

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA BIOQUÍMICO-  
FARMACÊUTICA  
ÁREA DE TECNOLOGIA QUÍMICO-FARMACÊUTICA

Amanda Bellini Silva

Estudo da encapsulação de fármacos antineoplásicos em sistemas nanoestruturados:  
Caracterização estrutural e efeito sinérgico de fármacos

São Paulo  
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA BIOQUÍMICO-  
FARMACÊUTICA  
ÁREA DE TECNOLOGIA QUÍMICO-FARMACÊUTICA

Amanda Bellini Silva

Estudo da encapsulação de fármacos antineoplásicos em sistemas nanoestruturados:  
Caracterização estrutural e efeito sinérgico de fármacos

Versão Original

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências com ênfase em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa

São Paulo  
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S586e Silva, Amanda Bellini  
Estudo da encapsulação de fármacos antineoplásicos em sistemas nanoestruturados: Caracterização estrutural e efeito sinérgico de fármacos / Amanda Bellini Silva. - São Paulo, 2023.  
84 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.  
Orientador: Barbosa, Leandro Ramos Souza

1. Drug Delivery. 2. Cubossomo. 3. Antineoplásico. 4. Vemurafenibe. 5. Curcumina. I.  
T. II. Barbosa, Leandro Ramos Souza, orientador.

Amanda Bellini Silva

Estudo da encapsulação de fármacos antineoplásicos em sistemas nanoestruturados:  
Caracterização estrutural e efeito sinérgico de fármacos

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa  
Orientador/presidente

---

1ºexaminador

---

2ºexaminador

---

3ºexaminador

São Paulo, 07 de Fevereiro de 2024

Dedico este trabalho a todos aqueles que um dia duvidaram de sua capacidade em realizar algo que sempre acharam impossível.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em um primeiro momento à mim, por mesmo nos momentos difíceis não ter desistido do meu sonho. Obrigada por acordar todos os dias disposta a descobrir algo novo e nunca deixar o estresse do processo inebriar a alegria de se fazer algo que ama.

Agradeço as minhas mães, Samanta e Roselane, por ajudarem a edificar uma base sólida que me permitisse alcançar outros patamares. Aos meus irmãos, Victor e Mayara, por estarem sempre ao meu lado, apoiando e encorajando minhas mais diversas ideias.

Agradeço ao meu companheiro, Guilherme, por estar comigo todas as noites e todos os dias difíceis, por me acalmar e me fazer acreditar que eu conseguiria chegar ao final desta jornada. Obrigada por nunca duvidar que eu seria capaz e por secar minhas lágrimas quando eu não acreditei.

Agradeço à minha grande amiga Heidie, que dividiu comigo a experiência de desenvolver um mestrado do zero. Obrigada por todos os ensaios em conjunto. As noites em claro rodando experimentos. Seu apoio incondicional me guiou nos dias mais escuros deste processo. Dividir com você essa jornada foi algo único!

Agradeço aos meus companheiros de casa, Rodolfo, Andrey, Augusto e Rodrigo, por todas as noites que me escutaram e auxiliaram. Obrigada por todas as pizzas e cookies de conforto.

Agradeço aos meus colegas de grupo, Iris Renata, Amanda e Luiz por estarem ao meu lado tanto emocionalmente quanto dentro do laboratório. A presença de vocês foi de grande valia para este processo.

Agradeço ao meu orientador, Leandro Barbosa, por me permitir trilhar meus primeiros passos dentro da ciência.

Agradeço à Raquel Frenedes por me auxiliar e ensinar a base do que eu sei sobre o cultivo e ensaios celulares. Sua presença foi maravilhosa neste período.

Agradeço aos técnicos de laboratório que me auxiliaram, Walber, Larissa e Wanderley, por toda a ajuda e toda a risada durante minha estadia no laboratório. Meus dias foram muito melhores com vocês.

Agradeço aos laboratórios LNBio. LNLS, LNNano, Laboratório de Biosistemas (IF-USP) e IQ-UNICAMP por permitirem que este projeto fosse realizado.

E finalmente, as agências de fomento, à FAPESP e ao CNPq, pelo apoio concedido através dos processos nº 2015/15822-1 e 155970/2018-6, respectivamente. O presente trabalho

foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico:  
é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais  
que impressionam como se fossem um conto de fadas.”

Marie Curie



## RESUMO

SILVA, A. B. **Estudo da encapsulação de fármacos antineoplásicos em sistemas nanoestruturados: Caracterização estrutural e efeito sinérgico de fármacos.** 2023. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Dentro da área da nanotecnologia, o sistema *drug delivery* vem sendo amplamente utilizado, cujo objetivo é proporcionar uma maior eficácia dos ativos farmacêuticos, podendo envolver desde uma distribuição mais seletiva dentro do organismo até a taxa que as moléculas serão liberadas e/ou a atenuação dos efeitos adversos provocados. Para isso, os ativos são encapsulados em nanoestruturas, podendo estas serem de natureza sintética ou natural. Dentre os nanocarreadores promissores encontram-se os cubossomos, que são nanoestruturas complexas capazes de encapsular ativos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos. O objetivo deste projeto foi estudar a encapsulação de fármacos antineoplásicos em sistemas *drug delivery* contra linhagens celulares, investigando também as alterações estruturais sofridas pelos cubossomos e os efeitos sinérgicos dos fármacos, sendo eles: a doxorrubicina, a cisplatina, a vemurafenibe e a curcumina. As metodologias empregadas para elucidar o efeito das combinações dos fármacos, a estruturação da nanopartícula e sua citotoxicidade foram: os estudos de viabilidade celular pós-exposição, espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta, análise de rastreamento de nanopartículas, espalhamento de raios-x a baixos ângulos, criomicroscopia eletrônica de transmissão, eficiência de encapsulação e ensaio de liberação. Inicialmente os fármacos foram testados isoladamente e em duplas, sendo utilizadas cinco linhagens celulares, afim de se promover um delineamento aos ensaios futuros. A partir destes resultados, foi-se optado por manter duas linhagens celulares, a HeLa, como representante de tecidos tumorais, e a HaCat, modelo de tecido saudável, devido a menor resistência apresentada por elas. Em relação as combinações entre as drogas, pode-se observar que todas as duplas formadas apresentaram resultados sinérgicos na linhagem tumoral, sendo mantida para os testes seguintes a combinação curcumina e vemurafenibe. Os cubossomos foram sintetizados eficientemente, sendo produzidos na ausência de fármacos bem como contendo curcumina e vemurafenibe. As nanopartículas apresentaram uma variação de diâmetro entre  $189 \pm 3$  nm e  $224 \pm 2$  nm, sendo o PDI entre 0,08 e 0,25. A conformação do cubossomo foi confirmada através da criomicroscopia eletrônica de transmissão e pelo espalhamento de raios-x a baixos ângulos, onde foi determinada uma estruturação característica de Pn3m. Para a eficiência de encapsulação os valores variaram entre 79% de encapsulação para a curcumina e 72% para a vemurafenibe, quando utilizadas isoladamente. No caso da encapsulação em dupla, os valores se converteram para 63% e 53% para a curcumina e vemurafenibe, respectivamente. A liberação das drogas do interior da nanopartícula oscilou entre 1500, 480 e 420 minutos para os cubossomos de curcumina, vemurafenibe e curcumina + vemurafenibe, respectivamente. Os testes de citotoxicidade demonstraram que as concentrações de 0,01 e 0,03 mg/mL foram capazes de promover uma viabilidade acima de 70%, porém, utilizando estas proporções não foi possível observar resultados significativos. Por fim, o sistema se mostrou estável e homogêneo, sendo capaz de promover a encapsulação dos fármacos tanto singularmente quanto em dupla e, apesar da quantidade de fármacos não ter sido suficiente para ocasionar alterações ao sistema celular, a execução deste trabalho abre portas para que novos estudos sejam realizados, podendo-se testar diferentes ativos bem como alterando a composição da nanopartícula afim de se reduzir a citotoxicidade.

**Palavras-Chave:** Antineoplásico; *Drug Delivery*; Cubossomos; Doxorrubicina; Cisplatina; Vemurafenibe; Curcumina

## ABSTRACT

SILVA, A. B. **Study of the encapsulation of antineoplastic drugs in nanostructured systems: Structured characterization and synergistic effect of drugs.** 2023. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Within the area of nanotechnology, the drug delivery system has been widely used, whose objective is to provide greater effectiveness of pharmaceutical active ingredients, which may range from a more selective distribution within the organism to the rate at which the molecules will be released and/or the attenuation of adverse effects caused. To achieve this, the active ingredients are encapsulated in nanostructures, which may be synthetic or natural in nature. Among the promising nanocarriers are cubosomes, which are complex nanostructures capable of encapsulating both hydrophilic and hydrophobic active ingredients. The objective of this project was to study the encapsulation of antineoplastic drugs in drug delivery systems against cell lines, also investigating the structural changes undergone by the cubosomes and the synergistic effects of the drugs, namely: doxorubicin, cisplatin, vemurafenib and curcumin. The methodologies used to elucidate the effect of drug combinations, the structuring of the nanoparticle and its cytotoxicity were: post-exposure cell viability studies, dynamic light scattering, zeta potential, nanoparticle tracking analysis, small angle x-rays scattering, transmission electron cryomicroscopy, encapsulation efficiency and release assay. Initially, the drugs were tested alone and in pairs, using five cell lines, in order to promote a design for future trials. Based on these results, it was decided to maintain two cell lines, HeLa, as a representative of tumor tissues, and HaCat, a model of healthy tissue, due to their lower resistance. Regarding the combinations between the drugs, it can be observed that all the pairs formed presented synergistic results in the tumor lineage, with the combination of curcumin and vemurafenib being maintained for the following tests. Cubosomes were efficiently synthesized, being produced in the absence of drugs as well as containing curcumin and vemurafenib. The nanoparticles varied in diameter between  $189 \pm 3$  nm and  $224 \pm 2$  nm, with the PDI being between 0.08 and 0.25. The conformation of the cubosome was confirmed through transmission electron cryomicroscopy and small angle x-rays scattering, where a characteristic structure of Pn3m was determined. For encapsulation efficiency, values varied between 79% encapsulation for curcumin and 72% for vemurafenib, when used alone. In the case of double encapsulation, the values converted to 63% and 53% for curcumin and vemurafenib, respectively. The release of drugs from the interior of the nanoparticle ranged between 1500, 480 and 420 minutes for the curcumin, vemurafenib and cubosomes with curcumin + vemurafenib, respectively. Cytotoxicity tests demonstrated that concentrations of 0.01 and 0.03 mg/mL were capable of promoting viability above 70%, however, using these proportions it was not possible to observe significant results. Finally, the system proved to be stable and homogeneous, being able to promote the encapsulation of drugs both singly and in pairs and, although the quantity of drugs was not enough to cause changes to the cellular system, the execution of this work opens doors for new studies are carried out, with the possibility of testing different active ingredients as well as changing the composition of the nanoparticle in order to reduce cytotoxicity.

**Keywords:** Antineoplastic; Drug Delivery; Cubosomes; Doxorubicin; Cisplatin; Vemurafenib; Curcumin.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE GRÁFICOS.....	XV
LISTA DE ORGANOGRAMAS.....	XVI
LISTA DE TABELAS.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Nanotecnologia.....	18
1.2. Sistemas para <i>Drug Delivery</i> .....	18
1.3. Cubossomos.....	19
1.3.1. Produção dos Cubossomos.....	21
1.3.1.1. Protocolo <i>Bottom up</i> .....	21
1.3.1.2. Protocolo <i>Top Down</i> .....	22
1.4. <i>Drug Delivery</i> e o Tratamento de Câncer.....	22
1.5. Fármacos para Tratamentos Quimioterápicos.....	23
1.5.1. Doxorrubicina (DOX).....	23
1.5.2. Vemurafenibe (VEM).....	24
1.5.3. Cisplatina (CIS).....	26
1.5.4. Curcumina (CUR).....	27
1.5.5. Efeito Sinérgico entre Fármacos.....	28
1.6. Linhagens Celulares.....	29
1.6.1. Linhagem MDA-MB-231.....	29
1.6.2. Linhagem NIH 3T3.....	30
1.6.3. Linhagem HeLa.....	30
1.6.4. Linhagem HaCat.....	31
1.6.5. Linhagem HT-29.....	31
1.7. Técnicas de Caracterização.....	32
1.7.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	32
1.7.2. Potencial Zeta.....	33
1.7.3. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	34
1.7.4. Espectroscopia no Ultravioleta/Visível (UV-VIS).....	35
1.7.5. Criomicroscopia eletrônica de transmissão (Crio-TEM).....	35
1.7.6. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).....	36
2. OBJETIVOS E METAS.....	38

2.1. Objetivo Geral.....	38
2.2. Metas.....	38
2.2.1. Meta 1.....	38
2.2.2. Meta 2.....	38
2.2.3. Meta 3.....	38
2.2.4. Meta 4.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. Materiais e Equipamentos.....	40
3.1.1. Materiais Consumíveis.....	40
3.1.2. Equipamentos.....	40
3.2. Métodos.....	41
3.2.1. Produção dos Cubossomos.....	41
3.2.1.1. Protocolo <i>Bottom up</i> .....	41
3.2.1.1.1. Produção de Cubossomos em Ausência de Fármaco.....	41
3.2.1.1.2. Produção de Cubossomos com Fármaco Encapsulado.....	43
3.2.1.2. Protocolo <i>Top Down</i> .....	44
3.2.1.2.1. Produção de Cubossomos em Ausência de Fármaco.....	44
3.2.1.2.2. Produção de Cubossomos com Fármaco Encapsulado.....	44
3.2.2. Viabilidade Celular Pós-Exposição.....	45
3.2.3. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	46
3.2.4. Potencial Zeta.....	46
3.2.5. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	47
3.2.6. Espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-VIS).....	47
3.2.6.1. Eficiência de Encapsulação (EE).....	47
3.2.6.2. Ensaio de Liberação (EL).....	48
3.2.7. Criomicroscopia eletrônica de transmissão (Crio-TEM).....	49
3.2.8. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
4.1. Teste de Sinergia.....	51
4.2. Caracterização Cubossomos.....	56
4.2.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	57
4.2.1.1. Ensaio de Estabilidade.....	57
4.2.2. Potencial Zeta.....	58
4.2.2.1. Ensaio de Estabilidade.....	59
4.2.3. Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Crio-TEM).....	60

4.2.4. Espalhamento de Raio-X à Baixos ângulos (SAXS).....	62
4.3.5. Eficiência de Encapsulação (EE).....	64
4.3.5.1. Cubossomo + Curcumina 0,5%.....	64
4.3.5.2. Cubossomo + Vemurafenibe 1%.....	65
4.3.5.3. Cubossomo + Vemurafenibe 1% + Curcumina 0,5%.....	65
4.3.6. Ensaio de liberação.....	66
4.3.6.1. Cubossomo + Curcumina 0,5%.....	66
4.3.6.2. Cubossomo + Vemurafenibe 1%.....	67
4.3.6.3. Cubossomo + Curcumina 0,5% + Vemurafenibe 1%.....	69
4.3.7. Teste de Citotoxicidade.....	70
4.3.7.1. Ensaio de Citotoxicidade com Cubossomos em Ausência de Fármaco. .....	70
4.3.7.2. Ensaio de Citotoxicidade com Cubossomos com Fármacos Encapsulados.....	72
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>
APÊNDICE A – Curva de calibração curcumina em Acetona.....	86
APÊNDICE B – Curva de calibração curcumina em DMSO.....	87
APÊNDICE C – Curva de calibração da vemurafenibe em DMSO.....	88

## LISTA DE ABREVIACOES

BID	Duas Vezes ao Dia
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada
CIS	Cisplatina
Crio-TEM	Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão
CUB	Cubossomo
CUR	Curcumina
DD	<i>Drug Delivery</i>
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Mdium
DNA	cido Desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
ECG	Eletrocardiograma
EE	Eficiência de Encapsulao
EL	Ensaio de Liberao
ER	Receptor de Estrognio
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
KDA	Quilodalton
HER2	Receptor 2 do Fator de Crescimento Humano
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MEF	Fibroblasto Embrionário de Rato
$\mu$ G	Micrograma
MG	Miligrama
ML	Mililitro
MV	Milivolt
NM	Nanometro
NNI	Iniciativa Nacional de Nanotecnologia
NTA	Análise de Rastreamento de Nanopartículas
PR	Receptor de Progesterona
SAXS	Espalhamento de Raio-X  Baixos Ângulos
TNF	Fatores de Necrose Tumoral
VEM	Vemurafenibe

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura molecular do surfactante F-127 (A), do fitantriol (B) e da monoleína (C).....	19
Figura 2 – Esquemática da estrutura da doxorubicina.....	24
Figura 3 – Esquemática da estrutura da vemurafenibe.....	26
Figura 4 – Esquemática da estrutura da cisplatina.....	26
Figura 5 – Esquemática da estrutura da curcumina.....	27
Figura 6 – Imagem microscópica da linhagem HeLa.....	30
Figura 7 – Esquemática das grandezas envolvidas em uma medida de potencial zeta.....	33
Figura 8 – Solução sendo finalizada na plataforma.....	42
Figura 9 – Solução de fitantriol e F-127 sendo condensada no rotaevaporador.....	42
Figura 10 – Placa de 96 poços após o processo de incubação do Alamar Blue (esquerda) e a leitura da placa através do Enspire 2300.....	46
Figura 11 – Criomicroscopia eletrônica de transmissão das amostras de cubossomo, (A) cubossomo branco, (B) cubossomo + curcumina 0,5%, (C) cubossomo + vemurafenibe 1% e (D) cubossomo + vemurafenibe 1% + curcumina 0,5%.....	61
Figura 12 – Amostras coletadas durante o ensaio de liberação da amostra de cubossomo com curcumina 0,5%.....	66
Figura 13 – Alíquota da esquerda pertencente a primeira coleta (esbranquiçada e opaca) e a alíquota da direita pertencente a última coleta (translúcida).....	68
Figura 14 – Amostras coletadas durante o ensaio de liberação da amostra de cubossomo com vemurafenibe 1% + curcumina 0,5%.....	70

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Ensaio de viabilidade celular das linhagens saudáveis e tumorais.....	52
Gráfico 2 – Definição da IC <sub>50</sub> da linhagem HaCat (A) e da HeLa (B).....	53
Gráfico 3 – Teste de citotoxicidade com IC <sub>25</sub> e combinações em HaCat (A) e HeLa (B).....	55
Gráfico 4 – Curva SAXS para a amostra de cubossomo em ausência de fármaco.....	62
Gráfico 5 – Curva de SAXS para amostra de cubossomo com curcumina 0,5%.....	63
Gráfico 6 – Curva de SAXS para a amostra de cubossomo com vemurafenibe 1%.....	64
Gráfico 7 – Ensaio de liberação da amostra de cubossomo com curcumina 0,5%.....	67
Gráfico 8 – Ensaio de liberação da amostra de cubossomo + Vemurafenibe 1%.....	68
Gráfico 9 – Curva de liberação da amostra de cubossomo com vemurafenibe 1% + curcumina 0,5%.....	69
Gráfico 10 – Citotoxicidade dos cubossomos em linhagem HaCat.....	71
Gráfico 11 – Citotoxicidade dos cubossomos em linhagem HaCat (A) e HeLa (B).....	72
Gráfico 12 – Citotoxicidade dos cubossomos em linhagem HaCat (A) e HeLa (B).....	73



## LISTA DE ORGANOGRAMAS

Organograma 1 – Métodos <i>Top Down</i> e <i>Bottom Up</i> .....	21
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diluição dos fármacos e solventes utilizados na solução estoque.....	43
Tabela 2 – Diluição das alíquotas durante o ensaio de eficiência de encapsulação.....	48
Tabela 3 – IC <sub>50</sub> das drogas nas diferentes linhagens celulares.....	54
Tabela 4 – Viabilidade celular HaCat (Esquerda) e HeLa (Direita).....	55
Tabela 5 – DLS amostras de cubossomo.....	57
Tabela 6 – DLS (nm) das amostras de cubossomo durante 30 dias.....	58
Tabela 7 – PDI da amostra de cubossomo durante 30 dias.....	58
Tabela 8 – Potencial zeta do cubossomo em ausência de fármaco.....	59
Tabela 9 – Potencial zeta das amostras de cubossomos durante 30 dias.....	60
Tabela 10 – Ensaio de encapsulação para amostra de cubossomo com curcumina 0,5% .....	65
Tabela 11 – Ensaio de encapsulação para a amostra de cubossomo com vemurafenibe 1% .....	65
Tabela 12 – Ensaio de encapsulação para as amostras de cubossomo com vemurafenibe 1% + curcurmina 0,5% .....	66

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Nanotecnologia

A expressão “nano” traz em seus primórdios referências datadas do grego, cujo significado do prefixo se refere a algo “anão” ou demasiadamente pequeno. Em cima deste conceito, surgiram a nanociência e a nanotecnologia, áreas de pesquisa que visam o estudo de pequenas estruturas, moléculas ou átomos que possuam características ou propriedades atrativas para o meio científico como, por exemplo, de substâncias com altos índices de condução elétrica, efeitos magnéticos, hidrossolubilidade, atividade fotocatalisadora ou efeitos óticos (LUGANI *et al.*, 2018). Tudo isso com o objetivo de aperfeiçoar e inovar processos já conhecidos, trazendo melhorias e permitindo ao campo acadêmico a possibilidade de desvendar questões até o momento desconhecidas (RAMSDEN, 2016).

Dentre as diferentes áreas das nanociências, uma das que mais se destaca é a nanomedicina. Essa vertente, nos últimos vinte anos, tem usufruído de inúmeros avanços cujo enfoque principal é otimizar e melhorar a qualidade e longevidade de vida dos indivíduos, com aperfeiçoamentos no campo dos métodos cirúrgicos e principalmente de tratamentos. Um dos aprimoramentos de destaque é à implementação de sistemas *drug delivery*, desenvolvidos com o objetivo de promover o carreamento de moléculas dentro de diferentes aplicações, como farmacológicas e cosméticas (TRUCILLO, 2021a).

### 1.2. Sistemas para *Drug Delivery*

O sistema *drug delivery* (DD) é uma das vertentes em destaque dentro das utilidades da nanotecnologia, sua definição engloba o ato de administrar e entregar ativos farmacêuticos de maneira eficiente e de preferência ao local destinado (alvo-terapêutico), fator largamente desejável em terapias quimioterápicas, reduzindo a toxicidade causada a órgãos terceiros durante o tratamento (DANG; GUAN, 2020). De maneira simplificada, o sistema DD consiste em tornar os medicamentos mais eficazes, podendo envolver desde uma distribuição mais seletiva dentro do organismo até o aumento do intervalo em que as moléculas serão liberadas e/ou a atenuação dos efeitos adversos provocados (BAE; PARK, 2020).

No mecanismo convencional de fabricação de medicamentos, os ativos farmacêuticos são comumente administrados em comunhão com substâncias denominadas de excipientes, podendo estes estar presentes em forma de diluentes, emulsões, lubrificantes ou estabilizadores

químicos, exercendo funções de controle de absorção ou biodisponibilidade (VILAR *et al.*, 2012). A partir do uso dos sistemas DD os ativos farmacêuticos passam a ser encapsulados em nanoestruturas, podendo ser de natureza sintética ou biodegradável, obrigatoriamente compatíveis com o princípio ativo utilizado (BIZERRA; SILVA, 2016), sua composição pode variar entre polímeros e partículas lipídicas, emulsões, membranas, hidrogéis, dendrímeros e outros complexos macromoleculares (TRUCILLO *et al.*, 2020b). Dentre essas diferentes nanopartículas, destacam-se os cubossomos, uma alternativa promissora dentro do campo do DD (MALHEIROS *et al.*, 2021a).

### 1.3. Cubossomos

Cubossomos são nanopartículas utilizadas como sistema DD com o objetivo de promover o carregamento de ativos farmacêuticos. Sua estrutura é composta por um surfactante não-iônico, usualmente o F-127 (Figura 1a), em adição com algum tipo de lipídio (AVANTIKA *et al.*, 2020), como o fitantriol (Figura 1b) e a monoleína (Figura 1c) (MALHEIROS *et al.*, 2021a). Esses lipídios são formados por duas regiões distintas: uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica, composta por uma ou mais cadeias de hidrocarbonetos.

