltefosina é limitada a aplicação tópica devido a seu alto potencial hemolítico. No presente trabalho, a miltefosina foi encapsulada em micelas poliméricas de pluronic F127 (poli(óxido de etileno)-(poli(óxido de propileno)-(poli(óxido de etileno)), a técnica utilizada foi o método de hidratação do filme polimérico. Um planejamento fatorial do tipo desenho de composto central (CCD) foi utilizado para investigar o efeito de três variáveis, a temperatura de hidratação, velocidade de agitação e tempo de agitação sobre o diâmetro hidrodinâmico da micela (D_h) e o índice de polidispersão (IP). As micelas poliméricas foram caracterizados mediante espalhamento de luz dinâmico (DLS), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). As micelas obtidas exibiram uma morfologia núcleo-corona esférica com $D_h = 29,09 \pm 0,168$ e $IP = 0,105 \pm 0,005$. A estabilidade física das micelas contendo miltefosina e liofilizadas foi estudada após 3 meses de armazenamento a 4 °C, sendo que as micelas apresentaram elevada estabilidade com baixo índice de polidispersão ($0,189 \pm 0,008$). Ensaios de citotoxicidade *in vitro* em células HeLa e H358 demonstraram que o efeito citotóxico das micelas foi semelhante ao da miltefosina livre. Adicionalmente, as micelas de pluronic F127 contendo 80 μ M de miltefosina não se mostraram hemolíticas, sendo que esse efeito é observado para o fármaco livre (30%). Portanto, a incorporação de miltefosina em micelas poliméricas de pluronic F127 pode ser considerada uma estratégia promissora para viabilizar o emprego desse fármaco, bem como de outras alquilfosfocolinas na terapia do cancer.

Palavras - chave: Alquilfosfocolinas, miltefosina, pluronics, poloxamers, micelas poliméricas.

ABSTRACT

VALENZUELA OSES, J.K. **Miltefosine drug nanoencapsulation in polymeric micelles of poly (ethylene oxide) poly (propylene oxide).**2016. 100f. (Master thesis). Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

Miltefosine is an alkylphosphocholine with antineoplastic activity but limit use to topical application due to high hemolytic potential. In this work we encapsulated miltefosine in polymeric micelles of pluronic F127 (poly-(ethylene oxide)-poly-(propylene oxide)-poly-(ethylene oxide)), the technique used was thin-film hydration method. A central composite design (CCD) was used to investigate the effect of three variables, namely film hydration temperature, stirring speed and stirring time on micelle hydrodynamic diameter (D_h) and polydispersity index (IP). Polymeric micelles were characterized by dynamic light scattering (DLS), differential scanning calorimetry (DSC) and transmission electron microscopy (TEM). The obtained miltefosine-loaded polymeric exhibited core-shell morphology with $D_h = 29.09 \pm 0.168$ nm and $PI = 0.105 \pm 0.005$. Physical stability of the lyophilized pluronic F127-miltefosine micelles after 3 months storage at 4°C showed high stability with low polydispersity index (0.189 ± 0.008). *In vitro* cytotoxicity against HeLa and H358 cells demonstrated that the cytotoxic effect pluronic F127-miltefosine micelles was similar to free miltefosine. Additionally, pluronic F127 micelles with 80 μ M of miltefosine incorporated were found to be no hemolytic, in comparison to an hemolytic potential of 30 % for the same concentration of free drug. Therefore, incorporation of miltefosine in pluronic F127 polymeric micelles can be considered a promising strategy to broaden the use of this drug in cancer therapy, as well as of other alkylphosphocholines.

Keywords: Alkylphosphocholines, miltefosine, pluronics, poloxamers, polymeric micelles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios da carcinogênese _____	20
Figura 2. Cascata metastática _____	22
Figura 3. Mecanismos de ação dos quimioterápicos em diferentes fases do ciclo celular _____	24
Figura 4. Molécula da miltefosina, hexadecilfosfocolina _____	26
Figura 5. Diversas nanoestruturas utilizadas para o transporte de fármacos _____	30
Figura 6. Representação esquemática de uma micela polimérica em água _____	32
Figura 7. Representação do efeito de retenção e permeação aumentada (EPR) _____	35
Figura 8. Copolímeros empregados para a produção de micelas poliméricas _____	37
Figura 9. Estrutura do copolímero de bloco plurônico _____	37
Figura 10. Representação esquemática dos mecanismos de associação do Pluronic® F127 em água _____	40
Figura 11. Representação esquemática da produção de micelas poliméricas pelo método de formação de filme polimérico _____	43
Figura 12. Valores de I_{393}/I_{372} para pireno ($2,0 \times 10^{-6}$ mol/L) em função da concentração de Pluronic F127 (mM) em solução tampão fosfato (PBS) _____	50
Figura 13. Diagrama de pareto padronizado para diâmetro das micelas de pluronic F127 e miltefosina _____	55
Figura 14. Diagrama de pareto padronizado para a inversa do índice de polidispersão das micelas de pluronic F127 e miltefosina. _____	57

Figura 15. Gráficos de superfície para a inversa da polidispersão ($1/IP$) em função da Temperatura de reidratação (X_1), velocidade de agitação (X_2) e tempo de agitação (X_3) _____ **58**

Figura 16. Distribuição do tamanho de partícula (nm) da preparação otimizada de micelas poliméricas de pluronic F127. Gráficos de intensidade, número e volume estatístico _____ **60**

Figura 17. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das micelas poliméricas de pluronic F127 não carregadas (A) e carregadas com miltefosina (B) _____ **64**

Figura 18. Curvas de DSC da mistura física, micela polimérica de pluronic F127 - miltefosina, polímero F127 e miltefosina pura _____ **67**

Figura 19. Curvas de TG da mistura física, micela polimérica de pluronic F127- miltefosina, polímero F127 e miltefosina pura _____ **70**

Figura 20. Espalhamento de luz dinâmico (DLS) em função da intensidade, número e volume a micela polimérica de F127 - miltefosina após estocagem durante 3 meses _____ **73**

Figura 21. Potencial hemolítico da miltefosina livre (barras brancas) e das micelas F127-MT (barras pretas) a diferentes concentrações de fármaco _____ **74**

Figura 22. Ensaios de viabilidade celular de células HeLa em 24, 48 e 72h, frente ao polímero pluronic F127 a 80, 48 e 24 μM (P80, P48, P24), micela polimérica contendo 100, 60 ou 30 μM de miltefosina (MP100, MP60, MP30) e miltefosina pura a 100, 60 ou 30 μM (M100, M60, M30) _____ **77**

Figura 23. Ensaios de viabilidade celular de células H358 em 24, 48 e 72h, frente ao polímero pluronic F127 a 80, 48 e 24 μM (P80, P48, P24), micela polimérica contendo 100, 60 ou 30 μM de miltefosina (MP100, MP60, MP30) e miltefosina pura a 100, 60 ou 30 μM (M100, M60, M30) _____ **78**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma _____ **18**
- Tabela 2.** Fármacos nanoencapsulados aprovados e sua situação no mercado ____ **31**
- Tabela 3.** Características físico-químicas de polímeros tribloco do tipo Pluronic® _ **39**
- Tabela 4.** Variáveis independentes (valores reais e codificados) e variáveis dependentes usadas no desenho de composto central _____ **45**
- Tabela 5.** Diâmetro micelar (D_h , nm) e índice de polidispersão (IP) de micelas poliméricas de F127 (7,2 mM) na presença de concentrações crescentes de miltefosina _____ **51**
- Tabela 6.** Desenho de composto central (CCD), para formulação de micelas poliméricas de pluronic F 127 7,2 mM e miltefosina 9 mM, com resultados de diâmetro micelar (D_h) e índice de polidispersão (IP) _____ **54**
- Tabela 7.** Dados de DSC da miltefosina pura, pluronic F127, mistura física e da micela polimérica pluronic F127- miltefosina com seus respectivos valores de entalpia _____ **68**
- Tabela 8.** Diâmetro hidrodinâmico (D_h) e índice de polidispersão (IP) das micelas poliméricas de pluronic F127-miltefosina antes e após a liofilização _____ **72**
- Tabela 9.** Relação observada entre o parâmetro crítico de agregação “ C_p ”, o formato do monômero e o formato do agregado resultante. V_H é o volume ocupado pela cauda apolar, a_o é a área da seção transversal da cabeça polar e l_c o comprimento do grupamento hidrofóbico _____ **76**

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

IARC	International Agency for Research on Cancer
OMS	Organização Mundial da Saúde
INCA	Instituto nacional de Câncer
FDA	Food and Drug Administration
HPV	Human Papiloma Virus
IGRT	Radioterapia Guiada por Imagem
IMRT	Radioterapia de Intensidade Modulada
NIH	National Institutes for Health
IL-2	Interleucina 2
ACS	American Cancer Society
APL	Alquilfosfolípídeo
APC	Alquilfosfocolina
CMC	Concentração micelar crítica
CHOL	Colesterol
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
POPC	Palmitoiloleoilfosfatidilcolina
DAPC	Diaraquidonoilfosfatidilcolina
DUPC	Dilinoleilfosfatidilcolina
PKCα	Protein kinase C Ca ⁺² dependente
ODPC	(Octiloxi) decilfosfocolina
EPR	Efeito de permeação e retenção aumentada
PEO	Polióxido de etileno
PPO	Polióxido de propileno
P- gp	Glicoproteína
MTT	(Brometo de 3 - (4,5 - dimetilthiazol - 2 - ilo) - 2,5 - difeniltetrazol
Dh	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
IP	Índice de polidispersão
CCD	Desenho de composto
TGA	Análise termogravimétrica
Tg	Temperatura de transição vítrea
CMT	Temperatura micelar crítica
SANS	Espalhamento de nêutrons a baixo ângulo
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MT	Miltefosina
MP	Micela polimérica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Câncer	18
2.1.1	Desenvolvimento do câncer	20
2.1.2	Células tumorais benignas	21
2.1.3	Células tumorais malignas	21
2.1.4	Tratamento do câncer	23
2.2	Alquilfosfolipídeos	25
2.2.1	Miltefosina	26
2.2.2	Mecanismo de ação	27
2.3	Nanoestruturas	29
2.3.1	Micelas poliméricas	32
2.3.2	Métodos de preparação de micelas poliméricas	35
2.3.3	Copolímeros anfífilicos empregados no preparo de micelas poliméricas	36
3	OBJETIVO	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Material	42
4.1.1	Solventes e reagentes	42
4.1.2	Linhagem celular	42
4.2	Métodos	42
4.2.1	Determinação da concentração micelar crítica (CMC)	42
4.2.2	Determinação da concentração de miltefosina a ser incorporada nas micelas	43
4.2.3	Desenvolvimento das micelas poliméricas pelo método do filme polimérico	44
4.2.4	Caracterização físico-química das micelas poliméricas	46
4.2.5	Estudos de estabilidade física	47
4.2.6	Determinação do potencial hemolítico	48

4.2.7	Ensaio biológico de viabilidade celular	48
5	RESULTADOS	49
5.1	Concentração micelar critica	49
5.2	Determinação da concentração de miltefosina a ser incorporada nas micelas	50
5.3	Desenvolvimento das micelas poliméricas pelo método do filme polimérico	53
5.4	Microscopia eletrônica de transmissão	63
5.5	Calorimetria exploratória diferencial e Termogravimetria	65
5.6	Estudos de estabilidade após a liofilização	71
5.7	Determinação do potencial hemolítico	74
5.8	Ensaio Biológico de Viabilidade Celular	77
6	CONCLUSÕES	80
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Câncer é um conjunto de doenças consideradas como importante problema de saúde pública em todo o mundo. De acordo com os dados projetados na GLOBOCAN da Agência de Investigação do Câncer (IARC) da Organização mundial da Saúde (OMS) entre 2005 e 2015, 84 milhões de pessoas morreram devido ao câncer. Essa mesma agência estimou um incremento de 19,3 milhões nos casos de câncer por ano para 2025 o que significa aproximadamente o triplo da incidência observada atualmente no mundo, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população.

Segundo o Ministério de Saúde, o câncer é a segunda principal causa de morte no Brasil e no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Além disso, a taxa de incidência de câncer é 25% maior em homens que em mulheres. Em seu relatório mais atual que projeta dados para o biênio 2016-2017, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) prevê que somente no Brasil a incidência de câncer represente 600 mil novos casos. Excluindo-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil novos casos), ocorrerão cerca de 420 mil novos casos de câncer, sendo que em homens o câncer de próstata (28,6%) e do pulmão (8,1%) e em mulheres o câncer de mama (28,1%) e de útero (7,9%) figurarão entre os principais (INCA, 2016).

Segundo Bray e colaboradores (2012), o aumento do número de casos de câncer atualmente está relacionado a mudanças no padrão de reprodutividade, fatores nutricionais e hormonais. Intervenções específicas como efetivas estratégias de prevenção e detecção primária, vacinas e programas de tratamento efetivos que englobem o desenvolvimento e financiamento de pesquisas para descoberta de novos fármacos podem melhorar a eficácia no tratamento.

Muitos agentes quimioterápicos (agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorais, inibidores da topoisomerase, etc) empregados na terapia do câncer atuam ao nível do DNA, no citoesqueleto ou no fuso mitótico inibindo diretamente o desenvolvimento do ciclo celular e consequentemente acarretando diversos efeitos adversos (CHABNER et al., 2006). Por outro lado, surge a classe

das alquilfosfocolinas, uma classe de compostos antineoplásicos análogos sintéticos de fosfolipídios que exibem toxicidade e atividade apoptótica frente a diversas linhagens celulares tumorais (KONSTANTINOV et al., 1998; VAN BLITTERSWIJK e VERHEIJ, 2013). Estes compostos alquilfosfocolínicos como a miltefosina tem demonstrado atividade antitumoral sobre alguns linhagens celulares, mas sua toxicidade gastrointestinal e elevado potencial hemolítico impossibilita seu uso no organismo.

Essas moléculas ocasionam distúrbios no metabolismo de fosfolipídios e na sinalização mediada por lipídios de membrana (GAJATE, MOLLINEDO, 2007) representando assim candidatos promissórios a novos fármacos antineoplásicos. O principal protótipo desta classe é a miltefosina ou hexadecilfosfocolina, a qual tem potente atividade citotóxica e cistostática frente a diversos tipos de células tumorais *in vitro* e *in vivo* (EISSA, AMER, 2012; LEONARD et al., 2001).

Alquilfosfocolinas não atuam na maquinaria genética como a maioria dos fármacos antitumorais, o que em geral resulta em uma diminuição na toxicidade desses fármacos (OBERLE et al., 2005). No entanto, o tratamento antitumoral por via oral com miltefosina é dificultado pela toxicidade gastrointestinal assim como a administração intravenosa leva a ação hemolítica, o que limita seu uso (LINDNER et al., 2008; FIEGL et al., 2008; SEIFERT et al., 2007; AGRESTA et al., 2003).

Sistemas nanocarreadores têm sido utilizados nos últimos anos para veicular fármacos tóxicos, dentro destes se encontram as micelas poliméricas, as quais têm a capacidade de incorporar fármacos hidrofóbicos. Micelas poliméricas permitem a modulação da liberação e proteção do fármaco tornando sua atividade mais específica, diminuindo os efeitos adversos sistêmicos e melhorando a eficiência no tratamento. A produção das micelas requer materiais biocompatíveis, de baixa toxicidade e que proporcionem alta estabilidade ao sistema a fim de manter as nanoestruturas circulando por um período adequado no sangue. Polímeros do tipo Pluronic®, especificamente o F127 (PEO₁₀₀-PPO₇₀-PEO₁₀₀) são uma alternativa interessante para a produção de micelas poliméricas devido ao fato de possuírem as propriedades acima mencionadas e serem aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso parenteral.

Portanto, torna-se oportuno um estudo de incorporação da miltefosina em micelas poliméricas de polióxido de etileno-polióxido de propileno (pluronic F127) visando melhorar o perfil de toxicidade de preparações contendo esse fármaco. Por fim, a análise da nanoformulação resultante frente a linhagens celulares tumorais é importante para avaliação inicial de potencial uso no tratamento do câncer.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

Câncer é um grupo de mais de 100 doenças que envolvem divisão descontrolada de células e resistência à morte. Estas células crescem e se dividem de forma descontrolada produzindo uma quantidade maior que a necessária para manter o equilíbrio do organismo. O número excessivo de células forma um aglomerado compacto conhecido como “tumor” ou “neoplasma” (ESTANQUEIRO et al., 2015). A Tabela 1 revela a projeção de incidência dos principais tipos de câncer na população masculina e feminina do Brasil no ano de 2016 segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA).

Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma .

Localização primária	casos novos	%		Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%		Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%		Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%		Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%		Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%		Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%		Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%		Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%		Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%		Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: INCA (2016).

O câncer de mama é o mais frequentemente diagnosticado e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo, com um número estimado de 1,7 milhões de casos e 521.900 mortes em 2012. O câncer de mama é responsável por 25% de todos os casos de câncer e de 15% das mortes neste grupo. Fatores de risco incluem fatores reprodutivos e hormonais e o uso de anticoncepcionais orais (COLDITZ et al., 2012). Outros fatores incluem obesidade,

terapia hormonal pós menopausa (estrógeno e progesterona), inatividade física e consumo de álcool (CHLEBOWSKI et al., 2013). A mamografia muitas vezes pode detectar o câncer de mama na fase inicial possibilitando tratamento mais eficaz, assim como a cura da doença. No entanto, nem todos os cânceres de mama podem ser detectados mediante esta técnica apresentando resultados falsos-negativos. Apesar destas limitações, numerosos estudos demonstraram que a detecção precoce com a mamografia aumenta as opções de tratamento (ANDERSON et al., 2010).

