

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Estudo da eficácia de encapsulação da Cinarizina em
cubossomos não-iônicos: caracterização estrutural e citotóxica

Mayra Cristina Gomes Lotierzo

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr Leandro Ramos Souza Barbosa

São Paulo

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Estudo da eficácia de encapsulação da Cinarizina em
cubossomos não-iônicos: caracterização estrutural e citotóxica

Mayra Cristina Gomes Lotierzo

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr Leandro Ramos Souza Barbosa

São Paulo

2021

Mayra Cristina Gomes Lotierzo

Estudo da eficácia de encapsulação da Cinarizina em cubossomos
não-iônicos: caracterização estrutural e citotóxica

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa

orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

São Paulo, 18 de junho de 2021

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

L885e Lotierzo, Mayra Cristina Gomes
Estudo da eficácia de encapsulação da Cinarizina em cubossomos não-iônicos: caracterização estrutural e citotóxica / Mayra Cristina Gomes Lotierzo. - São Paulo, 2021.
96 p.

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

1. Cubossomos. 2. Nanopáticas. 3. Cinarizina.
4. Drug Delivery. 5. Biofísica. I. T. II. Barbosa, Leandro Ramos Souza, orientador.

Resumo

LOTIERZO, M. C. G. **Estudo da eficácia de encapsulação da Cinarizina em cubossomos não-iônicos: caracterização estrutural e citotóxica.** 2021. 97f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Os cubossomos são partículas nanoestruturadas em forma de bicamada lipídica, bicontínuas e altamente curvadas, as quais devem ser estabilizadas por um polímero não-iônico, neste caso o Pluronic® F-127. Podem ser compostos por alguns tipos de lipídios específicos que possuem a capacidade de se auto associar em estruturas cúbicas quando estão em excesso de água, como o fitantriol (PHY) e a monoleína (GMO). Devido a sua estrutura única, cubossomos possuem um grande potencial para serem considerados como sistemas *drug delivery*. Os sistemas *drug delivery* são amplamente utilizados na pesquisa farmacêutica e em contextos clínicos para aumentar a eficácia de compostos utilizados para diagnóstico e de fármacos. No caso da cinarizina (CNZ), fármaco já aprovado para o tratamento de náuseas, vômitos e vertigens causadas pela doença de Ménière, existem inúmeros efeitos colaterais associados a sua baixa solubilidade. Desta forma, a encapsulação em cubossomos se torna uma abordagem promissora para resolver os problemas de atividade farmacológica relacionados ao fármaco. Neste trabalho, realizamos uma caracterização biofísica da interação da CNZ em cubossomos (contendo PHY ou myverol, MYV, sendo este composto por 80% de GMO). As técnicas biofísicas utilizadas foram: espalhamento de raios-X em baixos ângulos (SAXS), espalhamento dinâmico de luz (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), crio microscopia eletrônica de transmissão (Crio-TEM), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e potencial zeta. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada para verificar a porcentagem de eficiência de encapsulação (%EE) da CNZ nos cubossomos, enquanto que a citotoxicidade foi avaliada em eritrócitos através da análise da atividade hemolítica. Inicialmente, a influência de diferentes solventes (acetona, clorofórmio, etanol e octano) nas propriedades estruturais de cubossomos de PHY foi investigada, a fim de se minimizar os efeitos do solvente utilizados para a encapsulação da CNZ. Para amostras com acetona, descobriu-se que apenas altas concentrações tiveram influência na estrutura cristalográfica das nanopartículas, sendo o resultado foi totalmente reversível após 24h. O etanol fez com que o parâmetro de rede aumentasse de 10-15%. O clorofórmio e o octano tiveram efeitos diferentes sobre cubossomos de PHY em comparação com a acetona e o etanol; ambos induziram uma transição cúbico-hexagonal-micelar. Posteriormente, constatamos que as nanopartículas de PHY e MYV apresentaram diferentes estruturas cristalográficas, sendo elas Pn3m e Im3m, respectivamente. Devido a problemas com a baixa solubilidade de CNZ em PHY os estudos para esse lipídio foram suspensos. Nos testes para cubossomos de MYV ao incorporar a CNZ foi observado uma alteração da estrutura cúbica de Im3m para Pn3m e os valores dos parâmetros de rede se alteraram de acordo com a estrutura cristalina encontrada, porém os valores não apresentaram diferenças significativas de tamanho quando se trata da mesma estrutura, sugerindo que a CNZ não interferiu no parâmetro de rede. Os tamanhos das nanopartículas apresentaram uma população monodispersa com ~200 nm. DLS mostrou uma interferência da CNZ no tamanho dos cubossomos, variando de forma diretamente proporcional a concentração de CNZ na amostra, enquanto as técnicas de NTA e microscopia apresentaram nanopartículas de tamanhos bastante variados, mas independente da interferência da CNZ. A encapsulação de CNZ também

foi dosada por HLPC em cubossomos de MYV, obtendo um limite superior de 0,6 mg/mL. A atividade citotóxica dos cubossomos foi testada em eritrócitos, revelando uma taxa de hemólise bastante inferior em cubossomos com CNZ em relação a cubossomos puros. Acreditamos que os cubossomos podem sim ser utilizados como sistemas carreadores de CNZ.

Palavras chave: Cubossomos, Cinarizina, nanopartículas, *drug delivery*, lipídios.

Abstract

LOTIERZO, M. C. G. **Study of the encapsulation efficacy of Cinnarizine in non-ionic cubosomes: structural and cytotoxic characterization.** 2021. 97f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Cubosomes are nanostructured particles in the form of a lipid bilayer, bicontinuous and highly curved, which must be stabilized by a non-ionic polymer, in this case Pluronic® F-127. They can be composed of some types of specific lipids that have the ability to self-associate in cubic structures when they are in excess of water, such as phytantriol (PHY) and monolein (GMO). Due to their unique structure, cubosomes have a great potential to be considered as drug delivery systems. Drug delivery systems are widely used in pharmaceutical research and clinical settings to increase the efficacy of compounds used for diagnostics and drugs. In the case of cinnarizine (CNZ), a drug already approved for the treatment of nausea, vomiting and vertigo caused by Ménière's disease, there are numerous side effects associated with its low solubility. Thus, cubosomal encapsulation becomes a promising approach to solve drug-related problems of pharmacological activity. In this work, we performed a biophysical characterization of the CNZ interaction in cubosomes (containing PHY or myverol, MYV, which is composed of 80% GMO). The biophysical techniques used were: low angle X-ray scattering (SAXS), dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM), cryo transmission electron microscopy (Cryo-TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA) and zeta potential. High performance liquid chromatography (HPLC) was performed to verify the percentage of encapsulation efficiency (%EE) of CNZ in cubosomes, while cytotoxicity was evaluated in erythrocytes by analyzing the hemolytic activity. Initially, the influence of different solvents (acetone, chloroform, ethanol and octane) on the structural properties of PHY cubosomes was investigated in order to minimize the effects of the solvent used for the encapsulation of CNZ. For samples with acetone, it was found that only high concentrations had an influence on the crystallographic structure of the nanoparticles, with the result being fully reversible after 24h. Ethanol caused the network parameter to increase by 10-15%. Chloroform and octane had different effects on PHY cubosomes compared to acetone and ethanol; both induced a cubic-hexagonal-micellar transition. Later, we found that PHY and MYV nanoparticles presented different crystallographic structures, being Pn3m and Im3m, respectively. Due to problems with the low solubility of CNZ in PHY, studies for this lipid were suspended. In the tests for MYV cubosomes when incorporating CNZ, a change in the cubic structure from Im3m to Pn3m was observed and the lattice parameters changed according to the crystal structure found, but the differences observed were not significant when it comes to the same structure, suggesting that the CNZ did not interfere with the network parameter. The nanoparticle sizes showed a monodisperse population with ~200 nm. DLS showed an interference of CNZ in the size of the cubosomes, varying directly proportionally to the concentration of CNZ in the sample, while NTA and microscopy techniques showed nanoparticles of widely varying sizes, but independent of CNZ interference. CNZ encapsulation was also dosed