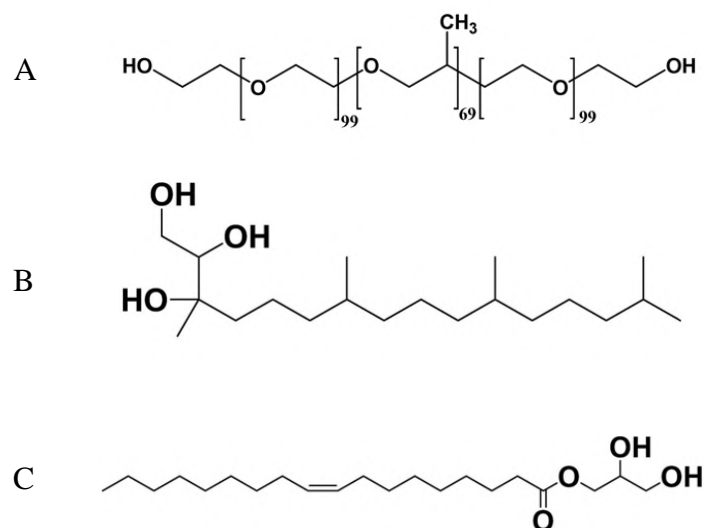


Figura 1 – Representação da estrutura molecular do surfactante F-127 (A), do fitantriol (B) e da monoleína (C).

**FONTE:** Umar *et al.* (2022, p. 5).

Devido a esta composição lipídica, as moléculas do cubossomo se agregam em virtude do efeito hidrofóbico. Esse efeito ocorre devido à diferença de polaridade entre a água e as cadeias de hidrocarbonetos que, quando colocadas em contato, as moléculas de água que circundam a cauda do lipídio formam redes organizadas, diminuindo a entropia e consequentemente aumentando a energia livre do sistema. Para recuperar a entropia perdida, as moléculas de água adsorvidas precisam ser liberadas, existindo duas maneiras para se realizar esse objetivo: seja pela adsorção de moléculas lipídicas a uma interface, seja por associação de cadeias de hidrocarbonetos de diferentes moléculas. O resultado dessa reação é a estruturação de um sistema geral de baixa energia, pois quando as caudas de diferentes moléculas lipídicas se associam, as cabeças hidrofílicas se aproximam gerando, consequentemente, um efeito de afastamento entre si. Muitos parâmetros podem interferir nesta associação molecular, como a pressão, o pH, a temperatura e a composição lipídica do sistema (por exemplo em misturas de lipídios) (OLIVEIRA *et al.*, 2022). O resultado deste mecanismo de associação resulta em uma nanopartícula formada por uma bicamada lipídica contínua altamente curvada, organizada em uma estrutura tridimensional cúbica (AVANTIKA *et al.*, 2020).

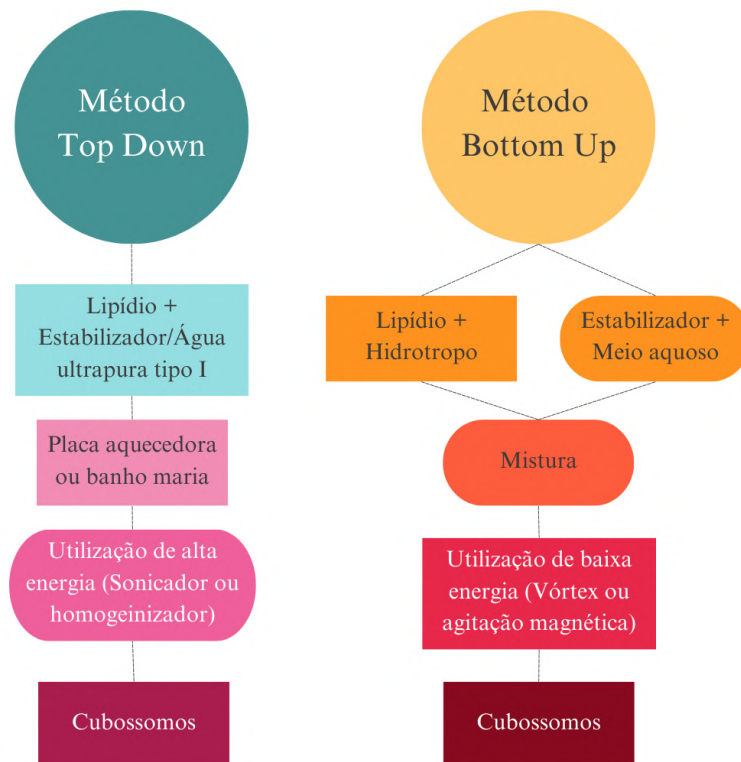
Essa estruturação cúbica pode ser apresentada de três maneiras distintas, a forma primitiva (também denominada de Im3m), a diamante (Pn3m) e a giroide (Ia3d), sendo as estruturas majoritariamente formadas a primitiva e a diamante. Um ponto que deve ser mencionado é que a formação Im3m surge com a adição do pluronic F-127, sendo que, sem este componente o diagrama de fases de ambos os lipídios seria formado pelas estruturas Ia3d e Pn3m (BARRIGA *et al.*, 2018). As três diferentes estruturas identificadas podem ser descritas em termos de duas redes tridimensionais de hastes interconectadas de maneira mútua, sendo também desconectadas. Na Ia3d, as hastes estão ligadas coplanarmente em arranjo 3 por 3, interconectadas de maneira mútua e desconectadas, sendo que cada rede é quiral, e as duas são imagens espelhadas. Na Pn3m, as hastes estão tetraedricamente unidas em um arranjo 4 por 4, formando estruturas de canais de água semelhantes a uma estrutura de diamante. Já na Im3m, as hastes estão unidas cubicamente em um arranjo 6 por 6, representando a estrutura mais simétrica entre as três (LOTIERZO, 2021). Essas características físicas fornecem aos cubossomos a capacidade de encapsular tanto ativos hidrofílicos, dentro dos canais de água e/ou lúmen das regiões lipídicas, quanto moléculas hidrofóbicas ou lipofílicas, nas áreas lipídicas (MALHEIROS *et al.*, 2021a).

As vantagens da utilização dessas nanopartículas são provenientes do seu efeito protetor em relação a possíveis danos físicos ou químicos que os ativos venham a sofrer no organismo,

além da possibilidade de promover o envio dos medicamentos para um tecido específico e o controle dos níveis de liberação do fármaco (GABALLA *et al.*, 2020).

### 1.3.1. Produção dos Cubossomos

A sintetização dos cubossomos pode seguir dois protocolos diferentes, o protocolo de *top down* e o de *bottom up* (Organograma 1). Ambas as técnicas se baseiam na dispersão do composto lipídico em excesso de água, porém os protocolos se diferenciam na maneira que esta mistura é preparada (CASTRO, 2018b).



Organograma 1 – Métodos *Top Down* e *Bottom Up*.

**FONTE:** Adaptado de Malheiros, 2018.

#### 1.3.1.1. Protocolo *Bottom up*

O protocolo de *bottom up*, também conhecido como o método de diluição com solvente, é a técnica que envolve a dispersão da mistura dos componentes lipídicos, o estabilizante e um hidrótopo em excesso de água com a mínima utilização de energia externa, sendo que para esta

síntese a utilização de um hidrótropo, cuja função é aumentar a solubilidade de compostos hidrofóbicos em água é crucial (GABALLA *et al.*, 2020).

Neste método, o lipídio solubilizado, normalmente em álcool, é gotejado compassadamente na solução aquosa contendo o estabilizante. Os cubossomos sintetizados por este mecanismo são comumente menores, quando comparados a técnica de *top down*, não sendo necessária a utilização de grandes quantias de energia para que estas pequenas partículas se agreguem formando cubossomos maiores (MALHEIROS, 2018).

Por não se utilizar de grandes fontes energéticas, este método é compatível com materiais termossensíveis, sendo este outro ponto diferencial. Além disso, por ser uma técnica que promove a distribuição mais homogênea do estabilizante por toda a solução, a amostra se apresenta um tempo maior de estabilidade, sendo o melhor método para o escalonamento industrial (SIVADASAN *et al.*, 2023).

Um das desvantagens deste método se faz referente a aplicações biológicas, devido a possibilidade de existir solvente residual presente na amostra, podendo assim aumentar o efeito citotóxico perante a testes *in vitro* e *in vivo* (BARRIGA *et al.*, 2018).

#### 1.3.1.2. Protocolo *Top Down*

O protocolo de *top down* consiste na realização de dois passos principais. Primeiramente é misturado o lipídio ao estabilizador diluído, formando assim um agregado viscoso. A segunda parte consiste em se utilizar de fontes de alta energia para dispersar o composto e formar as nanopartículas, esta fonte de energia pode ser oriunda de um homogeneizador de alta pressão ou um sonicator. Por esta técnica requerer altas fontes de energia, a sua escalonabilidade industrial acaba não sendo possível, além disso, compostos termossensíveis, como agentes biológicos, peptídeos e proteínas requerem maior atenção (GABALLA *et al.*, 2020).

Uma das vantagens deste método é o fator de reprodutibilidade, mostrando-se um protocolo capaz de sintetizar amostras estáveis e homogêneas, além disso, por não se utilizar de solventes orgânicos, como ocorre no *Bottom Up*, esta metodologia não demanda cautela quanto aos ensaios biológicos (BARRIGA *et al.*, 2018).

#### 1.4. *Drug Delivery* e o Tratamento de Câncer

O câncer é a segunda maior causa de fatalidades na população mundial, sendo seu tratamento proporcionado através de medicações quimioterápicas cujo objetivo é acarretar no

bloqueio da multiplicação das células cancerígenas ou extingui-las. Um ponto relevante a ser mencionado é a falta de especificidade que as moléculas antitumorais possuem em relação às células cancerígenas, sendo aquelas atraídas por tecidos que possuam uma replicação rápida, grupo que inclui tanto componentes cancerosos quanto tecidos saudáveis que promovem esta função. Esse fator faz com que tecidos saudáveis também sejam lesionados durante o protocolo medicamentoso, trazendo importantes efeitos adversos que devem ser considerados (HOSSSEN *et al.*, 2019).

Atualmente, novos mecanismos e protocolos terapêuticos vêm sendo utilizados para o tratamento do câncer, como é o caso da imunoterapia, fototerapia, hormonioterapia ou intervenções cirúrgicas, porém, a quimioterapia ainda persiste como o método de escolha na maioria dos quadros. A utilização dos sistemas DD dentro da nanotecnologia vem crescendo em relação à utilização de quimioterápicos, a fim de reduzir as problemáticas que esta terapêutica acarreta (TANG *et al.*, 2021). Com o uso de mecanismos de nanoencapsulação é possível promover a redução dos efeitos adversos ocasionados pela quimioterapia e aumentar a eficiência medicamentosa, além de possibilitar uma liberação dos ativos de maneira contínua e controlada sobre as células tumorais malignas (EDIS *et al.*, 2021). Nanomateriais como os lipossomos, polímeros, dendrímeros, nanopartículas magnéticas, dentre outros, vêm sendo testados como carreadores de quimioterápicos, cujo objetivo primordial é a promoção de uma especificidade em relação às células cancerígenas (YU *et al.*, 2019).

## 1.5. Fármacos para Tratamentos Quimioterápicos

Existem inúmeros ativos utilizados dentro dos protocolos medicamentosos para neoplasias, sendo exemplos de ativos amplamente utilizados e/ou pesquisados: a doxorrubicina, a vemurafenibe, a cisplatina e a curcumina. A problemática para estes compostos convencionais são seus fatores limitativos, como o surgimento de graves efeitos colaterais como, náusea, vômito, fadiga, perda de cabelo e, em quadros mais graves, óbito (EDIS *et al.*, 2021).

### 1.5.1. Doxorrubicina (DOX)

A doxorrubicina (DOX) (Figura 2) é um dos ativos quimioterápicos mais amplamente utilizados para o tratamento de enfermidades cancerígenas severas, sua aprovação pelo “*Food and Drug Administration Authority*” (FDA) foi instaurada no ano de 1974. Desde então, este



fármaco vem sendo empregado em protocolos terapêuticos de câncer de mama, linfoma, leucemia linfocítica aguda e câncer de bexiga (UPADHYAY *et al.*, 2020).

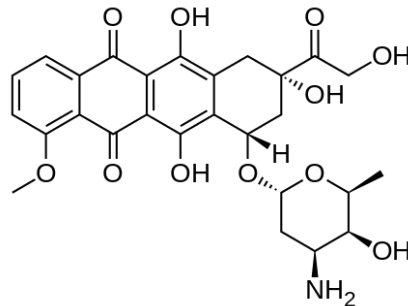


Figura 2 – Esquematização da estrutura da doxorubicina.

**FONTE:** Ajzashokouhi *et al.* (2020, p. 6).

Quimicamente, sua obtenção é realizada através da metabolização da bactéria *Streptomyces peucetius* (UPADHYAY *et al.*, 2020). Mesmo sendo uma medicação amplamente disseminada no meio clínico, seu emprego traz inúmeros efeitos indesejáveis, incluindo irritações de pele, êmese, perda de cabelo, lesão tecidual no local de inoculação do composto, resistência ao quimioterápico, inflamações bucais e, em casos mais severos pode chegar à evolução de quadros anafiláticos e danos a tecidos hígidos (AJZASHOKOUHI *et al.*, 2020). Além disso, este medicamento possui como uma das características que limitam sua utilização o coeficiente dose-dependente em quadros de cardiotoxicidade, fato já observado devido a lesões citológicas em mitocôndrias e retículos sarcoplasmáticos das células cardíacas (DANMAIGORO *et al.*, 2018). Em outras palavras, a cardiotoxicidade deste ativo pode promover desde quadros leves e subclínicos até ocorrências mais severas agudas e crônicas, chegando a casos de apresentação de insuficiência cardíaca congestiva (ICC). Quadros mais agudos podem ser observados por meio de eletrocardiogramas (ECG), cujas alterações variam entre reduções de complexos QRS, taquicardias e batimentos supraventriculares prematuros (SONGBO *et al.*, 2019).

A utilização desta molécula, tanto em neoplasias hematológicas quanto sólidas, propicia uma redução da progressão tumoral juntamente com fatores inibidores de divisão celular, não sendo ainda totalmente claros os mecanismos envolvidos na sua função. Este fármaco não possui a capacidade de penetração da barreira hematoencefálica, iniciando sua incumbência adentrando por difusão passiva as membranas celulares, fator possível devido a sua estruturação lipofílica, o que permite um rápido teor de disseminação pelos tecidos adjacentes. Uma vez internalizada, a molécula possui a habilidade de se inserir no ácido desoxirribonucleico (DNA),

sendo capaz de proporcionar seus atributos. Seu mecanismo de indução a apoptose é complexo, tendo como pontos principais a aglutinação juntamente com as enzimas nucleares, como é o caso da topoisomerase I e II, culminando em um processo de citotoxicidade e, conseqüentemente, proporcionando falhas nas estruturas de DNA durante as fases de G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> do processo de divisão celular. Além disso, a apoptose programada e síntese e liberação de radicais livres, precursores de lesões em membrana celular e DNA, incluem seus efeitos durante o tratamento contra a neoplasia. Sua metabolização ocorre por via hepática, sendo eliminada do organismo através da liberação da bile, fezes e urina (FRANCO *et al.*, 2019).

### 1.5.2. Vemurafenibe (VEM)

A vemurafenibe (VEM) é uma medicação quimioterápica amplamente utilizada para o tratamento de quadros neoplásicos de melanoma metastático não ressecável (MAXIMOVA *et al.*, 2020), sendo este o tipo mais agressivo de neoplasias cutâneas e de números mais elevados de mutação dentre as demais enfermidades neoplásicas (GOEY *et al.*, 2019).

Sua utilização teve início em 2011 graças à liberação concedida pelo FDA, enquanto na união europeia ocorreu em 2012, em consequência da aprovação da *European Medicines Agency in Europe* (MAXIMOVA *et al.*, 2020), sendo este o primeiro inibidor BRAF aprovado para procedimentos de tratamento, o protocolo terapêutico inclui doses diárias, frequentemente duas vezes ao dia (BID), podendo ser utilizada como medicação única ou concomitante a outro ativo, como é o caso das associações com inibidores de MEK (GOEY *et al.*, 2019).

Seu mecanismo de ação envolve realizar a inibição da adenosina-trifosfato de maneira competitiva, ligando-se seletivamente à proteína BRAF portadora da mutação V600E, esse mecanismo proporciona a inibição da cascata de fosforilação da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e, conseqüentemente, tornando possível a estagnação do crescimento tumoral, devido à interrupção causada durante a fase G<sub>1</sub> de divisão celular (FERNANDES, 2018).

A taxa de resistência à droga é um dos fatores limitativos do emprego da VEM (Figura 3), podendo gerar quadros de recidivas poucos meses depois de sua primeira administração, além disso, efeitos adversos podem ser observados durante o seu uso, incluindo fotossensibilidades, irritações e enfermidades na pele, como o queratoacantoma, hiperqueratose e carcinoma de células escamosas, sendo estas originadas devido à resposta clínica apresentar um caráter limitado, muitas vezes transitório, proveniente de resistências adquiridas ou intrínsecas (FERNANDES, 2018).

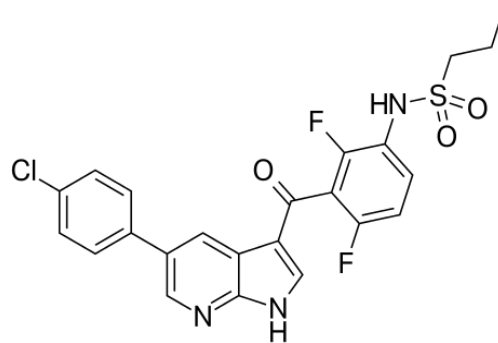


Figura 3 – Esquematização da estrutura da vemurafenibe.

**FONTE:** Cordeiro (2019, p. 23).

### 1.5.3. Cisplatina (CIS)

A cisplatina (CIS) (Figura 4) é um agente citotóxico largamente utilizado nos dias atuais, suas indicações incluem quadros de neoplasias de ovário, testículo, bexiga, útero, pulmão, tumores de pescoço e cabeça (ARAÚJO, 2019), cervical, esôfago e língua. Esta droga de base metálica foi a primeira desta composição descoberta com funções quimioterápicas capaz de promover protocolos tanto curativos quanto de caráter paliativo, seu uso pode ser administrado como monoterapia nos quadros de tumores sólidos ou outros ativos também podem ser combinados dentro do protocolo (CHEN; CHANG, 2019a).

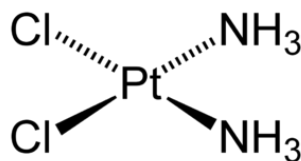


Figura 4 – Esquematização da estrutura da cisplatina.

**FONTE:** Adaptado de Araújo (2019, p. 18).

Sua descrição data de 1844, sendo liberado como medicação pela FDA apenas em 1978, revolucionando inúmeros prognósticos até então considerados letais. Seu efeito citotóxico é resultante de ligações juntamente com a cadeia de DNA, proporcionando ligações intra e intercadeias que induzem alterações estruturais e, conseqüentemente, inibem a transcrição e a replicação deste material genético, induzindo a morte programada das células neoplásicas. Juntamente com este mecanismo, o ativo proporciona a formação de radicais livres, a diminuição dos mecanismos de defesa antioxidantes e a ativação da cascata das caspases,

culminando em um quadro de apoptose. Estes efeitos atingem tanto as células neoplásicas quanto alguns tecidos hígidos do organismo, trazendo grande toxicidade sistêmica (ARAÚJO, 2019).

Quadros de diarreia, anorexia e êmese podem ser característicos devido ao seu alto efeito sobre o sistema gastrointestinal, toxicidade hematológica pode ser identificada devido alterações em diversas linhagens hematopoiéticas, como é o caso das variedades linfóides, mieloides e eritróides, a ototoxicidade é outro parâmetro muito observado nos casos de efeitos adversos deste tipo de protocolo, sendo relatados na anamnese queixas envolvendo vertigem, zumbido e perda de capacidade auditiva. A nefrotoxicidade foi um fator extremamente relevante dentro do coeficiente limitante de sua implementação nos protocolos de tratamento, trazendo quadros de lesão tubular aguda e outros danos renais (ARAÚJO, 2019).

Casos de resistência ao ativo proporcionam uma grande barreira à efetividade do mecanismo curativo da droga, não sendo facilmente definidos os índices que podem ser observados para culminar nesta situação. Alguns fatores estão envolvidos para que esta resultância seja atingida, podendo ser citados coeficientes como a redução do acúmulo da medicação no interior celular durante o protocolo de tratamento, desenvolvimento de aumento de reparos aos danos do DNA e a inativação citosólica da cisplatina (ALDOSSARY, 2019).

#### 1.5.4. Curcumina (CUR)

A curcumina (CUR) (Figura 5) é um componente natural oriundo da *Curcuma longa L.*, sendo este caracterizado como um fitoquímico polifenólico amplamente empregado dentro da medicina chinesa e ayurvédica, sua aplicabilidade varia desde atividades antineoplásicas, anti-inflamatórias, antioxidantes, imunomodulador, hepatoprotetor, nefroprotetor, antiprotozoários, antimicrobianas, antivirais até sua utilização em protocolos terapêuticos para doenças degenerativas como a doenças de Parkinson, Alzheimer e esclerose, enfermidades cardiovasculares e diabetes (MENDONÇA, 2012).

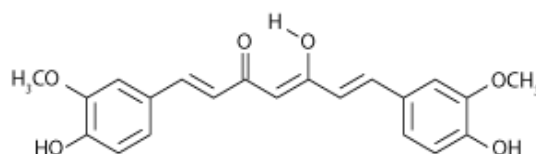


Figura 5 – Esquematização da estrutura da curcumina.

**FONTE:** Mendonça (2012, p. 17).

O mecanismo de ação envolvido durante a contenção da perpetuação do tecido neoplásico envolve mecânicas de inibição de multiplicação celular, atuando sobre diversos fatores de transcrição, e promoção da apoptose (ALVES *et al.*, 2019).

Além de sua implementação nos protocolos de quimioterapia e quimioprevenção, a curcumina ainda se mostrou relevante nos processos de redução da quimiorresistência, mecanismo amplamente problemático quando tratamos de medicações antineoplásicas, esta função é obtida através da destruição de células tumorais quimiorresistentes, em partes devido à inibição das vias metabólicas que levam à resistência ao tratamento. Este fator torna ainda mais interessante a sua implementação tanto em protocolos isolados quanto em associação com outros fármacos (COLLINO, 2014).

A associação da curcumina com outras medicações quimioterápicas tem se tornado cada vez mais usual dentro dos protocolos terapêuticos dos pacientes oncológicos. Sua utilização juntamente com a cisplatina tem apresentado números promissores no quesito de redução do crescimento celular, mesmo nos quadros onde a cisplatina foi utilizada em subdoses, possibilitando a redução dos efeitos adversos proporcionados pelo fármaco. A utilização juntamente com a doxorrubicina e outras medicações como a vincristina, o paclitaxel e a oxaliplatina exercem um efeito sinérgico em relação à sensibilização de células cancerosas de diversos tipos de neoplasias (MENDONÇA, 2012).

Embora seus efeitos dentro da terapêutica sejam inúmeros, a aplicabilidade da curcumina no ambiente clínico é limitada, sendo a baixa biodisponibilidade e, conseqüentemente, os ínfimos valores de concentração plasmática por administração oral um dos fatores mais relevantes neste quesito, parâmetro que se dá devido à baixa absorção promovida pelo trato gastrointestinal (ALVES *et al.*, 2019), seguida de uma biotransformação e eliminação rápida (MENDONÇA, 2012).

#### 1.5.5. Efeito Sinérgico entre Fármacos

A combinação entre diferentes medicações tem sido amplamente utilizada dentro da quimioterapia, buscando explorar a susceptibilidade de diferentes vias moleculares envolvidas na patogênese da enfermidade e, também, dos diversos mecanismos de ação de cada medicação utilizada de maneira individual (DUARTE; VALE, 2022).

Essas combinações podem acabar gerando três tipos diferentes de interação entre os componentes, podendo ser classificadas em: aditivas, antagonistas e sinérgicas. A interação aditiva é obtida quando dois ativos distintos são utilizados em conjunto e o seu efeito é igual a

somatória dos mesmos utilizados de maneira singular. A interação antagonista ocorre quando o efeito dos compostos somados é inferior aos resultados dos mesmos sendo utilizados sozinhos, este tipo de interação é comumente observado em quadros de competição pelo mesmo sítio de ligação. Por fim, a sinergia é definida pelo aumento do efeito dos compostos em somatória em comparação com quando utilizados solo (CHEN *et al.*, 2021c).