O câncer de colo de útero é o segundo câncer mais comumente diagnosticado e a terceira principal causa de morte entre as mulheres. Em 2012 se estimaram 527.600 novos casos desse câncer e 265.700 mortes ao redor do mundo. A grande variação de incidência geográfica nas taxas de câncer de colo do útero reflete diferenças na disponibilidade de triagem, que permite a detecção e remoção de lesões pré-cancerosas, e prevalência da infecção pelo vírus do papiloma (HPV) (VACCARELLA et al., 2013; BRUNI et al., 2010; FORMAN et al., 2012). O exame de papanicolau é o teste principal para rastreio de cancer do colo de útero e outras alterações pré-cancerosas possibilitando a detecção da doença na fase inicial.

Células tumorais apresentam características gerais semelhantes como: anaplasia frequente (indiferenciação celular), pleomorfismo (variação de tamanho e forma das células), morfologia nuclear anormal (o núcleo apresenta tamanho similar ao citoplasma), mitoses múltiplas descontroladas, além da capacidade de invasão de tecidos adjacentes e metástases em tecidos distantes (STRICKER, KUMAR, 2010). O crescimento e a progressão do tumor resultam em mutações genéticas acumulativas as quais são influenciadas significativamente pelo microambiente do mesmo. Em adição, para células cancerígenas o microambiente do tumor consiste da matriz extracelular, células do estroma, células endoteliais e células imunes que são recrutadas do entorno do tecido assim como da medula óssea (FANG, DECLERCK, 2013; INGBER, 2008). Tumores ou neoplasmas podem ser sólidos ou constituídos de líquidos e classificados de acordo com seu comportamento em benignos e malignos.

Em geral, o organismo dispõe de muitos mecanismos para reparar os danos celulares, assim no ciclo celular estes mecanismos de defesa permitem o reparo dessas mutações impedindo a transferência desta informação genética incorreta a outras células (MERKLE, 2007). Em alguns casos este processo de defesa pode falhar permitindo a manutenção da mutação. O tempo para a carcinogênese se completar é indeterminável precisando às vezes muitos anos para verificar o aparecimento do tumor (INCA, 2012).

2.1.1 Desenvolvimento do câncer

A cascata de eventos que possibilitam o desenvolvimento do câncer é denominada carcinogênese, a qual é lenta devido às muitas etapas necessárias para o crescimento da célula cancerosa (ALMEIDA et al., 2005). A carcinogênese é representada por três estágios principais: Iniciação, promoção e progressão (Figura 1).

Figura 1. Estágios da carcinogênese.

Fonte: Adaptada de OLIVEIRA et al., 2007

No primeiro estágio, as células sofrem um efeito direto ou indireto dos oncoiniciadores ou agentes cancerígenos após serem expostas a essas substâncias durante o processo de replicação do DNA produzindo modificações genéticas precoces, entretanto a detecção clínica do tumor ainda não é possível (MERKLE,

2007). Na promoção, estas células modificadas geneticamente são expostas aos denominados oncopromotores (por exemplo, hormônios), os quais são agentes cancerígenos que possibilitam seu crescimento. O contato longo e contínuo desta célula iniciada com o agente promotor possibilita sua transformação em célula maligna (MITCHELL et al., 2006). No último estágio da carcinogênese, a progressão, se produz à contínua e irreversível proliferação descontrolada destas células alteradas devido à ação de agentes oncoaceleradores podendo ocorrer invasão de tecidos adjacentes e metástases (MERKLE, 2007).

2.1.2 Células tumorais benignas

Tumores benignos são células diferenciadas semelhantes às dos tecidos saudáveis mas com taxa de crescimento anormal, acelerado (PORTH, 2010). Estas células não invadem tecidos adjacentes, mas podem fazer compressão das estruturas vizinhas, elas têm como características uma forma regular, cápsula fibrosa, crescimento por expansão e localizado, taxa de proliferação celular baixa e raramente recidivam após rescisão. Em função disto, os tumores benignos não provocam a morte, exceto em casos em que interfiram com funções vitais devido à sua localização (PORTH, 2010).

2.1.3 Células tumorais malignas

Diferente dos tumores benignos, as neoplasias malignas manifestam maior grau de autonomia e são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases, podendo ser resistentes ao tratamento e causar a morte do hospedeiro (INCA, 2012). As neoplasias malignas manifestam maior grau de autonomia devido às alterações agressivas destas células como instabilidade genética, independência de ancoragem, capacidade de coesão e de aderência celular reduzida, comprometimento da comunicação intercelular, alterações do ciclo de vida, produção de enzimas, hormônios e outras substâncias que proporcionam um

aumento do dano no organismo invadindo órgãos e tecidos vizinhos provocando metástases (PORTH, 2010).

Metástase refere-se à capacidade que tem a célula de se transportar de um tumor primário a outro tecido distante mediante via sanguínea e formar um segundo tumor. Este processo, denominado “cascata metastática”, inclui migração e invasão, circulação, extravasação, colonização, proliferação e angiogênese (Figura 2) (LEBER, EFFERTH, 2009). As metástases são responsáveis por até 90% de mortalidade associada ao câncer, contudo este processo de patogênese ainda não foi completamente entendido e a detecção precoce é de extrema importância para o tratamento adequado e para a sobrevivência do paciente portador de neoplasia (LARRY et al., 2009).

Figura 2. Cascata metastática. A. Células cancerígenas dentro do tumor primário adquirem um fenótipo invasivo. B. Células cancerígenas invadem a matriz e vasos sanguíneos entrando na circulação. C. Células cancerígenas transitam para órgãos distantes. D. Células invadem o microambiente do tecido adjacente. E. No tecido adjacente, células cancerígenas podem evadir a resposta imune inata. F. Célula cancerígena se adapta ao microambiente e inicia a proliferação.

Fonte: Adaptado de CHAFFER , WEINBERG, 2011

2.1.4 Tratamento do câncer

Cirurgia, radioterapia, terapia hormonal, imunoterapia e quimioterapia são as principais ferramentas para o tratamento de câncer, cada um deles apresenta características quanto a sua aplicação e efeitos adversos. A cirurgia consiste no principal tratamento utilizado para tumores sólidos, em muitos casos toda ou a maior parte do tecido canceroso pode ser removida.

Na terapia de radiação ou “radioterapia” se utilizam altas doses de radiação para matar células cancerígenas e regredir o processo de formação do tumor (NIH, 2015). Estas doses de energia formam íons ou radicais livres levando à destruição da estrutura celular e sua posterior morte. Os avanços técnicos na radioterapia, como radioterapia guiada pela imagem (IGRT) e radioterapia modulada pela intensidade (IMRT) permitem a entrega de um tratamento mais preciso para tumores diminuindo a dose de radiação para os tecidos saudáveis. Apesar dessas melhorias, o tratamento mediante o emprego de radioterapia muitas vezes não consegue proporcionar o controle local do tumor (JAFFRAY, 2012).

A terapia hormonal é outra modalidade importante utilizada para tipos de câncer dependentes de hormônios como câncer de próstata e de mama. Neste tratamento, os hormônios produzidos internamente são bloqueados pelos fármacos, estes fármacos se unem aos receptores na superfície das células tumorais evitando o crescimento ou a replicação da mesma. Quando combinada a outros tratamentos, a terapia hormonal pode diminuir o tamanho do tumor antes da cirurgia ou a radiação (terapia neo-adjuvante), diminuir a probabilidade da aparição do câncer após do tratamento principal (terapia adjuvante) e destruir células cancerígenas que podem reaparecer ou se expandir para outras partes do organismo. A terapia hormonal também apresenta efeitos adversos, podendo ocasionar perda óssea, catarata, riscos de trombozes em mulheres e impotência em homens (NIH, 2015).

Na década de 70 imunologistas começaram a pesquisar sobre o uso de anticorpos no tratamento de tumores, assim linfócitos ativados com lectinas ou interleucinas-2 (IL-2) foram encontrados em células tumorais *in vitro* (ROSENBERG, 1988) surgindo a imunoterapia como tratamento para o câncer. Esta terapia

conhecida também como terapia biológica ou bioterapia promover o sistema imune ou auxiliar atacando células cancerígenas específicas, por meio de anticorpos monoclonais, vacinas e outras imunoterapias não específicas (ACS, 2015).

A quimioterapia clássica continua sendo a modalidade farmacoterapêutica mais empregada para o tratamento do câncer. Em comparação aos outros tratamentos, a quimioterapia possibilita que os fármacos alcancem o sítio do tumor e também outros sítios distantes (PORTH, 2010). Os diversos agentes quimioterápicos exercem seus efeitos através de diversos mecanismos dependentes do ciclo celular evitando o crescimento da célula em fases específicas como apresentado na Figura 3.

Figura 3. Mecanismos de ação dos quimioterápicos em diferentes fases do ciclo celular.

Fonte: Adaptado de My cancer genome, 2016

Alguns fármacos atacam células em fases específicas do ciclo (Fase M ou S) e não diferenciam entre células saudáveis e cancerígenas, ocasionando efeitos colaterais. A alta toxicidade, portanto é um dos maiores problemas relacionados ao tratamento quimioterápico do câncer, colocando em risco órgãos não afetados pelo tumor (MEYER, 2008; JACOBSON et al., 2009). Além da toxicidade, muitos fármacos quimioterápicos são limitados pela sua inabilidade de alcançar o alvo terapêutico de ação em quantidade suficiente para sua eficácia (CHAPLIN et al., 1998). Em muitos casos uma parte do fármaco alcança o alvo e o resto é distribuído pelo corpo, esta é uma distribuição desfavorável dentro de órgãos e tecidos saudáveis e leva à depressão do sistema imune (NEEDHAM, DEWHIRST, 2001).

Devido à toxicidade dos quimioterápicos por atuação direta no DNA, uma nova classe de fármacos, os alquilfosfolípidos (APL), surgiu mais recentemente. Os APL têm sido considerados promissores no tratamento do câncer pois não interagem diretamente com o DNA e possuem a habilidade de induzir apoptose severa nas células tumorais (OBERLE et al., 2005). O fármaco representativo deste grupo é a miltefosina (hexadecilfosfocolina), a qual tem sido utilizada para o tratamento de metástases cutâneas de câncer de mama e linfoma cutâneo.

2.2 Alquilfosfolípidios

Os alquilfosfolípidios são um grupo de lipídios antitumorais sintéticos subdivididos em dois grandes grupos: O primeiro grupo é composto pelos alquil éter fosfolípidios antitumorais (APL), por exemplo, edelfosina (ET-18OCH₃), cuja estrutura contém ligações éter pela porção glicerol dos fosfolípidios. O segundo grupo é formado pelas alquilfosfocolinas (APC), que em sua estrutura não apresentam o glicerol, sendo formadas por um álcool de cadeia longa, esterificado a uma simples fosfobase tendo como principal representante a miltefosina (hexadecilfosfocolina). As APC exibem significativa atividade citotóxica e pró-apoptótica frente a um grande número de linhagens celulares (KONSTANTINOV et al., 1998; VAN BLITTERSWIJK, VERHEIJ, 2013). Além disso, elas não são mielotóxicas e podem estimular a hematopoese normal (BAGLEY et al., 2011; GEORGIEVA et al., 2002; ZAHARIEVA et al., 2007; YOSIFOV et al., 2011) o que

implica que poderiam ser utilizadas em tratamentos combinados a fim de melhorar a toxicidade de agentes citotóxicos convencionais sensibilizando as células tumorais à morte celular induzida por radiação, por exemplo (RUBEL et al., 2006).

2.2.1 Miltefosina

A miltefosina, hexadecilfosfocolina (Figura 4) é uma alquilfosfocolina sintética que não contém glicerol na sua estrutura e que foi identificada e definida por Eibl e Unger em 1980 como a exigência mínima estrutural dos alquilfosfolipídios. Este fármaco possui propriedades antineoplásicas induzindo a morte celular por apoptose da célula tumoral e também apresenta potente atividade leishanocida quando administrada oralmente (CROFT et al, 2006). A miltefosina foi um dos primeiros alquilfosfolipídios desenvolvidos e aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e é o principal representante das alquilfosfocolinas (MOLLINEDO et al., 2004; BUSTO et al., 2008).

Figura 4. Molécula da miltefosina, hexadecilfosfocolina.

Quando administrada oralmente, a miltefosina possui uma meia-vida de aproximadamente oito dias, no entanto poucos são os dados sob sua disponibilidade farmacocinética em humanos. Estudos em ratos tem demonstrado rápido acúmulo do fármaco em rins, fígado, pulmões, baço e outras glândulas. A partir de doses de 30 mg/Kg duas vezes por dia, concentrações de 155 – 189 nmol/g de tecido são alcançados (DORLO et al., 2008). A miltefosina é eliminada lentamente, com uma meia-vida de 96 horas (BRESISER et al., 1987). Este fármaco é indicado principalmente para o tratamento de leishmaniose visceral em dose de 50 ou 100 mg/Kg em pacientes com menos ou mais de 25 kg respectivamente.

Os efeitos adversos da miltefosina incluem distúrbios gastrointestinais e toxicidade renal. Afortunadamente estes sintomas são reversíveis e permitem seu uso via oral para o tratamento de leishmanioses. Entretanto, as doses necessárias para o tratamento do câncer levam à alta toxicidade gastrointestinal. Adicionalmente, o uso intravenoso não é possível devido ao efeito hemolítico dessa molécula. Portanto, atualmente, a miltefosina tem sido utilizada na clínica para o tratamento tópico de metástases cutâneas de câncer de mama e no linfoma cutâneo (DUMMER et al., 1993; KHADEM VATAN et al., 2011).

2.2.2 Mecanismo de ação

A miltefosina é uma molécula anfifílica formada por uma porção hidrofílica fosfocolina e uma porção hidrofóbica representada pela cadeia alquílica, apresentando capacidade de formar micelas em meio aquoso a uma concentração micelar crítica (CMC) entre 2 e 10 μM (CASTRO et al., 2001). Devido a sua característica anfifílica, a miltefosina interage com a membrana celular e atinge rapidamente outras membranas subcelulares sendo portanto capaz de afetar diferentes níveis do metabolismo. As enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios estão localizadas principalmente nas membranas do retículo endoplasmático, sendo esse um alvo para a atividade desta molécula (BERKOVIC et al., 2003).

Segundo estudos, a miltefosina interage com os lipídios da célula em vários níveis e sua ação envolve a interação com lipídios, em particular lipídios de membrana como os fosfolipídios e esteróis. Evidências do efeito desestabilizante das alquilfosfocolinas em sistemas modelo sugerem afinidade da miltefosina com *rafts* lipídicos (regiões ricas em colesterol e esfingofosfolipídios) (MÉNEZ et al., 2007). Por exemplo, alquilfosfolipídios inibem a interação das Ras GTPases com as GTPases *Raft*, desta maneira bloqueando a via de sinalização das “mitogen activated protein kinases” (MAPK) (VINK et al., 2007; SAMADDER et al., 2003).

Para entender as interações da miltefosina com as membranas celulares, um estudo computacional investigou diferentes sistemas de bicamadas lipídicas compostas de misturas de colesterol (CHOL), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), diaraquidonoilfosfatidilcolina (DAPC) e

dilinoleilfosfatidilcolina (DUPC). De acordo com os resultados, a miltefosina tem uma penetração aumentada em regiões da membrana ricas em lipídios poliinsaturados, o que pode influenciar a ação de acordo com o tipo de neoplasia. Nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que a miltefosina interfere com o transporte não vesicular de colesterol da membrana para o retículo-endoplasmático (SÁ et al., 2015).

As alquilfosfocolinas também inibem diretamente a via de sinalização da fosfoinositida-3-quinase (PI3K) (VINK et al., 2007; RUITER et al., 2003), uma via acionada pelas Ras GTPases. Finalmente, um dos alvos mais bem caracterizados desta classe farmacológica é a quinase PKC α (proteína quinase C Ca^{2+} dependente) (VINK et al., 2007; ÜBERALL et al., 1991). Investigações de como as alquilfosfocolinas se unem a domínios C2 da PKC α sugerem que o grupo catiônico das alquilfosfocolinas interfere com a coordenação dos oxigênios do fosfato com a molécula de Ca^{+2} , em comparação ao substrato endógeno fosfatidilserina, forçando os átomos a estabelecer interações com outros aminoácidos e influenciando na formação do complexo PKC- Ca^{+2} -membrana (SÁ, RANGEL-YAGUI, 2015).

Estudos prévios também sugerem que o análogo da miltefosina 10-(octiloxi)decilfosfocolina (ODPC) interfira com a interação dos lipídios saturados e proteínas de membrana, ocasionando estruturação ineficiente de proteínas de transdução de sinal. Em particular, proteínas transmembrana da fase lipídica saturada, as quais apresentam sítios palmitoilados diminuem em número após o tratamento das células leucêmicas com ODPC (THOME et al., 2012). A palmitoilação regula a afinidade destes lipídios pela maioria das proteínas integrais ligadas a lipídios saturados (LEVENTAL et al., 2010)

Em resumo, diversas hipóteses de mecanismos de ação são propostas para a miltefosina, mas certamente todas envolvem a interação com membranas celulares e seus componentes.

2.3 Nanoestruturas

Na última década a nanotecnologia tem sido uma área amplamente explorada e representa uma das direções mais importantes para o desenvolvimento tecnológico.