by HPLC in MYV cubosomes, obtaining an upper limit of 0.6 mg/ml. The cytotoxic activity of cubosomes was tested in erythrocytes, revealing a much lower rate of hemolysis in cubosomes with CNZ compared to pure cubosomes. We believe that cubosomes can indeed be used as CNZ carrier systems.

Keywords: Cubosomes, Cinarizine, nanoparticles, drug delivery, lipids.

Agradecimentos

Sei que diferente de muitos, gostaria de começar agradecendo primeiramente a mim, a todo meu esforço e dedicação nesses últimos anos de trabalho que me levaram a concluir este trabalho e realizar o sonho do mestrado.

Agradeço a minha família, ao meu pai que sempre me incentivou em tudo, me levando a acreditar que posso conquistar tudo que desejo. A minha mãe pelo carinho e atenção em todos os momentos de necessidade. Ao meu irmão, que apesar das dificuldades é meu companheiro de vida. E a minha querida avó, que mesmo sem entender todo esse percurso sempre me abraçava e orava por mim.

Agradeço especialmente ao meu orientador Leandro Barbosa, pois sem ele nada disso seria possível. Primeiramente por acreditar em mim e no meu potencial, por estar ao meu lado mesmo nos momentos de crise acadêmica, me levando a concluir esse trabalho. Além do mais, uma amizade que eu levarei por toda a vida, sabendo de seu apoio e carinho. É sempre bom ver as coisas por uma nova perspectiva e tomar uma cerveja no final do dia.

Agradeço imensamente a todos os meus colegas de laboratório. A Natália e ao Fredderico, meus companheiros de sala que estavam ao meu lado, segurando minha mão, enxugando meu choro, dando risadas, e fazendo desse percurso sempre um pouquinho melhor. A Leticia que me deu a oportunidade de auxiliá-la em seu projeto de IC, me proporcionando um aprendizado infinito e uma grande amizade. A Giovana por cada sorriso que me fazia dar com seu jeitinho. A minha finalmente amiga Barbara, pois esteve ali desde o primeiro dia, me ensinou tanto, e hoje eu posso dizer que mesmo a distância construímos uma linda amizade. Ao Raphael por todo suporte técnico que me faltava e carinho ao ensinar. Ao Gustavo por me apresentar um lado tão espiritual do IF e fazer minhas sextas-feiras melhores. E finalmente, a irmã que eu ganhei ao longo dessa caminhada, Bruna, por estar sempre ali comigo, em cada experimento, nervoso, choro, novidade, por ficar brava tanto quanto eu cada vez que a gente passava por um novo perrengue, vou te levar pra vida toda.

As amigas Barbara e Camila de outro estado que ganharam um cantinho no meu coração e me apresentaram o cuscuz.

Aos professores que iluminaram minha jornada, como a Profa. Dra. Carlota Rangel e Profa. Daniele Ribeiro de Araújo e seus grupos incríveis que me acolheram e deram todo o suporte necessário.

Agradeço a todas as instituições parceiras e laboratórios que proporcionaram a oportunidade de realizar cada um dos experimentos desse projeto: Laboratório de Biofísica (IF-USP), LNLS, LNNano, ICB-USP, UNICAMP, UFABC.

E finalmente, as agencias FAPESP e CNPq todo apoio financeiro desse projeto. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela bolsa concedida.

“Não há problema que
não possa ser solucionado
pela paciência”

(Chico Xavier)

Sumário

Lista de Figuras	3
Lista de Tabelas	6
Lista de Abreviações	7
1. Introdução.....	9
1.1 Nanotecnologia e nanomedicina	9
1.2 Cubossomos	11
1.3 Moléculas anfifílicas	14
1.3.1 Fitantriol (PHY).....	15
1.3.2 Monoleína (GMO).....	17
1.3.3 Myverol (MYV)	18
1.4 Pluronic F127®.....	20
1.5 Cinarizina.....	22
2. Objetivos	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. Materiais e Métodos	25
3.1 Materiais	25
3.2 Equipamentos.....	25
3.3 Preparo de amostra.....	25
3.3.1 Cubossomos de Fitantriol (PHY)	26
3.3.2 Myverol (MYV)	28
3.4 Espalhamento de Raios-X em Baixos Ângulos (SAXS, <i>Small-angle X-ray scattering</i>)	29
3.5 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, <i>Dynamic light scattering</i>)	33
3.6 Potencial Zeta (ζ)	35
3.7 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA, <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>).....	37
3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM, <i>transmission electron microscopy</i>) e Crio Microscopia Eletrônica de Transmissão (Crio-TEM).....	38
3.9 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, <i>high performance liquid chromatography</i>)	40
3.10 Hemólise em meio isosmótico	42

4. Resultados e Discussão	44
4.1 Cubossomos de PHY na presença de solventes	44
4.1.1 Influência imediata	44
4.1.2 Influência após 24h.....	50
4.2 Cubossomos de PHY com CNZ	55
4.3 Cubossomos de MYV com CNZ.....	60
5. Conclusão.....	73
6. Perspectivas.....	75
7. Referências.....	76