Existem inúmeros trabalhos que descrevem a presença de efeitos sinérgicos entre fármacos, podendo citar entre cisplatina e curcumina (TSAI *et al.*, 2011) (BECIT *et al.*, 2020), cisplatina e doxorrubicina (JIN *et al.*, 2020) (WU *et al.*, 2017) e doxorrubicina e curcumina (KARAVASILI *et al.*, 2019) (GUO *et al.*, 2020).

## 1.6. Linhagens Celulares

As linhagens celulares são elementos cruciais dentro do campo da pesquisa de medicamentos e nanopartículas, sendo possível através de testes *in vitro* estabelecer e descobrir inúmeras informações e mecanismos de interação com o organismo vivo, não necessitando, em um primeiro momento, desta exposição (SOUZA, 2019).

### 1.6.1. Linhagem MDA-MB-231

O câncer de mama foi estimado, em 2020, como o segundo tipo de câncer mais comum no globo, sendo caracterizado como o mais comum dentro da comunidade feminina. Além disso, seus números atingiram a casuística como a quinta maior causa de óbitos na classificação geral das mortes por neoplasia, sendo a causa mais frequente entre as mulheres com câncer em regiões menos desenvolvidas e a segunda causa de morte por câncer em regiões mais desenvolvidas (IARC, 2020).

No Brasil os números indicam que o câncer de mama seria a neoplasia mais comum entre as mulheres, não levando em consideração os de pele não melanoma, e também é o que causa mais mortes por câncer em mulheres (INCA, 2022). Este tipo de neoplasia é considerado como multifatorial, podendo envolver fatores reprodutivos, comportamentais, biológicos, genéticos, endócrinos e de estilo de vida (SILVA, 2020a). Sua classificação ocorre a partir do tecido de origem epitelial no revestimento interno dos ductos ou lóbulos da mama, podendo ser limitante ou invasivo. Além disso, sua classificação pode conter assinaturas moleculares, geralmente diagnosticados com base na ausência ou presença de três receptores: o receptor 2

do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), receptores de progesterona (PR) e os receptores de estrogênio (ER) (TUBARÃO, 2017).

A linhagem MDA-MB-231 é uma das linhagens celulares de câncer de mama mais comumente empregada dentro de estudos experimentais *in vitro*. Sua origem é de um adenocarcinoma mamário humano extraído de uma paciente caucasiana de 51 anos de idade, e que apresenta alterações numéricas em seu cariótipo, além de demonstrar uma tripla negatividade em relação aos receptores ER, PR e HER2, característica que demonstra elevado grau de agressividade (SILVA, 2020b).

### 1.6.2. Linhagem NIH 3T3

A realização de testes dos mais diversos interesses em culturas celulares têm se tornado um hábito cada vez mais usual dentro do campo da pesquisa, sendo os fibroblastos embrionários de rato (MEF) os tipos mais comumente empregados, devido a sua isolamento facilitada e seu rendimento abundante (PARK *et al.*, 2021a).

Os fibroblastos são células caracterizadas por sua multifuncionalidade, participando desde processos de reparação tecidual e cura, até mecânicas de sustentação e síntese de componentes. Devido a sua ampla aplicabilidade, estas células estão dispostas em diversas regiões do organismo hígido e, muitas vezes, participando de processos deletérios ao sistema, como é o caso das neoplasias. Nestes casos, os fibroblastos contribuem com a região estromal do tumor ocupando papel de grande relevância como fator evolutivo dos tecidos neoplásicos. Este coeficiente se dá pela alta taxa de resposta que os fibroblastos possuem a exposição frente a fatores de crescimento, mecânica também utilizada pelas células tumorais (SINGHAL *et al.*, 2016).

### 1.6.3. Linhagem HeLa

A linhagem HeLa (Figura 6) foi a primeira linhagem celular imortalizada humana, material proveniente de um câncer cervical uterino, sendo que, para a obtenção destas células a paciente Henrietta Lacks passou por um processo de remoção de dois pequenos fragmentos do colo uterino. Essa linhagem já foi amplamente utilizada como organismo para diversos tipos de ensaios, como testes de citocinese e endocitose, estudos de clonagem, fertilização, quimioterapia, testes durante o desenvolvimento da vacina de poliomielite, mapeamento

genético, além de ser utilizada na descoberta e classificação funcional dos genes envolvidos na mitose (HONGBAO, 2017).

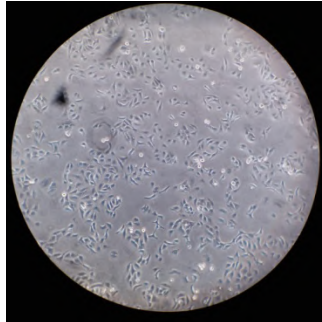


Figura 6 – Imagem microscópica da linhagem HeLa.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Um das características já determinadas desta linhagem é o fato de seu cariótipo possuir em média de 76 a 80 cromossomos, enquanto uma célula normal possui 48, concluindo que a HeLa possui uma mutação significativamente grande. Esta mutação está associada à presença do papilomavirus humano, responsável por quase todos os quadros de câncer cervical. A presença do DNA viral introduzido na célula hospedeira leva a síntese de proteínas que inativam a proteína p53, cuja função é prevenir mutações e supressão de tumor (LYAPUN *et al.*, 2019).

#### 1.6.4. Linhagem HaCat

A cultura celular e os testes *in vitro* são cruciais para possibilitar o conhecimento sobre o efeito de técnicas, biomateriais e substâncias, devido à capacidade de observação de possíveis efeitos citotóxicos e alterações no crescimento celular. Para que isso seja possível à utilização de linhagens celulares saudáveis se faz necessária dentro do campo da pesquisa (SOUZA, 2019).

A HaCat, queratinócito epidérmico humano, se trata de uma linhagem celular derivada de células da periferia distante de um melanoma humano. Tratam-se de células de fácil proliferação que não possuem a capacidade de formação de neoplasias *in vivo* (ZEIDLER, 2012).

#### 1.6.5. Linhagem HT-29



A HT-29 é uma linhagem de adenocarcinoma colorretal humano que é comumente utilizada em estudos sobre fatores de necrose tumoral (TNF), além disso, seu emprego em modelos para a diferenciação de células intestinais e células provenientes do câncer colorretal também são grandemente observados na literatura (WILSON; BROWNING, 2002).

Essas células, quando expostas a indutores específicos, podem se tornar capazes de expressar marcadores típicos de linhagens celulares intestinais distintas, diferenciando-se ao longo de diferentes linhagens que se assemelham àquelas encontradas no epitélio intestinal saudável, sendo assim consideradas células multipotentes, semelhantes às células-tronco da cripta intestinal, devido a esta característica, essas células têm sido empregadas como um *vitromodelo* para o estudo de diferenciação e proliferação de células-tronco intestinais (PARK *et al.*, 2018b).

## 1.7. Técnicas de Caracterização

A caracterização de nanopartículas se apresenta como um desafio presente no meio dos nanomateriais, sendo dependente de uma série de técnicas específicas, devido a sua complexidade referente ao tamanho e manipulação de amostra. Dentre as técnicas utilizadas podemos citar: espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta, análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-VIS), criomicroscopia eletrônica de transmissão (Crio-TEM) e espalhamento de raios-x a baixos ângulos (SAXS) (LOTIERZO, 2021).

### 1.7.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O espalhamento de luz (DLS) é uma técnica baseada no espalhamento de luz visível através da interação de um feixe de luz monocromático (LASER) com uma amostra, e é amplamente utilizada para análise das dimensões de partículas em suspensão, quando essas possuem diâmetros  $D_h \leq 1\mu\text{m}$  (JIA *et al.*, 2023).

A função de autocorrelação mede a flutuação na intensidade de espalhamento em um dado ângulo (que em geral, mas não necessariamente, é de  $90^\circ$ ). O decaimento desta função de autocorrelação em função do tempo está relacionado com o coeficiente de difusão transacional das partículas em estudos, inseridas. A função de autocorrelação da intensidade espalhada é dada por:

$$g_{(2)}(q, \tau) = \frac{[I(t)I(t + \tau)]}{[I(t)]^2}$$

onde  $\tau$  é o tempo de atraso,  $I(t)$  é a intensidade de espalhamento medida no detector do equipamento em um dado tempo e  $q$  é o módulo do vetor de onda de espalhamento definido como o módulo da diferença do vetor de luz incidente  $\vec{K}_e$  com vetor de onda dispersado  $\vec{K}_1$ :  $|\vec{q}| = |\vec{K}_e - \vec{K}_1|$  e adotando que as partículas do sistema possam ser consideradas esféricas, é possível obter o seu diâmetro hidrodinâmico  $D_H$ . A dinâmica de espalhamento pode ser derivada da função de autocorrelação, dada pela já bem conhecida relação de Stokes-Einstein (KNYSH *et al.*, 2023):

$$D_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta r D}$$

As medidas de DLS devem ser realizadas com amostra numa solução homogênea, com baixa turbidez e em diversas concentrações com o objetivo de se evitar erros de interpretação nos dados (JIA *et al.*, 2023).

### 1.7.2. Potencial Zeta

O potencial zeta é definido como o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento da partícula em estudo, ou seja, logo após a camada de Stern (FIGURA 7). Por exemplo, vamos supor uma partícula coloidal carregada negativamente, como ilustrado na figura 9, imediatamente em contato com esta partícula negativa, existirão íons positivos fortemente ligados a ela. Estes íons se encontram na chamada camada de Stern e irão se deslocar juntamente com a partícula. O potencial zeta é definido, então, como o potencial elétrico ao final da camada iônica que rodeia a partícula em estudo (MUNEER *et al.*, 2023).

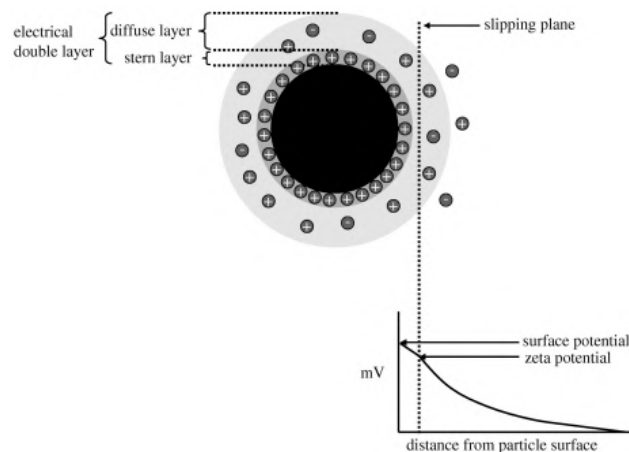


Figura 7 – Esquematisação das grandezas envolvidas em uma medida de potencial zeta.

**FONTE:** Castro (2018b, p. 53).

De um ponto de vista mais pragmático, o potencial zeta depende não somente da superfície da partícula, mas também do meio dispersante como, por exemplo, do pH, força iônica e temperatura, já que sua medida está diretamente relacionada a estabilidade de um sistema coloidal. É consenso na literatura da área que sistemas coloidais com valores de potencial zeta da ordem de  $|\zeta| > 30\text{mV}$  são ditos estáveis, já que sua agregação é dificultada pela existência de um potencial eletrostático repulsivo entre as partículas (LOTINA *et al.*, 2023). Vale a pena ressaltar que a grandeza física realmente medida neste experimento não é propriamente o potencial zeta, mas sim a chamada mobilidade eletroforética,  $\mu_E$ . Em poucas palavras, aplica-se um campo elétrico constante na solução e as partículas, dependendo de sua carga efetiva, se deslocam para um dado eletrodo (obviamente sempre o de sinal oposto ao da partícula). Utilizando então um feixe laser e o efeito doppler (variação da frequência de luz em função da existência de uma velocidade não nula de uma partícula) mede-se a velocidade escalar dessas partículas (em unidades de  $\mu\text{ms}$ ). A mobilidade eletroforética então é definida através da razão:  $\mu_E = \frac{2\epsilon\zeta}{3\eta} f(ka)$ , onde  $f(ka)$  é a chamada função de Huckel e é definida de acordo com a força iônica do meio (representada pelo inverso do comprimento de Debye,  $k$ ) e matematicamente como:  $f(ka) = 1.5$  para sistemas em que  $f(ka) \gg 1$  ou ainda,  $f(ka) = 1.0$  para sistemas em que  $(ka) < 1$ . A mobilidade eletroforética é definida como a razão entre a velocidade escalar de uma partícula e o campo elétrico externo aplicado à solução (CASTRO, 2018b).

### 1.7.3. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) é uma técnica de caracterização que se utiliza da dispersão de luz ocasionada pela presença de partículas em uma dispersão, sendo seu intervalo de avaliação de 30 a 1000nm, fator dependente do índice de refração das nanopartículas (FILIPE *et al.*, 2010) (RASPANTINI, 2018).

A técnica faz uma combinação entre uma câmera de dispositivo de carga acoplada (CCD) com uma microscopia de espalhamento de luz a laser, o que resulta na possibilidade de poder acompanhar as nanopartículas unitariamente, analisando individualmente o movimento

browniano de cada nanoestrutura presente na dispersão e, através de software específico, correlacionar o movimento apresentado com o tamanho da partícula (LOTIERZO, 2021).

O NTA vem como um complemento para as medidas obtidas pelo DLS, pois além de conseguir produzir pequenas gravações de curta duração (entre 30 e 60 segundos), sendo coletada uma média de 30 quadros por segundo. Esta técnica traz como uma de suas vantagens a possibilidade de analisar soluções coloidais contendo agregados ou até partículas maiores (GOMES, 2019).

#### 1.7.4. Espectroscopia no Ultravioleta/Visível (UV-VIS)

A espectroscopia UV-VIS é uma técnica capaz de promover estudos sobre as interações que ocorrem entre a radiação e a matéria, esta técnica consiste na irradiação com luz visível e/ou luz ultravioleta uma amostra que contenha regiões cromóforas, induzindo assim a transições eletrônicas dentro da molécula (BATISTA, 2010).

Essas transições eletrônicas se dão pelo fato dos elétrons que se encontram nas ligações covalentes podem transitar entre diferentes níveis energéticos, sendo observado que quando ocorre uma absorção apropriada de energia os elétrons se tornam excitados, passando de seu nível fundamental de energia para uma orbital de energia mais elevada. Através desse tipo de interação, a espectroscopia consegue medir as variações energéticas que ocorrem em uma amostra quando a mesma emite ou absorve frequências de radiação eletromagnética e, através destes dados conseguir correlacionar as flutuações de luz absorvida com a estrutura molecular da substância (SANTOS, 2011).

#### 1.7.5. Criomicroscopia eletrônica de transmissão (Crio-TEM)

A técnica de Criomicroscopia eletrônica de transmissão (Crio-TEM) permite a obtenção de imagens de alta resolução a partir de amostras biológicas preservadas em gelo amorfo, nela é possível obter detalhes da morfologia interna do sistema bem como sua estrutura tridimensional (CASTRO, 2018b).

No microscópio, a amostra retida na solução congelada é bombardeada com elétrons que passam através de uma lente magnética e registram múltiplas cópias das imagens de projeção da molécula (ou nanopartícula), suspensas em orientações aleatórias no filme vitrificado. No caso dos cubossomos, a técnica foi utilizada para confrontar os dados de SAXS, e obter maiores informações sobre os planos cristalinos (MALHEIROS, 2018b).

A grande vantagem da Crio-TEM é a não fixação química da amostra, podendo ser estudada dentro do ambiente fisiológico nativo. Além disso, sem a necessidade da cristalização, que trava a amostra em uma determinada posição, as estruturas podem ser congeladas em diversas conformações para permitir que os mecanismos biológicos sejam deduzidos (MALHEIROS, 2018b).

#### 1.7.6. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

O espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) é uma técnica utilizada para realizar caracterizações estruturais (NARAYANAN *et al.*, 2023) de amostras variando entre 1 e 1000 nm, não sendo necessária a fixação do material através de técnicas de cristalização, vitrificação ou mesmo fixação química, sendo uma coleta de informações no ambiente nativo do material a ser analisado (TREWHELLA, 2022).

Baseado na interferência de onda, o SAXS utiliza informações da interação entre um raio-x monocromático e os elétrons da amostra coletadas por um detector, podendo este raio-x ser de origem de um acelerador sincroton ou não. Quando esta interação ocorre são geradas duas possibilidades distintas: um espalhamento elástico ou inelástico. Um espalhamento inelástico ocorre quando os elétrons da amostra em questão absorvem o raio-x e, posteriormente, reemitem em ondas com energia inferior a inicial. O espalhamento elástico por outro lado conserva a energia de reemissão igual a energia inicial incidida na amostra. Para a análise por SAXS, os dados de força inelástica são desconsiderados, por não conseguirem fornecer informações sobre a estrutura interna da amostra (VELA; SVERGUN, 2020).

A técnica permite a produção de padrões de difração que podem ser empregados na determinação do parâmetro de rede do cristal líquido e o grupo espacial de qualquer sistema que seja composto por uma estrutura periódica. Esta periodicidade se faz presente devido aos planos cristalográficos, também conhecidos como planos de Bragg, onde cada estrutura apresenta um padrão de disposição entre os planos cristalográficos, sendo que esta distância entre eles pode ser vinculada a cada família de planos e a distância de repetição das células unitárias na rede cristalina (VELA; SVERGUN, 2020).

Para os cubossomos, o SAXS é comumente utilizado para a análise dos picos de difração e suas devidas posições, afim de se encontrar a simetria cristalina do sistema e, para estruturas cristalinas cúbicas a base de fitrantiol, seu diagrama de fase (MALHEIROS, 2018b).

Justificativa do projeto

Nesse sentido, se faz importante a realização de estudos que apresentem alternativas aos fatores limitantes atuais da quimioterapia. Por isso, justificou-se a realização do presente projeto, uma vez que a encapsulação de fármacos em nanoestruturas permite uma liberação controlada do quimioterápico, possivelmente diminuindo seus efeitos tóxicos em células saudáveis. Além disso, o presente estudo realizou testes utilizando a associação de drogas, uma vez que a poliquimioterapia é capaz de diminuir a resistência das células tumorais ao tratamento, aumentando sua efetividade devido aos efeitos sinérgicos dos ativos.

Vale a pena ressaltar que nosso grupo de pesquisa vem, nos últimos anos, se dedicando ao estudo de sistemas celulares, em específico ao estudo de citotoxicidades, e em colaboração com diversos outros grupos.

## 2. OBJETIVOS E METAS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral da proposta é estudar a encapsulação de fármacos antineoplásicos em sistemas *drug delivery* contra células cancerígenas investigando alterações estruturais e efeitos sinérgicos dos fármacos.

### 2.2. Metas

Para alcançarmos nosso objetivo, separamos este projeto em algumas metas principais, descritas abaixo:

#### 2.2.1. Meta 1

- Estudo do efeito dos fármacos DOX, VEM, CIS e CUR em ausência das nanopartículas em duas linhagens celulares, a HeLa e a HaCat.
  - A. Verificar a eficiência de cada um desses 4 fármacos em linhagens tumorais e também sua toxicidade em células provenientes de tecidos saudáveis.
  - B. Evidenciar, em experimentos *in vitro*, a existência, ou não, do efeito sinérgico dos fármacos mencionados anteriormente, ou seja, realizando os experimentos com os fármacos dois a dois.

#### 2.2.2. Meta 2

- Testar a capacidade de encapsulação de fármacos em cubossomos de fitantriol;
  - A. Estudar a possibilidade de encapsular os fármacos escolhidos em cubossomos de fitantriol, investigando a capacidade de encapsulação dos cubossomos para esses fármacos;

#### 2.2.3. Meta 3

- Caracterizar, do ponto de vista estrutural, o sistema nanoestruturado que se mostrar mais promissor nas etapas anteriores.
  - A. Caracterização por 7 diferentes técnicas experimentais, sendo elas: Viabilidade celular pós-exposição, espalhamento de raio-X a baixos ângulos (SAXS), espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial-zeta, ensaio de liberação (EL), eficiência de encapsulação (EE), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e criomicroscopia eletrônica de transmissão.

#### 2.2.4. Meta 4

- Investigar o efeito citotóxico das formulações descritas na Meta 2 em linhagens celulares neoplásicas e também em células saudáveis. Para realizarmos esta etapa do projeto, realizaremos experimentos *in vitro* acerca deste efeito citotóxico.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais e Equipamentos

##### 3.1.1. Materiais Consumíveis

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (D5648) - Sigma-Aldrich®.
- Sodium Bicarbonate (S5761) - Sigma-Aldrich®.
- Phosphate Buffered Saline (P4417) - Sigma-Aldrich®.
- Solução Tripsina/EDTA 250mg% (T2077) - Vitrocell Embriolife®.
- Phytantriol (mixed isomers) 3,7,11,15 – tetramethylhexadecane – 1,2,3 – triol (mixed isomers) (85005560) - Avanti Polar Lipids INC®.
- Soro Fetal Bovino (S0011) - Vitrocell Embriolife®.
- Pluronic F-127 (P2443) - Sigma-Aldrich®.
- Curcumin (C1386) - Sigma-Aldrich®.
- Cisplatin CRS (C2210000) - European Pharmacopoeia Reference Standard®.
- Álcool etílico 99.8° INPM – Itajá.
- Água ultrapura tipo I (Purelab Option) - Elga.
- Doxorubicin HCL (D-490-1) - Goldbio®.
- Vemurafenib (V-2800) - LC Laboratories®.
- AlamarBlue (BUF012A) - BIO-RAD®.
- Dimethyl Sulfoxide (D2650) - Sigma-Aldrich®.
- Trypan Blue Stain 0,4% (15250-061) - Gilco®.
- Penicilina/Estreptomicina (P0223) - Vitrocell Embriolife®.
- Ethanol (1.00983.1000) - Merck®.

##### 3.1.2. Equipamentos

- Enspire 2300 - PerkinElmer.
- Zetasizer Nano ZS - Malvern Panalytical.
- Countess™ Automated Cell Counter - Thermo Fisher Scientific.
- Micropipeta Multicanal F1 (8 canais – 30 a 300µL) - Thermo Fisher Scientific.

- Kit Micropetas Monocanal (1-10 $\mu$ L, 10-100 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L, 0,5-5mL) - Thermo Fisher Scientific.
- Phmetro de bancada - Sinergia Científica.
- Placa Aquecedora com Agitador Magnética C-MAG HS 7 - IKA.
- Rotaevaporador RV 10 digital - IKA.
- Banho de Aquecimento HB 10 digital - IKA.
- Purificador de Água Purelab Option - Elga.
- Balança de precisão AY220 - Shimadzu.
- Banho Ultratermostatizado Chiller MA184 - Marconi Equipamentos para Laboratórios.
- Bomba de Vácuo AK D1 6B - Leybold Trivac.
- NanoSight NS300 - Marvern Panalytical.
- Centrífuga 5810R - Eppendorf.
- Fluxo laminar biológico Tipo A/B3 - Thermo Scientific.
- Estufa Series II Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator - Thermo Forma.
- Banho maria com circulação Isotemp 2100 Fault - Fisher Scientific.
- Microscópio TMS - Nikon.
- Capela de Exaustão - Oxicamp.
- Sonicador Dismembrator Model 100 - Fisher Scientific.
- UV-VIS agilent 8453.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Produção dos Cubossomos

#### 3.2.1.1. Protocolo *Bottom up*

##### 3.2.1.1.1. Produção de Cubossomos em Ausência de Fármaco

Para a sintetização dos cubossomos com a técnica de *bottom up* descrito na literatura (AKHLAGHI et al., 2016), o primeiro passo foi a realização da seleção e higienização dos materiais e vidrarias necessárias, a fim de garantir que nenhum contratempo ou contaminação ocorresse no meio do procedimento ou que não estejam disponíveis para uso. Com os materiais

separados, a próxima etapa foi a pesagem dos componentes necessários, sendo que no preparo os solutos escolhidos foram o fitantriol e o pluronic F-127 surfactante não-iônico. Os compostos foram pesados e armazenados em béqueres separadamente nas proporções de 25mg de F-127 e 100mg de fitantriol. Terminada esta etapa ambos os solutos foram diluídos por seus solventes, sendo 22,5 ml de água destilada para o F-127 e 10 ml de álcool etílico para o fitantriol. O próximo passo do experimento foi levar as amostras ao banho maria numa temperatura de 45° C por volta de meia hora ou até o momento da estabilização das temperaturas. Após essa estabilização, a solução de fitantriol foi adicionada lentamente dentro do béquer contendo a solução de F127. Finalizado o processo de pipetagem do fitantriol, a solução foi deixada por um curto período de tempo sob a plataforma aquecida. É perceptível que ao fim do processo de pipetagem a solução ganha uma coloração esbranquiçada (Figura 8).