A nanotecnologia facilita a terapia combinada mediante o emprego de nanotransportadores que possibilitam a encapsulação de mais de um fármaco na mesma estrutura além de promover a solubilidade, aumentar a meia-vida na circulação sanguínea e promover liberação controlada e sítio-específica (GRONEBERG et al., 2006; FAROKHZAD, LANGER, 2006; THAKOR, GAMBHIR, 2013). Por exemplo, imunolipossomos de longa circulação combinam suas habilidades de permanecer durante um longo período com a capacidade de acúmulo alvo-específico (BALAJI, DEVI, 2010).

Nanotransportadores são sistemas nanométricos que variam de 1 - 1000 nm e que são capazes de transportar agentes anticancerígenos como fármacos de baixa massa molecular ou macromoléculas como genes e proteínas, evitando o contato destes com os tecidos saudáveis e permitindo o acúmulo em células tumorais, de maneira a alcançar altas concentrações em comparação com os fármacos livres (DANHIER et al., 2010; NORTHFELT et al., 1996; IYER et al., 2006). Diversos tipos de nanoestruturas têm sido utilizados para o transporte de fármacos incluindo nanocristais, nanopartículas poliméricas, lipossomos, quantum dots, micelas poliméricas, dendrímeros, nanotubos de carbono, etc. (Figura 5).

Figura 5. Diversas nanoestruturas utilizadas para o transporte de fármacos.

Fonte: Adaptado de DIGESU et al., 2016

A nanotecnologia tem proporcionado uma plataforma multifuncional para a administração de fármacos. O número de formulações nanotecnológicas aprovadas e em fase de ensaio clínicos aumentou significativamente nos últimos anos, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Fármacos nanoencapsulados aprovados e sua situação no mercado

Nanocarreador	Fármaco (Nome comercial)	Indicação	Fase
Lipossomos	DOX (Doxil®/ Caelyx®)	Sarcoma de Kaposi, câncer de ovário, câncer de mama	Comercial
	Daunorubicina(DaunoXome®)	VIH relacionado a sarcoma de Kaposi.	Comercial
	Sulfato de Vincristina(Marquibo®)	Leucemia linfoblástica aguda.	Comercial
	Citarabina(DepoCyte®)	Meningitis linfomatosa.	Comercial
	PTX (Genexol®-PM)	Câncer de mama recorrente, pulmão, pâncreas.	Fase II
Micelas poliméricas	DOX (SP1049C)	Adenocarcinoma metastático do trato gastrointestinal, câncer de mama.	Fase II/III
	DOX, liso-termosensitivo (ThermoDox®)	Tumores sólidos	Fase III
	Oxiplatino (NC-4016)	Câncer colorretal	Fase I
	Cisplatino (Nanoplatin®)	Tumores sólidos	Fase I
Dendrimeros	Docetaxel(DEP® Docetaxel)	Tumores sólidos	Fase I
Nanopartículas poliméricas	SiRNA (CALAA-01)	Tumores sólidos	Fase I
Nanopartículas proteicas	PTX(Abraxane®)	Câncer metastático de mama.	Comercial
	PTX(Opaxio®)	Tumores sólidos	Fase III
Conjugações fármaco-polímero	Doxorubicina(PK2)	Câncer de fígado	Fase I

Legenda: DOX: Doxorubicina, PTX: Paclitaxel

Fonte: Adaptado de Estanqueiro et al., 2015

Dentre as diversas alternativas nanotecnológicas, as micelas poliméricas representam uma das classes mais efetivas para diagnóstico e quimioterapia de tumores e diversos copolímeros e tipos de micelas vêm sendo investigados (ALEXIS et al., 2008; LU, PARK, 2013, VARVARIGOU et al., 2014; ABDELBARY, MAKHLOUF, 2014).

2.3.1 Micelas poliméricas

Micelas poliméricas são nanoestruturas compostas de copolímeros anfifílicos que se agregam espontaneamente quando solubilizados em certos solventes a concentrações superiores à concentração micelar crítica (CMC). Em ambientes aquosos, blocos hidrofílicos formam a região mais externa das micelas e os blocos hidrofóbicos formam o centro da micela no qual fármacos hidrofóbicos podem ser incorporados (Figura 6) (NISHIYAMA, KATAOKA, 2006; OERLEMANS et al., 2010).

Figura 6. Representação esquemática de uma micela polimérica em água. Copolímeros anfifílicos dibloco, por exemplo, produzem espontaneamente um núcleo hidrofóbico, sendo que fármacos lipofílicos são fisicamente aprisionados no núcleo. O tamanho da micela usualmente compreende a faixa de 10 a 200 nm.

Fonte: Adaptado de LU, PARK, 2013

A formação de micelas, sejam essas constituídas de tensoativos clássicos ou de copolímeros, reflete um balanço complexo de várias forças intermoleculares, incluindo interações de van der Waals, eletrostáticas, estéricas, hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio (TANFORD, 1980; ISRAELICHAVILI, 2011). A principal força atrativa resulta do efeito hidrofóbico associado aos grupamentos hidrofóbicos. A força repulsiva contrária é resultado das interações estéricas e/ou eletrostáticas associadas aos grupamentos hidrofílicos. O processo de micelização é resultado de um balanço entre estas forças atrativas e repulsivas (BLANKSCHTEIN et al., 1986).

Micelas poliméricas não se dissociam imediatamente após a injeção intravenosa dentro do organismo devido à baixa CMC (10^{-6} - 10^{-7} M) e lenta cinética de dissociação (PACHIONI et al., 2015). Estes baixos valores de CMC, na faixa de 1 - 10 µg/mL são menores que os observados para micelas formadas por tensoativos convencionais e conferem estabilidade termodinâmica aos agregados micelares, característica importante para circulação in vivo. Micelas poliméricas apresentam baixa toxicidade em comparação a micelas formadas por tensoativos clássicos de baixa massa molecular.

Uma importante propriedade das micelas poliméricas é seu tamanho, que varia de 5 - 80 nm e permite incorporar fármacos e algumas macromoléculas individuais (por ex. anticorpos) com tamanho inferior a 5 nm (RANGEL-YAGUI et al., 2005). Elas são consideradas seguras em relação à toxicidade crônica, além disso o diâmetro médio < 80 nm e a baixa distribuição de tamanho permite evadir a filtração renal aumentando sua circulação sistêmica sem risco de bloquear os vasos sanguíneos. As cadeias que formam o copolímero podem ser dissociadas em monômeros ao longo do tempo, este fenômeno resulta na excreção total dos copolímeros a partir da via renal (YOKOYAMA, 2011).

Micelas poliméricas podem incorporar altas quantidades de fármacos hidrofóbicos em seu núcleo, assim diversos fármacos utilizados para o tratamento de câncer podem ser solubilizados em micelas poliméricas. Fármacos como doxorrubicina, ruboxil e paclitaxel têm sido encapsulados nestas estruturas (HOWARD et al., 2006). Do ponto de vista prático, micelas poliméricas são fáceis de preparar e esterilizar (GALLERT et al., 2012).

Tem sido reportado que o tamanho das nanoestruturas é importante para o transporte *in vivo* de fármacos encapsulados pois a opsonização e consequente fagocitose pelos macrófagos são relacionados ao tamanho e forma das nanoestruturas. Assim, partículas menores que 200 nm demonstraram ter baixas taxas de remoção em comparação com aquelas de tamanhos maiores (MAEDA et al., 2013).

Micelas poliméricas possuem um tamanho adequado que permite seu extravasamento e acumulação no local do tumor mas não em locais fora do alvo, minimizando assim efeitos colaterais em órgãos sadios, este fenômeno é conhecido como efeito de permeação e retenção aumentada (EPR) (DRBOHLAVOVA et al., 2013). O EPR é característico dos tumores e outras patologias que englobam processos biológicos complexos (angiogênese, permeabilidade vascular, regulação hemodinâmica, heterogeneidade no perfil genético do tumor e no microambiente tumoral, etc.) e que variam dependendo do tipo de tumor e do paciente. Tumores possuem uma vasculatura anormal, produto da formação de vasos sanguíneos novos e irregulares. Eles apresentam um epitélio descontínuo e carecem de membrana basal presente nas estruturas vasculares normais (JAIN, STYLIANOPOULOS, 2010) gerando fenestrações nos capilares atingindo tamanhos que variam de 200 - 2000 nm dependendo do tipo de tumor, ambiente e a sua localização (HOBBS et al., 1998).

Estas fenestrações oferecem pouca resistência ao extravasamento para o interstício do tumor. Portanto, nanoestruturas extravassam para o tumor e são retidas por períodos longos de tempo em comparação com tecidos sadios, devido à formação de sistema linfático precário nesses tecidos (Figura 7) (FANG et al., 2011).

Figura 7. Representação do efeito de retenção e permeação aumentada (EPR).

Fonte: Adaptado de STOCKHOFE et al., 2014

O transporte de micelas poliméricas contendo fármaco é determinado por propriedades físico-químicas da nanoformulação como hidrofiliicidade/hidrofobicidade, carga positiva/negativa, tamanho < 200nm e massa menor a 40 kDa para evadir o reconhecimento pelo sistema reticuloendotelial e a filtração renal, respetivamente (NISHIYAMA, KATAOKA, 2006).

Devido às características e vantagens expostas, o potencial benefício do uso de micelas poliméricas na terapia do câncer tem despertado interesse nas últimas décadas.

2.3.2 Métodos de preparação de micelas poliméricas

Basicamente são três os métodos desenvolvidos para a preparação de micelas poliméricas que se encontram descritos na literatura. Estes métodos são dissolução direta, evaporação do solvente ou filme polimérico e diálise. A dissolução direta de copolímeros anfifílicos e o fármaco em água é a técnica mais simples utilizada para preparação de micelas poliméricas. A uma concentração acima da

concentração micelar crítica (CMC), o copolímero e o fármaco se agregam em água para formar as micelas. A desvantagem que apresenta este método é a baixa carga de fármaco (KUMAR et al., 2015), além disso micelas alongadas e muito polidispersas podem ser obtidas usando esta técnica (YANG et al., 2009).

No método de diálise, Soluções de fármaco e polímero no solvente orgânico são colocados no saco de diálise e mergulhados em água, induzindo a formação de micelas (GOHY, 2005; JETTE et al., 2004). A formação de micelas utilizando este método varia dependendo do solvente orgânico empregado, o qual pode afetar o rendimento da produção. Alguns estudos reportaram que o uso de dimetilsulfóxido resulta em baixo rendimento (6%) e maior polidispersão em comparação com as micelas obtidas usando dimetilacetamida (LA et al., 1996). O processo de diálises muitas vezes requer mais de 36 horas para sua completa produção, o que dificulta sua utilização.

Na técnica do filme polimérico, por sua vez, um filme de polímero e fármaco é obtido a partir de uma solução desses em solvente orgânico submetida à evaporação. Micelas poliméricas são produzidas após a reconstituição do filme em água ou solução tamponada. Micelas de alguns copolímeros têm o potencial para solubilizar altas quantidades de fármacos hidrofóbicos (MOURYA et al., 2011). O método do filme é o mais utilizado devido a sua simplicidade e por produzir nanoestruturas menores e mais uniformes.

2.3.3 Copolímeros anfifílicos empregados no preparo de micelas poliméricas

Atualmente diversos tipos de nanomateriais poliméricos têm sido investigados para a produção de micelas sendo de especial interesse os copolímeros anfifílicos do tipo di ou triblocos. Adicionalmente, resíduos de fosfolipídios têm sido empregados satisfatoriamente para produzir micelas com núcleo lipídico (LUKYANOV, TORCHILIN, 2004). Os materiais mais comumente empregados para os segmentos hidrofílicos (corona) e hidrofóbicos são listados na Figura 8.

Figura 8. Copolímeros empregados para a produção de micelas poliméricas.

Fonte: Adaptado de MOVASSAGHIAN et al., 2015

Os copolímeros do tipo Pluronic® introduzidos na década de 50 sob o nome de poloxâmeros, consistem de arranjos de blocos hidrofílicos de poli(óxido de etileno) (PEO) e blocos hidrofóbicos de poli(óxido de propileno)(PPO) organizados em uma estrutura tribloco A-B-A: PEO-PPO-PEO (Figura 9).

Figura 9. Estrutura do copolímero de bloco plurônico.

Fonte: Adaptado de BATRAKOVA, KABANOV, 2008

Alguns polímeros desta família são descritos nas farmacopeias americana e europeia (ROWE et al., 2005) e são comercializados como Pluronic® (deste ponto em diante, denominados pluronics), Synperonic®, Tetronic® entre outros (KABANOV et al., 2002). Nos últimos anos pluronics tem sido de grande interesse para a produção de sistemas carreadores de fármacos devido às vantagens que eles oferecem como tamanho pequeno das micelas (menor que 100 nm) e baixa concentração micelar crítica (CMC) (LEE et al., 2010). Pluronics são biocompatíveis, não tóxicos e são capazes de interagir com membranas biológicas e superfícies hidrofóbicas (BATRAKOVA, KABANOV, 2008). Em adição, eles podem inibir a bomba de efluxo glicoproteína-P (P-gp), aumentando a absorção de determinados fármacos (CHIAPPETA, SOSNIK, 2007).

Diferentes poloxâmeros comercializados como pluronics são usados em diversos produtos farmacêuticos, como excipientes para sistemas carreadores de fármacos (JEONG et al., 1997) e como adjuvantes para formulação de vacinas (COESHORTT et al., 2004). O interesse no uso de pluronics não é recente, sendo que a primeira formulação micelar desenvolvida para o tratamento do câncer e que atualmente está em fase III de avaliação clínica é uma mistura de doxorubicina e pluronics L61/F127 (SP1049C, desenvolvida pela Supratek Pharma Inc.) (COLLET, 2003).

Estudos reportaram a habilidade desta formulação para destruir células cancerígenas de medula óssea (células altamente tumorigênicas e com alta proliferação) e diminuir a tumorigenicidade e agressividade de células cancerígenas *in vivo* apresentando amplo espectro de ação em leucemia e câncer de mama (ALAKHOVA et al., 2013). Os copolímeros pluronics comumente utilizados incluem F68, F87, P105, P123, L121, L61 e F127. Esta nomenclatura específica foi introduzida pela BASF para indicar a morfologia de cada copolímero (Líquido (L), pasta (P) e floco (F) seguido de um número de 2 a 3 dígitos que se referem às porções hidrofílica e hidrofóbica. O primeiro ou os dois primeiros dígitos (no caso de três dígitos) multiplicados por 300 indicam a massa molecular aproximada da porção hidrofóbica (PPO); o último dígito multiplicado por 10 indica a porcentagem de PEO (Tabela 3).

Tabela 3. Características físico-químicas de copolímeros tribloco do tipo Pluronic®.

Pluronic®	N° médio de unidades de EO (x)	N° médio de unidades de PO (y)	Massa molar (g)	Ponto de fusão em solução aquosa a 1% (°C)	HLB	CMC(M)
L61	4,55	31,03	2000	24	3	$1,1 \times 10^{-4}$
L121	10,00	68,28	4400	14	1	$1,0 \times 10^{-6}$
F127	200,45	65,17	12600	>100	22	$2,8 \times 10^{-6}$
F68	152,73	58,97	8400	>100	29	$4,8 \times 10^{-4}$
F87	122,50	39,83	7700	>100	24	$9,1 \times 10^{-5}$
P105	73,86	56,03	6500	91	15	$6,2 \times 10^{-6}$
P123	39,20	69,40	5750	90	8	$4,4 \times 10^{-6}$

Legenda: HLB = Balanço hidrofílico-lipofílico; CMC = concentração micelar crítica

Fonte: Adaptado de KABANOV et al., 2002

Entre os diversos tipos de pluronics, F127 merece destaque devido à potencial utilização como veículo para administração de fármacos (RAVAL *et al.*, 2012). O Pluronic® F127 apresenta grande interesse na indústria devido à sua propriedade de formar gel *in situ* dependendo da sua concentração e temperatura (ALEXANDRIDIS *et al.*, 1995). Soluções concentradas de F127 (20-30% peso/volume) podem alternar de uma fase líquida (baixa viscosidade) a um gel sólido (alta viscosidade) resultando em solidificação termoreversível (MOORE *et al.*, 2000; YOU, VAN WINKLE, 2010). Uma representação esquemática deste processo é apresentada na Figura 10.

Figura 10. Representação esquemática dos mecanismos de associação do Pluronic® F-127 em água.

Fonte: Adaptada de DUMORTIER et al., 2006

Estudos recentes também demonstram a capacidade do copolímero F127 em aumentar o transporte de fármacos através da barreira hematoencefálica (BHE) (GABATHULER, 2010).