Lista de Figuras

Figura 1: A variedade de nanopartículas estudadas nos últimos 40 anos de pesquisas, em termos de forma e tamanho, materiais utilizados e potenciais adições às superfícies das nanopartículas. Fonte: Adaptada de (SUN et al., 2014).	10
Figura 2: Estruturas comumente encontradas na automontagem de moléculas anfifílicas, como monoleína e fitantriol. Fonte: (TAN et al., 2019).....	11
Figura 3: Esquematização da estrutura cúbica $Im\bar{3}m$ apontando os setores hidrofílicos e hidrofóbicos da matriz, bem como as drogas que podem ser carreadas em cada região. Fonte: (KARAMI; HAMIDI, 2016)	12
Figura 4: Diferentes possíveis estruturas cristalográficas de cubossomos. Fonte: Adaptada de (https://cherezov.usc.edu/resources.htm)	13
Figura 5: Arranjos estruturais de moléculas anfifílicas constituídas por polímeros, surfactantes, detergentes ou lipídios. Fonte: Adaptada de http://www.theonislabs.com/research/	15
Figura 6: Diagrama de fase do fitantriol em solução aquosa a diferentes temperaturas. Fonte: Adaptada de (AKBAR et al., 2017)	16
Figura 7: Diagrama de fase da monoleína em solução aquosa a diferentes temperaturas. Fonte: Adaptada de (CAFFREY, 2009).	18
Figura 8: Diagrama de fase do myverol 18-99K em solução aquosa a diferentes temperaturas. Fonte: (CLOGSTON et al., 2000).....	20
Figura 9: Interação do polímero estabilizador F127 com os cubossomos de PHY e GMO, mostrando que para PHY o polímero permanece adsorvido na superfície da nanopartícula e para GMO o polímero interage com a bicamada lipídica dentro da nanoestrutura. Fonte: (DONG et al., 2012).	21
Figura 10: Esquema de configuração típica de um sistema de SAXS. Uma fonte de raios-X produz o feixe primário e monocromador seleciona o comprimento de onda utilizado. O sistema de colimação define o volume do feixe. Um suporte de amostra está localizado no caminho do feixe, então, quando os raios X passam, eles são espalhados pela amostra em todas as direções. O detector, localizado à distância da amostra, lê os fótons de entrada em um ângulo máximo de 2θ . Fonte: https://www.researchgate.net/figure/figura-1-Esquema-da-linha-de-SAXS-do-Laboratorio-Nacional-de-Luz-Sincrotron-LNLS_fig6_323902876	30
Figura 11: Dados de SAXS para a fase volumétrica cúbica PHY a 25 ° C mostrando simetria $Pn\bar{3}m$. Adaptado de: (BARAUSKAS; LANDH, 2003).....	31
Figura 12: Esquema da técnica de DLS. Fonte: http://www.otsukael.com/product/detail/productid/23/category1id/2/category2id/2/category3id/32	33
Figura 13: Funções de correlação e relação com populações de tamanho de partícula a partir de um experimento de DLS. Fonte: http://www.otsukael.com/product/detail/productid/23/category1id/2/category2id/2/category3id/32	34

Figura 14: Representação gráfica das camadas iônicas e do potencial elétrico relacionado a cada região em torno da partícula. Fonte: https://nanocomposix.com/pages/nanoparticle-characterization-techniques#target	36
Figura 15: Esquema do aparato experimental de um equipamento de NTA. Fonte: (HOLE et al., 2013)	37
Figura 16: Curvas SAXS de cubossomos na ausência (linhas pretas) e presença de concentrações crescentes de solvente orgânico. Os sistemas estudados foram acetona (a), clorofórmio (b), etanol (c) e octano (d).....	46
Figura 17: Valores dos parâmetros da célula unitária calculados usando SCryPTA. Dentro de cada quadrado, pode-se encontrar a fase estrutural observada para cada sistema. As barras representam os desvios padrão que também foram calculados usando SCryPTA. As fases micelares são isotrópicas e não têm picos de difração.	47
Figura 18: Curvas de SAXS de cubossomos na ausência (preto linha) e presença de aumento concentrações de solvente orgânico após 24 h de interação com o solvente. Os sistemas estudados foram acetona (a), clorofórmio (b), etanol (c), e octano (d).....	51
Figura 19: Valores dos parâmetros de rede da célula unitária calculados usando SCryPTA. Dentro de cada quadrado, pode-se encontrar a fase estrutural observada para cada sistema após 24h. As barras representam os desvios padrão que também foram calculados usando SCryPTA. As fases micelares são isotrópicas e não têm picos de difração.	52
Figura 20: Micrografias de Cryo-TEM de cubossomos de fitantriol na ausência de solventes (controle), e na presença de clorofórmio 1: 100, etanol 1: 2, e octano 1:50. Todas as partículas encontradas apresentam alguma estrutura interna evidenciada pelas FFTs inseridas. Barras de escala são apresentadas em cada figura.	55
Figura 21: A esquerda temos dados de SAXS para cubossomos de PHY brancos e com CNZ produzidos pelo método de adição. A direita o parâmetro de rede, calculado através do software SCryPTA, para as mesmas amostras analisadas por SAXS.....	56
Figura 22: A esquerda temos dados de SAXS para cubossomos de PHY brancos e com CNZ produzidos pelo método de co-solubilização. A direita o parâmetro de rede, calculado através do software SCryPTA, para as mesmas amostras analisadas por SAXS.....	57
Figura 23: Dados de DLS para cubossomos de PHY brancos e com CNZ produzidos por co-solubilização.....	58
Figura 24: Micrografias de TEM para cubossomos de PHY brancos e com 1 mg/mL de CNZ.....	59
Figura 25: A esquerda temos dados de SAXS para para as 4 diferentes condições de protocolos testados para MYV. A direita o parâmetro de rede, calculado através do software SCryPTA, para as mesmas amostras analisadas por SAXS.	61
Figura 26: Dados de DLS para os 4 diferentes protocolos testados para MYV.....	62
Figura 27: A esquerda temos dados de SAXS para cubossomos de MYV brancos e com CNZ produzidos pelo método de co-solubilização. A direita o parâmetro de rede, calculado através do software SCryPTA, para as mesmas amostras analisadas por SAXS, separadas de acordo com a estrutura apresentada Pn3m ou Im3m.	63

Figura 28: Dados de DLS para cubossomos de MYV brancos e com CNZ produzidos por co-solubilização.....	64
Figura 29: Micrografias de TEM e Crio-TEM para cubossomos brancos e com CNZ nas concentrações 0,2 mg/mL e 1,0 mg/mL. Bem como o cálculo de FFT referente as micrografias de Crio-TEM.	66
Figura 30: Dados de potencial zeta obtidos para cubossomos de MYV brancos e com CNZ nas concentrações 0,2 mg/mL, 0,6 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL	67
Figura 31: pH de amostras de MYV para cubossomos branco e com diferentes concentrações de CNZ.....	68
Figura 32: A esquerda temos o cromatograma para amostras de cubossomos com diferentes concentrações de CNZ, obtidos por HPLC. A direita, Curva analítica padrão para quantificação de CNZ, na faixa de concentração de 10-60 µg/mL.	69
Figura 33: Gráfico de correlação entre o percentual de encapsulação, concentração encapsulada e concentração inicial de CNZ. Os valores foram obtidos a partir de regreções lineares da área a baixo dos picos do cromatograma, obtido por HPLC.	70
Figura 34: Efeito hemolítico de cubossomos brancos e com CNZ sobre eritrócitos. Os experimentos foram feitos em triplicata.	71
Figura 35: Efeito hemolítico médio de cubossomos brancos e com CNZ sobre eritrócitos, correlacionados diretamente a concentração de CNZ presente na amostra.	72