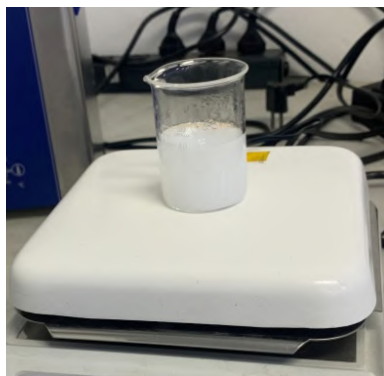


Figura 8 – Solução sendo finalizada na plataforma.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

A solução realocada no balão e levada para o rotaevaporador à vácuo (Figura 9) afim de reduzir o volume final da solução para 5mL, padronizado pelo grupo.



Figura 9 – Solução de fitantriol e F-127 sendo condensada no rotaevaporador.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

O processo no rotaevaporador foi realizado sob uma rotação de 80 rpm, sendo utilizada uma bomba de vácuo para tornar o procedimento mais rápido e eficiente. Não existe um tempo exato para que seja atingido o êxito do processo, porém à medida que a amostra condensa é esperado que se forme uma “linha” de amostra no fundo do balão volumétrico.

Após o término do procedimento, a solução foi transferida para um frasco devidamente identificado onde a mesma ficará sendo armazenada e, caso o volume não atinja os 5mL desejados, o restante pode ser completado com água ultrapura tipo I. Nos quadros onde a amostra obtida for maior que 5 ml a mesma deve retornar ao rotaevaporador.

### 3.2.1.1.2. Produção de Cubossomos com Fármaco Encapsulado

Para a síntese de cubossomos incorporados com os ativos escolhidos foram previamente preparadas duas soluções base de fitantriol e F-127, seguindo as mesmas proporções já descritas na produção do cubossomo em ausência de fármaco, 25mg de F-127 e 100mg de fitantriol, sendo dissolvidas em 22,5 ml de água destilada e 10 ml de álcool etílico, respectivamente.

Previamente a diluição dos compostos, foram preparadas soluções estoque dos fármacos diluídos (Tabela 1) em seus respectivos solventes e armazenados. A técnica escolhida para fazer a incorporação dos fármacos nos cubossomos foi à de co-solubilização, onde uma porção desta solução preparada foi adicionada ao fitantriol já dissolvido.

Fármaco	Concentração da Solução Estoque	Solvente
Curcumina	7 mg/mL	Acetona
Curcumina	7 mg/mL	DMSO
Vemurafenibe	5 mg/mL	DMSO

Tabela 1 – Diluição dos fármacos e solventes utilizados na solução estoque.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Da solução estoque dos ativos dissolvida em seus respectivos solventes foi pipetada uma quantidade e adicionada ao béquer de fitantriol, produzindo ao final do processo cubossomos com porcentagens de ativos referentes em relação a massa de PHY, sendo eles: curcumina 0,5% e 1%; vemurafenibe 0,1%, 0,5%, 1% e 5%. Vale ressaltar que os resultados apresentados neste

projeto são referentes somente aos cubossomos de curcumina de 0,5%, pelo fato das amostras de cubossomo com curcumina 1% terem se mostrado instáveis no decorrer dos ensaios, além disso, em relação aos cubossomos de vemurafenibe foi utilizada majoritariamente a concentrações de 1%, devido a fatores de melhor eficiência de encapsulação.

Após a diluição, ambos os compostos, fitantriol/fármaco e F-127, foram transferidos para o banho-maria à 45°C por 30 minutos, sendo importante salientar que, a partir do momento que os ativos fotossensíveis foram adicionados, as amostras passaram a ser cobertas com papel alumínio para minimizar o contato com a luz. Após o banho-maria, a solução de fitantriol/fármaco foi pipetada na diluição de F-127 com auxílio de uma pipeta Pasteur e, posteriormente, transferida para o rotaevaporador à 80 rpm e banho-maria de 45°C. Com o término do procedimento, a solução foi passada para um frasco âmbar devidamente identificado onde a mesma ficará sendo armazenada.

### 3.2.1.2. Protocolo *Top Down*

#### 3.2.1.2.1. Produção de Cubossomos em Ausência de Fármaco

Para se iniciar a sintetização pela técnica de *top down*, assim como para a técnica de *bottom up*, a organização e higienização dos materiais necessários é crucial para uma boa sintetização, minimizando o risco de possíveis contaminações e imprevistos. Com o material já higienizado e seco, o próximo passo para a síntese dos cubossomos na ausência de fármaco foi a pesagem do fitantriol e do F-127 nas proporções de 25mg de F-127 e 100mg de fitantriol. Após a pesagem, o F-127 foi diluído em 5 mL de água ultrapura tipo I e, juntamente com o fitantriol, permaneceu em uma chapa aquecedora à 45°C por um período de 10 minutos. Passado o tempo necessário para a estabilização dos compostos, o F-127 diluído foi adicionado ao fitantriol, podendo assim a amostra ser passada pelo sonicador. Ao final do procedimento, a alíquota passa a apresentar uma forma leitosa semelhante as amostras sintetizadas pela técnica de *bottom up*.

#### 3.2.1.2.2. Produção de Cubossomos com Fármaco Encapsulado

A produção de cubossomos com fármaco encapsulado se iniciou com a pesagem do fitantriol e F-127, seguindo as mesmas proporções utilizadas para sintetização do cubossomo em ausência de um ativo encapsulado.

Após a pesagem, o F-127 foi diluído em 5 mL de água ultrapura tipo I e os fármacos foram adicionados ao fitantriol. Os percentuais dos fármacos são em relação ao peso de fitantriol, sendo eles: curcumina 0,5% e 1% e vemurafenibe 0,1%, 0,5%, 1% e 5%.

O próximo passo foi promover a estabilização da temperatura em uma chapa aquecedora à 45°C por um período de 10 minutos, seguido da adição da solução de F-127 ao fitantriol. A etapa seguinte foi a passagem pelo sonicador, podendo este procedimento ser repetido quantas vezes forem necessárias até que a amostra se apresente homogênea.

### 3.2.2. Viabilidade Celular Pós-Exposição

Os testes de viabilidade celular foram realizados inicialmente com 5 linhagens, sendo elas: NIH 3T3, MDA-MB-231, HT-29, HaCat e HeLa. Estes ensaios se utilizaram apenas dos fármacos puros, servindo de base para a seleção de uma linhagem saudável e uma linhagem tumoral para continuar os experimentos, onde as escolhidas foram: a HeLa e a HaCat. As linhagens foram cultivadas em meio apropriado, dulbecco's modified eagle médium (DMEM), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS) e 1% de solução de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Os repiques dessas linhagens foram feitos de 1 a 3 vezes por semana, sendo todas as manipulações realizadas em ambiente estéril dentro do fluxo laminar, com materiais também esterilizados, a fim de propagar qualquer tipo de contaminação por agentes externos (MASSIMINO, 2016).

Em seguida, aproximadamente  $10^4$  células (contagem automática utilizando o Countess™ da Invitrogen) foram adicionadas às placas de cultura celular de 96 poços, para promover este processo primeiramente as células incubadas devem ter o seu meio de cultivo antigo aspirado e uma solução de PBS deve ser utilizada para fazer uma lavagem, retirando os resquícios do meio antigo (SILVA, 2020b). Com a lavagem realizada, o PBS foi aspirado e uma solução de Tripsina-EDTA 0,02% foi incorporada as células, dentro de cinco minutos as células que até então estavam aderidas a placa passam a ficar sobrenadantes, devendo esta solução ser passada para um falcon, juntamente com 8 mL de meio, e centrifugada à 300 força centrífuga relativa (RCF) por 5 minutos. O meio sobrenadante foi aspirado e uma nova alíquota de meio adicionada, sendo as células resuspendidas. Uma alíquota dessa solução contendo células foi pipetada e incorporada ao corante *trypan blue*, sendo este composto internalizado pelas células mortas. Essa mistura foi depositada em uma câmara de contagem do Countess™ e levada ao equipamento onde teve a sua concentração elucidada (MASSIMINO, 2016). As concentrações desejadas foram incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5 % de CO<sub>2</sub> durante

24 horas para crescimento. O meio de cultura foi então substituído por um novo meio contendo diferentes concentrações das drogas em estudo, seguido de incubação por um período de tempo (24 horas) (SILVA, 2020b).

A viabilidade celular foi avaliada através do teste de Alamar Blue, conforme instruções do fabricante (Thermo Fisher, DAL 1025). Após o processo de tratamento de 24 horas com as drogas, elas foram aspiradas e uma solução de Alamar Blue à 10% em meio foi adicionada aos poços. As placas tratadas permaneceram em incubação na estufa por um período médio de quatro horas até a sua análise no leitor de placas (Figura 10).

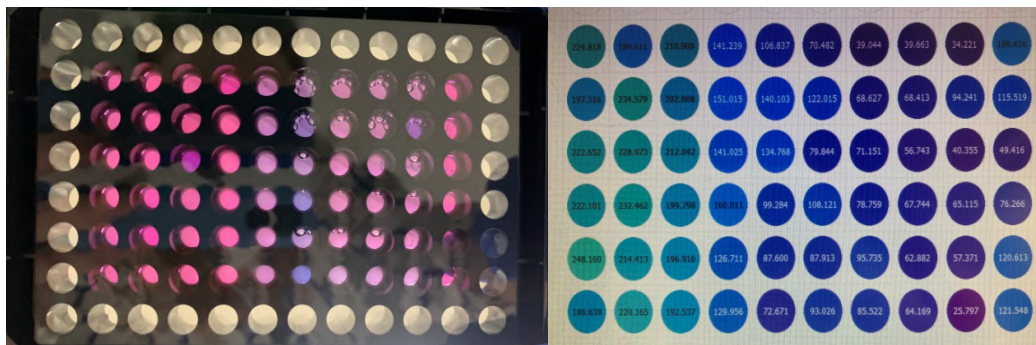


Figura 10 – Placa de 96 poços após o processo de incubação do Alamar Blue (esquerda) e a leitura da placa através do Enspire 2300.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

### 3.2.3. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As medidas foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, sendo utilizado um Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). A diluição de 1:20 ou de 1:100 de diluente, que no caso das amostras deste projeto foi utilizada a água ultrafiltrada tipo I.

As configurações utilizadas durante o experimento de DLS foram para um dispersante do tipo água, seguindo a temperatura de 37° para mimetizar a temperatura corporal humana, foco da utilização da nanopartícula. O ângulo de detecção do feixe foi de 173°, sendo o raio fixado em um ponto exato. As mensurações foram de 3 rodadas compostas por 15 corridas.

### 3.2.4. Potencial Zeta

As medidas foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, sendo utilizada um Zetasizer Nano ZS (Marvern Palytical). A diluição utilizada foi a de 1:18:2, sendo

as proporções de amostra, água ultrapura tipo I e PBS 1X, respectivamente. As configurações utilizadas foram um dispersante de PBS 10 mM. As mensurações foram de 3 rodadas compostas por 100 corridas.

### 3.2.5. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A realização das leituras foi promovida no Laboratório Nacional de Biociências, LNBio, sendo o NanoSight NS300 (Marvern Panalytical). A diluição utilizada foi de 1:7500, o diluente empregado foi água ultrapura tipo I previamente filtrada. As mensurações foram de 5 rodadas de 1 minuto cada.

### 3.2.6. Espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-VIS)

#### 3.2.6.1. Eficiência de Encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação (EE) foi realizada com o objetivo de quantificar percentualmente a quantidade de fármaco encapsulado no interior do cubossomo, fazendo a separação do fármaco livre através de consecutivas filtrações (JENIFER; UPPUTURI, 2022).

Para a realização da EE foram utilizados filtros de 30 kDa para o volume de 4 mL, sendo que nestes filtros foram dispostos 2,4 mL de cada amostra. Os filtros passaram por quatro centrifugações consecutivas de 10 minutos à 4000 rpm, sendo que entre as centrifugações amostras de 100 µL foram coletadas da parte interna do filtro. Além disso, o líquido desprendido do filtro contendo o fármaco livre também foi armazenado, e o seu volume foi repostado em água ultrapura tipo I na parte interna do filtro (WENG *et al.*, 2020).

A única exceção para esta técnica foi a amostra de curcumina 0,5%, pelo fato da curcumina não atravessar o filtro e impregnar na membrana devido a sua alta hidrofobicidade. Logo, para se determinar a EE das amostras de curcumina o conteúdo sintetizado foi deixado sedimentando durante 24 horas e, após este período, uma alíquota foi coletada para análise.

As alíquotas coletadas da parte interna do filtro e a alíquota da amostra de curcumina foram diluídas (Tabela 2) em seus respectivos solventes e suas análises foram feitas com a utilização do UV-VIS.



Amostra	Diluição	Solvente
Cubossomo + Curcumina 0,5%	100:900	Acetona
Cubossomo + Vemurafenibe 1%	100:1000	DMSO
Cubossomo + Curcumina 0,5% + Vemurafenibe 1%	100:1000	DMSO

Tabela 2 – Diluição das alíquotas durante o ensaio de eficiência de encapsulação.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Para promover a verificação das concentrações através da espectrofotometria foi se utilizada a absorvância de 305 nm para a vemurafenibe (D'ANGELO *et al.*, 2022) e 420 nm a curcumina (NORONHA *et al.*, 2023). Esses valores foram comparados com uma curva analítica pré-estabelecida, utilizando soluções de 0,0005 mg/mL a 0,05 mg/mL para vemurafenibe e para curcumina de 0,0005 mg/mL a 0,01 mg/mL. Vale ressaltar que ambas as curvas analíticas apresentaram um  $R^2 = 0,99$  (AKBAR *et al.*, 2018).

### 3.2.6.2. Ensaio de Liberação (EL)

O ensaio de liberação (EL) foi realizado com o objetivo de se determinar qual a quantidade de fármaco liberada em relação ao tempo e também qual o comportamento de liberação deste ativo (JENIFER; UPPUTURI, 2022).

Para a realização dos ensaios foram utilizados filtros de 10 KDa de 1 mL e de 5 mL, sendo os filtros de 1 mL utilizados para as amostras de vemurafenibe e vemurafenibe+curcumina, enquanto os filtros de 5 mL para as amostras de curcumina.

Para as amostras de vemurafenibe e vemurafenibe+curcumina o filtro de 1 mL teve seu volume repleto de amostras previamente preparadas, sendo esse, posicionado em um béquer de 50 mL contendo 48 mL de PBS 1X. Em contrapartida, para as amostras de curcumina, o filtro foi preenchido com uma solução de 2 mL de cubossomo+curcumina à 0,5% adicionado à 3 mL de água ultrapura tipo I. Esse filtro preenchido foi alocado em um béquer de 400 mL juntamente com uma solução de 245 mL de PBS 1X + 0,5% de Tween 80 (D'ANGELO *et al.*, 2022). Ambos os béqueres preparados para liberação foram deixados sob uma placa aquecedora à 37°C e sob agitação (ZHANG; FENG, 2006b).

Antes de se iniciar o experimento, uma porção de 100  $\mu\text{L}$  da solução de dentro do filtro foi coletada para se determinar a proporção base, devendo estes mesmos 100  $\mu\text{L}$  serem substituídos com água ultrapura tipo I. Com esta primeira coleta feita, o sistema foi colocado sob agitação e aquecimento e, permaneceu assim durante as próximas 24 horas.

As coletas de amostragem funcionaram da seguinte maneira, as alíquotas retiradas de dentro do filtro tiveram o volume constante de 100  $\mu\text{L}$ , sendo pontualmente realizada a reposição de 100  $\mu\text{L}$  de água ultrapura tipo I. Em relação as coletas realizadas da solução externa ao filtro, as amostragens pipetadas foram de 1 mL, sendo repostas, conseqüentemente, 1 mL do mesmo PBS 1X + 0,5% de Tween 80 para a amostra de curcumina e 1 mL de PBS 1X para as amostras de vemurafenibe e vemurafenibe+curcumina. Nas primeiras duas horas do ensaio foram realizadas coletas a cada 10 minutos, sendo que, terminado este período, as coletas passaram a ser a cada hora.

É válido ressaltar que durante todo o experimento o béquer se manteve tampado com parafilm e isolado da luz com papel alumínio, mas mesmo com estas cautelas, foi observado uma redução do volume final devido a evaporação, sendo necessário a averiguação da perda de volume e, conseqüentemente, a realização das devidas correções.

As amostragens foram armazenadas em eppendorfs protegidos da luz, sendo estes posteriormente diluídos na proporção de 50:500 de acetona para as amostras de curcumina, 50:300 de DMSO para as amostras de vemurafenibe e 50:500 de DMSO para vemurafenibe+curcumina. As soluções foram avaliadas com o auxílio do UV-VIS.

### 3.2.7. Criomicroscopia eletrônica de transmissão (Crio-TEM)

As análises por criomicroscopia eletrônica de transmissão foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia, LNNano. Para o ensaio, 3  $\mu\text{L}$  da amostra foram depositados em um grid usando um Vitrobot®, com um tempo de fixação da amostra de 20 segundos. Para remover o excesso de amostra, foi realizado um processo automatizado de blotting com uma força negativa de -3. Após essa etapa, o grid foi imerso rapidamente em etano líquido dentro de um ambiente de nitrogênio líquido. Por fim, as grades foram transportadas em uma caixa com nitrogênio líquido até o momento das medições.

### 3.2.8. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

O espalhamento de raios-x a baixos ângulos foi realizado no Laboratório Nacional Síncroton da Suécia (MAX IV), sendo promovidos na linha de luz CoSAXS. As faixas de energia e comprimento de onda variaram de 5 a 20 keV, respectivamente. A resolução de energia foi de  $2 \times 10^{-4}$ , e a fonte de fótons utilizava um ondulator de vácuo com comprimento de 2m, comprimento de período de 19,3 mm e valor K de 2,2. O feixe focalizado e a resolução espacial foram configurados em um ponto focal de 2 m, com dimensões do feixe na amostra de  $150 \times 150 \mu\text{m}$ , no detector de  $30 \times 5 \mu\text{m}$  e no tamanho do ponto focal da amostra de  $24 \times 5 \mu\text{m}$ . Isso resultou em um fluxo esperado de fótons na amostra de  $10^{13}$  @ 12 keV. Um detector Eiger2 4M foi empregado, e as curvas obtidas para o buffer foram subtraídas das curvas obtidas para as amostras para evitar interferências nos dados finais.

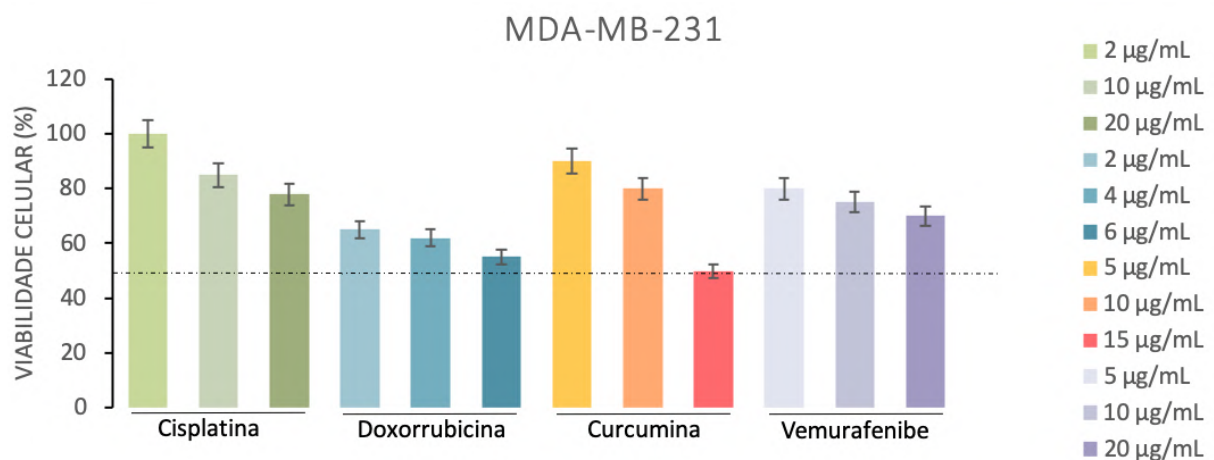
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Teste de Sinergia

Para a realização dos testes de sinergia, nos deparamos com umas das grandes dificuldades iniciais para o desenvolvimento do projeto, a escolha de uma linhagem celular. O fato de possuímos quatro diferentes ativos que, conseqüentemente, atuam focalmente em determinados tipos de cânceres com diferentes mecanismos celulares de atuação foi um dos desafios iniciais em questão pois, devido a essa diversidade, é dificultoso encontrar um tipo específico de câncer e, conseqüentemente uma linhagem celular, que utilize todas as medicações como protocolo padrão.

Em um primeiro momento, optamos por realizar uma varredura de concentrações em três linhagens já muito bem estabelecidas dentro do campo da pesquisa, incluindo tanto linhagens celulares tumorais quanto saudáveis, afim de se determinar o impacto dos protocolos de tratamento no tecido hígido. Foram escolhidas três concentrações iniciais para a realização de experimento

Nesse contexto, o gráfico 1 mostra um ensaio piloto de toxicidade em células sadias, os fibroblastos NIH 3T3, e neoplásicas de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231 e de cólon da linhagem HT-29, em concentrações crescentes de fármacos. Os resultados mostraram um decréscimo dose-dependente na viabilidade celular de algumas linhagens após tratamento por 24 horas com diferentes concentrações das drogas.