3 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo principal desenvolver micelas poliméricas de pluronic F127 contendo o fármaco miltefosina, caracterizá-las físico-quimicamente, determinar a eficiência de encapsulação e atividade citotóxica *in vitro*. Para tanto, as seguintes etapas foram definidas:

- Caracterização físico-química dos padrões (miltefosina e pluronic F127);
- Determinação da concentração micelar crítica do copolímero F127 pelo método fluorimétrico empregando pireno;
- Desenvolvimento das micelas poliméricas pelo método do filme polimérico utilizando desenho fatorial para obter a melhor formulação;
- Caracterização das micelas poliméricas por espalhamento de luz dinâmico (DLS), microscopia de transmissão eletrônica (TEM), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG).
- Avaliação da estabilidade física da formulação micelar em função do tempo;
- Avaliação do potencial hemolítico da formulação micelar otimizada;
- Avaliação *in vitro* da citotoxicidade da formulação micelar empregando linhagens celulares HeLa (Carcinoma epidermóide do colo de útero) e H358 (células de câncer de pulmão).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Solventes e reagentes

O copolímero Pluronic® F127, o ácido fosfotungstico hidratado e os corantes pireno e brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). A miltefosina (hexadecilfosfocolina) foi obtida da Avanti® polar lipids, Inc (ALABAMA, USA). O sangue de carneiro desfibrinado foi adquirido da Newprov (Pinhais, PR). Todos os demais reagentes foram de grau analítico. Em todos os ensaios empregou-se água ultrapura obtida por tratamento em equipamento Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

4.1.2 Linhagem celular

- HeLa: Carcinoma epidermóide do colo de útero.
- H358: Carcinoma broncoalveolar humano.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

A concentração micelar crítica do copolímero F127 em água a 25°C foi determinada pelo método de solubilização de pireno. O fluorógeno pireno tem a capacidade de particionar dentro do núcleo hidrofóbico das micelas durante o processo de micellização produzindo mudanças nas propriedades espectroscópicas (TORCHILIN, 2001), assim uma diminuição na relação da intensidade entre a primeira e a terceira banda (I_1/I_3) de pireno é utilizado para medir a CMC (PRAZERES et al., 2012). Uma solução de pireno em clorofórmio a uma concentração final de 0.5 mg/mL e uma solução de copolímero F127 em água ultrapura a diferentes concentrações foram preparadas. Volumes de 4 µL de solução estoque de pireno foram colocados em frascos abertos para a total evaporação do

clorofórmio. Em seguida, 5 mL da solução polimérica foram adicionados em cada frasco. As concentrações de copolímero utilizadas variaram na faixa de 0,088 – 1,814 g/mL, a concentração final de pireno foi fixada em 2×10^{-6} M. As amostras foram excitadas a 334 nm e o espectro de fluorescência foi analisado entre 350 - 500 nm, as larguras das fendas de excitação e emissão foram fixadas a 2.5 e 5 nm respectivamente. As absorbâncias foram medidas a 372 e 393 nm em fluorímetro Cary Eclipse da Agilent (Santa Clara, CA), a uma temperatura de 25 °C.

4.2.2 Determinação da concentração de miltefosina a ser incorporada nas micelas

A metodologia utilizada foi baseada na técnica de evaporação de solvente ou “filme polimérico” (GAO et al., 2002; YOKOYAMA et al., 2004) (Figura 11).

Figura 11. Representação esquemática da produção de micelas poliméricas pelo método de formação de filme polimérico.

Sistemas foram preparados em evaporador rotatório adicionando miltefosina (1 - 12 mM) e pluronic F127 (7,2 mM) previamente dissolvidos em clorofórmio. O solvente foi evaporado a 50°C, 200 rpm, 30 minutos em evaporador rotatório R-215 (BUCHI Switzerland).

Os filmes poliméricos obtidos foram reidratados com 5 mL de solução tampão fosfato, pH 7.4, 10 mM a 30°C, agitação rotatória de 700 rpm por 30 minutos. Os sistemas obtidos foram analisados mediante estudos de diâmetro hidrodinâmico das micelas (D_h) e índice de polidispersão (IP) utilizando espalhamento de luz dinâmico (DLS). A concentração de miltefosina considerada adequada para incorporação nas micelas foi a máxima concentração em que ainda foram preservadas as características das micelas (diâmetro e índice de polidispersão).

4.2.3 Desenvolvimento das micelas poliméricas pelo método do filme polimérico

Após a determinação da quantidade máxima de miltefosina em sistemas com 7,2 mM de pluronic F127, investigou-se o efeito da temperatura de hidratação, velocidade de agitação e tempo de agitação nas micelas polimérica obtidas. Para o preparo dos sistemas, 90,8 mg de pluronic F127 e 3,6 mg de miltefosina foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio. O solvente foi evaporado em evaporador rotatório a 50°C, 200 rpm por 30 minutos para obter o filme de copolímero-fármaco, o qual foi reidratado com 5 mL de solução tampão fosfato, pH 7.4, 10 mM a diferentes temperaturas, velocidades e tempos de agitação. Os sistemas micelares claros e homogêneos a concentrações de copolímero e miltefosina de 7,2 mM e 9 mM, respectivamente, foram filtrados mediante o emprego de filtros de membrana hidrofílica de 0,22 μm .

4.2.3.1 *Desenho de composto central (CCD)*

O processo mais eficiente para avaliar a influência de diferentes variáveis no processo de produção das micelas requer um desenho sistemático e detalhado. A otimização destas variáveis foi conduzida empregando desenho de composto central (CCD) o qual é comumente utilizado para estimar a superfície de resposta de segunda ordem. Assim, o desenho experimental 2^3 foi utilizado para investigar os efeitos da temperatura de hidratação (X_1), velocidade de agitação (X_2) e tempo de agitação (X_3) sob o diâmetro hidrodinâmico (Y_1) e a inversa do índice de polidispersão (Y_2) das micelas formadas. As três variáveis independentes foram analisadas em 2 níveis, baixo (-1) e alto (+1) e 3 replicatas foram realizadas para o ponto central (0).

A distância dos pontos axiais ao ponto central foi dada por $\alpha=2^{k/4}$ (k é o número de variáveis independentes, neste estudo ($\alpha = 1,68$)). Seis pontos axiais foram adicionados e um total de dezessete formulações foram preparadas de acordo com o CCD. Um modelo estatístico de segunda ordem incorporando a interação e termos polinomiais foi empregado para ajustar os dados (ZHOU et al., 2012). A Tabela 4 apresenta as variáveis independentes investigadas e as variáveis dependentes (valores reais e codificados).

Tabela 4. Variáveis independentes (valores reais e codificados) e variáveis dependentes usadas no desenho de composto central.

Variáveis independentes	Níveis codificados das variáveis				
	- α	-1	0	1	+ α
X_1 = Temperatura de hidratação (°C)	23	30	40	50	57
X_2 = Velocidade de agitação (rpm)	480	550	650	750	820
X_3 =Tempo de agitação (min)	20	30	45	60	70
Variáveis dependentes	Restrições				
Y_1 =Diâmetro da micela (nm)	preservar igual à micela sem fármaco				
Y_2 = 1/índice de polidispersão	Maximizar				

Analises de variância (ANOVA) foram realizadas mediante o emprego do programa MINITAB 17. Significância estatística foi definida como $p < 0,05$ e o teste de Fisher's foi realizado para testar a adequação do modelo estatístico.

4.2.4 Caracterização físico-química das micelas poliméricas

A caracterização de nanoestruturas em geral envolve muitas técnicas físico-químicas, entre elas a avaliação morfológica, potencial zeta, pH, distribuição de tamanho de partículas, eficiência de encapsulação, entre outras (SAPSFORD et al., 2011).

4.2.4.1 Distribuição do tamanho de partícula (D_h)

A determinação do diâmetro hidrodinâmico micelar (D_h) e distribuição de tamanho das partículas (índice de polidispersão, IP) foram realizadas pela técnica de espectroscopia de relação de fótons ou espalhamento de luz dinâmico (DLS). Cada alíquota dos sistemas de micelas poliméricas foi diluída em solução tampão fosfato (1:2) e analisada com ângulo de espalhamento de 90 °C a uma temperatura de 25°C no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia das micelas poliméricas carregadas de miltefosina foi estudada mediante o emprego de microscopia de transmissão eletrônica no microscópio JEOL JEM 2100 (JEOL, Tokyo, JAPAN). Os sistemas contendo micelas poliméricas foram colocados em um suporte de cobre de 300 mesh e corados com solução de ácido fosfotúngstico a 2% w/v, seguida de lavagem com água destilada. As amostras foram investigadas usando uma voltagem de aceleração de 200 kV a temperatura ambiente.

4.2.4.3 Calorimetria exploratória diferencial

Calorimetria é uma técnica primária que mede as propriedades térmicas de materiais e estabelece uma relação entre a temperatura e as propriedades físicas das substâncias, determinando a entalpia associada ao processo de interesse (HOHNE et al., 2003). Esta técnica tem sido utilizada em nanotecnologia para medir as propriedades termodinâmicas de biomoléculas e materiais nanométricos (VARGHESEA et al., 2008). Nesse trabalho a calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada empregando-se o equipamento TA-2920 (TA- Instruments, New Castle, DE). Para as análises, aproximadamente 4,0 mg das amostras de pluronic F127, miltefosina pura, mistura física e micela polimérica contendo miltefosina foram colocadas em cápsula de alumínio seladas, submetidas à taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C. min}^{-1}$, avaliando seu comportamento no intervalo de temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 350

A análise termogravimétrica (TGA) é outra técnica utilizada para determinar a estabilidade térmica de materiais. Diversos polímeros empregados para o desenvolvimento de nanopartículas são analisados através desta técnica para avaliar a temperatura de transição vítrea (T_g), o grau de cristalinidade e seus efeitos sobre a taxa de degradação (MAKADIA et al., 2011). A análise termogravimétrica (TG) foi realizada no equipamento TA-2920 (TA- Instruments, New Castle, DE) na faixa de 25 a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando-se amostras de pluronic F127, miltefosina pura, mistura física e micela polimérica contendo miltefosina em cadinho de platina, massa de aproximadamente 3 mg , razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C. min}^{-1}$ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL. min^{-1} .

4.2.5 Estudos de estabilidade física

A estabilidade física das micelas poliméricas liofilizadas foi avaliada após 3 meses de estocagem a 4°C . Amostras liofilizadas foram ressuspensas num volume de 2 mL de solução tampão fosfato, submetidas à agitação magnética de 200 rpm por 5 minutos e filtradas por membranas de $0,22\text{ }\mu\text{m}$. Amostras no tempo zero e após 3 meses foram coletadas e analisadas quanto ao tamanho de partícula e índice de polidispersão no equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern)

4.2.6 Determinação do potencial hemolítico

Os ensaios foram realizados em triplicata, empregando-se solução tampão fosfato de sódio (PBS) contendo 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado (NewProv) e o sistema micelar (7,2 mM de pluronic e 9 mM de miltefosina) a uma concentração de 30 a 450 μ M de miltefosina. As amostras foram incubadas a 37°C, agitação magnética de 250 rpm por 60 minutos.

Posteriormente, foram centrifugadas a 25 °C, 1788 x g durante 5 minutos e a absorbância foi lida a λ =540 nm. A porcentagem de hemólise foi determinada como a razão entre a absorbância da amostra e a absorbância obtida para o sangue em água destilada, que corresponde a 100% de hemólise e representada conforme a equação 1. O branco dos ensaios empregado foi o PBS (RANGEL-YAGUI et al., 2007).

$$\% \text{ hemólise} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{água}}} \quad \text{Equação 1}$$

4.2.7 Ensaio biológico de viabilidade celular

Os ensaios biológicos de inibição celular foram realizados em colaboração com a Profa. Daniela Sanchez Bassères, do Instituto de Química da USP. O ensaio biológico foi determinado pelo método de Loosdrecht (1991) em células HeLa e H358. As células HeLa e H358 (6×10^3 células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, pH 7,2.

A atividade citotóxica foi investigada pela adição de diferentes concentrações de miltefosina e micelas poliméricas contendo o fármaco nas mesmas quantidades (30 μ M, 60 μ M e 100 μ M) e polímero (24 μ M, 48 μ M e 80 μ M). Após 24, 48 e 72 h de tratamento, foram adicionados 25 μ L de solução de MTT (Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium) 5 mg/mL em meio DMEM por 1 hora a 37 °C com uma atmósfera de 2,5% de CO₂. Ao final da incubação, o meio de cultura foi retirado e 100 μ L de DMSO foi adicionado a cada poço. Em seguida a coloração obtida foi lida a 570 e 610 nm em leitor de microplacas Eon Microplate Spectrophotometer-BioTek.

5 RESULTADOS

5.1 Concentração micelar crítica

Concentração micelar crítica é um parâmetro importante, sendo que baixos valores de CMC asseguram a estabilidade de micelas após da diluição. Polímeros plurônicos como o F127 se caracterizam por apresentarem baixos valores de CMC e vários deles têm sido utilizados na indústria farmacêutica como carreadores de fármacos hidrofóbicos. A CMC do plurônico F127 foi determinada pela solubilização de sonda hidrofóbica (pireno). O pireno é uma molécula pouco solúvel em água mas tem solubilidade aumentada em soluções micelares por incorporação no interior hidrofóbico das micelas.

Em água, a intensidade da primeira banda (372 nm, I_1) do espectro de emissão do pireno é mais alta que a da terceira banda (393 nm, I_3), enquanto que num ambiente hidrofóbico I_3 é maior que I_1 . Assim, quando a concentração de polímero é menor que a CMC a razão de I_{393}/I_{372} é mais baixa e praticamente constante. Ao atingir a CMC, a razão I_{393}/I_{372} aumentou devido à incorporação do pireno nas micelas e maior intensidade da terceira banda.

A figura 12 apresenta a curva obtida para a relação I_3/I_1 em função da concentração de polímero F127. Como observado na figura, I_{393}/I_{372} permanece constante para valores abaixo da CMC enquanto que acima dela, a razão da fluorescência aumentou substancialmente, o que reflete a incorporação de pireno no núcleo hidrofóbico das micelas poliméricas. O valor de CMC obtido para o polímero F127 foi $1,18 \times 10^{-4}$ mol/L, este é similar a valores reportados por outros autores os quais variam na faixa de $7,9 \times 10^{-5} - 5,5 \times 10^{-4}$ mol/L (GYULAI et al., 2016).

Micelas formadas de copolímeros anfifílicos se desagregam lentamente quando diluídas abaixo da CMC, facilitando tempos de residência maiores no organismo, isto torna-se importante desde o ponto de vista farmacológico devido a que só micelas de polímeros com baixos valores de CMC podem existir enquanto que polímeros com alta CMC podem-se dissociar em monómeros e seu conteúdo pode precipitar no sangue (YOKOYAMA et al., 1992).

Figura 12. Valores de I_{393}/I_{372} para pireno ($2,0 \times 10^{-6}$ mol/L) em função da concentração de pluronic F127 (mM) em água.

Estes sistemas permitem incorporar fármacos dentro do núcleo ou na interface da micela mediante conjugação química ou aprisionamento físico (CROY, KWON, 2006). Fármacos encapsulados dentro da estrutura micelar evitam o contato com o meio externo e, portanto, observam-se menores taxas de dissociação da ligação fármaco-copolímero (MANSOOR, 2006).

5.2 Determinação da concentração de miltefosina a ser incorporada nas micelas

Diversas formulações variando a concentração de fármaco foram estudadas com o intuito de determinar a máxima quantidade de fármaco que pode ser incorporado na micela polimérica.

Para uma quantidade fixa de copolímero F127 (7,2 mM) investigamos a incorporação de quantidades crescentes de miltefosina na faixa de 1 - 12 mM. As micelas poliméricas com miltefosina incorporada foram analisadas mediante espalhamento de luz dinâmico (DLS) e os resultados de diâmetro hidrodinâmico micelar (D_h) e índice de polidispersão (IP) são apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Diâmetro micelar (D_h , nm) e índice de polidispersão (IP) de micelas poliméricas de F127 (7,2 mM) na presença de concentrações crescentes de miltefosina.

Miltefosina (mM)	Pico 1 D_h (nm)	Intensidade pico 1 (%)	Pico 2 D_h (nm)	Intensidade pico 2 (%)	IP $\pm$ DP
0	30,96	100	-	-	0,109 $\pm$ 0,01
1	30,30	100	-	-	0,093 $\pm$ 0,01
3	25,25	100	-	-	0,169 $\pm$ 0,01
6	25,92	100	-	-	0,121 $\pm$ 0,01
9	36,46	98	-	-	0,245 $\pm$ 0,02
12	26,17	94,1	4,9	2,6	0,253 $\pm$ 0,02

Os ensaios de espalhamento de luz dinâmico (DLS) apontam para a obtenção de micelas de diâmetro hidrodinâmico (D_h) e índice de polidispersão (IP) de 36,46 e $0,245 \pm 0,002$, respectivamente para uma concentração de 9mM de miltefosina no sistema.

Em concentrações crescentes de fármaco, micelas apresentaram diâmetro de ~ 25 nm, o qual evita sua depuração renal mantendo o tempo de circulação no sangue (DAVIS et al., 2008), isso pode ser atribuído ao comprimento do bloco EO que governa o número de agregação e tamanho micelar.

Estudos prévios demonstraram a solubilidade de hidrocarbonetos em micelas de pluronic e concluíram que, devido à hidrofobicidade, hidrocarbonetos interagem com o núcleo micelar, o qual é mais hidrofóbico que a corona da micela.

Duas possíveis situações foram relatadas, aquela em que as moléculas se distribuem uniformemente ao longo do núcleo da micela ou aquele em que o aumento da hidrofobicidade das moléculas cria um “núcleo” dentro do núcleo central, entretanto um excesso de fármaco pode afetar esta interação podendo levar a formação de micelas do fármaco que não foi encapsulado (NAGARAJAN, 2001).

Como pode ser observado, micelas de pluronic F127 com tamanho de 30 nm de diâmetro foram obtidas na ausência de miltefosina.

O tamanho das micelas foi relativamente preservado com a incorporação de miltefosina em todas as concentrações estudadas. A 12 mM de miltefosina, entretanto, observou-se um pico correspondente a partículas de 4,9 nm de diâmetro o qual poderia corresponder à micelas puras de miltefosina.