Lista de Tabelas

Tabela 1: Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas do fitantriol (massa molecular; coeficiente de partição octanol/água – LogP; balanço hidrofílico/lipofílico – HLB; ponto de fusão - PF).	16
Tabela 2: Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas da monoleína (massa molecular; coeficiente de partição octanol/água – LogP; balanço hidrofílico/lipofílico – HLB; ponto de fusão - PF).	17
Tabela 3: Moléculas encontradas no myverol, suas concentrações e estruturas químicas. Fonte: (CLOGSTON et al., 2000)	19
Tabela 4: Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas do Pluronic® F127 (massa molecular; coeficiente de partição octanol/água – LogP; balanço hidrofílico/lipofílico – HLB; ponto de fusão - PF).	21
Tabela 5: Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas da Cinarizina (massa molecular; coeficiente de partição octanol/água – LogP; balanço hidrofílico/lipofílico – HLB; ponto de fusão - PF).	22
Tabela 6: Identificação da amostra incluindo o solvente orgânico e proporção utilizada em valores teóricos. A proporção volumétrica é a quantidade de solvente em relação à solução de cubossomos. A concentração (solvente %, v/v) é a quantidade de solvente com respeito a solução final de cubossomos. O número de moléculas é a proporção molar de moléculas de solvente em relação as moléculas de fitantriol (PHY).	27
Tabela 7: Simetrias espaciais cristalinas possíveis para cubossomos	32
Tabela 8: Condições cromatográficas para quantificação de CNZ nas formulações, segundo a metodologia Lamie e Monir (2016).	41
Tabela 9: Dados de NTA para amostras de cubossomos brancos e com CNZ. Foi avaliado o tamanho das nanopartículas e sua concentração na amostra.....	65

Lista de Abreviações

%EE – Eficiência de encapsulação

BU – Bottom up

CAC – concentração de agregação crítica

CCD – dispositivo de carga acoplada

CNZ – Cinarizina

Cryo-TEM – Cryogenic transmission electron microscopy

DLS – Dynamic light scattering

DPPC – Dipalmitoilfosfatidilcolina

EPR – Electron paramagnetic resonance

F127 – Poloxamer 407 / Pluronic® F127

FDA – Food and Drug Administration

FFT – Fast Fourier transform

GMO – Monoleína

HBL – Balanço hidrofílico/lipofílico

HPLC – High performance liquid chromatography

LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

LNNano – Laboratório Nacional de Nanotecnologia

LogP – coeficiente de partição octanol/água

MYV – Myverol

NTA – Nanoparticle tracking analysis

PBS – Phosphate buffered saline

PDI – Índice de polidispersão

PEO – óxido de polietileno

PF – Ponto de fusão

pH – Potencial hidrogeniônico

PHY – Fitantriol

PPO – óxido de polipropileno

SAXS – Small angle X-rays scattering

TEM – Transmission electron microscopy

TF – Temperatura de fusão

1. Introdução

1.1 Nanotecnologia e nanomedicina

A nanotecnologia começou a se desenvolver em meados dos anos 50, e desde então suas aplicações em diversas áreas revolucionaram o séc. XX. Esta ciência estuda partículas com dimensões entre 1 e 1000 nm visando produzir materiais com propriedades específicas e diferenciadas. As vantagens quando comparadas a estruturas em escalas micrométricas são inúmeras, justamente por terem propriedades físico-químicas como reatividade química de condutância elétrica, magnetismo, efeitos ópticos e resistência física que podem ser usadas para superar algumas das limitações encontradas. (NIKALJE et al., 2015) Os estudos abrangem áreas multidisciplinares relacionadas a física, química, biologia e engenharia, com aplicações em campos como eletroeletrônicos, tecnologias de comunicação, nano chips de armazenamento, nanomateriais, alimentos, agricultura, embalagens e, com especial destaque, a nanomedicina. (ZHANG et al., 2008)

A aplicação da nanotecnologia à medicina, conhecida como nanomedicina, refere-se ao uso destes materiais em pequena escala para desenvolver novas modalidades terapêuticas e de diagnóstico. Os sistemas de *drug delivery* vêm avançando como uma ferramenta promissora para fornecer tratamento eficiente levando o medicamento a tecidos específicos. (TORCHILIN, 2014) Este sistema nanoparticulado melhora significativamente o efeito no alvo e a biodisponibilidade de um medicamento, reduzindo sua toxicidade e possíveis efeitos colaterais. (FORNASIER et al., 2020)

Os sistemas de *drug delivery* são amplamente utilizados na pesquisa farmacêutica e em contextos clínicos para aumentar a eficácia de agentes diagnósticos e fármacos, incluindo os anticancerígenos, antimicrobianos e antivirais. (TORCHILIN, 2014) O uso desses sistemas visa superar dificuldades associadas aos fármacos tradicionais, como pobre solubilidade aquosa, baixa biocompatibilidade, distribuição não específica no organismo e possíveis efeitos colaterais. Com o crescente avanço da técnica, sistemas biocompatíveis estão sendo criados para detectar células doentes e promover a cura pontual. (BHOSALE et al., 2013) Em contra ponto, as desvantagens se relacionam aos custos de produção. (MENG et al., 2018)

Diversas nanopartículas (figura 1) podem ser utilizadas para a produção de sistemas *drug delivery*, podendo ser feitas de uma variedade de materiais, como metais (Au ou Ag) lipídios, polímeros e nanotubos de carbono. Todos os materiais de matéria-prima devem ser biocompatíveis (JURJ et al., 2017). Suas formas definem as propriedades físico-químicas, o tipo de molécula que pode ser carregada, e como ela será liberada. Muitas estruturas como, por exemplo, micelas, lipossomos, dendrímeros, hidrogéis, vesículas, cubossomos, polimerossomas, entre outras vem sendo estudadas (AKHTER et al., 2018). As propriedades das nanopartículas, como forma, carga superficial, lipofilicidade, tamanho, geometria, densidade, etc. são características importantes que determinam a vida útil das nanopartículas e possíveis aplicações. (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015)