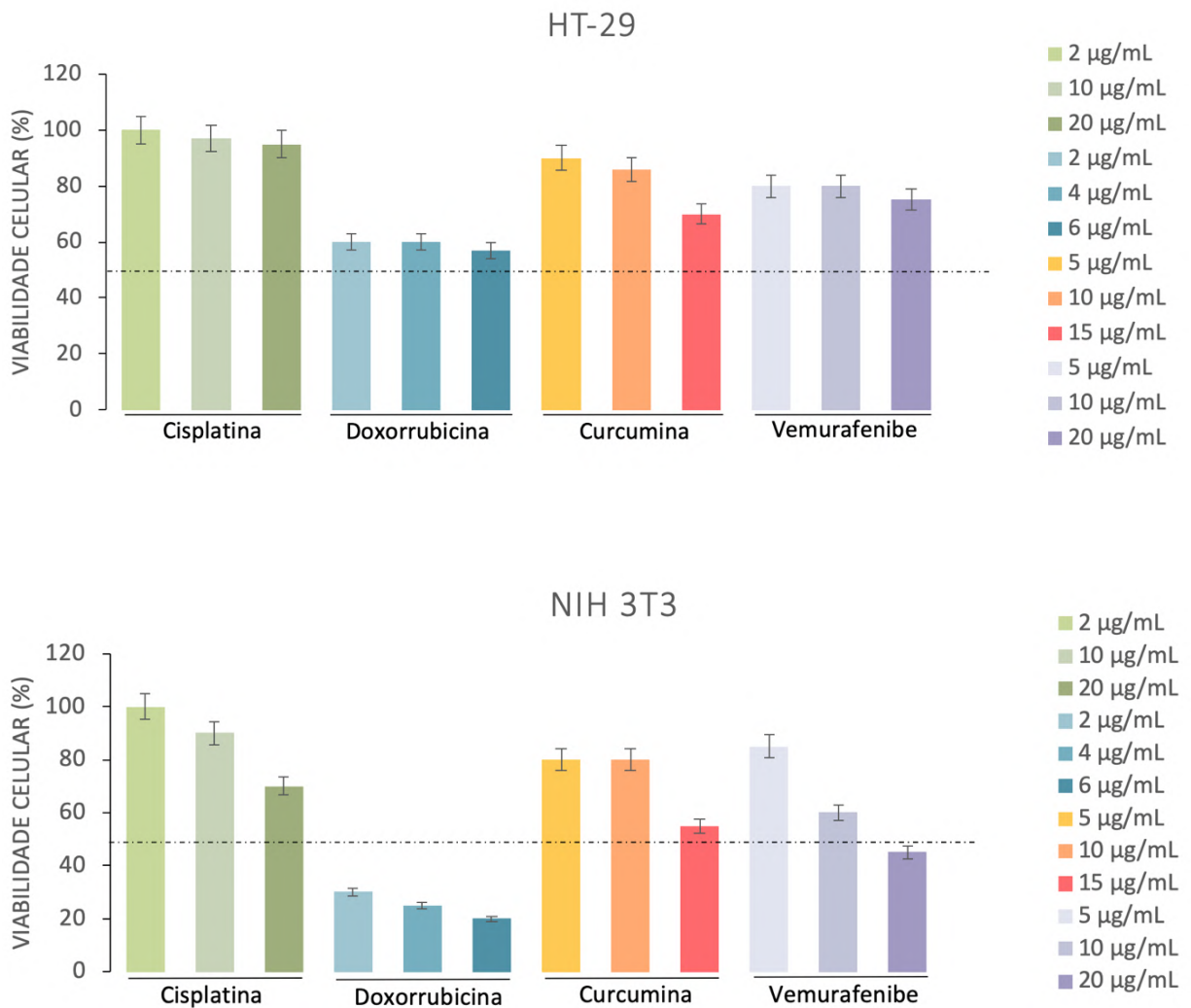


Gráfico 1 – Ensaio de viabilidade celular das linhagens saudável e tumorais.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

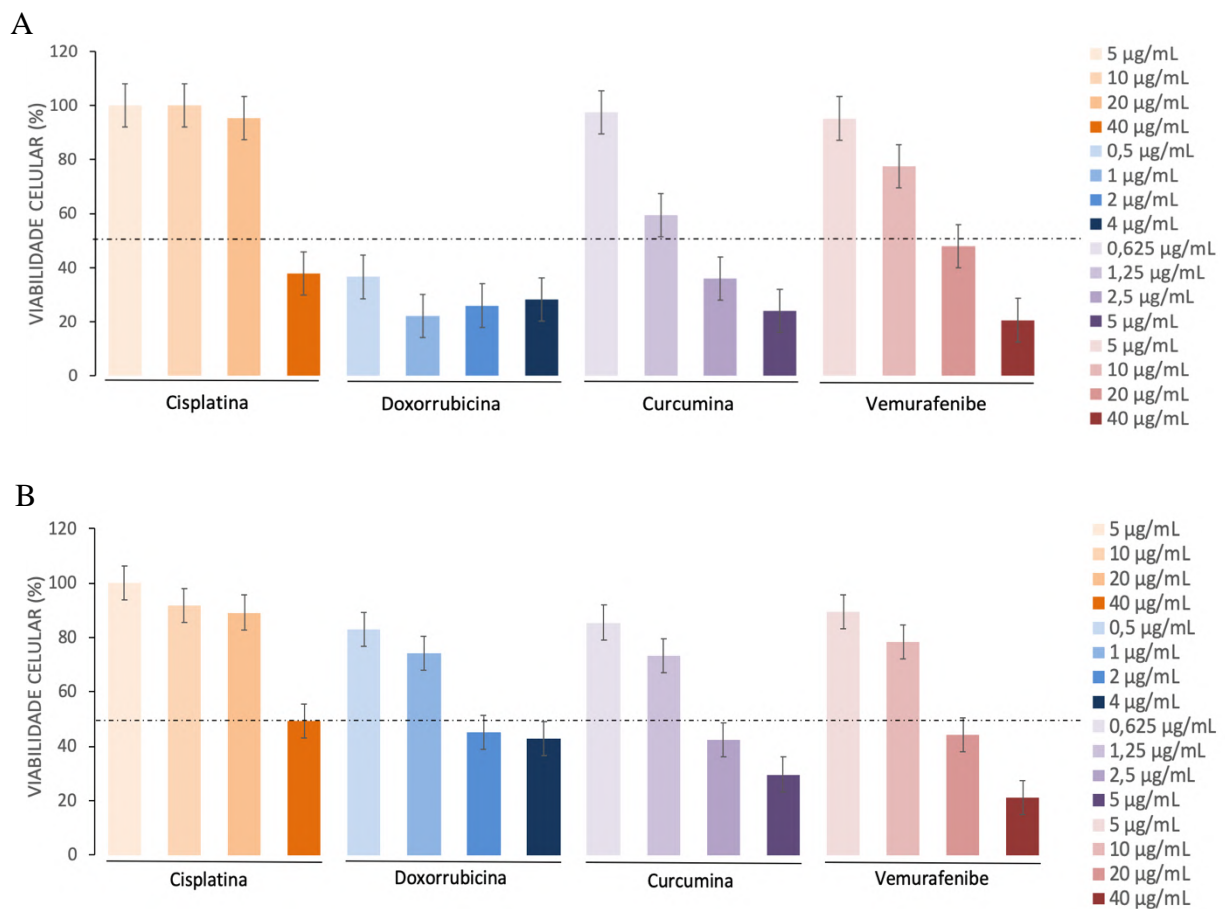
Salienta-se que os resultados celulares se basearam na IC50, também conhecida como concentração inibitória, esse parâmetro se baseia na dosagem necessária para se obter uma viabilidade celular de 50% do total de células em experimento, preceito amplamente utilizado para a caracterização de experimentos celulares (LARSSON *et al.*, 2020) (GIRGIN *et al.*, 2023).

Esse ensaio nos permitiu avaliar a susceptibilidade das diferentes linhagens às drogas quimioterápicas de interesse, parâmetro importante na determinação de doses e tempo de tratamento na terapia oncológica. Nesses ensaios pilotos, de forma geral, verificou-se que as células neoplásicas são mais resistentes a algumas drogas quimioterápicas, ou seja, é necessária uma maior concentração de droga para atingir um efeito citotóxico interessante. Essa resistência

se deve às diversas alterações de metabolismo que ocorrem nas células tumorais que culminam no seu crescimento acelerado e sua proliferação descontrolada, mas que também alteram a sensibilidade da célula aos quimioterápicos. Atualmente, essa é a maior limitação da quimioterapia, aliada à crescente toxicidade em células saudáveis, resultando em importantes efeitos adversos aos pacientes.

Baseados nos resultados dos primeiros ensaios (Gráfico 1) optamos por testar outras linhagens celulares tumoral e saudáveis, afim de verificar se outras células apresentariam o mesmo comportamento e necessitariam de doses mais altas de fármaco, sendo a HeLa e a HaCat os objetivos de escolha para os novos testes.

Após a escolha e cultivo das células em questão, um primeiro ensaio foi realizado para a determinação de  $IC_{50}$  (Gráfico 2), sendo levadas em consideração algumas publicações para se estimar possíveis doses, designando-se quatro doses para cada fármaco do projeto. Os testes seguiram o padrão de triplicata para cada condição.



Após os testes, pode-se observar que a linhagem HaCat, queratinócitos humanos, se mostrou mais sensível quando comparada a linhagem saudável NIH 3T3, necessitando de dosagens menores para a curcumina e doxorrubicina atingirem o seu IC50. Essa característica nos fez optar por continuar com a linhagem HaCat para os próximos ensaios, afim de se verificar os danos ocasionados em tecidos mais susceptíveis do organismo ao receber o tratamento.

A linhagem HeLa demonstrou um comportamento semelhante a HaCat quando tratada com a curcumina e a vemurafenibe nas mesmas concentrações. Além disso, esta linhagem necessitou de dosagens menores para a doxorrubicina, a curcumina e a vemurafenibe atingirem o seu IC50, o que despertou interesse para a continuação dos estudos com essa célula. Além disso, inúmeros estudos utilizam-se da linhagem HeLa para estudos com cisplatina (BECIT *et al.*, 2020) (YI *et al.*, 2020), doxorrubicina (HU *et al.*, 2018) (REIS *et al.*, 2021), vemurafenibe (LAAJALA *et al.*, 2023) e curcumina (BECIT *et al.*, 2020).

Outra informação obtida deste experimento (Gráfico 2) foram as IC50 de cada uma das drogas apresentadas para a sua respectiva célula (Tabela 3), sendo estes os resultados considerados para os demais ensaios celulares.

	Cisplatina	Doxorrubicina	Curcumina	Vemurafenibe
HaCat	30 µg/mL	0,5 µg/mL	1,7 µg/mL	20 µg/mL
HeLa	40 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL

Tabela 3 – IC<sub>50</sub> das drogas nas diferentes linhagens celulares.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

A partir dos IC<sub>50</sub> das amostras foi estipulado o IC<sub>25</sub> e, com estas novas doses foram realizados os testes seguintes de citotoxicidade, onde cada uma das condições foi reproduzida em quintuplicata, sendo que cada linhagem celular foi cultivada em uma placa petri e deixada em estufa. Juntamente com os testes utilizando as drogas livres, foi iniciado o protocolo para a averiguação de possíveis interações sinérgicas entre os ativos, sendo combinado par a par as dosagens de IC<sub>25</sub> previamente determinadas (Gráfico 3).



Gráfico 3 – Teste de citotoxicidade com IC<sub>25</sub> e combinações em HaCat (A) e HeLa (B).

FONTE: Arquivo pessoal.

Droga	Viabilidade Média (%)	Morte Celular (%)	Soma da morte celular (%)	Droga	Viabilidade Média (%)	Morte Celular (%)	Soma da morte celular (%)
Cisplatina	66	34	-----	Cisplatina	79	21	-----
Doxorrubicina	30	70	-----	Doxorrubicina	73	27	-----
Curcumina	67	33	-----	Curcumina	87	13	-----
Vemurafenibe	66	34	-----	Vemurafenibe	78	22	-----
CIS+DOX	22	78	104	CIS+DOX	42	58	48
CIS+CUR	28	72	67	CIS+CUR	47	53	34
CIS+VEM	28	72	68	CIS+VEM	41	59	43
DOX+CUR	22	78	103	DOX+CUR	50	50	40
DOX+VEM	32	68	104	DOX+VEM	41	59	49
CUR+VEM	28	72	67	CUR+VEM	56	44	35

Tabela 4 – Viabilidade celular HaCat (Esquerda) e HeLa (Direita).

FONTE: Arquivo pessoal.



Baseado nos resultados observados, foi possível determinar que todas as duplas apresentaram um maior percentual de morte celular quando comparadas aos resultados atingidos com os fármacos utilizados singularmente na linhagem HeLa, sendo um ponto muito vantajoso para o estudo.

Para a linhagem HaCat, pode ser observado que as duplas CIS+CUR, CIS+VEM e CUR+VEM mostraram resultados maiores quando utilizadas em combinação, sendo também observado que as células saudáveis se mostraram muito mais sensíveis, quando comparadas as células tumorais, aos receberem as mesmas dosagens dos protocolos quimioterápicos. Estes pontos são cruciais para a justificativa sobre a utilização de nanopartículas para a entrega de agentes quimioterápicos, uma vez que é almejado obter um maior direcionamento, promovendo a minimização dos efeitos adversos e minimizando a atuação destes medicamentos em tecidos saudáveis.

Ao final dos experimentos, realizados em quatro ciclos de quintuplicata, optou por continuar os experimentos com a dupla CUR+VEM, por se tratar de uma combinação com poucos relatos em pesquisa. Além disso, esta dupla é composta por dois ativos com potencial farmacológico, a vemurafenibe que se mostra como a droga mais recente liberada descrita neste projeto e a curcumina, um ativo ao qual o interesse vem sendo acrescido nos últimos anos.

Vale ressaltar que, em literatura, já existe um estudo que se utilizou da combinação entre curcumina e vemurafenibe, indicando a CUR como responsável pela supressão da proliferação celular, induzindo as células resistentes ao tratamento à apoptose (CHIU *et al.*, 2022). Para a combinação CUR+CIS, já existem relatos que comprovem a sua sinergia em outros trabalhos (TSAI *et al.*, 2011) (BECIT *et al.*, 2020), podendo ser observado também para a dupla cisplatina e doxorubicina (JIN *et al.*, 2020) (WU *et al.*, 2017) e doxorubicina e curcumina (KARAVASILI *et al.*, 2019) (GUO *et al.*, 2020).

#### 4.2. Caracterização Cubossomos

A partir da escolha da dupla a ser encapsulada, o próximo passo do projeto foi a sintetização e caracterização da nanopartícula, tanto o cubossomo branco (sem a presença de ativos encapsulados) quanto com os fármacos. Além disso, foram produzidos cubossomos com as drogas isoladamente bem como em combinação afim de se verificar se o uso em conjunto traria possíveis alterações quando comparadas com o uso singularmente.

#### 4.2.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Os dados de DLS (Tabela 5) apresentaram uma variação de diâmetro entre  $189 \pm 3$  nm e  $224 \pm 2$  nm para as amostras de cubossomo branco e contendo fármacos encapsulados. Os valores obtidos coincidem com os encontrados em literatura, existindo trabalhos que descrevem valores entre 200 a 300 nm para cubossomos a base de fitantriol (ZHAI *et al.*, 2015), outros que citam que os mesmos cubossomos podem alcançar a casa dos 500 nm (OLIVEIRA *et al.*, 2022).

	Z-ave (nm)	PDI
Cubossomo Branco	$189 \pm 3$	$0,08 \pm 0,01$
Cubossomo + Curcumina 0,5%	$193 \pm 5$	$0,12 \pm 0,04$
Cubossomo + Vemurafenibe 1%	$227 \pm 13$	$0,25 \pm 0,01$
Cubossomo + Curcumina 0,5% + Vemurafenibe 1%	$224 \pm 2$	$0,22 \pm 0,02$

Tabela 5 – DLS amostras de cubossomo.

**FONTE:** Arquivo pessoal

O PDI das amostras apresentou uma variação entre 0,08 e 0,25, estando estes valores de acordo com a literatura, sendo considerada uma solução homogênea para resultados inferiores a 0,4 (VICTORELLI *et al.*, 2022) (BESSONE *et al.*, 2021).

##### 4.2.1.1. Ensaio de Estabilidade

Foi realizado um ensaio de estabilidade para verificar possíveis variações de diâmetro e PDI da mesma amostra em um período de 30 dias (Tabela 6) (Tabela 7) corridos e, como pode ser observado nos resultados, não houveram valores discrepantes em relação aos números de referência. Além disso, a análise macroscópica das amostras não apresentou aglomerações ou sedimentações relevantes.

	Cub Branco	Cub + Cur 0,5%	Cub+Vem 1%	Cub+Cur 0,5%+Vem 1%
Dia 1	$196 \pm 2$	$188 \pm 1$	$206 \pm 1$	$216 \pm 5$

Dia 2	216 ± 2	182 ± 1	210 ± 1	218 ± 2
Dia 3	197 ± 2	180 ± 1	208 ± 1	230 ± 2
Dia 4	195 ± 1	184 ± 1	207 ± 2	216 ± 1
Dia 10	261 ± 2	212 ± 3	210 ± 3	224 ± 2
Dia 15	259 ± 2	221 ± 1	213 ± 1	293 ± 38
Dia 30	227 ± 1	192 ± 1	219 ± 2	227 ± 2

Tabela 6 – DLS (nm) das amostras de cubossomo durante 30 dias.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

	Cub Branco	Cub+Cur 0,5%	Cub+Vem 1%	Cub+Cur 0,5%+Vem 1%
Dia 1	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,02
Dia 2	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01
Dia 3	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01
Dia 4	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,03
Dia 10	0,4 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,02
Dia 15	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,7	0,3 ± 0,01
Dia 30	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,01

Tabela 7 – PDI da amostra de cubossomo durante 30 dias.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Este processo de estabilidade se faz crucial para nanopartículas que se tenham o objetivo de utilização biológica, pelo fato de que nanocarreadores lipídicos possuem a tendência de se acumular nos tecidos alvo, sendo dependentes de suas características físico-químicas, como é o caso da distribuição de tamanho e carga. Logo, uma amostra homogênea se faz vantajosa no campo do *Drug Delivery* apresentando características de eficiência e estabilidade (DANAIEI *et al.*, 2018).

#### 4.2.2. Potencial Zeta

O potencial zeta (Tabela 8) das amostras variou entre  $-0,02 \pm 0,68$  mV e  $-0,5 \pm 0,33$ , confirmando que, a utilização do surfactante F-127 tornou a superfície da nanopartícula não-

iônica (ALHAKAMY *et al.*, 2022) e, conseqüentemente, promova uma repulsão estérica para as demais, culminando em um sistema estável (MALHEIROS, 2018b). Além disso, os valores dos potenciais dos cubossomos contendo fármacos não apresentam uma divergência percentual significativa, demonstrando que os ativos tendem a se localizar na região mais profunda da bicamada lipídica (CHANG *et al.*, 2021).

	Potencial Zeta (mV)
Cubossomo Branco	-0,02 ± 0,68
Cubossomo + Curcumina 0,5%	-0,03 ± 0,06
Cubossomo + Vemurafenibe 1%	-0,5 ± 0,33
Cubossomo + Curcumina 0,5% + Vemurafenibe 1%	-0,08 ± 0,25

Tabela 8 – Potencial zeta do cubossomo em ausência de fármaco.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Valores de potencial zeta entre -10 mV e +10 mV são caracterizados como neutros, enquanto valores maiores que +30 mV e menores que -30 mV são considerados como fortemente catiônicos e fortemente aniônicos, respectivamente (CLOGSTON; PATRI, 2011). Esses valores, além de fornecerem informações sobre a estabilidade do sistema, podem também auxiliar na determinação do tipo de interação que ocorre dentro de sistemas biológicos, como a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (JIANG *et al.*, 2008). Partículas neutras tendem a conseguir interagir com a membrana celular eficientemente afim de cumprir seus objetivos de liberação (KREUTER, 2001) (AUGUSTINE *et al.*, 2020) (ZHANG *et al.*, 2021b), sendo ainda capazes de promover a redução da casuística de opsonização, alta circulação sanguínea, maior percentual de evasão ao sistema fagocitário (SALATIN *et al.*, 2014) e minimização da adsorção de proteínas em sua superfície (BEHZADI *et al.*, 2017).

#### 4.2.2.1. Ensaio de Estabilidade

O potencial zeta foi utilizado para promover uma curva de estabilidade durante 30 dias (Tabela 9) para as amostras, podendo ser observado que não houve alterações expressivas entre as medidas. Os resultados também demonstram que os ativos não foram capazes de promover

a alteração de carga da partícula no decorrer no tempo, além de poder ser observado uma manutenção da estabilidade dos sistemas.

	Cub Branco	Cub+Cur 0,5%	Cub+Vem 1%	Cub+Cur 0,5% +Vem 1%
Dia 1	-1,41 ± 0,15	-1,27 ± 0,13	-1,28 ± 0,01	0,37 ± 0,23
Dia 2	-1,26 ± 0,22	-0,02 ± 0,55	-1,79 ± 0,19	-0,02 ± 0,23
Dia 3	-0,47 ± 0,3	-0,15 ± 0,35	-0,23 ± 0,07	-0,15 ± 0,39
Dia 4	-0,35 ± 0,25	0,25 ± 0,06	-0,52 ± 0,54	-0,01 ± 0,18
Dia 10	-0,11 ± 0,22	-0,84 ± 1,09	0,48 ± 0,42	-0,17 ± 0,43
Dia 15	0,06 ± 0,38	-0,97 ± 0,16	-0,81 ± 0,26	-1,03 ± 0,12
Dia 30	0,14 ± 0,49	0,48 ± 0,2	0,1 ± 0,21	0,01 ± 0,52

Tabela 9 – Potencial zeta das amostras de cubossomos durante 30 dias.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

#### 4.2.3. Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Crio-TEM)

A criomicroscopia eletrônica de transmissão para os cubossomos na ausência de fármaco (Figura 11) apresentou uma variação de tamanho entre 180 nm a 200 nm. Para a amostra de cubossomo com curcumina 0,5% (Figura 11) apresentou uma variação de tamanho de 200 nm a 220 nm, esses valores são semelhantes aos observados para cubossomos de fitantriol, sendo descrito uma variação de tamanho entre 60 nm e 300 nm (HINTON *et al.*, 2014). As amostras com vemurafenibe 1% (Figura 11) apresentaram uma variação de tamanho entre 220 nm a 240 nm. E, por fim, as nanopartículas contendo curcumina 0,5% + Vemurafenibe 1% (Figura 11) demonstraram uma variação de tamanho entre 220 nm e 240 nm, existindo uma discrepância quando comparado aos resultados observados no DLS. Possíveis variações em relação ao tamanho das nanopartículas podem aparecer, quando comparado os valores a outras técnicas. Esse tipo de distinção se dá devido as diferentes formas de análise, sendo que, técnicas como o DLS e NTA analisam a amostra como um todo, enquanto o crio-TEM avalia pequenas populações de nanopartículas isoladas (LUO *et al.*, 2015) (NASR, GHORAB, ABDELAZEM, 2015).

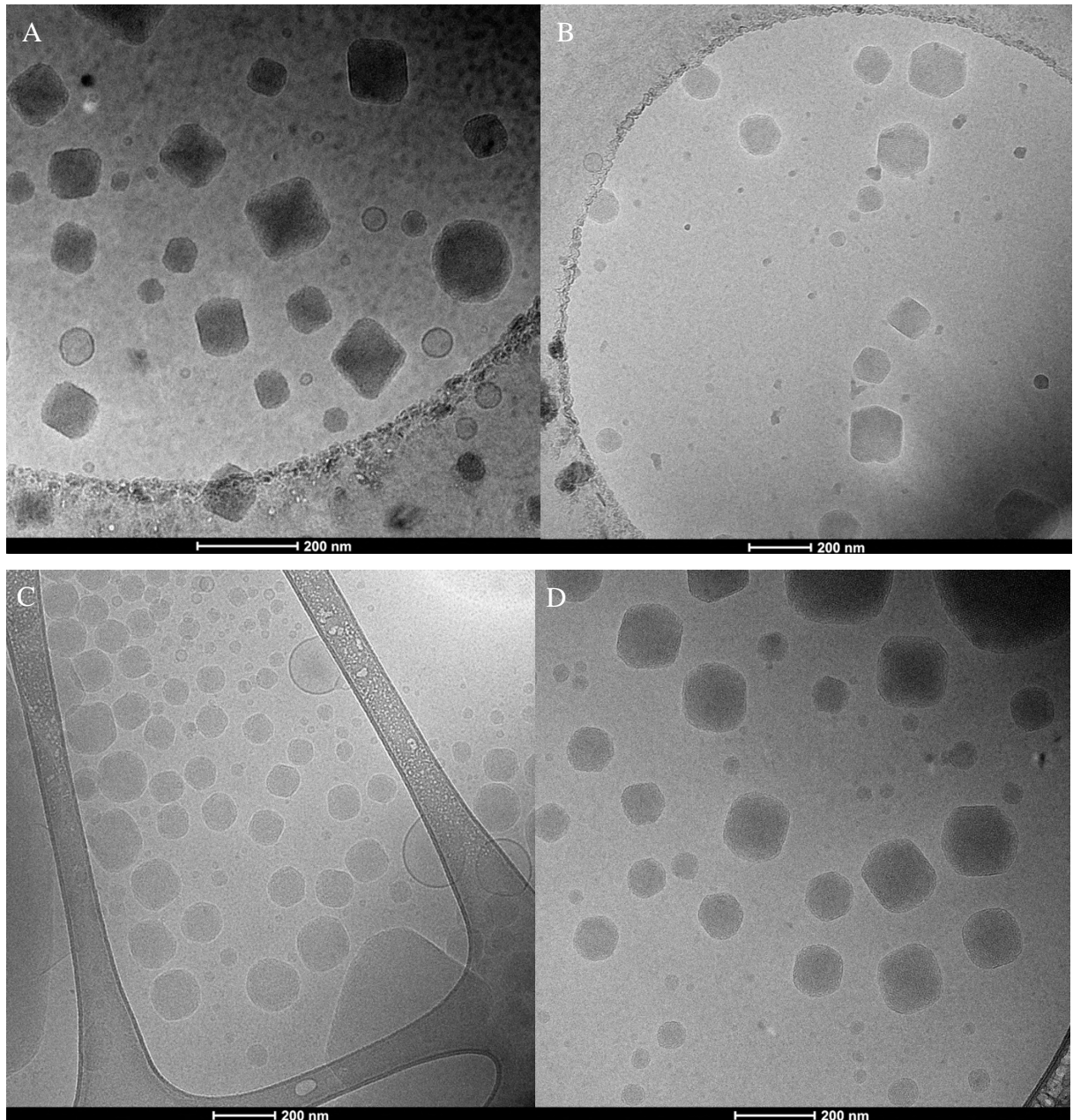


Figura 11 – Criomicroscopia eletrônica de transmissão das amostras de cubossomo, (A) cubossomo branco, (B) cubossomo + curcumina 0,5%, (C) cubossomo + vemurafenibe 1% e (D) cubossomo + vemurafenibe 1% + curcumina 0,5%.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Todas as amostras apresentaram uma manutenção na estrutura externa do cubossomo, exibindo uma geometria variável e bordas levemente arredondadas, atributo já descrito em literatura como umas das características dos cubossomos a base de fitantriol (LOTIERZO, 2021). Outra característica que pode ser observada é a formação de partículas que diferem da conformação usual dos cubossomos, estruturas semelhantes a vesículas, atributo descrito em literatura (CASTRO, 2018b) (MALHEIROS et al., 2021). As imagens também puderam

demonstrar uma estruturação interna periódica, sendo posteriormente confirmada com a técnica de SAXS (HINTON *et al.*, 2014).