Para confirmar essa hipótese, realizamos uma leitura de DLS de uma solução de miltefosina a 6 mM em PBS e obtivemos que as micelas de miltefosina pura apresentam diâmetro hidrodinâmico de 6 nm.

Portanto, aparentemente a 12 mM a miltefosina encontra-se em excesso e micelas puras de fármaco são formadas. Micelas de miltefosina pura apresentam propriedades hemolíticas e se desagregam facilmente quando administradas oral ou parenteralmente. Assim consideramos concentrações de 9 mM como a máxima quantidade de miltefosina a ser incorporada em micelas de pluronic F127 a 7,2 mM.

Resultados obtidos de estudos de microdistribuição intratumorais anteriores indicaram que formulações micelares de diâmetro inferior a 50 nm são superiores em termos de extravasamento e penetração em tecidos tumorais, além disso o tamanho permite manter a circulação das micelas por um longo periodo de tempo e evadir a depuração renal destas nanopartículas (~ 5,5 nm) (CHOI et al., 2007).

5.3 Desenvolvimento das micelas poliméricas pelo método do filme polimérico

Para a produção das micelas poliméricas foi empregada a metodologia de formação de filme polimérico, empregando-se 9 mM de miltefosina e 7,2 mM de pluronic F127. O desenho de composto central (CCD) foi desenvolvido para avaliar a influência dos efeitos da temperatura de hidratação (X_1), velocidade de agitação (X_2) e tempo de agitação (X_3) sobre o diâmetro micelar (Y_1) e a inversa da polidispersão (Y_2). Foram realizadas as dezessete formulações do desenho por duplicata e os resultados são apresentados na tabela 6.

Os dados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) e os coeficientes de regressão foram calculados. A significância estatística foi definido como $p < 0,05$. Um modelo estatístico de terceira ordem foi utilizado para ajustar os dados. Teste de Fisher's foi ajustado para analisar a adequação do modelo. Os gráficos de superfície de resposta foram obtidos usando o software Design Expert (Version 10) (Stat-Ease, Inc, Minneapolis, MN).

Tabela 6. Desenho de composto central (CCD), para formulação de micelas poliméricas de pluronic F 127 7,2 mM e miltefosina 9 mM, com resultados de diâmetro micelar (D_h) e índice de polidispersão (IP)

Variáveis independentes				Variáveis dependentes	
Amostra	Temperatura de reidratação (°C)	Velocidade de agitação (RPM)	Tempo de agitação (min)	D_h (nm) $\pm$ DP	IP $\pm$ DP
1	30	550	30	24,33 $\pm$ 0,04	0,112 $\pm$ 0,001
2	50	550	30	21,88 $\pm$ 0,82	0,231 $\pm$ 0,011
3	30	750	30	22,61 $\pm$ 0,38	0,199 $\pm$ 0,011
4	50	750	30	23,48 $\pm$ 0,38	0,148 $\pm$ 0,013
5	30	550	60	22,55 $\pm$ 0,04	0,213 $\pm$ 0,013
6	50	550	60	21,82 $\pm$ 0,09	0,247 $\pm$ 0,011
7	30	750	60	22,68 $\pm$ 0,07	0,188 $\pm$ 0,003
8	50	750	60	22,43 $\pm$ 0,34	0,167 $\pm$ 0,013
9	23	650	45	23,82 $\pm$ 0,06	0,134 $\pm$ 0,003
10	57	650	45	21,34 $\pm$ 0,11	0,223 $\pm$ 0,013
11	40	480	45	23,03 $\pm$ 0,62	0,189 $\pm$ 0,008
12	40	820	45	22,54 $\pm$ 0,17	0,225 $\pm$ 0,007
13	40	650	20	22,44 $\pm$ 0,29	0,172 $\pm$ 0,003
14	40	650	70	22,58 $\pm$ 0,06	0,224 $\pm$ 0,016
15	40	650	45	22,75 $\pm$ 0,01	0,207 $\pm$ 0,004
16	40	650	45	21,79 $\pm$ 0,28	0,227 $\pm$ 0,014
17	40	650	45	21,88 $\pm$ 0,01	0,205 $\pm$ 0,004

O tamanho de partícula (D_h) é um importante fator na formulação de sistemas carreadores de fármacos, podendo influenciar na cinética de liberação e nos perfis de biodistribuição e eliminação. No diagrama de pareto são mostrados os efeitos dos fatores estudados sobre o tamanho das micelas poliméricas (Figura 13).

Figura 13. Diagrama de pareto padronizado para diâmetro das micelas de pluronic F127 e miltefosina.

Na equação 2 é apresentado o diâmetro micelar (D_h) em função da temperatura (X_1), velocidade de agitação (X_2) e tempo de agitação (X_3).

$$D_h (Y_1) = 21,16 - 0,043X_1 + 0,005X_2 + 0,173X_3 - 0,0002X_2X_3 \quad \text{Equação 2}$$

O coeficiente de regressão R^2 apresentou valor baixo (0,538) indicando um nível baixo de significância para o modelo. Das variáveis estudadas, a temperatura afeta mais significativamente o tamanho da partícula sendo que o tamanho da partícula aumenta com a diminuição da temperatura.

Isso pode ser justificado pelo fato de que em menores temperaturas a energia cinética das moléculas de água é menor e, portanto, as interações de hidrogênio com a porção PEO das micelas favorecida, o que acarreta em maior diâmetro hidrodinâmico das micelas.

Em contrapartida, o aumento da temperatura leva à desidratação da corona de PEO e consequente redução de tamanho das micelas.

As micelas poliméricas apresentaram valores de D_h na faixa de $21,34 \pm 0,11$ nm a $24,33 \pm 0,04$ nm, os quais são consideráveis para este tipo de sistemas, sendo que para o sistema micelar de pluronic F127 sem o fármaco $D_h = 30,96$ nm.

Além do diâmetro das micelas, o índice de polidispersão é outro parâmetro importante utilizado para analisar a estabilidade de uma formulação.

Na figura 14 é apresentado o gráfico de pareto em que observa-se a influencia das três variáveis no índice de polidispersão.

A diminuição da temperatura de rehidratação tem uma influencia maior na distribuição do tamanho das partículas, enquanto que a velocidade e o tempo de agitação tiveram efeitos menores sobre a mesma.

Figura 14. Diagrama de pareto padronizado para a inversa do índice de polidispersão das micelas de pluronic F127 e miltefosina.

O alto valor de $R_2 = 0,896$ indica que as variáveis analisadas influenciaram notadamente na polidispersão das micelas. Na equação 3 é apresentada a relação entre a inversa da polidispersão em função da temperatura (X_1), velocidade de agitação (X_2) e tempo de agitação (X_3).

$$1/IP(Y_2) = 102,5 - 2,309X_1 - 0,127X_2 - 1,426X_3 + 0,003(X_1)^2 + 0,002X_1X_2 + 0,029X_1X_3 + 0,001X_2X_3 - 0,000041X_1X_2X_3 \quad \text{Equação 3}$$

Os efeitos da temperatura de reidratação, velocidade de agitação e tempo de agitação no índice de polidispersão são apresentados em forma de gráficos de superfície de resposta na figura 15.

Figura 15. Gráficos de superfície para a inversa da polidispersão ($1/IP$) em função da Temperatura de reidratação (X_1), velocidade de agitação (X_2) e tempo de agitação (X_3).

A função desejável é utilizada como um método de otimização numérica para múltiplas respostas (MONTGOMERY, 1999). Cada resposta Y_i é associada com sua função desejável parcial d_i que varia na faixa de $0 \leq D_i \leq 1$. Se a resposta Y_i está na faixa aceitável D_i assume o valor de 1; quando se encontra fora desta faixa, $D_i = 0$. Para a inversa do índice de polidispersão, o objetivo foi maximizar esse parâmetro pois uma menor dispersão indica maior uniformidade na distribuição de tamanho das partículas no sistema. A função desejável parcial para a resposta Y_i pode ser calculada segundo a equação 4:

$$Di = \frac{Y_{m\acute{a}x} - Y_i}{Y_{m\acute{a}x} - Y_{m\grave{i}n}}$$

Equação 4

Em que Di é a função desejável parcial para o índice de polidispersão. Valores de $Y_{m\acute{a}x}$ e $Y_{m\grave{i}n}$ para $1/IP$ foram de 9 e 4 respectivamente e Y_i é o resultado medido.

A otimização em função deste único fator mostra que a uma temperatura de 23°C, velocidade de agitação de 480 rpm e tempo de agitação de 20 min se consegue obter uma formulação com diâmetro micelar de $29,09 \pm 0,168$ e $IP = 0,105 \pm 0,005$. Gráficos de espalhamento de luz (DLS, intensidade de espalhamento, número e volume de partículas em função do diâmetro das partículas espalhantes para a amostra otimizada) são apresentados na figura 16.

Figura 16. Distribuição do tamanho de partícula (nm) da preparação otimizada de micelas poliméricas de pluronic F127. Gráficos de intensidade, número e volume estatístico.

Alguns autores têm sugerido que a solubilidade de um fármaco envolve a incorporação no interior da micela e a adsorção na interface água-micela (KRISHNA, FLANAGAN, 1989). Em geral, a existência de diferentes sítios de solubilização do fármaco dentro de estruturas micelares depende de suas propriedades físicas como microviscosidade, polaridade e grau de hidratação, os quais não são uniformes ao longo da micela (DUTT, 2003).

Estudos têm demonstrado que a eficiência de solubilização de fármacos não polares incrementa com a longitude das cadeias PEO enquanto que o tamanho diminui com o aumento desta porção hidrofílica (BARRY, EI, 1976). A extensão da solubilização dentro de uma micela depende do sítio de localização e da forma da micela, assim, a forma da micela é determinada pelo valor do parâmetro $C_p = V_H / l_c a_0$, em que C_p é o parâmetro de empacotamento crítico, V_H corresponde ao volume da porção hidrofóbica da molécula anfifílica, l_c é o comprimento dessa mesma porção e a_0 corresponde à área da sessão transversal da porção polar da molécula anfifílica. Quando esse parâmetro aumenta, a micela torna-se mais assimétrica e o volume do núcleo interno aumenta em relação a sua porção externa. Portanto, pode-se esperar que a solubilização de fármacos no núcleo aumente com o aumento da assimetria (ROSEN, 1989).

A forma e o tamanho das micelas pode ser controlada variando alguns fatores como temperatura, concentração e composição do polímero, força iônica e pH. Nas estruturas micelares em meio aquoso, as cabeças polares são direccionadas à fase aquosa enquanto que a cadeia hidrofóbica se distancia dela (RANGEL-YAGUI et al., 2005).

Barry e colaboradores (1976) estudaram a termodinâmica de micelização de uma série de esteróides (hidrocortisona, dexametasona, testosterona e progesterona) nas cadeias PEO e demonstraram que o coeficiente de partição incrementa com a diminuição da polaridade e da temperatura, assim dois fatores poderiam estar envolvidos: A inserção de moléculas solubilizadas em micelas de forma ordenada diminui a entropia e no outro lado quando a molécula é relativamente não polar, ela migra a partir da solução aquosa para a fase micelar, assim pode ser concluído que muitos fármacos são adsorvidos na superfície da micela.

A temperatura de micelização crítica (CMT) do copolímero pluronic F127 foi estudada a diferentes porcentagens mediante espalhamento de neutrons a baixo ângulo (SANS), soluções com 1% de polímero apresentaram temperaturas de micelização de 24°C a qual aumenta quando a concentração do polímero diminui (ALEXANDRIDIS, 2002). Outros estudos mostraram que o aquecimento afeta o processo de formação de gel em soluções de 15 – 30 % de pluronic F127, no entanto a 10% não houve alteração na viscosidade da mesma (WANKA et al., 1994). Esse efeito é atribuído ao fato de que o aumento da temperatura resulta em aumento da energia cinética das moléculas de água e consequente desidratação das porções PEO. Assim, ocorrem mais interações do tipo van der Waals entre as porções PEO das micelas e formação do gel. Esse efeito também é proporcional à concentração de copolímero (KANG, 2012).

Para uma mesma concentração de copolímero, diferentes viscosidades são observadas a diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C), sendo que a viscosidade aumenta com o aumento da temperatura. Valores de CMC e CMT dependem fortemente da estrutura e massa molecular dos copolímeros. Para copolímeros com a mesma longitude de PEO, o copolímero com número maior de cadeias hidrofóbicas PPO forma micelas a temperaturas mais baixas (ALEXANDRIDIS et al., 1994).

Estudos reportam que a temperatura de micelização crítica do copolímero diminui consideravelmente devido a adição de fármacos hidrofóbicos, assim micelas de pluronic F127 apresentaram $CMT = 23 \pm 1$ °C em presença de ibuprofeno, aspirina e eritromicina (BASAK , BANDYOPADHYAY, 2013).

Scherlund e colaboradores (2000) observaram uma diminuição da CMT e da temperatura de gelificação quando anestésicos locais foram adicionados a soluções de pluronics.

Pesquisadores encapsularam moléculas de ibuprofeno em soluções de pluronic P104 e P105 e moléculas de flurbiprofeno em soluções de P103 e P123 e demonstraram que a encapsulação de fármacos favorece o processo de micelização resultando num incremento do número de agregação e no diâmetro do núcleo micelar (FOSTER et al., 2009; ALEXANDER et al., 2011).

Nilson e colaboradores (2007) estudaram a influência da temperatura na polidispersão de micelas formadas por copolímeros plurônicos e concluíram que a baixas temperaturas (25°C) observa-se uma estreita distribuição de tamanho das micelas, esta distribuição aumenta com o incremento da temperatura.

Para copolímeros não iônicos, o efeito da temperatura na solubilidade do fármaco depende da sua localização na micela (dentro do núcleo ou na camada de PEO). Fármacos que se localizam preferencialmente na camada de PEO são afetados devido à desidratação dos grupos PEO, o qual reduz o espaço disponível para a incorporação do fármaco nestas regiões. No entanto, fármacos altamente hidrofóbicos aumentam sua solubilidade no núcleo interno quando a temperatura é incrementada devido ao crescimento micelar (FLORENCE, ATTWOOD, 2003).

5.4 Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia de nanopartículas é uma característica importante que avalia seu desempenho no transporte de fármacos.

Com o objetivo de confirmar a obtenção de micelas poliméricas de miltefosina-F127 e verificar a morfologia dessas, as análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas, as zonas escuras representam o núcleo PEO das micelas com o fármaco incorporado. Partículas de tamanho médio de 40 nm foram observadas, em forma esférica e com distribuição uniforme, sugerindo a estrutura micelar. O tamanho de partícula similar para a micela contendo miltefosina incorporada sugere que o fármaco não influencia significativamente no tamanho das micelas de pluronic F127 (Figura 17).

Figura 17. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das micelas poliméricas de pluronic F127 não carregadas (A) e carregadas com miltefosina (B).

Nesta técnica baseada na microscopia de coloração negativa com ácido fosfotúngstico, um filme denso de elétrons do corante é formado ao redor da micela (CARLO, HARRIS, 2011), assim a micrografia da micela mostrava manchas escuras e tamanhos maiores em comparação com o DLS.

Dentro das diversas técnicas empregadas para avaliar o diâmetro hidrodinâmico de nanopartículas, o espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma ferramenta útil para monitorar a estabilidade coloidal de uma suspensão, no entanto a precisão do tamanho de partícula não está completamente entendida devido a efeitos não avaliados como a concentração da dispersão, ângulo de espalhamento e anisotropia das nanopartículas (TAKAHASHI et al., 2008). A microscopia eletrônica, por sua vez, permite visualizar nanopartículas de tamanhos pequenos com maior precisão mediante emprego de corante ajudando na determinação do diâmetro da micela, assim esta técnica em geral é empregada em conjunto com o DLS e outras técnicas para melhorar a caracterização do sistema.

A análise microscópica revelou micelas não agregadas e com a superfície lisa. É relatado que as nanopartículas pontiagudas poderiam estimular macrófagos no interior do tecido (ALBANESE et al., 2010). O tamanho de 40 nm possibilita sua

incorporação em vesículas endocíticas, ou seja, acesso celular por meio de endocitose (KABANOV et al., 2002).

Como mencionado anteriormente, o parâmetro de empacotamento crítico C_p define a morfologia de agregados anfifílicos, ou seja, se a auto-agregação ocorrerá em micelas esféricas, cilíndricas ou em lamelas/vesículas. No caso de copolímeros anfifílicos, devido à complexidade estrutural e dificuldade em se obter C_p , emprega-se uma simplificação desse parâmetro, a fração hidrofílica (f_h). Assim, copolímeros com $f_h > 0,5$ agregam-se preferencialmente em micelas esféricas. Copolímeros com $0,5 > f_h > 0,4$ agregam-se preferencialmente em micelas cilíndricas e quando com $0,4 > f_h > 0,25$ ocorre a formação de vesículas poliméricas (PACHIONI et al., 2015).

O copolímero pluronic F127 apresenta $f_h = 0,68$ e portanto, espera-se que ocorra preferencialmente a agregação em micelas esféricas, como foi observado.

A magnitude das forças de atração hidrofóbica entre as cadeias hidrocarbonadas, as forças de repulsão electrostática entre os grupos polares e os efeitos de hidratação destas cadeias influenciam na agregação e estabilidade da micela modulando a curvatura da estrutura micelar o qual é um critério importante para determinar sua forma. Esta curvatura é expressada em termos de parâmetro de empacotamento (v_h/a_0l_c) onde a_0 é a área interfacial ocupada pelos grupos hidrofílicos, v_h é o volume da cadeia hidrofóbica e l_c sua extensão no núcleo da micela e está relacionada com a porção hidrofílica do polímero (NAGARAJAN, 2001).