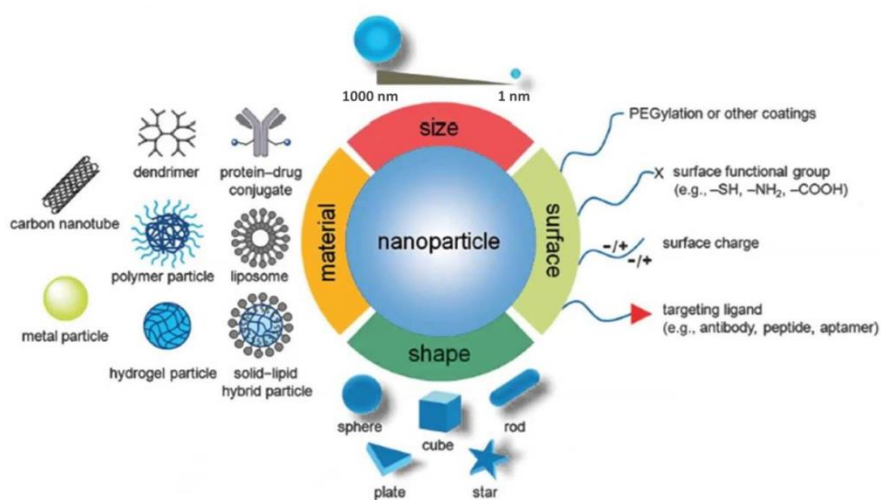


Figura 1: A variedade de nanopartículas estudadas nos últimos 40 anos de pesquisas, em termos de forma, tamanho, materiais utilizados e potenciais adições às superfícies das nanopartículas. Fonte: Adaptada de (SUN et al., 2014).

Dentre as inúmeras nanopartículas utilizadas para *drug delivery* destacam-se as formadas por lipídios, como lipossomos e cubossomos. No início dos anos 70 lipossomos tiveram suas primeiras aplicações na nanomedicina, sendo utilizados para carreadores para vacinas. (NIKALJE et al., 2015) Outras nanopartículas, como os cubossomos, são de aplicação mais recente no campo de entrega de fármacos. (ZABARA et al., 2019)

Independentemente da via de administração, as nanopartículas interagem com as células predominantemente via fagocitose, internalização mediada ou fusão com a

membrana celular, depois disso, elas passam por internalização celular na qual ocorre a liberação do fármaco (MUNTIMADUGU; KOMMINENI; KHAN, 2017) (DESHPANDE; SINGH, 2017). Dependendo se as drogas estão localizadas nas porções hidrofóbicas ou hidrofílicas do carreador, os mecanismos de liberação podem variar. (AKHTER et al., 2018)

1.2 Cubossomos

Os cubossomos são partículas nanoestruturadas em uma bicamada lipídica, contínua e altamente curvada que se estende nas três dimensões formando canais de água que podem se dobrar em diferentes estruturas, sendo as principais: Ia3d, Pn3m e Im3m, como vemos na figura 2. Podem ser produzidos pela adição de alguns lipídios específicos, como o fitantriol, a monoleína e o myverol, em excesso de água, resultando em uma suspensão coloidal. Sua auto associação forma estruturas periódicas de simetria cúbica que são estabilizadas pela presença de um polímero não iônico adicionado a suspensão coloidal. (TAN et al., 2019) (PATEL, THAKKAR, 2021)

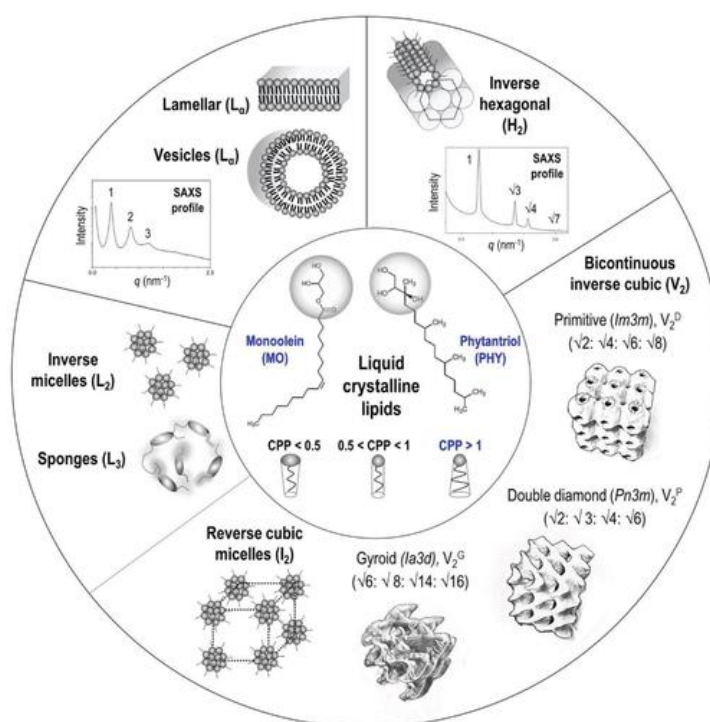


Figura 2: Estruturas comumente encontradas na automontagem de moléculas anfífilas, como monoleína e fitantriol. Fonte: (TAN et al., 2019)

Vale ressaltar que os cubossomos destacam-se em relação a outras partículas devido a sua alta área superficial de $\sim 400 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e seu volume hidrofóbico interno de

aproximadamente 50%, tornando-o um importante carreador de substâncias hidrofóbicas, anfifílicas e hidrofílicas (figura 3). (ESPOSITO, MARIANI, DRECHSLER, 2016) São altamente estáveis, podendo permanecer por meses sem alterações em sua estrutura interna, quando preparados em ambiente estéril. (RIZWAN; BOYD, 2015) (BARRIGA, HOLME, STEVENS, 2018)

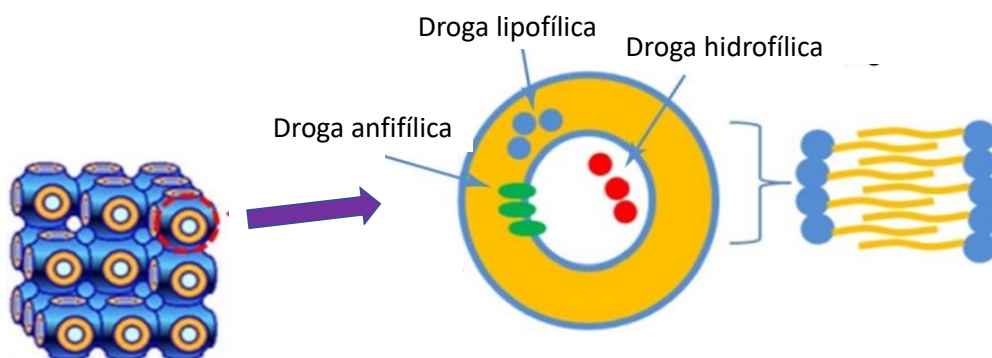


Figura 3: Esquemática da estrutura cúbica $Im3m$ apontando os setores hidrofílicos e hidrofóbicos da matriz, bem como as drogas que podem ser carreadas em cada região. Fonte: (KARAMI; HAMIDI, 2016)

Cubossomos necessitam de um agente estabilizador para impedir a agregação das nanopartículas (coalescência), geralmente é utilizado um polímero não iônico. O mais empregado, atualmente, é o copolímero tribloco Poloxamer 407, comercialmente conhecido como Pluronic F127®, que restringe essa agregação por impedimento estérico (KARAMI; HAMIDI, 2016). Outras moléculas também foram relatadas para desempenhar o mesmo papel que F127, (LOTIERZO et al., 2020) (CHONG et al., 2011) como tween 80, (SERIEYE et al., 2017) (YOUNUS et al., 2018) (AZHARI et al., 2021) ácido oleico (FRASER et al., 2013) (FONG et al., 2020) e vitamina E (PATEL, THAKKAR, 2021) (YAGHMUR, TRAN, MOGHIMI, 2020).