A estruturação das nanopartículas também compõe um fator crucial na internalização e interação com a membrana celular, sendo as nanopartículas esféricas as que apresentam a menor eficiência em relação a interação com sítios ativos celulares, enquanto os nanomateriais estruturados alongadamente exibem maior eficiência (SALATIN *et al.*, 2014) (AUGUSTINE *et al.*, 2020). Os cubossomos, por apresentarem conformações geométricas variáveis, evidenciam-se mais eficientemente quando comparados a nanopartículas esféricas.

#### 4.2.4. Espalhamento de Raio-X à Baixos ângulos (SAXS)

A curva de SAXS (Gráfico 4) para a amostra de cubossomo na ausência de fármaco demonstrou picos agudos e bem definidos, evidenciando os picos de Bragg espaçados nas proporções de  $\sqrt{2}$ :  $\sqrt{3}$ :  $\sqrt{4}$ :  $\sqrt{6}$ :  $\sqrt{8}$ :  $\sqrt{9}$ :  $\sqrt{10}$  (MATHEWS *et al.*, 2022), característica esta que salienta a formação de uma estrutura Pn3m, padronagem já estabelecida para cubossomos sintetizados a base de fitrantriol (LOTIERZO, 2021).

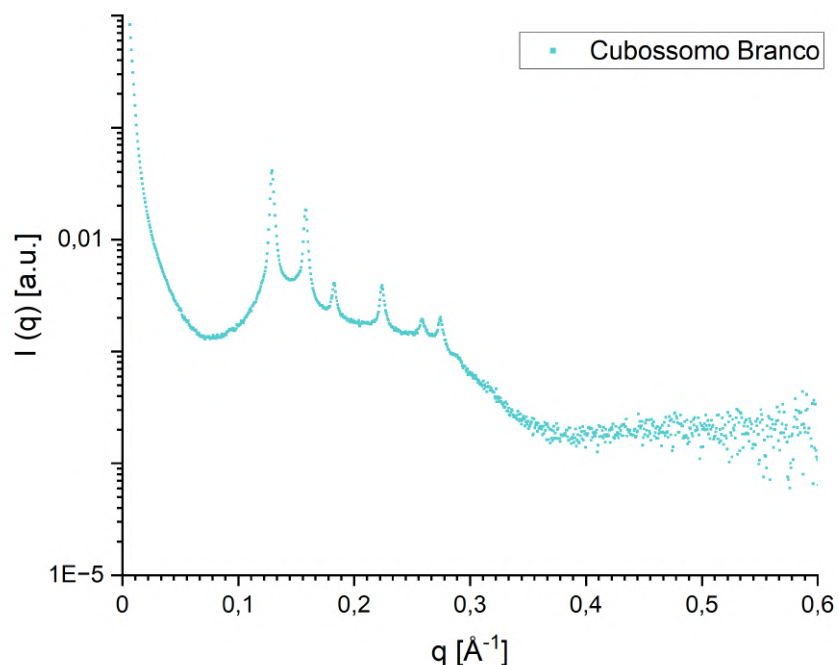


Gráfico 4 – Curva SAXS para a amostra de cubossomo em ausência de fármaco.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

O SAXS para a amostra de cubossomo com curcumina 0,5% (Gráfico 5) apresentou grande semelhança em relação aos picos, quando comparada ao cubossomo na ausência de fármaco, apresentando também uma estruturação Pn3m (LOTIERZO, 2021), além disso, seus parâmetros de rede variaram entre 6,87 nm e 6,91 nm, confirmando que a encapsulação da curcumina não foi capaz de promover grandes alterações estruturais na nanopartícula.

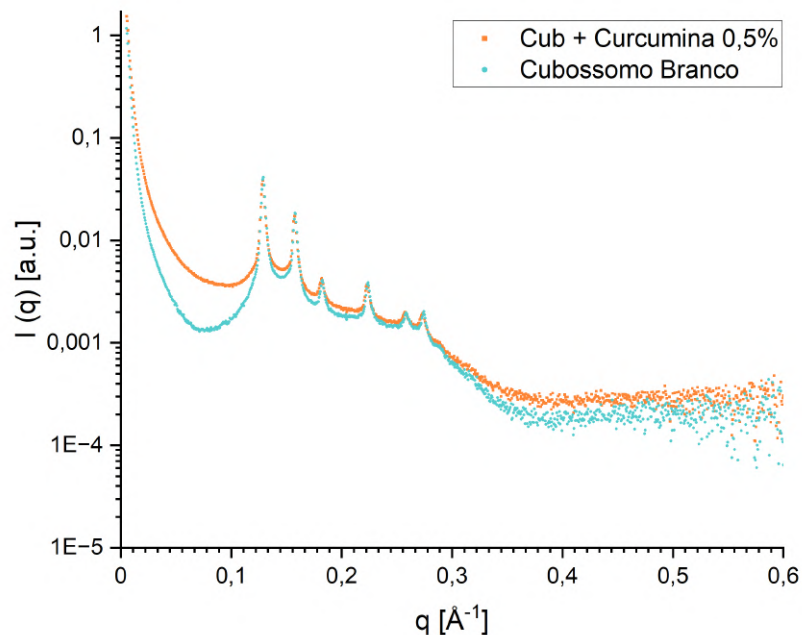


Gráfico 5 – Curva de SAXS para amostra de cubossomo com curcumina 0,5%.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Mesmo não existindo grandes alterações de estruturação, algumas divergências puderam ser notadas através de cálculos já estabelecidos pelo grupo, sendo o aumento do diâmetro dos canais de água na amostra com curcumina encapsulada o mais relevante, pois este aumento leva a uma maior proporção entre as partículas de água em relação as lipídicas.

Para a amostra de cubossomo + vemurafenibe 1% (Gráfico 6) também pôde ser observado uma grande semelhança entre os picos apresentados, quando em comparação com a amostra de cubossomo branco, sendo possível a determinação através dos picos de Bragg de uma estruturação Pn3m (LOTIERZO, 2021). Os parâmetros de rede se mostraram em 6,91 nm para o cubossomo + vemurafenibe 1%, demonstrando que a encapsulação da vemurafenibe não foi capaz de promover grandes alterações estruturais na nanopartícula.



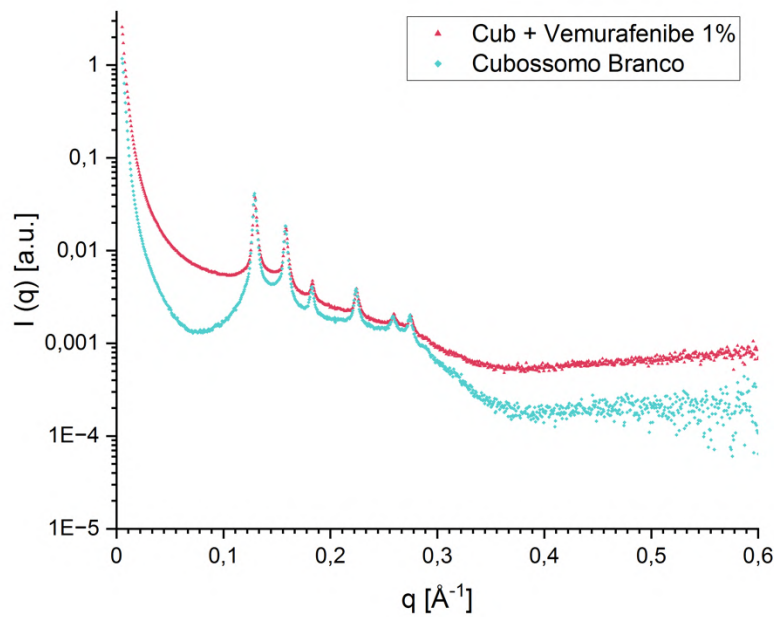


Gráfico 6 – Curva de SAXS para a amostra de cubossomo com vemurafenibe 1%.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Além da formação cubica apresentada por estes cubossomos, pudemos obter outras informações referentes a sua estruturação, através de cálculos estabelecidos pelo grupo, sendo a mais relevante em relação a capacidade de vemurafenibe de promover a aumento do diâmetro dos canais de água da nanopartícula e, conseqüentemente, incitar o aumento da proporção entre as partículas de água em relação as lipídicas.

#### 4.3.5. Eficiência de Encapsulação (EE)

##### 4.3.5.1. Cubossomo + Curcumina 0,5%

O ensaio sobre a porcentagem de encapsulação para a amostra de curcumina 0,5% (Tabela 10) foi realizado logo depois do processo de síntese e, levando em consideração o valor de fármaco total que foi utilizado e a concentração obtida após a avaliação pelo UV-Vis, o resultado da média da porcentagem de eficiência de encapsulação para o cubossomo encapsulado de curcumina foi de 79%.

	EE Curcumina (%)
Amostral	70%

Amostra 2	85%
Amostra 3	83%

Tabela 10 – Ensaio de encapsulação para amostra de cubossomo com curcumina 0,5%.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Em literatura, os valores de eficiência de encapsulação variam entre 86% (VICTORELLI *et al.*, 2022) em amostras feitas com cubossomos a base de monooleína e 90% para amostras onde a curcumina foi encapsulada em lipossomos a base de lecitina e colesterol (CHEN *et al.*, 2020b). A variação que ocorre neste ensaio se faz presente devido as diferentes interações entre a curcumina e lipídeos formadores das nanopartículas, sendo o foco principal a interação via pontes de hidrogênio entre o grupo hidroxila da curcumina e a cabeça polar dos lipídeos, fator este que também determina a orientação da droga dentro da bicamada lipídica (CHANG *et al.*, 2021).

#### 4.3.5.2. Cubossomo + Vemurafenibe 1%

O ensaio de encapsulação das amostras de cubossomo + vemurafenibe 1% (Tabela 11) apresentaram uma média de 72% de encapsulação em cubossomos. Na literatura, os valores de encapsulação da VEM variam de acordo com o tipo de nanopartícula estudada, no caso dos lipossomos, a EE da vemurafenibe se apresenta em torno de 98,9% (ZOU *et al.*, 2018), em nanopartículas de óxido de manganês a sua porcentagem de encapsulação foi de 62% (SAVLA *et al.*, 2014), enquanto em dendrímeros anfifílicos o valor sobe para 69% (RUSSI *et al.*, 2023).

	EE Vemurafenibe (%)
Amostra1	87%
Amostra 2	71%
Amostra 3	57%

Tabela 11 – Ensaio de encapsulação para a amostra de cubossomo com vemurafenibe 1%.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

#### 4.3.5.3. Cubossomo + Vemurafenibe 1% + Curcumina 0,5%

O ensaio de eficiência de encapsulação (Tabela 12) foi realizado levando em consideração o valor de fármaco total utilizado e a concentração obtida após os processos de centrifugação, sendo seu resultado uma média de 63% para a curcumina e 53% para a vemurafenibe. Quando estes valores são comparados as EE dos fármacos encapsulados separadamente percebe-se uma redução na eficiência de ambos os ativos. Os valores da curcumina encapsulada singularmente foram de 79%, passando para 63% quando usada concomitante com a vemurafenibe. No caso da VEM, os valores foram de 72% no seu uso isolado, passando a ser 53% na dupla. Uma das possíveis hipóteses para esse tipo de resultado seja a competição entre os dois ativos pela região hidrofóbica da nanopartícula.

	EE Curcumina (%)	EE Vemurafenibe (%)
Amostra 1	61%	41%
Amostra 2	61%	56%
Amostra 3	68%	61%

Tabela 12 – Ensaio de encapsulação para as amostras de cubossomo com vemurafenibe 1% + curcumina 0,5%.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

#### 4.3.6. Ensaio de liberação

##### 4.3.6.1. Cubossomo + Curcumina 0,5%

Com o ensaio de liberação (Gráfico 7) (Figura 12) foi possível constatar que nos primeiros 120 minutos ocorreu um crescimento de liberação exponencial, atingindo neste espaço de tempo um total de 43% de liberação do ativo encapsulado.

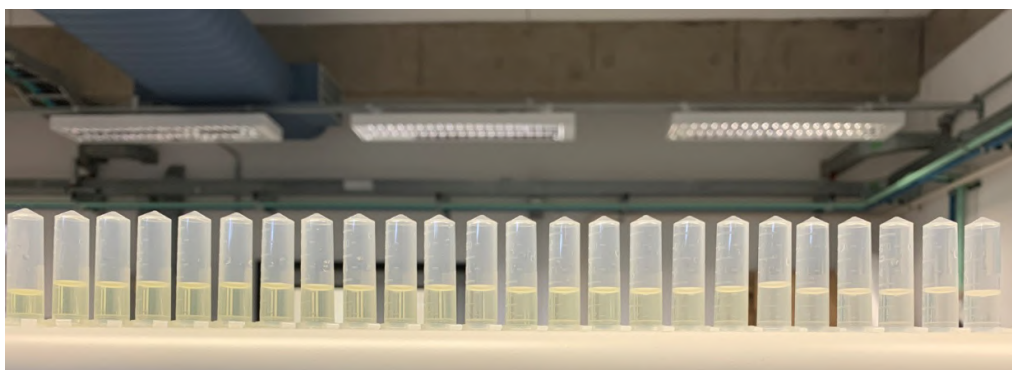


Figura 12 – Amostras coletadas durante o ensaio de liberação da amostra de cubossomo com curcumina 0,5%.

FONTE: Arquivo pessoal.

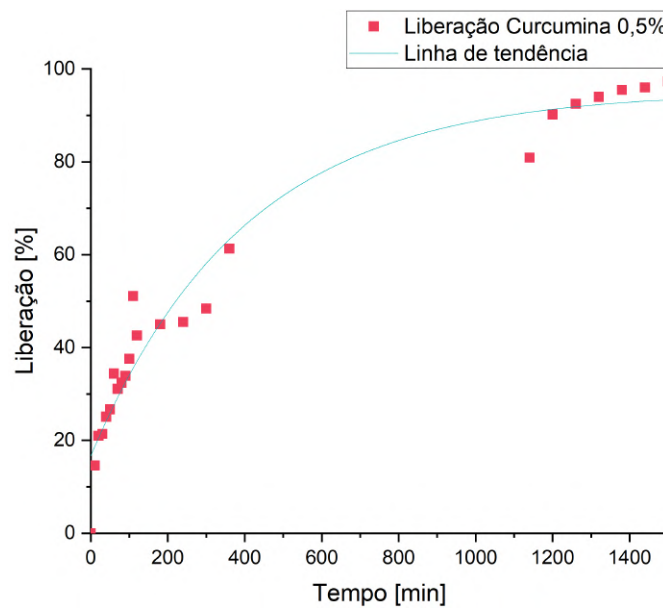


Gráfico 7 – Ensaio de liberação da amostra de cubossomo com curcumina 0,5%.

FONTE: Arquivo pessoal.

Entre o tempo de 300 minutos e 360 minutos ocorre outro pico de liberação, saltando de uma porcentagem de 48% para uma liberação de 61% ao término dos 360 minutos. Após este período, o mesmo comportamento é observado entre os tempos de 1140 minutos e 1200 minutos, partindo de uma liberação de 81% para uma porcentagem de 90%.

A partir do tempo de 1200 minutos é possível se observar o início de uma estabilização em relação à liberação da curcumina, tendo ocorrido no total destes últimos 300 minutos uma liberação de 5%, totalizando, ao final do ensaio, uma porcentagem de liberação de 97% em 1500 minutos.

#### 4.3.6.2. Cubossomo + Vemurafenibe 1%

Os ensaios de liberação das amostras de cubossomo + Vemurafenibe 1% (Gráfico 8) apresentaram um padrão semelhante entre elas, sendo um fármaco de liberação mais ágil quando comparada a liberação da curcumina. O tempo médio para uma liberação da amostra

completa deste fármaco dura em torno de 480 minutos, sendo que durante os primeiros 120 minutos ocorre uma liberação percentual de 67%, atingindo 97% de liberação em 480 minutos. Os experimentos foram feitos em triplicata.

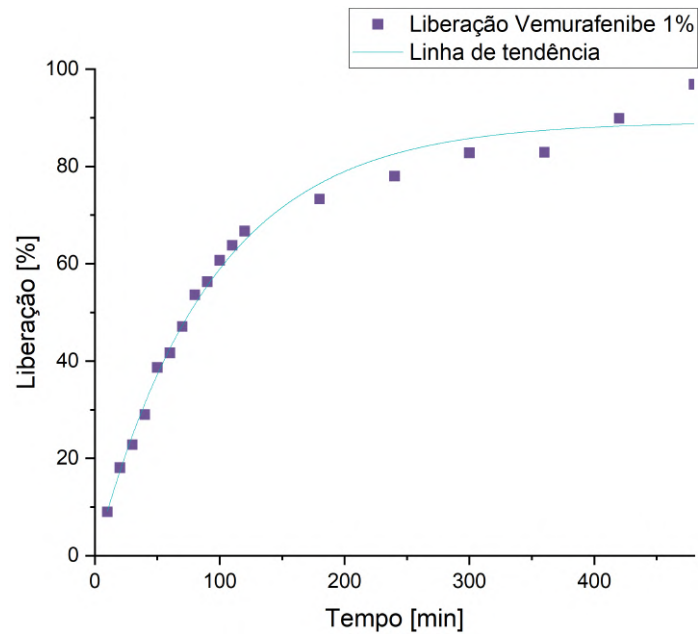


Gráfico 8 – Ensaio de liberação da amostra de cubossomo + Vemurafenibe 1%.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Durante o experimento é nítida a diferença de coloração das alíquotas coletadas no início e no final do processo (Figura 13), sendo que a medida que a vemurafenibe é liberada de dentro da nanopartícula, a mesma perde a coloração esbranquiçada característica do fármaco e se torna cada vez mais translúcida.

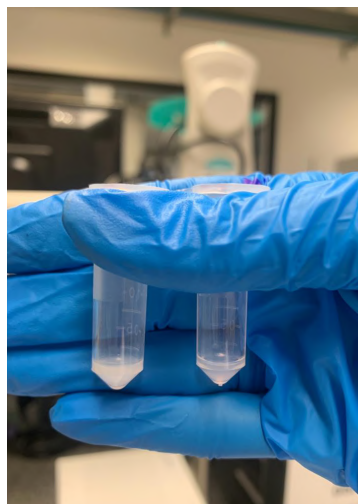


Figura 13 – Alíquota da esquerda pertencente a primeira coleta (esbranquiçada e opaca) e a alíquota da direita pertencente a última coleta (translúcida).

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Em literatura, os ensaios de liberação apresentam resultados discrepantes aos apresentados neste trabalho, variando de acordo com a nanopartícula empregada. Um trabalho que cita a nanoencapsulação de vemurafenibe em dendrímeros anfifílicos relata que no período de 24h em torno de 40% do fármaco foi liberado (RUSSI *et al.*, 2023), enquanto em outro artigo que se utiliza de lipossomos descreve que após 24h de experimento a quantidade de VEM no interior da nanopartícula permanece inalterada (ZOU *et al.*, 2018).

#### 4.3.6.3. Cubossomo + Curcumina 0,5% + Vemurafenibe 1%

O ensaio de liberação das amostras de cubossomo + vemurafenibe 1% + curcumina 0,5% (Gráfico 9) (Figura 14) foram realizados em triplicata, sendo que todas as amostragens apresentaram comportamento similar. O tempo necessário para o término da amostra foi 420 minutos, sendo que os primeiros 120 minutos foram demonstrados como um período de liberação exponencial, atingindo um percentual de liberação de 75%.

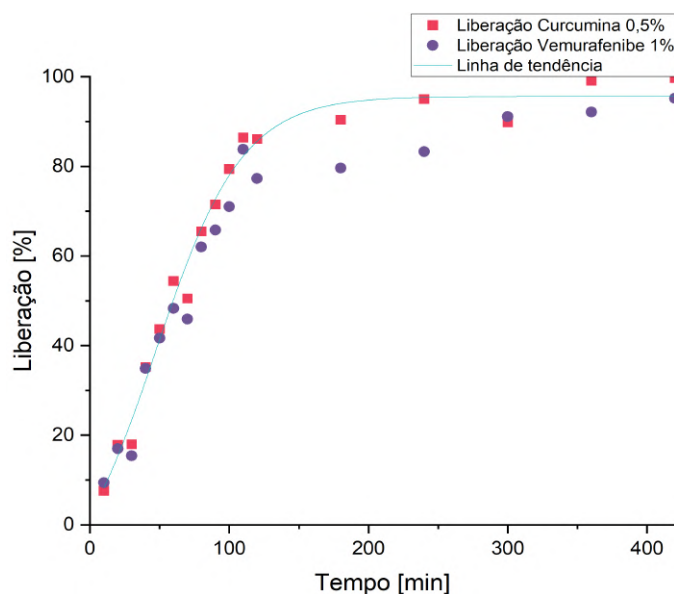


Gráfico 9 – Curva de liberação da amostra de cubossomo com vemurafenibe 1% + curcumina 0,5%.

**FONTE:** Arquivo pessoal.



Figura 14 – Amostras coletadas durante o ensaio de liberação da amostra de cubossomo com vemurafenibe 1% + curcumina 0,5%.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Quando comparamos os ensaios da dupla em relação aos outros experimentos realizados com os fármacos separadamente pudemos observar algumas discrepâncias de padrão. O primeiro ponto relevante foi relação a diminuição do tempo necessário para a liberação majoritária da curcumina, sendo que a média de liberação da curcumina unitariamente varia em torno de 1500 minutos e, quando utilizada concomitantemente com a vemurafenibe, o seu tempo de liberação reduz para uma média de 420 minutos. A amostra de vemurafenibe apresentou uma redução de tempo de liberação menos expressiva, quando comparada a de curcumina, tendo uma redução do tempo de 480 minutos das amostras onde seu uso é exclusivo para 420 minutos nos ensaios onde a dupla foi utilizada. A teoria para este resultado seria devido a interação entre os dois ativos, por se tratarem de duas moléculas hidrofóbicas e estarem localizadas possivelmente na mesma região dentro do cubossomo. Um artigo na literatura descreve a encapsulação de curcumina e doxorubicina em micelas tanto isoladamente quanto em dupla, porém, por um ativo ser hidrofóbico e o outro hidrofílico, ambos os fármacos se localizavam em locais distintos da nanopartícula não ocorrendo alterações na liberação dos compostos singularmente ou em conjunto (ZHAO *et al.*, 2020).

#### 4.3.7. Teste de Citotoxicidade

##### 4.3.7.1. Ensaio de Citotoxicidade com Cubossomos em Ausência de Fármaco

Foram realizados três ensaios de citotoxicidade em relação aos cubossomos, a fim de se quantificar o percentual de viabilidade celular perante a presença da nanopartícula, característica extremamente relevante para determinar as concentrações ideais para que o nanocarreador não interfira na homeostasia do organismo.

A Concentração das nanopartículas para a realização destes testes foi obtida através do NTA, levando em consideração a diluição de 1:7500, o valor foi de  $3,05 \times 10^{12}$  partículas/mL e, através dos cálculos de concentração foi obtido um valor de 7,67 mg/mL. Vale ressaltar que os valores estão de acordo com medidas anteriores do grupo (MALHEIROS *et al.*, 2021a).