5.5 Calorimetria exploratória diferencial e Termogravimetria

Análise térmica refere-se a um grupo de técnicas nas quais as propriedades físico-químicas de uma substância são medidas em função do tempo ou da temperatura enquanto a amostra é submetida a temperatura controlada (GILL et al., 2010). A calorimetria diferencial exploratória (DSC) e a termogravimetria (TG) são técnicas aplicadas na caracterização, avaliação de pureza, compatibilidade dos excipientes numa formulação, estabilidade e decomposição térmica de fármacos (BERTOL; OLIVEIRA; 2001; MONAJJEMZADEH et al., 20015).

Alterações estruturais de materiais são acompanhados por trocas de calor, por exemplo, absorção de calor durante a fusão ou emissão de calor durante a cristalização. DSC é empregado para medir essas trocas de calor durante programas de temperatura controlada e permite obter conclusões sobre as propriedades estruturais de uma amostra. Esta técnica é capaz de monitorar e quantificar eventos térmicos e permite identificar as temperaturas às quais estes eventos ocorrem.

A natureza exata das transições térmicas deve ser determinada com métodos complementares, como observações microscópicas, termogravimetria, difração de raios X ou técnicas espectroscópicas para distinguir, por exemplo, a fusão, as transições polimórficas, a perda de água ou a decomposição da substância (BUNJES, UNRUH, 2007). A partir de curvas de DSC, a influência de diferentes parâmetros tais como tempo de armazenamento e temperatura ou interações entre os componentes do sistema podem ser estudados.

Com o objetivo caracterizar as micelas poliméricas para obter informações sobre as interações entre fármaco e o polímero, técnicas de DSC e TG/DTG foram empregadas. Os experimentos de análises térmicas referentes à termogravimetria relacionam perda de massa em função do aumento de temperatura (TGA). Com as informações obtidas é possível identificar a temperatura de degradação dos sistemas.

A perda de massa de cada material é observada em regiões características correspondentes aos eventos térmicos de cada material analisado.

Análises de DSC do polímero puro, miltefosina pura, mistura física e da micela de pluronic F127-miltefosina foram realizadas (Figura 18). A curva de DSC do pluronic F127 apresentou um evento endotérmico de fusão, com início em 48,30 °C e T_{pico} de fusão em 53,40°C (ΔH 143 J/g) o qual está em concordância com KIBBE (2004), além disso, apresentou um evento exotérmico no intervalo de 149,0 – 159,30°C com T_{pico} em 155,60°C (ΔH -18,30 J/g) devido à natureza semicristalina do polímero com uma fase cristalina que consiste de camadas de PEO e camadas amorfas formadas de PPO – PEO (LAZARI, LOPEZ-QUINTELLA, 2009).

A curva de DSC da miltefosina pura indicou um evento endotérmico correspondente à perda de água, com início em 95,5 °C e T_{pico} em 103,60°C (ΔH

35,4 J/g), a 226,5°C (ΔH 58,8 J/g) é observada a temperatura de fusão do fármaco seguida da decomposição. O DSC da miltefosina apresentou três eventos endotérmicos, o primeiro com início em 44,5 °C e término em 54,8 °C e um T_{pico} de fusão a 50,3 °C (ΔH 71,2 J/g), o segundo com T_{pico} em 97,2 °C (ΔH 16,60 J/g) e um terceiro com T_{pico} em 204,8 °C (ΔH 30,20 J/g).

Estes resultados de DSC para o miltefosina pura estão de acordo com o apresentado por Das e colaboradores (2010) e confirmam que a essas temperaturas ambas substâncias são estáveis e não se descompoem.

A curva de DSC da micela de pluronic F127-miltefosina indicou um evento térmico com início em 45,60 °C e T_{pico} de fusão em 47,50 °C (ΔH 35,7 J/g).

Figura 18. Curvas de DSC da mistura física, micela polimérica F127-miltefosina , polímero F127 e miltefosina pura.

A tabela 7 resume os valores das $T_{início}$, T_{pico} e entalpia para cada uma das amostras.

Tabela 7. Dados de DSC da miltefosina pura, pluronic F-127, mistura física e da micela polimérica pluronic F127-miltefosina com seus respectivos valores de entalpia.

Amostras	1° evento		2° evento		ΔH (J/g) obtido
	$T_{início}$ (°C)	T_{pico} (°C)	$T_{início}$ (°C)	T_{pico} (°C)	
Miltefosina	95,5	103,6	225,9	226,5	58,8
Pluronic F127	48,3	53,4	-	-	143,0
Mistura física	44,0	49,2	204,0	204,8	30,2
Micela polimérica	45,6	47,5	-	-	35,7

Análises de DSC das micelas poliméricas carregadas de miltefosina mostraram picos de fusão a 47,5 °C (ΔH 35,7 J/g) em comparação com a miltefosina pura e a mistura física, as quais apresentaram picos de fusão a temperaturas de 226,5 °C e 204,8 °C que são característicos da estrutura do fármaco.

As Curvas DSC para a micela polimérica e sua respectiva mistura física demonstraram que houve deslocamento de eventos térmicos para valores menores de faixa de temperatura para a micela polimérica quando comparada com a mistura física apresentando T_{pico} menores que o polímero F127 isolado (53,40°C), podendo sugerir que há uma maior interação entre a matriz polimérica com o fármaco após sua incorporação na forma de micela polimérica.

Na mistura física não houveram mudanças significativas no pico endotérmico da miltefosina.

Na formulação de micela polimérica foram observados temperatura de fusão e valor de entalpia menores em relação à mistura física, demonstrando que ocorreu diminuição no grau de cristalinidade das partículas, o que é desejável para o processo de incorporação do fármaco. Estes resultados sugerem que a miltefosina

foi incorporada na micela polimérica em forma estável. A micela polimérica não mostrou nenhum pico cristalino de miltefosina. Isto implica que o fármaco presente na micela polimérica de pluronic F127 diminuiu sua cristalinidade em comparação com o fármaco puro.

A análise de DSC permite observar também a miscibilidade do polímero com o fármaco (ROUZES et al., 2003; BRAGAGNI et al., 2013). Esta miscibilidade é confirmada quando ocorre diminuição do ponto de fusão, da temperatura de transição vítrea e/ou da cristalinidade (PILLIN et al., 2006; LIM et al., 2013)

Com relação à análise termogravimétrica, as curvas de TG do pluronic F-127 e da miltefosina apontam para perdas de massa de 94% no intervalo de 330 – 430 °C para o polímero e de 1,0 % do fármaco devido à desidratação, já a decomposição é observada com temperatura superior a 253,9°C com perda de massa de 23,91%.

Para a mistura física, a curva de TG apresentou a degradação térmica com início a uma temperatura aproximada de 245,2 °C, ocorrendo em várias etapas e apresenta uma perda de massa de 95,5 % no intervalo de 245,2 – 417,2°C. No caso da micela polimérica, perda de massa de 89,3 % é observada no intervalo de temperatura de 358,9 – 392,4 °C. Estes resultados são apresentados na figura 19.

Figura 19. Curvas de TG da mistura física, micela polimérica de pluronic F127-miltefosina, polímero F127 e miltefosina pura.

A perda de massa de 94 % pode ser observada na curva de TG do polímero confirmando a natureza semicristalina do F127.

Uma perda de massa inicial de 1,01 % foi observada na curva de TG para a miltefosina, a qual corresponde à desidratação (perda de água da molécula). Após a desidratação, é possível observar mais dois eventos endotérmicos, o primeiro é referente ao ponto de fusão a 229,5 °C com uma perda de 10,14 % em massa seguido de um rápido início do processo de decomposição e o segundo evento ocorre a temperaturas superiores a 253,9 °C. A perda de massa de 23,91 % observada na curva de TG confirma o início do processo de decomposição após a fusão da miltefosina. Esses dados estão de acordo com a literatura, a qual menciona a decomposição do fármaco em temperaturas de 232,2 – 232,9 °C, com perda de massa devido à carbonização (PRAVINBHAY, 2015).

Em relação à degradação da micela polimérica, foi possível observar que a temperatura de decomposição (358,9 – 392,4 °C) está acima daquela observada para o fármaco isolado (253,9 °C). Assim, a estrutura da micela polimérica poderia aumentar a estabilidade do fármaco. Esta decomposição térmica da micela de

pluronic F127 carregada de miltefosina foi confirmada pela curva de TG com variação de perda de massa de 95,6 % a 89,3 %.

O Pluronic® pode influenciar na diminuição do ponto de fusão do fármaco. Como este polímero possui uma temperatura de fusão menor, uma diminuição da temperatura de fusão do fármaco foi evidente, o que sugere a miscibilidade da miltefosina nas cadeias de polímero (GHEBREMESKEL; VEMAVARAPU; LODAYA et al., 2007).

5.6 Estudos de estabilidade após a liofilização

A aplicabilidade industrial de nanopartículas dispersas em meio aquoso pode ser limitada, devido aos problemas de baixa estabilidade físico-química, em períodos de armazenamento prolongados. Dentre esses, destacam-se a agregação das partículas, a estabilidade do polímero, do fármaco ou de outros excipientes e a liberação precoce do fármaco (SCHAFFAZICK et al.; 2003; LEMOINE et al.; 2000; MAGENHEIM et al.; 1993). Formulações liofilizadas, por outro lado, são estáveis à temperatura ambiente e são facilmente reconstituíveis (NEDERGAARD et al., 2008).

O sistema micelar de pluronic F127-miltefosina foi congelado previamente a -70 °C *overnight*. Seguidamente, a micela polimérica foi sometida a liofilização por 24 horas a uma pressão de 0,120 mbar. Esta amostra foi mantida a 4 °C durante 3 meses. Amostras liofilizadas foram reconstituídas em solução tampão fosfato 10 mM. O diâmetro das micelas e o índice de polidispersão foram medidos antes e após a liofilização, os ensaios foram realizados em triplicata. A tabela 8 apresentam os resultados de diâmetro micelar da micela liofilizada.

Tabela 8. Diâmetro hidrodinâmico (D_h) e índice de polidispersão (IP) das micelas poliméricas de pluronic F127-miltefosina antes e após a liofilização

Formulação (F127:MT) (7.2 mM:9 mM)	Diâmetro médio (D_h) Pico 1 (%)	Índice de polidispersão (IP)
Antes da liofilização	$29,09 \pm 0,168$ (100%)	$0,105 \pm 0,005$
Após da liofilização	$22,35 \pm 0,098$ (99,1%)	$0,181 \pm 0,008$

Após a reconstituição da amostra liofilizada observou-se pouca variação no tamanho das micelas, com um incremento mais significativo no índice de polidispersão como mostrado no espalhamento de luz dinâmico na figura 20.

Alguns estudos têm relatado o emprego de crioprotetores para a desidratação de suspensões de nanopartículas através de liofilização. Estes crioprotetores formam uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas, evitando a agregação delas durante o congelamento (LEMOINE et al.; 2000; KONAN et al.; 2002). A necessidade de um estabilizador durante a liofilização de nanopartículas é importante para se obter uma amostra que possa ser facilmente reconstituível (HOLZER et al., 1999). Estudos apontam que os polímeros pluronicos F68, F127 e polisorbato 80 têm se mostrado eficazes na estabilização da indometacina (LIU et al., 2015; LIU et al., 2011; TUOMELA et al., 2015). Portanto, no caso de micelas poliméricas dormadas pela agregação de pluronic F127 a própria formulção poderia exercer efeito crioprotetor.

Figura 20. Espalhamento de luz dinâmico (DLS) em função da intensidade, número e volume a micela polimérica de F127 - miltefosina após da estocagem durante 3 meses.

5.7 Determinação do potencial hemolítico

A compatibilidade sanguínea de nanomateriais é uma característica importante na administração intravenosa, uma via comumente utilizada para o transporte de fármacos (YU et al., 2011; YILDIRIM et al., 2013). A interação de nanopartículas com os componentes do sangue pode causar lise dos glóbulos vermelhos e a formação de coágulos (trombose) (ROSSI et al., 2010; PAN et al., 2016). A atividade hemolítica das micelas poliméricas de pluronic F127 carregadas de miltefosina foi avaliada e observamos atividade hemolítica relativamente baixa de 6,1% a uma concentração de 80 μM de miltefosina (32,6 $\mu\text{g/mL}$) em comparação com o fármaco livre que apresentou hemólise de 30,6% na mesma concentração (Figura 21).

Figura 21. Potencial hemolítico da miltefosina livre (barras brancas) e das micelas F127-MT (barras pretas) a diferentes concentrações de fármaco.

A miltefosina se insere na bicamada lipídica dos eritrócitos incrementando sua permeabilidade e induzindo a hemólise devido à solubilização da bicamada (VIVES et al., 1997; SANCHEZ et al., 2007). Esta solubilização é mais eficiente se a estrutura do fármaco e os lipídios da bicamada possírem longitudes de cadeias hidrocarbonadas similares (MARTINEZ et al., 2007). No presente trabalho, a membrana dos eritrócitos é essencialmente rico em lipídios com 16 e 18 átomos de carbonos e podem ser interrompidas pelas cadeias hidrofóbicas do fármaco, que apresenta uma cadeia alquílica com 16 átomos de carbono.

O potencial hemolítico da miltefosina pode ser explicado pelo fato de que esta molécula apresenta uma estrutura em forma de cone, conforme apresentado na tabela 9. Sabe-se que moléculas que apresentam estrutura cônica apresentam maior facilidade de formar micelas e portanto são mais hemolíticas do que moléculas que adotam estrutura de cone truncado ou cilindro. Para predizer a estrutura espacila da miltefosina, o parâmetro de empacotamento crítico (C_p) da mesma foi calculado, sendo que para V_H considerou-se $27,4 \text{ \AA}^3$ para os grupos CH_3 e $26,9 \text{ \AA}^3$ para os grupos CH_2 , $a_0 = 71,7 \text{ \AA}^2$ e $l_c = 1,265 \text{ \AA}$, obtendo-se $C_p = 0,29$. Valores menores que 0,33 resultam numa estrutura cônica (ISRAELACHVILI, 1991; PACHIONI, 2013).

Tabela 9. Relação observada entre o parâmetro crítico de agregação “ C_p ”, o formato do monômero e o formato do agregado resultante. V_H é o volume ocupado pela cauda apolar, a_0 é a área da seção transversal da cabeça polar e l_c o comprimento do grupamento hidrofóbico

Parâmetro crítico de agregação ($v/a_0 l_c$)	Formato da molécula	Estruturas formadas
$< 1/3$	Cone	Micelas esféricas
$1/3 - 1/2$	Cone truncado	Micelas cilíndricas
$1/2 - 1$	Cone truncado	Bicamadas flexíveis/vesículas
~ 1	Cilindro	Bicamadas planas
> 1	Cone truncado invertido	Micelas reversas

Fonte: Adaptado de ISRAELACHVILI, 2011

A incorporação da miltefosina em micelas poliméricas, entretanto, pode possibilitar o transporte do fármaco no sangue devido à diminuição da hemólise.

5.8 Ensaio Biológico de Viabilidade Celular

Os ensaios *in vitro* para avaliar a citotoxicidade das micelas poliméricas contendo miltefosina foram realizados empregando-se linhagens celulares de câncer cervical (HeLa) e de câncer de pulmão (H358). Os tratamentos foram aplicados um dia após o cultivo das células. As figuras 22 e 23 apresentam a viabilidade celular das células HeLa e H358 a diferentes concentrações de fármaco livre e incorporados nas micelas (30, 60 e 100 μM) após 24, 48 e 72 horas. Observa-se que a viabilidade celular diminuiu em função da concentração do fármaco e que a micela polimérica de pluronic F127-miltefosina apresentou citotoxicidade similar ao fármaco livre em todas as concentrações (30, 60 e 100 μM).

Figura 22. Ensaio de viabilidade celular de células HeLa em 24, 48 e 72h, frente ao polímero pluronic F127 a 80, 48 e 24 μM (P80, P48, P24), micela polimérica contendo 100, 60 ou 30 μM de miltefosina (MP100, MP60, MP30) e miltefosina pura a 100, 60 ou 30 μM (M100, M60, M30).

Figura 23. Ensaios de viabilidade celular de células H358 em 24, 48 e 72h, frente ao polímero pluronic F127 a 80, 48 e 24 μ M (P80, P48, P24), micela polimérica contendo 100, 60 ou 30 μ M de miltefosina (MP100, MP60, MP30) e miltefosina pura a 100, 60 ou 30 μ M (M100, M60, M30).

Independente do tempo de incubação utilizado no ensaio, o polímero F127 induz a toxicidade acima da concentração micelar crítica (72 μ M) frente às células HeLa, porém o mesmo não ocorre com as células H358.. Uma vez no interior das células, o pluronic F127 pode exercer atividade tóxica na mitocôndria e membranas nucleares, conduzindo assim à morte celular. Pode-se esperar que esta é uma consequência da natureza anfifílica do F127 com um HLB (balanço hidrófilo-lipofílico) em torno de 24 (EVANS et al., 1994). Adicionalmente, tem sido reportado por outros autores que o efeito citotóxico de monômeros e micelas de pluronic em células não cancerígenas foi significativamente menor que em células cancerígenas (RAPOPORT et al., 2000; MELIK-NUBAROV et al., 1999).