É importante salientar que apesar das moléculas de monoleína e fitantriol formarem estruturas cúbicas, a organização interna das nanopartículas é diferenciada. No diagrama de fases de ambos lipídios, verificamos a presença das estruturas $Ia3d$ e $Pn3m$, no entanto, ao adicionarmos Pluronic F127® na produção das nanopartículas, uma terceira estrutura cristalográfica, conhecida como $Im3m$ (figura 3), pode ser formada. (BARRIGA, HOLME, STEVENS, 2018)

As três diferentes estruturas observadas podem ser descritas em termos de duas redes tridimensionais de hastes conectadas, mutuamente interligadas e desconectadas. A

Ia3d possui as hastes unidas coplanarmente 3 por 3, mutualmente interligados e desconectados, cada rede é quiral, e as duas são imagens espelhadas; na Pn3m, as hastes são tetraedricamente unidas 4 por 4, formando estruturas dos canais de água semelhantes a uma estrutura de diamante; e na Im3m, as hastes são unidas cubicamente 6 por 6, sendo a estrutura mais simétrica de todas. (MARIANI, LUZZATI, DELACROIX, 1988)

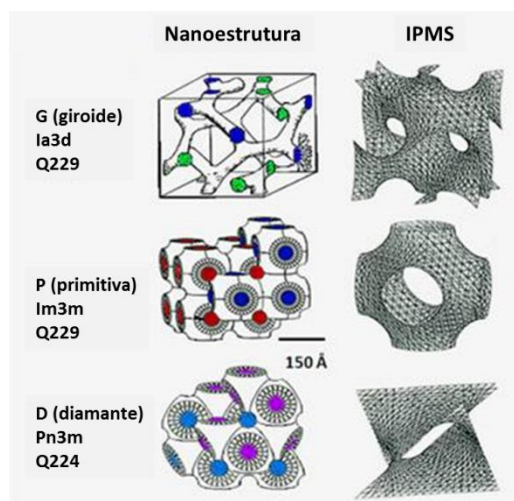


Figura 4: Diferentes possíveis estruturas cristalográficas de cubossomos. Fonte: Adaptada de (<https://cherezov.usc.edu/resources.htm>)

As estruturas de cristal líquido dos cubossomos são frequentemente investigadas para aplicações biomédicas. (NIKALJE et al., 2015) (ZABARA et al., 2019) Dentre suas principais aplicações, encontramos a liberação controlada de drogas, aplicável devido ao seu pequeno tamanho de poro (5-10 nm). Os mecanismos de liberação das drogas encapsuladas ocorrem geralmente por difusão, por conta do gradiente de concentração da droga que se estabelece no local de liberação. Porém, existem vários fatores que influenciam na taxa de liberação do sistema, como por exemplo: solubilidade do fármaco no meio dispersante, o seu coeficiente de difusão, tamanho e distribuição dos poros, temperatura, pH, força iônica do meio biológico, e claro, a geometria das nanopartículas. (PATEL, THAKKAR, 2021)

Além disso, quando uma droga é incorporada à nanopartícula, ela se torna parte de sua matriz e as moléculas podem ser encapsuladas nos cubossomos por meio de diferentes processos: co-solubilização ou adicionadas após as nanopartículas serem formadas. (MO; MILLERET; NAGARAJ, 2017)

As principais vantagens do uso de cubossomos são que este nanossistema pode carregar mais de um medicamento ou molécula diferente ao mesmo tempo, podendo ser até uma hidrofóbica e outra hidrofílica. O maior volume hidrofóbico permite que os cubossomos suportem grandes cargas de drogas em sua matriz. (KARAMI; HAMIDI, 2016) (SHARMA, DHAWAN, NANDA, 2020)

Ademais, existem evidências na literatura mostrando que os cubossomos são nanopartículas resistentes a variações de pH, (MULLER; SALONEN; GLATTER, 2010) alguns estudos mostram que as nanopartículas mantêm a estrutura cúbica, mesmo em meios ácidos ou alcalinos, sustentando variações de pH de 5,5 a 10. (NAZARUK; MAJKOWSKA PILIP; BILEWICZ, 2017)

1.3 Moléculas anfifílicas

Moléculas anfifílicas são aquelas definidas por conterem grupos polares (com alta afinidade pela água) e grupos apolares (com pouca afinidade pela água). Uma das principais características dessas moléculas é a capacidade de se auto associar em solução aquosa a partir de uma dada concentração, chamada de concentração de agregação crítica (CAC). (MARZZOCO, TORRES, 2007) Esta auto associação em meio aquoso é feita de modo a se minimizar o contato das regiões hidrofóbicas e maximizar o contato das regiões hidrofílicas com a água, formando os mais diferentes tipos de estruturas como: micelas, vesículas, polímerossomos, cubossomos, dentre outras (figura 5). (LETCHEFORD, BURT, 2007)

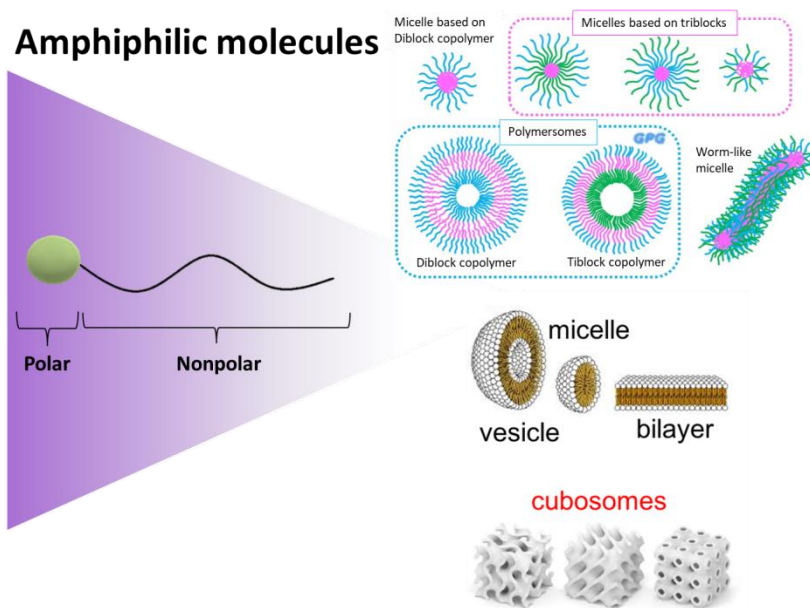


Figura 5: Arranjos estruturais de moléculas anfifílicas constituídas por polímeros, surfactantes, detergentes ou lipídios. Fonte: Adaptada de <http://www.theonislabs.com/research/>