Para o primeiro teste de citotoxicidade foram escolhidas as concentrações de 1 mg/mL e de 0,5 mg/mL (Gráfico 10) em linhagem HaCat, sendo observado uma baixa manutenção da viabilidade celular, indicando que, para otimizar a utilização desta nanopartícula seria necessário utilizar concentrações menores. Estes valores se encontram de acordo com os descritos em literatura, existindo relatos que citam a manutenção de uma alta viabilidade para concentrações em torno de de 6  $\mu\text{g/mL}$ , chegando a 20% de viabilidade para a concentração de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  para a linhagem A549 (ZHAI *et al.*, 2015). Em um outro trabalho, também utilizando cubossomos a base de fitantriol, foi determinada uma viabilidade abaixo de 10% tanto a linhagem HEK293 quanto para a CHO-GFP na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$  (MUIR *et al.*, 2012).

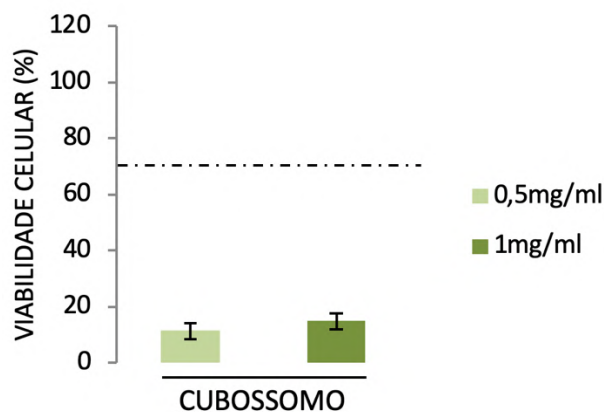


Gráfico 10 – Citotoxicidade dos cubossomos em linhagem HaCat.

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Salienta-se que, para a averiguação de citotoxicidade para nanomateriais é considerado um limite de 70% de viabilidade celular para que o composto não seja considerado tóxico (SALESA *et al.*, 2021) (CASTRO *et al.*, 2021a).



Como pode ser observado (Gráfico 11), em ambos os ensaios a concentração que manteve a viabilidade celular maior que 70% da concentração total de células tanto saudáveis quanto a linhagem neoplásica foi a de 0,01 mg/mL. A concentração de 50 µg/mL promoveu uma baixa manutenção da viabilidade em ambas as linhagens, valores condizentes com os observados em literatura para esta mesma concentração para a linhagem A549, neste mesmo estudo a concentração de 25 µg/mL promoveu uma viabilidade de 70 % (HINTON *et al.*, 2014).

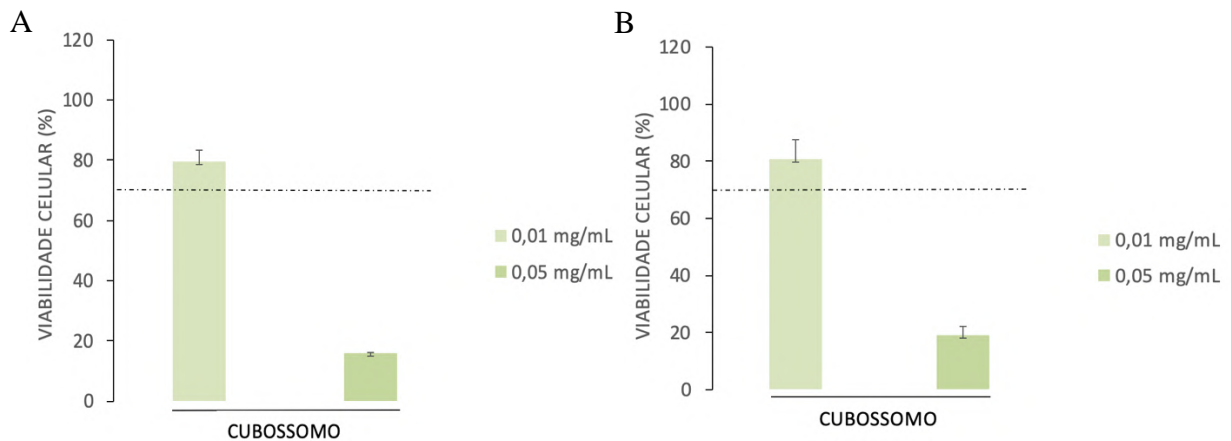


Gráfico 11 – Citotoxicidade dos cubossomos em linhagem HaCat (A) e HeLa (B).

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Uma alternativa para reduzir a citotoxicidade da nanopartícula seria a substituição do fitantriol por um outro composto, a monoleína, existindo inúmeros trabalhos em literatura utilizando este lipídeo como base para cubossomos, sua citotoxicidade varia entre torno de 100 µg/mL para uma viabilidade de aproximadamente 100% na linhagem A549 (HINTON *et al.*, 2014), outro estudo cita uma manutenção da viabilidade alta em uma concentração de 50 µg/mL para a linhagem HEK293 (HARTNETT *et al.*, 2015).

#### 4.3.7.2. Ensaios de Citotoxicidade com Cubossomos com Fármacos Encapsulados

Baseado nos ensaios realizados com as nanopartículas em ausência de fármacos, foram escolhidas duas concentrações com o objetivo de quantificar a citotoxicidade dos cubossomos com vemurafenibe 1%, curcumina 0,5% e vemurafenibe 1% + curcumina 0,5% nas linhagens escolhidas, sendo elas: 0,01mg/mL e 0,03mg/mL da nanopartículas (Gráfico 12).

Para a realização destes testes foi realizado o NTA previamente para cada condição, sendo que, para as amostras de curcumina a concentração obtida foi de  $6,7 \times 10^{12}$  partículas/mL, essa concentração foi corrigida levando em consideração a diluição de 1:7500 para a realização do experimento e, através dos cálculos de concentração foi obtido o valor de 57 mg/mL. Para a amostra de vemurafenibe 1% a concentração foi de  $8,2 \times 10^{12}$  partículas/mL, sendo obtido um resultado final de 77,5 mg/mL. Por fim, para a amostra de cubossomo + vemurafenibe 1% + curcumina 0,5% os valores foram de  $6,61 \times 10^{12}$  partículas/mL, chegando numa concentração de 33 mg/mL.

Como pode ser observado, as células apresentaram uma viabilidade celular acima de 90% para ambas as linhagens, não sendo observadas variações relevantes com as concentrações testadas.

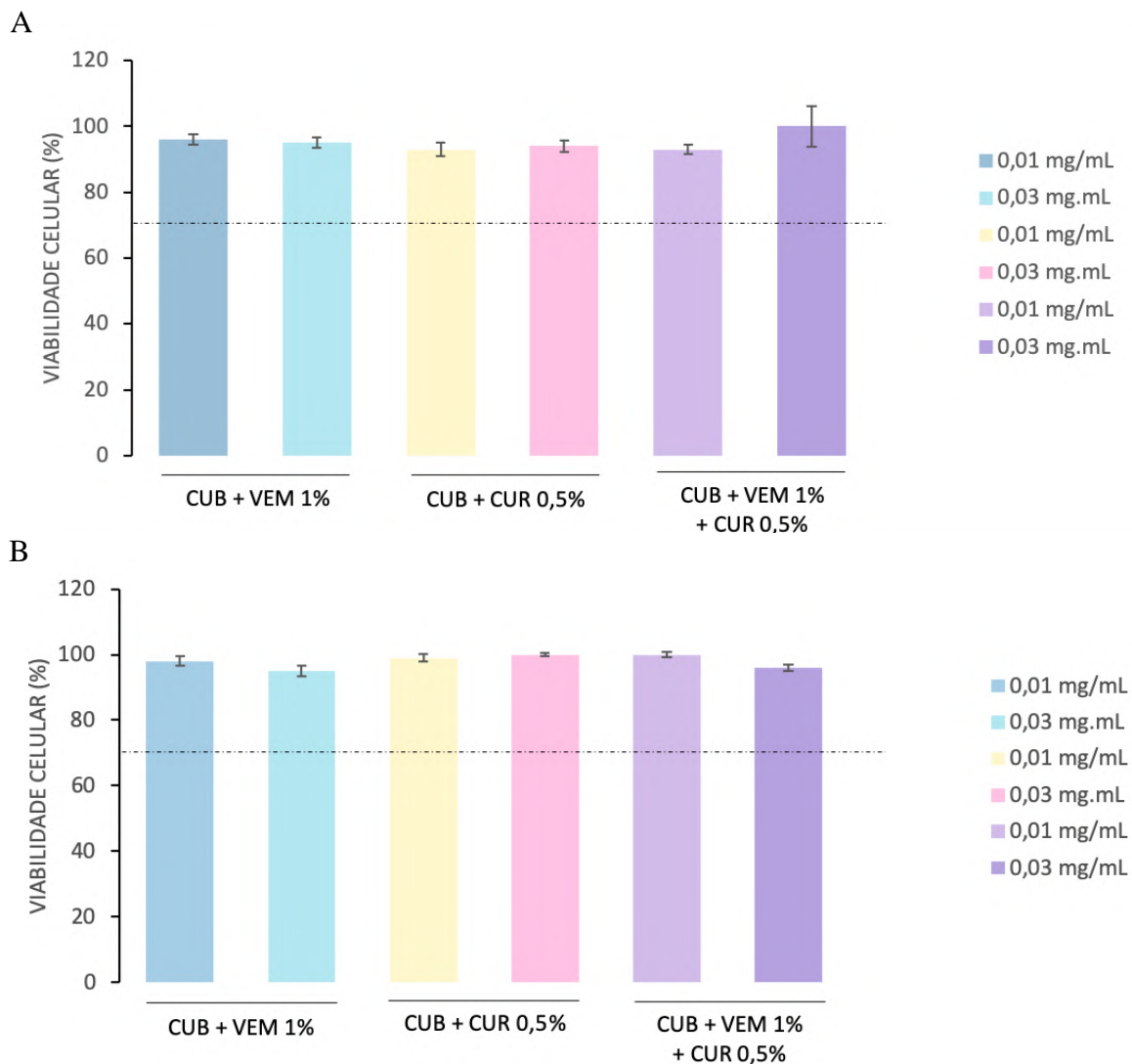


Gráfico 12 – Citotoxicidade dos cubossomos em linhagem HaCat (A) e HeLa (B).

**FONTE:** Arquivo pessoal.

Salienta-se que, juntamente com este experimento, as concentrações dos fármacos encapsulados também foram elucidadas, afim de se determinar qual o impacto destas dosagens sobre as células tratadas. Para a amostra de cubossomo + vemurafenibe 1%, a concentração inicial do composto na solução era de 0,17 mg/mL, sendo que, após as diluições se obteve a quantia de 0,02 µg/mL para a de 0,01mg/mL e de 0,06 µg/mL para a de 0,03 mg/mL. O cubossomo + curcumina 0,5% teve a sua leitura preliminar de 0,07 mg/mL, atingindo um volume final de 0,07 µg/mL para a solução de 0,01mg/mL e de 0,3 µg/mL para a de 0,03 mg/mL. Por fim, a amostra de cubossomo + vemurafenibe 1% + curcumina 0,5% foi medida primordialmente em 0,2 mg/mL e 0,07 mg/mL para vemurafenibe e curcumina, respectivamente, sendo o montante final de 0,06 µg/mL e 0,2 µg/mL para a vemurafenibe nas concentrações de 0,01 mg/mL e 0,03 mg/mL, na devida ordem, enquanto para a curcumina os valores se apresentaram em 0,02 µg/mL para a solução de 0,01 mg/mL e de 0,06 µg/mL para a de 0,03 mg/mL. Como pode ser observado, as concentrações carregadas pelas nanopartículas não se mostraram quantitativamente significantes para poder exercer qualquer efeito sobre as linhagens celulares.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante este mestrado foram realizados inúmeros testes envolvendo as drogas selecionadas inicialmente, tanto sozinhas quanto combinadas em duplas, sendo obtidos inúmeros resultados em relação à presença de sinergia entre os ativos. No decorrer deste tempo conseguimos estabelecer um protocolo confiável para se trabalhar com os fármacos, além do desenvolvimento de mecanismos para promover a encapsulação dos ativos sozinhos e também em combinação.

A síntese dos cubossomos se apresentou de maneira eficaz, sendo atingido o padrão descrito em literatura, além disso, conseguimos atingir um índice de homogeneidade em relação as amostras sintetizadas, trazendo um índice maior de confiabilidade para os resultados obtidos e, apesar da quantidade de fármacos não ter sido suficiente para ocasionar alterações ao sistema celular, a execução deste trabalho abre portas para que novos estudos sejam realizados, podendo-se testar diferentes ativos bem como alterando a composição da nanopartícula afim de se reduzir a citotoxicidade, porém buscando manter as características de estabilidade e encapsulação dos fármacos, atributos demonstrados durante este projeto como pontos benéficos para esta nanoestrutura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJZASHOKOUHI, A.H.; BOSTAN, H.B.; JOMEZADEH, V.; HAYES, A.W.; KARIMI, G. A review on the cardioprotective mechanisms of metformin against doxorubicin. **Human and Experimental Toxicology**, Londres, v. 39, n. 3, p. 237-248, 2020.

AKBAR, Muhammad Usman; ZIA, Khalid Mahmood; NAZIR, Ahsan; IQBAL, Jamshed; EJAZ, Syeda Abida; AKASH, Muhammad Sajid Hamid. Pluronic-based mixed polymeric micelles enhance the therapeutic potential of curcumin. **AAPS PharmSciTech**, Nova Iorque, n. 19, v. 1, p. 2719-2739, 2018.

ALDOSSARY, Sara. A. Review on pharmacology of cisplatin: Clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. **Biomedical & Pharmacology Journal**, Londres, v. 12, n. 1, p. 7-15, 2019.

ALHAKAMY, N. A.; HOSNY, K. M.; RIZG, W. Y.; ESHMAWI, B. A.; BADR, M. Y.; SAFHI, A. Y.; MURSHID, S. S. A. Development and Optimization of Hyaluronic Acid-Poloxamer In-Situ Gel Loaded with Voriconazole Cubosomes for Enhancement of Activity against Ocular Fungal Infection. **Gels**, Switzerland, v. 8, n. 4, p. 241-257, 2022.

ALMEIDA, Luciana; FELZENSZWALB, Israel; MARQUES, Mônica; CRUZ, Carla. Nanotechnology activities: Environmental protection regulatory issues data. **Heliyon**, Philadelphia, v.6, n. 1, p. 1-8, 2020.

ALVES, Anne Karolyne Carnaúba; SANTOS, Juliana de Farias; SEABRA, Maria das Graças. **A eficácia da curcumina no tratamento oncológico: uma revisão sistemática**. 2019. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Nutrição), Centro Universitário Tiradentes, Maceió, 2019.

ARAÚJO, Juliana Gusmão. **Efeito da melatonina na ototoxicidade e genotoxicidade da cisplatina em ratos wistar**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Doutorado em Ciências Médicas), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

AUGUSTINE, Robin; HASAN, Anwarul; PRIMAVERA, Rosita; WILSON, Rudilyn Joyce; THAKOR, Avnesh S.; KEVADIYA, Bhavesh D.. Cellular uptake and retention of nanoparticles: insights on particle properties and interaction with cellular components. **Materials Today Communications**, Switzerland, v. 25, n. 1, p. 1-19, 2020.

AVANTIKA, Dhadwal; RAJ, Sharma Dev; SINGH, Ashawat Mahendra; PRAVIN, Kumar. Cubosomes: A novel carrier for transdermal drug delivery. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, Rajasthan, v. 10, n. 1, p. 123-130, 2020.

BAE, You Han; PARK, Kinam. Advanced drug delivery 2020 and beyond: Perspectives on the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 158, n. 1, p. 4-16, 2020.

BARRIGA, Hanna M. G.; HOLME, Margaret N.; STEVENS, Molly M.. Cubosomes: the next generation of smart lipid nanoparticles? **Angewandte Chemie International Edition**, Alemanha, v. 57, n. 1, p. 2-23, 2018.

BATISTA, Tatiana. **Fotopolimerização de estirenosulfonato de sódio em suspensão de argila. Caracterização do sistema reacional e dos compósitos obtidos.** 2010. Trabalho de conclusão de curso (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

BECIT, Merve; DILSIZ, Sevtap Aydin; BASARAN, Nursen. Interaction of curcumin on cisplatin cytotoxicity in hela and hepG2 carcinoma cells. **Istanbul Journal of Pharmacy**, Istanbul, v. 50, n. 3, p. 202-210, 2020.

BEHZADI, Shahed; SERPOOSHAN, Vahid; TAO, Wei; HAMALY, Majd A.; ALKAWAREEK, Mahmoud Y.; DREADEN, Erik C.; BROWN, Dennis; ALKILANY, Alaaldin M.; FAROKHZAD, Omid C.; MAHMOUDI, Morteza. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. **Chemical Society Reviews**, Inglaterra, v. 46, n. 14, p. 4218-4244, 2017.

BESSONE, Carolina Del Valle; AKHLAGHI, Seyedeh Parinaz; TÁRTARA, Luis Ignacio; QUINTEROS, Daniela Alejandra; LOH, Watson; ALLEMANDI, Daniel Alberto. Latanoprost-loaded phytantriol cubosomes for the treatment of glaucoma, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Netherlands, v. 160, n. 1, p. 1-11, 2021.

BIZERRA, Alexa; SILVA, Viviane. Sistemas de Liberação Controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, Três Lagoas, v. 3, n. 2, p. 1-12, ago./dez. 2016.

CASTRO, Raphael Dias. **Production and characterization of cationic cubosomes.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018a.

CASTRO, Denise Tornavoi; REIS, Andréa Cândido; TEIXEIRA, Ana Beatriz Vilela; ALVES, Oswaldo Luiz. Cytotoxicity and elemental release of dental acrylic resin modified with silver and vanadium based antimicrobial nanomaterial. **Journal Health Science**, Londrina, v. 23, n. 12-17, 2021b.

CHEN, Shang-Hung; CHANG, Jang-Yang. New insights into mechanisms of cisplatin resistance: from tumor cell to microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, Switserland, v. 20, n. 4136, p. 1-21, 2019a.

CHEN, Yan; LU, Yao; LEE, Robert; XIANG, Guangya. Nano Encapsulated Curcumin: And Its Potencial for Biomedical Applications. **International Journal of Nanomedicine**, Inglaterra, v. 15, n. 1, p. 3099-3120, 2020b.

CHEN, Xuan; LI, Hongyan; ZHANG, Bing; DENG, Zeyuan. The synergistic and antagonistic antioxidant interactions of dietary phytochemical combinations. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Inglaterra, v. 62, n. 20, p. 1-21, 2021c.

CHANG, Cuihua; MEIKLE, Thomas; DRUMMOND, Calum; YANG, Yanjun; CONN, Charlotte. **Soft Matter**, Londres, v. 17, n.1, p. 3306 – 3313, 2021.

CLOGSTON, Jeffrey; PATRI, Anil K. **Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery**, 1 Ed. Estados Unidos: Humana Press, 2011, p. 63-70.

COLLINO, Luma. **Curcumina: de especiaria à nutraceutico**. 2014. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmacêutico-Bioquímico), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

CORDEIRO, Helon Guimarães. **Análise da responsividade de células de câncer colorretal ao vemurafenibe e influência em proteínas fosfatases e vias de sinalização do TGF BETA e NOTCH1**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2019.

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; DAVARANI, F. H.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R.. Impacto f particle size and polydispersity index on the clinical applications of lepidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, Switzerland, v. 10, n. 57, p. 1-17, 2018.

DANG, Yu; GUAN, Jianjun. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. **Smart Materials in Medicine**, Beijing, v. 1, n. 1, p. 10-19, 2020.

D'ANGELO, Natália A.; CÂMARA, Mayra C. C.; NORONHA, Mariana A.; GROTTTO, Denise; CHORILLI, Marlus; LOURENÇO, Felipe R.; YAGUI, Carlota O. Rangel; LOPES, André M.. Development of PEG-PCL-based polymersomes through design of experiments for co-encapsulation of vemurafenib and doxorubicin as chemotherapeutic drugs. **Journal of Molecular Liquids**, Switzerland, v. 349, n. 118166, p. 1-14, 2022.

DANMAIGORO, Abubakar; SELVARAJAH, Gayathri Thevi; NOOR, Mohd Hezmee; MAHMUD, Rozi; BAKAR, Zuki Abu. Toxicity and safety evaluation of doxorubicin-loaded cockleshell-derived calcium carbonate nanoparticle in dogs. **Advances in Pharmacological Sciences**, Londres, v. 2018, p. 1-21, 2018.

DONATO, Cristina Di; IACOVINO, Rosa; ISERNIA, Carla; MALGIERI, Gaetano; GARCIA, Angela Varela; CONCHEIRO, Angel; LORENZO, Carmen Alvarez. Polypseudorotaxanes of pluronic F127 with combinations of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins for topical formulations of acyclovir. **Nanomaterials**, Switzerland, v. 10, n. 613, p. 1-15, 2020.

DUARTE, Diana; VALE, Nuno. Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology. **Currenty Research in Pharmacology and Drug Discovery**. Switzerland, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2022.

EDIS, Zehra; WANG, Junli; WAQAS, Muhammad Hhurrar; LJAZ, Muhammad; LJAZ, Munazza. Nnacarriers-mediated drug delivery systems for anticancer agents: An overview and perspectives. **International Journal of Nanomedicine**, Londres, v. 16, n. 1, p. 1313-1330, 2021.

FERNANDES, Débora Kristina Alves. **Avaliação do potencial de superação da quimioresistência do melanoma aos inibidores de BRAF<sup>V600E</sup> (vemurafenibe) e de MEK (trametinibe) utilizando terapia combinatória com 4-nerolidilcatecol (4-NC)**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Doutorado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

FRANCO, Nathalia; DEGREGORI, Emanuelle Bortolotto; MATTOS, Natália Fantinel; TEIXEIRA, Luciana Gonçalves; CONTESINI, Emerson Antonio. Utilização de antibióticos quimioterápicos na oncologia de pequenos animais: Revisão. **PUBVET**, Maringá, v. 13, n. 2, p. 1-8, 2019.

GABALLA, Sherif A.; GARHY, Omar H.; ABDELKADER, H. Cubosomes: Composition, preparation and drug delivery applications. **Journal of Advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, Minia, v. 3, n.1, p. 1-9, 2020.

GIRGIN, Munteha; ISIK, Sevim; CARSIBASI, Nigar Kantarci. Proposing natural compounds against alzheimer's disease targeting acetylcholinesterase. **PLoS ONE**, Estados Unidos, v. 18, n. 4, p. 1-23, 2023.

GOEY, Andrew K.L.; WITH, Mirjam; AGEMA, Bram C.; HOOP, Esther Oomen-De; SINGH, Rajbir K.; VELDT, Astrid A.M. Van Der; MATHIJSSSEN, Ron H.J.; SHAIK, Ron H.N.; BINS, Sander. Effects of pharmacogenetic variants on vemurafenib-related toxicities in patients with melanoma, **Pharmacogenomics**, Pensilvânia, v. 20, n. 18, p. 1283-1290, 2019.

GOMES, Bib Mady Diniz. **Otimização da síntese verde de nanopartículas de prata para incorporação em gel antimicrobiano**. 2019. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado de Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

GUO, Wei; SONG, Yuanyuan; SONG, Wantong; LIU, Yingmin; LIU, Zhihe; ZHANG, Dawei; TANG, Zhaohui; BAI, Ou. Co-delivery of doxorubicin and curcumin with polypeptide nanocarrier for synergistic lymphoma therapy. **Scientific Reports**, Londres, v. 10, n. 7832, p. 1-16, 2020.

HARTNETT, Terence E.; LADEWIG, Katharina; O'CONNOR, Andre J.; HARTLEY, Patrick G.; MCLEAN, Keith M.. Physicochemical and cytotoxicity analysis of glycerol monoolein-based nanoparticles. **Journal of Royal Society of Chemistry**, Londres, v. 5, n. 1, p. 26543-26549, 2015.

HINTON, Tracey M.; GRUSCHE, Felix; ACHARYA, Durga; SHUKLA, Ravi; BANSAL, Vipul; WADDINGTON, Lynne J.; MONAGHAN, Paul; MUIR, Benjamin W.. Bicontinuous cubic phase nanoparticle lipid chemistry affects toxicity in cultured cells. **Toxicology Research**, Londres, v. 3, n. 1, p. 11-22, 2014.