A habilidade de copolímeros pluronicos em afetar a permeabilidade de barreiras biológicas tem sido amplamente estudada. Pluronic F127 pode influenciar a biodistribuição de fármacos anticancerígenos aumentando a especificidade de sua ação (BATRAKOVA et al., 1996). O pluronic F127 se liga a membranas de células tumorais resultando na fluidificação da bicamada enquanto que a microviscosidade das células sadias aumenta a uma concentração de 0,4-1 μ M. A concentração e a

temperatura são fatores importantes que afetam a captação do copolímero dentro das células. Estudos sobre a dependência da temperatura na captação de copolímero por diferentes células revelaram peculiaridades das células tumorais, por exemplo, a absorção dependente da temperatura de copolímero L61 por linhagem celular SP2/0 de mieloma a 37 °C foi duas vezes mais efetiva que a 4 °C. Portanto, a captação é devido à endocitose da fase fluida ou difusão do copolímero através da membrana. Sabe-se que células tumorais possuem uma fluidez maior acumulando mais polímero que células sadias (MELIK-NUBAROV et al., 1999).

A baixas concentrações de fármaco, a miltefosina livre e a micela polimérica exibem significativo e equivalente efeito inibitório frente a células HeLa. Micelas poliméricas carregadas de fármaco apresentaram uma alta capacidade para matar células H358, isto pode ser explicado devido ao fato da miltefosina comicelizar com o plurônico F127 e não se encontrar solubilizada no interior apolar da micela, resultando numa rápida liberação do fármaco a partir da micela. Além disso micelas poliméricas podem ser internalizadas no interior das células por endocitose (NISHIYAMA, KATAOKA, 2006). Utilizando o mecanismo de endocitose a internalização da micela é facilitada, isto tem sido relatado em copolímeros anfífilos que podem aumentar a disponibilidade de fármacos no citoplasma (SHUAI et al., 2004; XIONG et al., 2010).

Nesse trabalho, as micelas de pluronic F127-miltefosina demonstraram citotoxicidade similar ao fármaco livre na mesma concentração, mesmo a concentrações abaixo da CMC do polímero (0,1% m/m).

Em geral, o consumo e a citotoxicidade de micelas são influenciadas por diversos fatores como densidade da superfície, carga da superfície, tamanho e forma (ALBANESE et al., 2012).

Os resultados de citotoxicidade mostraram que a formulação micelar tem potencial de citotóxico frente a células tumorais e, conseqüentemente, potencial atividade antineoplásica com um efeito hemolítico menor quando comparada com o fármaco livre, o que poderia viabilizar o uso da miltefosina na terapia do câncer de colo do útero e/ou de pulmão.

6 CONCLUSÕES

A terapia anticâncer requer contínuo desenvolvimento, particularmente com aplicações de métodos modernos e minimamente invasivos. O emprego de micelas poliméricas permite um eficiente transporte de fármacos para células tumorais além de diminuir sua concentração efetiva, o que é importante para diminuir os efeitos adversos da terapia antineoplásica.

No presente trabalho, micelas poliméricas de pluronic F127 contendo miltefosina foram obtidas de maneira otimizada mediante a técnica de rehidratação do filme polimérico. Valores de diâmetro micelar e índice de polidispersão de 29,09 nm e 0,105, respectivamente, foram obtidos a 23 °C, agitação 480 rpm e 30 min. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) confirmaram a forma esférica da micela. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG) mostraram a incorporação da miltefosina nas micelas.

Estas micelas poliméricas foram transportadas eficientemente dentro de células HeLa e H358 providenciando uma eficiente atividade antitumoral, semelhante ao fármaco livre. Adicionalmente, a diminuição do potencial hemolítico da miltefosina pela incorporação nas micelas poliméricas promove maior biocompatibilidade da formulação micelar em relação ao fármaco livre.

Os resultados apresentados sugerem que a incorporação de miltefosina em micelas poliméricas de pluronic F127 possa ser uma alternativa promissora para o tratamento de câncer cervical e/ou de pulmão.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS, 2015. **American Cancer Society**. Disponível em: < <http://www.cancer.org>> Acesso em 20 Junho 2016.

ADELBARY, G.; MAKLOUF, A. Adoption of polymeric micelles to enhance the oral bioavailability of dexibuprofen: formulation, *in vitro* evaluation and *in vivo* pharmacokinetic study in healthy human volunteers. **Pharm. Dev. Technol**, n. 19, p. 717 - 727, 2014.

AGRESTA, M. et al. Synthesis and antiproliferative activity of alkylphosphocholines. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 126, n. 2, p. 201 - 210, 2003.

ALAKHOVA, D.Y. et al. Effect of Doxorubicin/Pluronic SP1049C on Tumorigenicity, Aggressiveness, DNA Methylation and Stem Cella Markers in Murine. **Plos One**, v. 8, n. 8, p. 1 – 14, 2013.

ALBANESE, A.; SYKES, E.A.; CHAN, W.C. Rough around the edges: the inflammatory response of microglial cells to spiky nanoparticles. **ACS Nano**, v. 4, p. 2490 - 2493, 2010.

ALBANESE, A.; TANG, P.S.; CHAN, W.C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 14, p. 1 - 16, 2012.

ALEXANDER, S. et al. Flurbiprofen encapsulation using Pluronic triblock copolymers. **Langmuir**, v. 27, p. 8054, 2011.

ALEXANDRIDIS, P.; HATTON, A. Poly (ethylene oxide) - poly (propylene oxide) - poly (ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics and modeling. **Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 96, p. 1 - 46, 1995.

ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARTH, J.; HATTON, A. Micellization of poly (ethylene oxide) - poly (propylene oxide) - poly (ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. **Macromolecules**, v. 27, p. 2414 - 2425, 1994.

ALEXIS, F. et al. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. **Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations**, v. 26, p. 74 - 85, 2008.

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

ANDERSON, B. et al. Optimisation of breast cancer management in low - resource and middle - resource countries: executive summary of the Breast Health global initiative consensus. **The Lancet Oncology** , v. 12, p. 387 - 398, 2010.

BAGLEY, R.G. et al. Erufosine, an alkylphos-phocholine, with differential toxicity to human cancer cells and bone marrowcells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 68, p. 1537–1546. 2011.

BALAJI, S.; DEVI, B.P. Nanotechnology and cancer - an overview. **Int. J. Pharma Bio Sci**, v. 1, p. 186 - 201, 2010.

BARRY, B.W.; El Eini, D.I.D. Solubilization of hydrocortisone, dexamethasone, testosterone and progesterone by long - chain polyoxyethylene surfactants. **J. Pharm**, v. 28, p. 210 - 218, 1976.

BASAK, R.; BANDYOPADHYAY, R. Encapsulation of hydrophobic drugs in Pluronic f127 micelles; effects of drug hydrophobicity, solution temperature and pH. **Langmuir**, v.29, p. 4350 – 4356, 2013.

BATRAKOVA, E.V.; KABANOV, A.V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inerte nanocarriers to biological response modifiers. **J. Controlled Release**, v. 130, p. 98, 2008.

BATRAKOVA, T.Y. et al. Anthracycline antibiotics non - covalently incorporated into the block copolymer micelles: *in vivo* evaluation of anti - cancer activity. **Br. J. Cancer**, v. 74, p. 1545 - 1552, 1996.

BERKOVIC, D.; WERNICKE, J.H.; FLEER, E.A.M. Effects of etherlipid analogs on cell membrane functions. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 3, p. 185 - 193, 2003.

BERTOL, C.D.; CRUZ, A.P.; SUTLZER, H.K. Thermal decomposition kinetics and compatibility studies of primaquine under isothermal and non-isothermal conditions. **J Therm Anal Calorim**, v. 102, p. 187 - 192, 2010.

BLANKSCHTEIN, D.; THURSTON, G.; BENEDEK, G. Phenomenological Theory of Equilibrium Thermodynamic Properties and Phase Separation of Micellar Solution. **J. Chem. Phys**, v. 85, n. 12, p. 7268 - 7288, 1986.

BRAGAGNI, M. et al. Selection of PLA polymers for the development of injectable prilocaine controlled release microparticles: Usefulness of thermal analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1 - 2, p. 468 - 475, 2013.

BRAY, F. et al. Global cancer transitions according to the Human Development. Index (2008 - 2030): a population - based study. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 8, p. 790 - 801, 2012.

BRESISER, A. et al. Distribution and metabolism of hexadecylphosphocholine in mice. **Lipids**, v. 22, n. 11, p. 925 - 926, 1987.

BRUNI, L. et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta - analysis of 1 million women with normal cytological findings. **J. Infect Dis**, v. 202, p. 1789 - 1799, 2010.

BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X - ray and neutron scattering. **Advanced drug delivery**, v. 59, n. 6, p. 379 - 402, 2007.

BUSTO, J.V. et al. Combination of the anti -tumor cell ether lipid edelfosina with sterols abolishes hemolytic side effects of the drug. **J Chem Biol**, ed. 1, p. 89 - 94, 2008.

CARLO, S.D.; HARRIS, J.R. Negative staining and Cryo-negative staining of macromolecules and viruses for TEM. **Micron**, v. 42, n.2, p. 117 – 131, 2011.

CASTRO, B. et al. Interaction of drugs with hexadecylphosphocholine micelles. Derivative spectroscopy, acid - base and solubility studies. **Material Science and Engineering**, v. 18, n. esp, p. 71 - 78, 2001.

CHABNER, B.A. et al. Chemotherapy of Neoplastic Diseases. In: BRUNTON, L.L., LAZO, J.S., PARKER, K.L. eds. Goodman & Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 11.ed. Nova Iorque: McGraw - Hill, 2006.

CHAFFER, C.L., WEINBERG, R.A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559 - 1564, 2011.

CHAPLIN, D. et al. Modification of tumor blood flow: Current status and future directions. **Semin. Radiat. Oncol**, v. 8, p. 151 - 163, 1998.

CHIAPPETTA, D.A.; SOSNIK, A. Poly (ethylene oxide) - poly (propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agent: improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, v. 66, p. 303 - 317, 2007.

CHLEBOWSKI, R.T. et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the women's Health Initiative Observational Study. **J Natl Cancer Inst**, v. 105, p. 526 - 535, 2013.

COESHOTT, C.M. et al. Pluronic® F127 - based systemic vaccine delivery systems. **Vaccine**, v. 22, p. 2396 - 2405, 2004.

COLDITZ, G.A.; BAER, H.J.; TAMINI, R.M. Breast cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr, eds. **Cancer Epidemiology and Prevention**. 3rd ed. New York: Oxford University Press, p. 995 - 1012, 2006.

COLLET, J.H. In Handbook of Pharmaceutical Excipients. American Pharmaceutical, ed. R.C. Rowe, P. Sheskey and P. J. Weller. **American Pharmaceutical Association**, Washingtons, DC, p. 447 - 450, 2003.

CROFT, S.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n.1, p. 111 - 126, 2006.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti - cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 148, p. 135 - 146, 2010.

DAVIS, M.E.; CHEN, Z.G.; SHIN, D.M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v.7, n.9, p. 771 - 782, 2008.

DIGESU, M.D. et al. From Diagnosis to treatment clinical applications of Nanotechnology in Thoracic Surgery. **Thoracic surgery clinics**, v. 26, n. 2, p. 215 - 228, 2016.

DORLO, T.P.C. et al. Pharmacokinetics of Miltefosine in Old World Cutaneous Leishmaniasis Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2855 - 2860, 2008.

DRBOHLAVOVA, J. et al. Nanocarriers for Anticancer Drus – New Trends in Nanomedicine. **Current Drug Metabolism**, v.14, p. 547 – 564, 2013.

DUMMER, R. et al. Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphoas: Results of a phase I/II study. **Journal American Academy Dermatology**, v. 29, n.6, p. 963 - 970, 1993.

DUMORTIER, G. et al. A review of co-polymer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharm. Res**, v. 23, p. 2709 – 2728, 2006.

DUTT, G.B. Rotational diffusion of hydrophobic probes in Brij-35 micelles: Effect of temperature micellar internal environment. **J Phys Chem B**, v. 107, p. 10546 – 10551, 2003.

EISSA, M.M.; AMER, E.I. Giardia lambkia: A new target of miltefosine. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 5, p. 443 – 452, 2012.

ESTANQUEIRO, M. et al. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, p. 631 – 648, 2015.

EVANS, D. F.; WENNERSTROM, H. **The Colloidal Domain. Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet**, New York, VCH, 1994.

FANG, H.; DECLERCK, Y.A. Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials. **Cancer Res**, v. 73, p. 4965 – 4977, 2013.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved and limitations and augmentation of the effect. **Adv. Drug Deliv. Rev**, v. 63, p. 136 - 151, 2011.

FAROKHZAD, O.C.; LANGER, R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnosis modalities. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 58, p. 1456 – 1459, 2006.

FIEGL, M. et al. Erufosine, a novel alkylphosphocholine, in acute myeloid leukemia: Single activity and combination with other antileukemic drugs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 62, n.2, p. 321 – 329, 2008.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical Principles of Pharmacy**, 3rd ed. The MacMillan Press, London, 2003.

FDA: Food And Drug Administration. For Health Professionals. Disponível em <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 25 de Junho de 2016.

FORMAN, D. et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. **Vaccine**, v. 30, p. 12 – 23, 2012.

FOSTER, B.; COSGROVE, T.; ESPIDEL, Y. PFGSE-NMR study of pH triggered behavior in Pluronic – Ibuprofen solutions. **Lagmuir**, v. 25, n. 12, p. 6760, 2009.

GABATHULER, R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood - brain barrier to treat brain diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 37, p. 48 - 57, 2010.

GAJATE, C.; MOLLINEDO, F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. **Blood**, v. 109, n.2, p. 711 – 719, 2007.

GAO, Z. et al. Diacyllipid – polymer micelles as nanocarriers for poorly soluble anticancer drugs. **Nano Lett**, v.2, n.9, p. 979 – 982, 2002.

GEORGIEVA, M.C. et al. Combination effects of alkylphosphocholines and gemcitabine in malignant and normal hematopoietic cells. **Cancer Letters**, v.182, p. 163–174, 2002.

GHEBREMESKEL, A.N.; VEMAVARAPU, C.; LODAYA, M. Use of surfactants as plasticizers in preparing solid dispersions of poorly soluble API: selection of polymer-surfactant combinations using solubility parameters and testing the processability. **Int J Pharm**, v. 328, p. 119 – 129, 2007

GILL, P.; MOGHADAM, T.T.; RANJBAR, B. et al. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. **J Biomol Tech**, v.21, n. 4, p. 167 - 193, 2010.

GOHY, J.F. **Adv. Polym. Sci**, v. 190, p. 65, 2005.

GRALLERT, S.R. et al. Polymeric micelles and molecular modeling applied to the development of radiopharmaceuticals. **Braz. J. Pharm. Sci**, v. 48, n. 1, 2012.

GRONEBERG, D.A.; GIERSIG, M.; WELTE, T. Nanoparticle – based diagnosis and therapy. **Curr Drug targets**, v. 7, p. 643 – 648, 2006.

HOBBS, S.K. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels. Role of tumor type and microenvironment. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v. 95, p. 4607 – 4612, 1998.

HOHNE, G.; HEMMINGER, H.; FLAMMERSHEIM, J. Differential Scanning Calorimetry. **Springer, Heidelberg**, p. 72 – 73, 2003.

HOLZER, M. et al. Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze - drying and storage. **Eur J Pharm Biopharm**, v.72, p. 428 - 437, 2009

HOWARD, B. et al. Ultrasound - Enhanced Chemotherapy of Drug - Resistant Breast Cancer Tumors by Micellar - Encapsulated Paclitaxel. **Am J Drug**, v.4, n.2, p. 97 - 104, 2006.

IARC/OMS. International Agency for Research on Cancer. Organização Mundial da Saúde. Disponível em <<http://www.iarc.fr>>. Acesso em: 3 jun. 2016.

INGBER, D.E. Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment?. Semin. **Cancer Biol**, v. 18, n. 5, p. 356 - 364, 2008.

INCA: Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 30 Junho, 2016.

INCA: Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2015/2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 25 Junho, 2016.

ISRAELACHVILI, J.N. **Intermolecular & Surface Forces**. Academic Press. London, Ed, 1991.

ISRAELACHVILI, J.N. **Intermolecular & Surface Forces**. Academic, Amsterdam. Florida, 2nd edn, 2011.

IYER, A.K. et al. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **Drug Discov Today**, v.11, n.17-18, p. 812–818, 2006.

JACOBSON, J.O. et al. American Society of Clinical Oncology/Oncology Nursing Society Chemotherapy Administration Safety Standards. **Journal Clinical Oncology**, n. 99, p. 1-7, 2009.

JAFFRAY, D.A. I Image-guided radiotherapy: from current concept to future perspectives. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 9, n.12, p. 688 – 699, 2012.

JEONG, B.; BAE, Y.H.; LEE, D.S.; KIM, S.W. Biodegradable block copolymers as injectable drug - delivery systems. **Nature**, v. 388, p. 860 - 862, 1997.

JETTE, K.K. et al. **Pharm. Res**, v.21, p. 1184, 2004.

KABANOV, A.; BATRAKOVA, E.; ALAKHOV, V. Pluronic® block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p 759 - 779, 2002.

KANG, N.A. **Effect of Ternary solutes on the evolution of structure and gel formation in amphiphilic copolymer solutions**. Doctoral Thesis, University of Michigan, 2012.

KHADEM VATAN. et al. Miltefosine-Induced Apoptotic Cell Death on Leishmani major and L. tropica Strains. **Korean J Parasitol**, v. 49, n.1, p. 17 - 23, 2011.