O parâmetro de empacotamento é uma grandeza que pode prever quais fases são preferencialmente formadas por um dado lipídio, uma vez que o comprimento da cadeia e o volume do hidrofóbico são conhecidos, bem como a área de superfície do grupo polar (RIZWAN; BOYD, 2015). Um diagrama de fase de uma molécula é capaz de exibir seu polimorfismo em determinados graus de hidratação, revelando todas as estruturas de associação possíveis (AZMI; MOGHIMI; YAGHMUR, 2015). Porém, nem todos os lipídios podem se auto associar em estruturas cúbicas devido às suas formas e parâmetro de empacotamento.

Algumas moléculas anfifílicas podem se auto associar na estrutura cúbica, mas as mais estudadas são a monooleína (GMO) e o fitantriol (PHY)

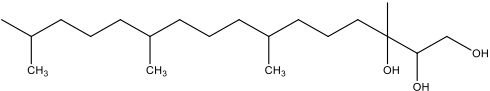
1.3.1 Fitantriol (PHY)

O fitantriol (PHY, tabela 1) tem sido utilizado para produção de cubossomos desde 2000. Este lipídio biocompatível ganhou um interesse mais recente no campo biomédico em comparação a outros monoglicéridos por vários motivos, como disponibilidade comercial com 95% de pureza. Por não apresentar nenhuma instauração na cadeia alquil e a ausência de uma ligação éster no grupo da cabeça polar da molécula o PHY apresenta estabilidade química superior e tornou-se interessante para a produção

de carreadores de *drug delivery*. (BARAUSKAS; LANDH, 2003) (AKHLAGHI, LOH, 2017)

Com a aplicação já estabelecida em cosméticos, o PHY é utilizado para a produção de nanocarreadores, devido a estudos favoráveis a sua administração oral, sendo menos suscetível à degradação pelo sistema gastrointestinal por conta de sua estabilidade química. (KARAMI; HAMIDI, 2016) (NGUYEN et al., 2011)

Tabela 1: Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas do fitantriol (massa molecular; coeficiente de partição octanol/água – LogP; balanço hidrofílico/lipofílico – HLB; ponto de fusão - PF).

Fórmula Estrutural	Massa Molecular	LogP	HLB	PF
	330,55	5,9	6,36	57°C

No diagrama de fases do PHY (figura 6) podemos verificar as possíveis estruturas formadas por essa molécula, sendo que a estrutura cúbica é predominante, onde Pn3m e Ia3d são as fases cúbicas. Também é possível encontrar condições onde as estruturas formadas são lamelares e hexagonais. (AKHLAGHI, LOH, 2017)

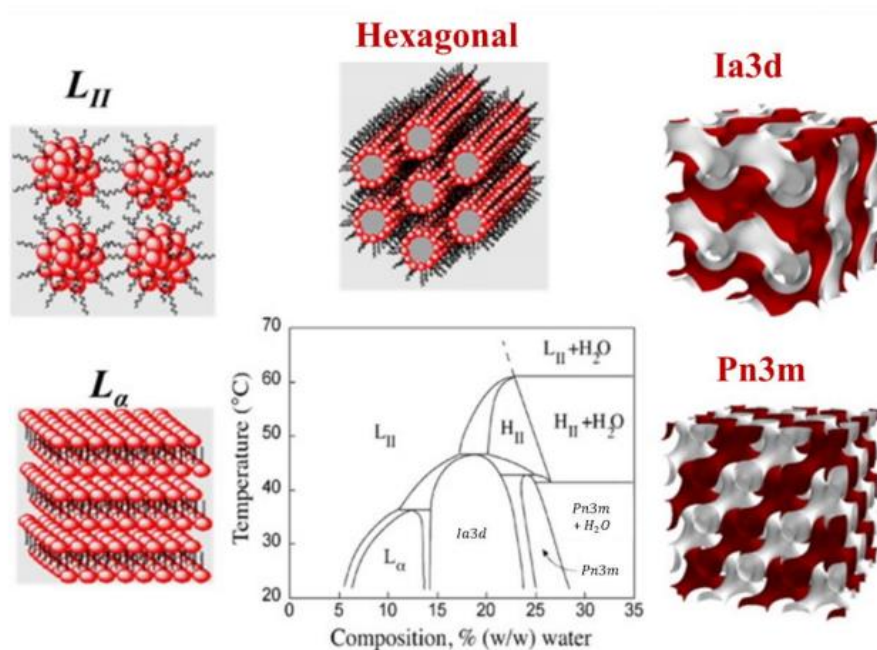


Figura 6: Diagrama de fase do fitantriol em solução aquosa a diferentes temperaturas. Fonte: Adaptada de (AKBAR et al., 2017)

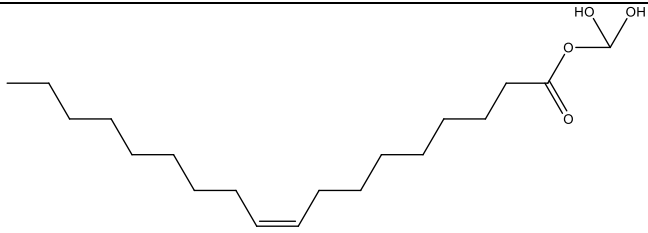
1.3.2 Monoleína (GMO)

A monoleína (*monogliceride glycerol – monoolein*, tabela 2) é um monoacilglicerol de cadeia mais longa, que exibe um mesomorfismo muito rico em uma faixa relativamente estreita de temperatura. Os tipos de fases formadas dependem da temperatura e esse caráter é conhecido como mesomorfismo termotrópico. A preferência de fase também depende do conteúdo de água. Esta propriedade é conhecida como mesomorfismo liotrópico. (CLOGSTON et al., 2000)

GMO é uma molécula lipídica interessante para a produção de nanocarreadores por ser atóxico, biodegradável, biocompatível, e resistente à mudanças na temperatura. (PAN et al., 2013) É aprovada pelo departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration* (FDA), e amplamente utilizada na indústria alimentícia como emulsionante. (CFR, 2020) (SERIEYE et al., 2017) Esta molécula também apresenta efeitos hemostáticos e propriedades antibacterianas. (ERICSSON et al., 2009)

A geometria da molécula de GMO favorece a formação de estruturas cúbicas, pois possui uma longa cadeia alquílica, (18 grupos metil) com uma instauração entre os grupos metila 9 e 10, e uma cabeça polar formada pela esterificação de um ácido carboxílico e o glicerol (tabela 2).