HONGBAO, Ma. HeLa cells and immortality. **Cancer Biology**, New York, v. 7, n. 3, p. 71-78, 2017.

HOSSEN, Sarwar; HOSSAIN, M. Khalid; BASHER, M.K.; MIA, M.N.H.; RAHMAN, M.T.; ODDIN, M. Jalal. Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. **Journal of Advanced Research**, Cairo, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2019.

HU, Tianmu; QAHTAN, LEI, Lei; LEI, Zhixin; ZHAO, Dapeng; NIE, Hemin. Inhibition of hela cell growth by doxorubicin-loaded and tuftsin-conjugated arginate-PEG microparticles. **Bioactive Materials**, Netherlands, v. 3, n. 1, p. 48-54, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Câncer de mama: vamos falar sobre isso? **INCA**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 4, 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CÂNCER. Cancer today, **Globocan 2020**, França, 2020.

JENIFER, Jophine; UPPUTURI, Ravi Theaj Prakash. In vitro release mechanism and cytotoxic behavior of curcumin loaded casein nanoparticles. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, v. 58, n. 1., p. 1-12, 2022.



JIA, Zixian; LI, Jiantao; YANG, Dezheng; KANAIEV, Andrei. Dynamic Light Scattering: A powerful tool for in situ nanoparticle sizing. **Colloids and Interfaces**, Switzerland, v. 7, n. 15, p. 1-18, 2023.

JIANG, Jingkun; OBERDORSTER, Gunter; BISWAS, Pratim. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **Journal of Nanoparticle Research**, Berlim, v. 11, n. 1, p. 77-89, 2009.

JIN, Yonglong; WANG, Yi; LIU, Xiguang; ZHOU, Jing; WANG, Xintong; FENG, Hui; LIU, Hong. Synergistic combination chemotherapy of lung cancer: cisplatin and doxorubicin conjugated prodrug loaded, glutathione and pH sensitive nanocarriers. **Drug Design, Development and therapy**. Londres, v. 14, n. 1, p. 5205-5215, 2020.

KARAVASILI, Christina; ANDREADIS, Dimitrios A.; KATSAMENIS, Orestis L.; PANTERIS, Emmanuel; ANASTASIADOU, Pinelopi; KAKAZANIS, Zacharias; ZOUMPOURLIS, Vasilis; MARKOPOULOU, Catherine K.; HOUTSOPOULOS, Sotirios; VIZIRIANAKIS, Ioannis S.; FATOUROS, Dimitrios G.. Synergistic antitumor potency of a self-assembling peptide hydrogel for the local co-delivery of doxorubicin and curcumin the treatment of head and neck cancer. **Molecular Pharmaceutics**, Estados Unidos, v. 16, n. 1, p. 2326-2341, 2019.

KNYSH, Alexander; NABIEV, Igor; SOKOLOV, Pavel. Dynamic Light Scattering analysis in biomedical research and applications of nanoparticles and polymers. **Journal of Biomedical Photonics & Engineering**, Samara, v. 9, n. 2, p. 1-24, 2023.

KREUTER, Jorg. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Switzerland, v. 47, n. 1, p. 65-81, 2001.

LAAJALA, Mira; ZWAAGSTRA, Marleen; MARTIKAINEN, Mari; NEKOUA, Magloire Pandoua; BENKAHLA, Mehdi; SANE, Famara; GERVAIS, Emily; CAMPAGNOLA, Grace; HONKIMAA, Anni; KHOJINE, Amir Babak Sioofy; HYOTY, Heikki; OJHA, Ravi; BAILLIOT, Marie; BALISTRERI, Giuseppe; PEERSEN, Olve; HOBBER, Didier; KUPPEVELD, Frank Van; MARJOMAKI, Varpu. Vemurafenib inhibits acute and chronic enterovirus infection by affecting cellular kinase phosphatidylinositol 4-Kinase type III  $\beta$ . **Microbiology Spectrum**, Estados Unidos, v. 11, n. 4, p. 1-19, 2023.

LARSSON, Peter; ENGQVIST, Hanna; BIERMANN, Jana; RONNERMAN, Werner; ARONSSON, Eva Forssell; KOVÁCS, Anikó; KARLSSON, Per; HELOU, Khalil; PARRIS, Toshima Z.. Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens. **Scientific Reports**, Londres, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

LOTIERZO, Mayara Cristina Gomes. **Estudo da eficiência de encapsulação da cinarizina em cubossomos não-iônicos: caracterização estrutural e citotóxica**. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

LOTINA, A. S.; PORTELA, R.; BAEZA, P.; RODRIGUEZ, V. A.; VILLARROEL, M. Zeta potencial as a tool for functional materials development. **Catalysis Today**, Netherlands, v. 423, n. 1, p. 1-11, 2023.

LUGANI, Yogita; KAUR, Gurpreet; OBEROI, Simmi; SOOCH, Balwinder Singh. Nanotechnology: Current applications and future prospects. **World Journal of Advance Healthccare Reserarch**, Bhopal, v. 2, n.5, p. 137-139, 2018.

LUO, Q. et al. A novel glyceryl monoolein-bearing cubosomes for gambogenic acid: Preparation, cytotoxicity and intracellular uptake. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 493, n. 1, p. 30–39, 2015.

LYAPUN, I.N.; ANDRYUKOV. B.G.; BYNINA, M.P. HeLa cell culture: Immortal heritage of Henrietta Lacks. **Molecular genetics, Microbiology and Virology**, Switzerland, v. 34, n. 4, p. 195-200, 2019.

MALHEIROS, Barbara; CASTRO, Raphael Dias; LOTIERZO, Mayra C.G; CASADEI, Bruna R.; BARBOSA, Leandro R. S. Design and manufacturing of monodisperse and malleable phytantriol-based cubosomes for drug delivery applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technologies**, Switzerland, v. 61, n. 1, p. 1-8, 2021a.

MALHEIROS, Bárbara. **Caracterização biofísica de cubossomos, designados para entrega de fármacos e sua interação com uma droga modelo: o caso da miltefosina**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018b.

MASSIMINO, Livia Contini. **Nanopartículas de Curcumina: Obtenção e caracterização**. 2016. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

MATHEWS, Patrick; MERTINS, Omar; ANGELOV, Borislav; ANGELOVA, Angelina. Cubosomal lipid nanoassemblies with pH-sensitive shells created by biopolymer complexes: A synchrotron SAXS study. **Journal of Colloid and Interface Science**, Netherlands, v. 607, n. 1, p. 440-451, 2022.

MAXIMOVA, Natalia; MAESTRO, Alessandra; ZANON, Davide; MARCUZZI, Annalisa. Rapid recovery of postnivolumab vemurafenib-induced drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome after tocilizumab and infliximab administration. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, Londres, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2020.

MENDONÇA, Leonardo Meneghin. **Avaliação de uma preparação hidrossolúvel de curcumina sobre a toxicidade induzida pelo quimioterápico cisplatina: possíveis efeitos protetores in vitro e in vivo, e identificação de alterações na expressão do gene Tp53**. 2012. Trabalho de conclusão de curso (Doutorado em Toxicologia), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MUIR, Benjamin W.; ACHARYA, Durga P.; KENNEDY, Danielle F.; MULET, Xavier; EVANS, Richard A.; PEREIRA, Suzanne M.; WARK, Kim L.; BOYD, Ben J; NGUYEN, Tri-Hung; HINTON, Tracey M.; WADDINGTON, Lynne J.; KIRBY, Nigel; WRIGHT, David K.; WANG, Hong X.; EGAN, Gary F.; MOFFAT, Bradford A.. Metal-free and MRI visible theranostic lyotropic liquid crystal nitroxide-based nanoparticles. **Biomaterials**, Switzerland, v. 33, n. 1, p. 2723-2733, 2012.

MUNNER, Rizwan; HASHMET, Muhammad Rehan; POURAFSSHARY, Peyman; SHAKEEL, Mariam. Unlocking the power of artificial intelligence: Acu=curate zeta potential prediction using machine learning. **Nanomaterials**, Switzerland, v. 13, n. 1209, p. 1.17, 2023.

NARAYANAN, Theyencheri; CHÈVREMONT, William; ZINN, Thomas. Small-angle x-ray in the era of fourth-generation light sources. **Journal of Applied Crystallography**, New Jersey, v. 56, n. 1, p. 939-946, 2023.

NASR, M.; GHORAB, M. K.; ABDELAZEM, A. In vitro and in vivo evaluation of cubosomes containing 5- fluorouracil for liver targeting. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 1, p. 79–88, 2015.

NORONHA, Mariana A.; D'ANGELO, Natália A.; SÁNCHEZ, Germán Pérez; SEVERINO, Patrícia, FOGLIO, Mary Ann; GREAVES, Tamar L.; PEREIRA, Jorge F. B.; LOPES, André M.. Self-assembling micelles of lipopolysaccharides (LPS)for loading hydrophobic (bio)molecules. **Journal of Molecular Liquids**, Switzerland, v. 372, n. 1, p. 1-10, 2023.

OLIVEIRA, Cristina; FERREIRA, Celso J.O.; SOUZA, Miguel; PARIS, Juan L.; GASPAS, Ricardo; SILVA, Bruno F.B.; TEIXEIRA, José A.; FERREIRA-SANTOS, Pedro; BOTELHO, Claudia M. A Versatile nanocarrier – Cubosomos, characterization and applications. **Nanomaterials**, Basileia, v.12, n.2224, p. 1-26, 2022.

PARK, Jiwon; CHOI, Ju Kwang; LEE, Kyeong Eun; CHOI, Da Hyeon; PARK, Yoon Shin. Characteristics of mouse embryonic fibroblasts by cryopreservation period for tissue engineering. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, Shanghai, p. 1-7, 2021a.

PARK, Joo-Hung; LEE, Jeong-Min; LEE, Eun-Jin; KIM, Da-Jeong; HWANG, Won-Bhin. Kynurenine promotes the goblet cell differentiation of HT-29 colon carcinoma cells by modulating Wnt, Notch and AhR signals. **Oncology Reports**, Londres, v, 39, n. 1, p. 1930-1938, 2018b.

RAMSDEN Jeremy. **Nanotechnology**. 2 Ed. Amsterdã: Elsevier, 2016, p. 1-18.

RASPANTINI, Giovanni Loureiro. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de PCL-TPGS contendo docetaxel visando terapia do câncer de próstata**. 2018. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

REIS, Samara Bonesso; SILVA, Juliana de Oliveira; FOSSA, Fernanda Garcia; LEITE, Elaine Amaral; MALACHIAS, Angelo; LANA, Gwenaelle Pound; MOSQUEIRA, Vanessa Carla Furtado; OLIVEIRA, Mônica Cristina; BARROS, André Luís Branco; JESUS, Marcelo Bispo. Mechanistic insights into the intracellular release of doxorubicin from pH-sensitive liposomes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Netherlands, v. 134, n. 1, p. 1-10, 2021.

RUSSI, Maria; VALERI, Rachaele; MARSON, Domenico; DANIELLI, Chiara; FELLUGA, Fulvia; TINTARU, Aura; SKOKO, Natasa; AULIC, Suzana; LAURINI, Erik; PRICL, Sabrina. Some things old, new and borrowed: Delivery of dabrafenib and vemurafenib to melanoma cells via self-assembled nanomicelles based on an amphiphilic dendrimer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Netherlands, v. 180, n. 1, p. 928-987, 2022.

SALATIN, Sara; DIJAJ, Solmaz Maleki; KHOSROUSHAHI, Ahmad Yari. Effect of surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles. **Cell Biology International**, Switzerland, v. 39, n. 8, p. 881-890, 2015.

SALESA, Beatriz; ASSIS, Marcelo; ANDRÉS, Juan; AROCA, Ángel Serrano. Carbon nanofibers versus silver nanoparticles: Time-dependent cytotoxicity, proliferation, and gene expression. **Biomedicines**, Switzerland, v. 9, p. 1155, p. 1-17, 2021.

SAVLA, Ronak; GARBUZENKO, Olga; CHEN, Suzie; ROGUIGUEZ-RODRIGUEZ, Loma; MINKO, Tamara. Tumor-targeted responsive nanoparticle-based systems for magnetic resonance imaging and therapy. **Pharmaceutical Research**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 3487-3502, 2014.

SILVA, Guilherme Guimarães. **Caracterização clonal de linhagens celulares de câncer de mama e sua implicação em modelos experimentais para estudos in vitro**. 2020a. Trabalho de conclusão de curso (Pós-Graduação em Ciências da Saúde), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2020a.

SILVA, Ana Luíza de Gouvêa. **Avaliação do potencial anti-tumoral de nanopartículas magnéticas conjugadas a azul de metileno para carcinoma de mama e de ovário**. 2020b. Trabalho de conclusão de curso (Pós-Graduação em Ciências Biológicas), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2020b.

SILVADASAN, D.; SULTAN, M. H.; ALQAHTANI, S. S.; JAVED, S. Cubosomes in Drug Delivery—A Comprehensive Review on Its Structural Components, Preparation Techniques and Therapeutic Applications. **Biomedicines**, Amsterdã, v. 11, n. 1, p. 1114 – 1139, 2023.

SINGHAL, Prabhat K.; SASSI, Slim; LAN, Lan; AU, Patrick; HALVORSEN, Stefan C.; FUKUMURA, Dai; JAIN, Rakesh K.; SEED, Brian. Mouse embryonic fibroblasts exhibit extensive developmental and phenotypic diversity. **PNAS**, Washington, v. 113, n. 1, p. 122-127, 2016.

SONGBO, Mei; LANG, Hong; XINYONG, Cai; BIN, Xiao; PING, Zhang; LIANG, Shao. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicology Letters**, Irlanda, v. 307, n. 1, p. 41-48, 2019.

SOUZA, Tamires de Fátima Goebel. **Efeito cicatrizante da fração metanólica das folhas de sideroxylon obtusifolium: Estudo in vitro em queimaduras superficiais em camundongos**. 2019. Trabalho de conclusão de curso (Doutorado em Farmacologia), Universidade do Ceará, Ceará, 2019.

TANG, Lu; LI, Jing; ZHAO, Qingqing; PAN, Ting; ZHONG, Hui; WANG, Wei. Advanced and innovative nano-systems for anticancer targeted drug delivery. **Pharmaceutics**, Switzerland, v. 13, n. 1, p. 1-30, 2021.

TUBARÃO, Luciana Neves. **Estabelecimento de um modelo in vitro de câncer de mama para avaliação de receptor ativado por protease (PAR) como alvo terapêutico**. 2017. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

TREWHELLA, Jill. Recent advances in small-angle scattering and its expanding impact in structural biology. **Structure**, Amsterdã, v. 30, n. 1, p. 15-23, 2022. TRUCILLO, Paolo. Drug Carriers: Classification, administration, release profiles and industrial Approach. **Processes**, Switzerland, v. 9, n. 470, p. 1-18, 2021a.

TRUCILLO, Paolo; CAMPARDELLI, Roberta; REVERCHON, Ernesto. Liposomes: From Bangham to supercritical fluids. **Processes**, Switzerland, v. 8, n. 1022, p. 1-15, 2020b.

TSAI, Min-Shao; WENG, Shao-Hsing; KUO, Ya-Hsun; CHIU, Yu-Fan; LIN, Yun-Wei. Synergistic effect of curcumin and cisplatin via down-regulation of thymidine phosphorylase and excision repair cross-complementary 1 (ERCC1). **Molecular Pharmacology**, Estados Unidos, v. 80, n. 1, p. 136-146, 2011.

UMAR, Hassaan; WAHAB, Habibah A.; GAZZALI, Amirah Mohd; TAHIR, Hafsa; AHMAD, Waqas. Cubosomes: design, development and tumor-targeted drug delivery applications. **Polymers**. Suíça, v. 14, n. 1., p. 1-18, 2022.

UPADHYAY, Shishir; GUPTA, Kunj Bihari; MANTHA, Anil Kumar; DHIMAN, Monisha. A short review: Doxorubicin and its effect on cardiac proteins. **Journal of Cellular Biochemistry**, Nova Jersey, v. 122, n. 1, p. 153-165, 2021.

VELA, Stefano; SVERGUN, Dmitri I.. Methods, developmente and applications of small-angle x-ray scattering to characterize biological macromolecules in solution. **Current Research in Structural Biology**, Amsterdã, v. 2, n. 1, p. 164-170, 2020.

VICTORELLI, Francesca Damiani; MANNI, Livia Salvati; BIFFI, Stefania; BORTOT, Barbara; BUZZÁ, Hilde Harb; LUTZ-BUENO, Viviane; HANDSCHIN, Stephan; CALIXTO, Giovana; MURGIA, Sergio; CHORILLI, Marlus; MEZZENGA, Raffaele. Potencial of curcumin-loaded cubosomes fot topical treatment of cervical cancer. **Journal of Colloid and Interface Science**, Netherlands, v. 620, n. 1, p. 419-430, 2022.

VILAR, Gemma; PUCHE, Judit Tulla; ALBERICIO, Fernando. Polymers and Drug Delivery Systems. **Current Drug Delivery**, Sharjah, v. 9, n. 1, p. 1-28, 2012.

YU, Yue; YANG, Xi; LIU, Ming; NISHIKAWA, Masahiro; TEI, Takahiro; MIYAKO, Eijiro. Anticancer drug delivery to cancer cells using alkyl amine-functionalized nanodiamond supraparticles. **Nanoscale Advances**, Tóquio, v. 1, n. 9, p. 3291-3772, set./ 2019.

WENG, Jingwen; TONG, Henry; CHOW, Shing Fung. In vitro release study of the polymeric drug nanoparticles: Development and validation of a novel method. **Pharmaceutics**, Switzerland, v. 12, n. 732, p. 1-18, 2020.

WILSON, C.A.; BROWNING, J.L. Death of HT29 adenocarcinoma cells induced by TNF family receptor activation is caspase-independent and displays features of both apoptosis and necrosis. **Cell Death and Diferenfferention**, Londres, v.9, n.1, p. 1321-1333, 2002.

WU, Haiqiu; JIN, Haojie; WANG, Cun; ZHANG, Zihao; RUAN, Haoyu; SUN, Luyan; YANG, Chen; LI, Yongjing; QIN, Wenxin; WANG, Changchun. Synergistic cisplatin/doxorubicin combination chemotherapy for multidrug-resistant cancer via polymeric nanogels targeting delivery. **Applied Materials & Interfaces**, Estados Unidos, n. 9, n. 11, p. 9426-9436, 2017.

YI, Sang Ah; KIM, Go Woon; YOO, Jung; HAN, Jeung-Whan; KWON, So Hee. HP1 $\gamma$  sensitizes cervical cancer cells to cisplatin through the suppression of UBE2L3. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 21, n. 5976, p. 1-14, 2020.

ZHAI, Jiali; HINTON, Tracey M.; WADDINGTON, Lynne J.; FONG, Celesta; TRAN, Nhiem; MULET, Xavier; DRUMMOND, Calum J.; MUIR, Benjamin W.. Lipid-PEG

conjugates sterically stabilize and reduce the toxicity of phytantriol-based lyotropic liquid crystalline nanoparticles. **Langmuir**, Estados Unidos, v. 31, n. 1, p. 10871-10880, 2015.

ZHANG, Xiao; MA, Guanghui; WEI, Wei. Simulation of nanoparticles interacting with a cell membrane: probing the structural basis and potential biomedical application. **NPG Asia Materials**, Reino Unido, v. 13, n. 52, p. 1-18, 2021a.

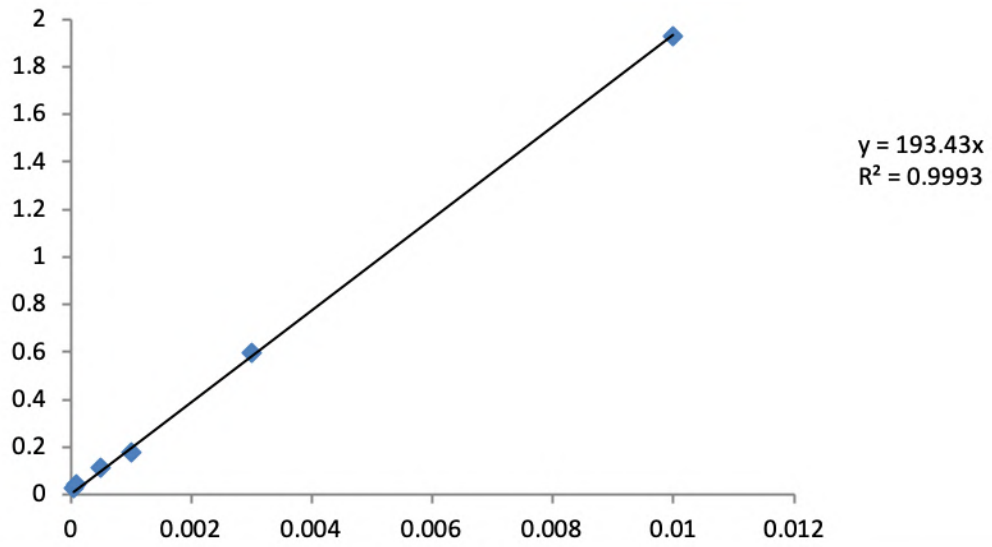
ZHANG, Zhiping; FENG, Si-Shen. The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. **Biomaterials**, Netherlands, v. 27, n. 1, p. 4025-4033, 2006b.

ZHAO, Guangfu; SUN, Yan; DONG, Xiaoyan. Zwitterionic polymer micelles with dual conjugation of doxorubicin and curcumin: synergistically enhanced efficacy against multidrug-resistant tumor cells. **Langmuir**, Estados Unidos, v. 36, n. 1, p. 2383-2395, 2020.

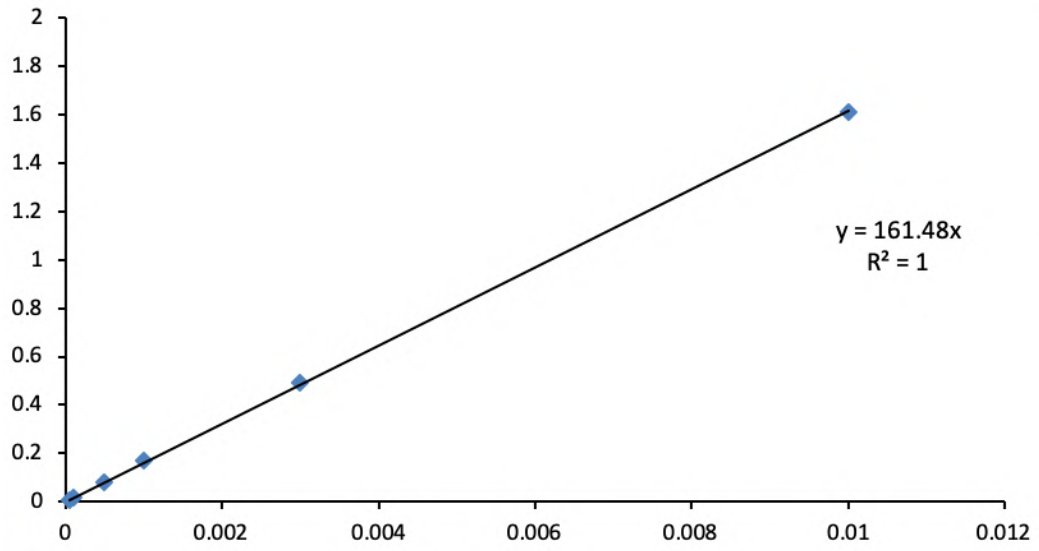
ZEIDLER, Juliana Dias. **Vulnerabilidades específicas de células malignas humanas dependentes de Ras oncogênico: FGF2 e PMA como supressores de tumor**. 2012. Trabalho de conclusão de curso (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ZOU, L.; DING, W.; ZHANG, Y.; CHENG, S.; LI, F.; RUAN, R.; WEI, P.; QIU, B. Peptide-modified vemurafenib-loaded liposomes for targeted inhibition of melanoma via the skin. **Biomaterials**, Netherlands, v. 182, n. 1, p. 1-12, 2018.

## APÊNDICE A – Curva de calibração curcumina em Acetona.



## APÊNDICE B – Curva de calibração curcumina em DMSO.





## APÊNDICE C – Curva de calibração da vemurafenibe em DMSO.