KONAN, Y.N.; GURNY, R.; ALLÉRMANN, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub- 200 nm nanoparticles. **Int. J. Pharm**, v. 233, p. 239 - 252, 2002.

KONSTANTINOV, S.M. et al. Alkylphosphocholines; effects on human leukemic cell lines and normal bone marrow cells. **International Journal of Cancer**, v. 77, p. 778 - 786, 1998.

KRISHNA, A.K.; FLANAGAN, D.R. Micellar solubilization of a new antimalarial drug, β -arteether. **J Pharm Sci**, v. 78, n. 7, p 574 - 576, 1989.

KUMAR, B.P. et al. Polymeric micelles as novel carriers for poorly soluble drugs - a review. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, p. 4009 - 4018, 2015.

LA, S.B.; OKANO, T.; KATAOKA, K. Preparation and characterization of the micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated poly (ethylene oxide) - poly (beta-benzyl L- aspartate) block copolymer micelles, v. 85, n.1, p. 85 - 90. **J Pharm Sci**, 1996.

LARRY, J.S.; GRIFFIN, R.; MAKHOUL, I. Mechanisms of bone metastases of breast cancer. **Endocrine Related Cancer**, v.16, p. 703 - 713, 2009.

LAZZARI, M.; LOPEZ - QUINTELA, M. Micellization phenomena in semicrystalline block copolymers: reflexive and critical views on the formation of cylindral micelles. **Macromol Rapid Commun**, v.30, n.21, p. 1785 - 1791, 2009.

LEBER, M.F.; EFFERTH, T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis, review. **International Journal of Oncology**, v. 34, p. 881 - 895, 2009LEE *et al.*, 2010

LEE, Y. *et al.* **Soft Matter**, v.6, p. 977, 2010.

LEMOINE, D. *et al.* Stability study of nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v.17, n. 22, p. 2191 - 2197, 1996.

LEONARD, R. *et al.* Randomized, double - blind, placebo - controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 21, p. 4150 - 4159, 2001.

LEVENTAL, I. *et al.* Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A**, v. 107, p. 22050 - 22054, 2010.

LIM, H.; HOAG, S. Plasticizer effects on physical – mechanical properties of solvent cast soluplus® films. **AAPS Pharm Sci Tech**, v.14, n.3, p. 903 – 910, 2013.

LIN, Y.; ALEXANDRIDIS, P. Temperature - Dependent Adsorption of Pluronic F127 Block Copolymers onto Carbon Black Particles Dispersed in Aqueous Media. **J. Phys. Chem. B**, v. 106, p. 10834 - 10844, 2002.

LINDNER, L.H. *et al.* Dual role of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in thermosensitive liposomes: Active ingredient and mediator of drug release. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n.2, p. 112 – 120, 2008.

LIU, P. *et al.* Interaction studies between indomethacin nanocrystals and PEO/PPO copolymer stabilizers. **Pharm. Res**, v. 32, p. 628 – 639, 2015.

LIU, P. *et al.* Nanosuspensions of poorly soluble drugs: Preparation and development by wet milling. **Int. J. Pharm**, v. 411, p. 215 – 222, 2011.

LOOSDRECHT, A.A. *et al.* Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **J Immunol Methods**, v. 141, n.1, p. 15 - 22, 1991.

LU, Y.; PARK, K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 198-214, 2013.

LUKYANOV, A.N.; TORCHILIN, V.P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, p. 1273 – 1289, 2004.

MAEDA, H.; NAKAMURA, H.; FANG, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. **Adv Drug Deliv Ver**, v. 65, p. 71 – 79, 2013.

MAGENHEIM, B. et al. A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers - ultrafiltration technique at low pressure. **Int J Pharm**, v. 94, p. 115 - 123, 1993.

MAKADIA, H.; SIEGEL, S. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, v. 3, n.3, p. 1377 - 1397, 2011.

MANSOOR, M. **Nanotechnology for Cancer Therapy**, ed 2, CRC Press, 803 p, 2006.

MARTINEZ, V. et al. Disturbance of erythrocyte lipid bilayer by amino acid-based surfactants. **Amino Acids**, v. 33, p. 459 – 462, 2007.

MELIK-NUBAROV, N.S. et al. Interaction of tumor and normal blood cells with ethylene oxide and propylene oxide block copolymers. **FEBS Lett**, v. 466, p. 194 - 198, 1999.

MÉNEZ, C. et al. Intestinal absorption of miltefosine contribution of passive paracellular transport. **Pharm. Res**, n. 24, p. 546 - 554, 2007.

MERKLE, J.; CARRIER, R.N. Manual de fisiopatologia. 2 ed. São Paulo: Roca, 2007.

MEYER, C.A. How chemotherapy damages the central nervous system. **Journal of Biology**, n.7, p. 1 – 3, 2008.

MITCHELL, R.N. et al. Robbins e Cotran: **fundamentos de patologia**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 176 - 201, 2006.

MOLLINEDO, F. et al. ET-18- OCH₃ (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor. **Curr Med Chem**, v.11, p. 3163–3184, 2004

MONAJJEMZADEH, F.; GHADERL, F. Thermal Analysis Methods in Pharmaceutical Quality Control. **J Mol Pharm Org Process Res**, v. 3, n. 1, 2015.

MONTGOMERY, D.C. Experimental Design for Product and Process Design and Development. Journal of the Royal Statistical Society: **Series D (The Statistician)**, v. 48, n. 2, p 159 - 177, 1999.

MOORE, T. et al. Experimental investigation and mathematical modeling of Pluronic F127 gel dissolution: drug release in stirred systems. **J. Control. Release**, v. 67, p. 191 - 202, 2000.

MOURYA, V.K. et al. Polymeric micelles: General considerations and their Applications. **Ind. J Pharm**, v. 45, p. 128 - 138, 2011.

MOVASSAGHIAN, S.; MERKELL, O.M.; TORCHILIN, V.P. Applications of polymer micelles for imaging and drug delivery. **WIREs Nanomed Nanobiotechnol**, v. 7, p. 691 - 707, 2015.

MY CANCER GENOME. Genetically Informed Cancer Medicine. Disponível em <<http://www.mycancergenome.org>>. Acesso em: 30 Junho 2016.

NAGARAJAN, R. Molecular Packing Parameter and Surfactant Self-Assembly: The Neglected Role of the Surfactant Tail. **Langmuir**, v. 18, p. 31 - 38, 2002.

NHI, 2015. **National Institute of Health**. Cancer treatment. Disponível em: <<http://www.cancer.gov>>. Acesso em 30 Junho 2016.

NEDERGAARD, H. et al. *In vitro* stability of lyophilized and reconstituted recombinant activated factor VII formylated for storage at room perature. **Clin ther**, v. 30, n.7, p. 1309 – 1315, 2008.

NEEDHAM, D., DEWHIRST, M. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. **Adv. Drug Deliv. Rev**, v. 53, p. 285-305, 2001.

NILSON, M. et al. Influence of Polydispersity on the Micellization of Triblock Copolymers Investigated by Pulsed Fiedl Gradient Nuclear Magnetic Resonance. **Macromolecules** , v. 40, n. 23, p. 8250 - 8258, 2007.

NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K. Nanostructured devices based on block copolymer assemblies for drug delivery: designing structures for enhanced drug function. **Adv Polym Sci**, v. 193, p. 67 - 101, 2006.

NOH, T. et al. Block copolymer micelles conjugated with anti - EGFR antibody for targeted delivery of anticancer drug. **Polymer**, p. 7321 - 7331, 2008.

NORTHFELT, D.W. et al. Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. **J. Clin. Pharmacol**, v.36, p. 55–63, 1996.

OBERLE, C.; MASSING, U.; KRUG, H.F. On the mechanism of alkylphosphocholine (APC) induced apoptosis in tumor cells. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 3, p. 235 - 245, 2005.

OERLEMANS, C. et al. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. **Pharm Res**, p. 1 - 21, 2010.

OLIVEIRA, P. et al. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2007.

OMS. Organização Mundial Da Saúde. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 30 Junho 2016.

PACHIONI, J. **Síntese e caracterização de análogos alquilfosfocolínicos e N-metil alquilfosfoetanolamínicos do fármaco antineoplásico miltefosina**, 2013. 90 f. Tese (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

PACHIONI, J. et al. Nanostructures for protein drug delivery. **Biomater. Sci**, v.4, p. 205 - 218, 2015

PAN, D. et al. The Effect of Polymeric Nanoparticles on Biocompatibility of Carrier Red Blood Cells. **Plos One**, v. 11, n. 3, 2016.

PILLIN, I.; MONTRELAY, N.M.; GROHENS, Y. Thermo - Mechanical Characterization of Plasticized PLA: Is the Miscibility The Only Significant Factor. **Polymer**, v. 47, n.13, p. 4676 – 4682, 2006.

PORTH, C.M. **Fisiopatologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

PRAVINBHAY, J.D. **Development and performance evaluation of miltefosine - loaded nanostructured lipid carriers for management of visceral leishmaniasis**, 2013. 113 p. Master thesis. National Institute of Pharmaceutical Education and Research, India, 2015.

PRAZERES, T. et al. Determination of the critical micelle concentration of surfactants and amphiphilic block copolymers using coumarin 153. **Inorganica Chimica Acta**, v. 381, p. 181 - 187, 2012.

RANGEL-YAGUI, C.O. et al. Novel potential drug against T. cruzi and its interaction with surfactant micelles. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 12, n. 2, p 183 - 192, 2007.

RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA-Jr, A.; TAVARES, L.C. Micellar solubilization of drugs. **J Pharm Pharmaceut Sci**, v.8, n. 2, p. 162 - 178, 2005.

RAPOPORT, N.; MARIN, A.P.; TIMOSHIN, A.A. Effect of a polymeric surfactant on electron transport in HL-60 cells. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 384, p. 100 - 108, 2000.

RAVAL, A. et al. Preparation and optimization of media using Pluronic® micelles for solubilization of sirolimus and release from the drug eluting stents. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 93, p. 180 - 187, 2012.

ROSEN, M.J. **Surfactants and interfacial phenomena**, 2ed., John Wiley & Sons, New York, 1989.

ROSENBERG, S.A. The development of new immunotherapies for the treatment of cancer using interleukin - 2. A review. **Ann Surg**, v. 208, n.2, p. 121 - 135, 1988.

ROSSI, L. et al. Erythrocyte - based Drug Delivery. **Expert Opin on Drug Delivery**, v.2, n.2, p. 311 - 322, 2005.

ROUZES, C. et al. Influence of polymeric surfactants on the properties of drug loaded PLA nanospheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 32, p. 125 - 135, 2003.

ROWE, R.; SHESKEY, P.; OWEN, S. **Pharmaceutical Handbook of Pharmaceutical Excipients**, Fifth Edition. London UK and Am. Pharm. Assoc., Washington, USA, 2005.

RUBEL, A. et al. The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro. **Radiat Oncol**, p. 1 - 6, 2006

RUITER, G.A. et al. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. **Anti-Cancer Drugs**, v. 14, n. 2, p. 167-173, 2003.

SÁ, M. et al. Understanding Miltefosine - Membrane Interactions Using Molecular Dynamic Simulations. **Langmuir**, v. 31, p. 4503 - 4512, 2015.

SÁ, M.; RANGEL-YAGUI, C.O. Molecular Determinants for the binding mode of Alkylphosphocholines in the C2 Domain of PKC α . **Molecular informatics**, v. 34, p. 84 - 96, 2015.

SAMADDER, P. et al. The antitumor ether lipid 1-Q-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycerophosphocoline (ET-18-OCH₃) inhibits the association between Ras and Raf - 1. **Anticancer Research**, v. 23, p. 2291-2295, 2003.

SANCHEZ, L. et al. The biological properties of lysine - derived surfactants. **Amino Acids**, v. 32, n.1, p. 133 - 136, 2007.

SAPSFORD, K.E. et al. Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. **Anal Chem**, v. 83, p. 4453 - 4488, 2011.

SCHAFFAZICK, S.R. et al. Caracterização e estabilidade físico – química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726 – 737, 2003.

SCHERLUND, M. et al. Micellization and gelation in block copolymer systems containing local anesthetics. **Int. J. of Pharmaceutics**, v 211, p 37, 2000.

SEIFERT, K. et al. Antileishmanial Structure-activity relationships of synthetic phospholipids: *In vitro* and *in vivo* activities of selected derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n.12, p. 4525 – 4528, 2007.

SHUAI, X. et al. Micellar carriers based on block copolymers of poly (ϵ -caprolactone) and poly (ethylene glycol) for doxorubicin delivery. **Journal of Controlled release**, v. 98, p. 415 - 426, 2004.

STOCKHOFF, K. et al. Radiolabeling of nanoparticles and polymers for PET imaging. **Pharmaceutics**, v. 7, n. 4, p. 392 - 418, 2014.

STRICKER, T.P.; KUMAR, V. Neoplasias. In: KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N., ASTER, E.C. Robbins & Cotran - Patologia: **bases patológicas da doença**, e.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 7, p. 259 - 330, 2010.

TAKAHASHI, K. et al. Precise measurement of size of nanoparticles by dynamic light scattering with uncertainty analysis. **Part. Syst. Charact**, v. 25, p. 31 - 38, 2008.

TANFORD, C. The Hydrophobic Effect: Formation of micelles and biological membranes. **Wiley - Interscience**, New York, 1980.

THAKOR, A.S.; GAMBHIR, S.S. Nanooncology: The future of Cancer Diagnosis and Therapy. **CA-A Cancer Journal For Clinicians**, v. 63, n. 6, p. 395 – 418, 2013.

THOME, C.H. et al. Linker for activation of T-cell family member (LAT2) a lipid raft adaptor protein for AKT signaling is an early mediator of alkylphospholipid anti - leukemic activity. **Mol. Cell. Proteomics**, v.11, p. 1898 - 1912, 2012.

TORCHILIN, V.P. Structure and design of polymeric surfactant - based drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 137 - 172, 2001.

TUOMELA, A. et al. Solid formulations by a nanocrystal approach: Critical process parameters regarding scale-ability of nanocrystals for tableting applications. **Int. J. Pharm**, v. 485, p. 77 – 86, 2015.

ÜBERALL, F. et al. Hexadecylphosphocholine inhibits inositol phosphate formation and protein kinase C activity. **Cancer Research**, v. 51, n. 3, p. 807 - 812, 1991.

VACARELLA, S. et al. Worldwide trends in cervical cancer incidence. Impact of screening against changes in disease risk factors. **Eur J Cancer**, v. 49, p. 3262 – 3273, 2013.

VAN BLITTERSWIJK, W.J.; VERHEIJ, M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1831, p. 663 - 674, 2013.

VARGHESEA, N. et al. A calorimetric investigation of the assembly of gold nanorods to form necklaces. **Chem Phys Lett**, v. 450, p. 340 - 344, 2008.

VARVARIGOU, A.D.; GEORGOULIAS, P.; LOUDOS, G. Polymeric micelles and vesicles: biological behavior and evaluation using radiolabeling techniques. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 19, n. 2, p. 189 - 193, 2014.

VINK, S.R. et al. Lipid rafts and metabolic energy differentially determine uptake of anticancer alkylphospholipids in lymphoma versus carcinoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 10, p. 1456 - 1465, 2007.

VIVES, M.A. et al. Irritancy potential induced by surfactants derived from lysine. **Toxicology in vitro**, p. 779 - 783, 1997.

WANKA, G.; HOFFMANN, H.; ULBRICHT, W. Phase diagrams and aggregation behavior of poly (oxyethylene) - poly (oxypropylene) - poly (oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. **Macromolecules**, v. 27, p. 4145 - 4159, 1994.

XIONG, X.B.; ULUDAG, H.; LAVASANIFAR, A. Virus - mimetic polymeric micelles for targeted siRNA delivery. **Biomaterial**, v. 31, p. 5886 - 5893, 2010.

YANG, L. et al. Novel biodegradable polylactide/poly (ethylene glycol) micelles prepared by direct dissolution method for controlled delivery of anticancer drugs. **Pharm Res**, v. 26, n. 10, p. 2332 - 2342, 2009.

YILDIRIM, A. et al. Pluronic polymer capped biocompatible mesoporous silica nanocarriers. **Chem Commun**, v. 49, p. 9782 - 9784. 2013.

YOKOYAMA, M. Clinical Applications of Polymeric micelle carrier systems in chemotherapy and image diagnosis of solid tumors. **J Exp Clin Med**, vol. 3, p. 151 - 158, 2011.

YOKOYAMA, M. et al. Polymer design and incorporation methods for polymeric micelle carrier system containing water – insoluble anti – cancer agent camptothecin. **J. Drug Target**, v. 12, p. 373 – 384, 2004.

YOSIFOV ,D.Y. et al. Erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (erufosine) is a potential antimyeloma drug devoid of myelotoxicity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.67, p. 13–25, 2011.

YOU, S.; VAN WINKLE, D. Single molecule observation of DND electrophoresis in Pluronic F127. **J. Phys. Chem. B**, v. 114, p. 4171 - 4177, 2010.

YU, T., MALUGIN, A., GHANDEHARI, H. Impact of Silica Nanoparticle Design on Cellular Toxicity and Hemolytic Activity. **ACS Nano**, v.5, p. 5717 - 5728, 2011.

ZAHARIEVA, M.M. et al. Erufosine: a membrane targeting antineoplastic agent with signal trans-duction modulating effects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1095,p. 182–192, 2007.

ZHOU, Y.Z. et al. Optimization of PLGA nanoparticles formulation containing L-DOPA by applying the central composite design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, p. 1 - 10, 2012.