Tabela 2: Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas da monoleína (massa molecular; coeficiente de partição octanol/água – LogP; balanço hidrofílico/lipofílico – HLB; ponto de fusão - PF).

Fórmula Estrutural	Massa Molecular	LogP	HLB	PF
	356,54	6,5	3,8	35.0°C

É importante salientar que a monoleína pode formar diferentes estruturas em meio aquoso, dependendo da quantidade relativa de água presente no sistema. A figura

4 mostra uma representação do diagrama de fase da monoleína em sistemas aquosos, onde podemos visualizar estruturas cúbicas (Pn3m e Ia3d), bem como fases lamelar e hexagonal (figura 7). A estrutura cúbica da monoleína prevalece na presença de água superior a 30% e em temperaturas inferiores a 80°C. (PAN et al, 2013) (SPICER, HAYDEN, LYNCH, 2001)

Infelizmente, a GMO é um lipídio relativamente caro, que não seria viável para o projeto. Desta forma, optamos por usar um análogo de menor pureza, o myverol. Essa mistura lipídica foi doada pela Kerry® Bio-Science Inc., e contém monoleína em maioria da sua composição.

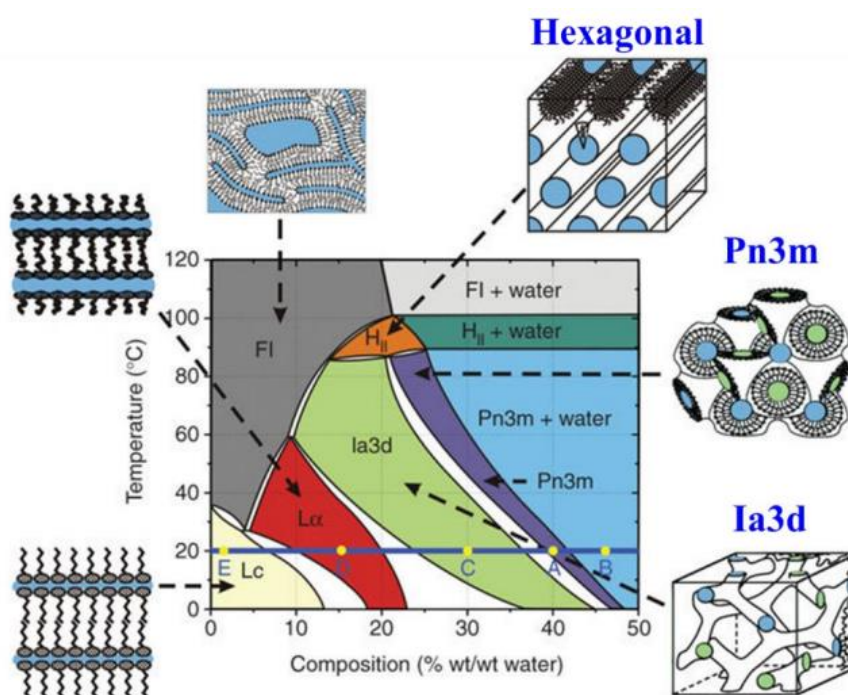


Figura 7: Diagrama de fase da monoleína em solução aquosa a diferentes temperaturas. Fonte: Adaptada de (CAFFREY, 2009).

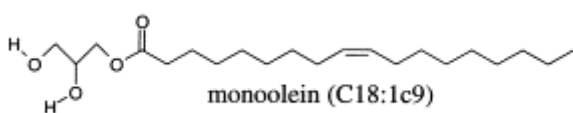
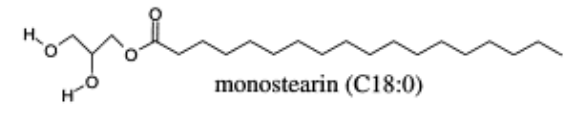
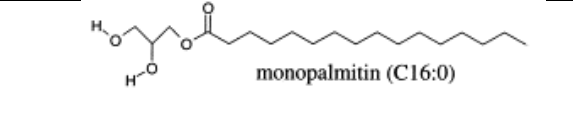
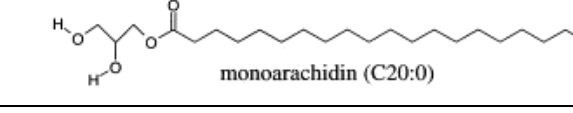
1.3.3 Myverol (MYV)

O myverol (MYV) é um produto comercialmente disponível e rico em monoacilgliceróis. É produzido pela reação do glicerol com óleos e gorduras vegetais, seguido de uma destilação molecular. Vários graus de MYV estão disponíveis comercialmente, diferindo no perfil de ácidos graxos e da derivação do óleo que compõem o processo. No presente estudo, foi utilizado Myverol 18-99K, que é derivado de óleo de canola. (CLOGSTON et al., 2000)

Os myverols têm inúmeras utilizações em alimentos, desde emulsificação, aeração, lubrificação, anti-endurecimento, anti-espumante e estabilização de óleo, sendo uma fonte barata de monoacilgliceróis. (LARKIN et al., 2016)

MYV é conhecido por ser uma mistura de lipídios (monoglicerídeos) que contém aproximadamente 80% de monooleína. (DONG et al., 2010) (HEDEGAARD et al., 2013) (PHAM et al., 2015) (VAN 'T HAG et al., 2017). Os outros monoacilgliceróis no Myverol incluem as espécies saturadas, monoestearina e monopalmitina, acompanhadas por uma pequena quantidade de monoaraquidina. (CLOGSTON et al., 2000) A tabela 3 a seguir discrimina cada molécula encontrada na mistura MYV junto com suas estruturas químicas.

Tabela 3: Moléculas encontradas no myverol, suas concentrações e estruturas químicas. Fonte: (CLOGSTON et al., 2000)

Percentual (%)	Molécula	Fórmula estrutural
86,6	Monooleína	 monoolein (C18:1c9)
7,0	Monoestearina	 monostearin (C18:0)
3,5	Monopalmitina	 monopalmitin (C16:0)
0,9	Monoaraquidina	 monoarachidin (C20:0)
2,0	Não Identificado	--

O diagrama de fases dessa mistura de lipídios (figura 8), relatado por CLOGSTON et al., 2000, podemos identificar um predomínio de estruturas cúbicas, apresentando as fases Ia3d e Pn3m, assim como no diagrama de fases da monooleína, apresentado anteriormente na figura 7.

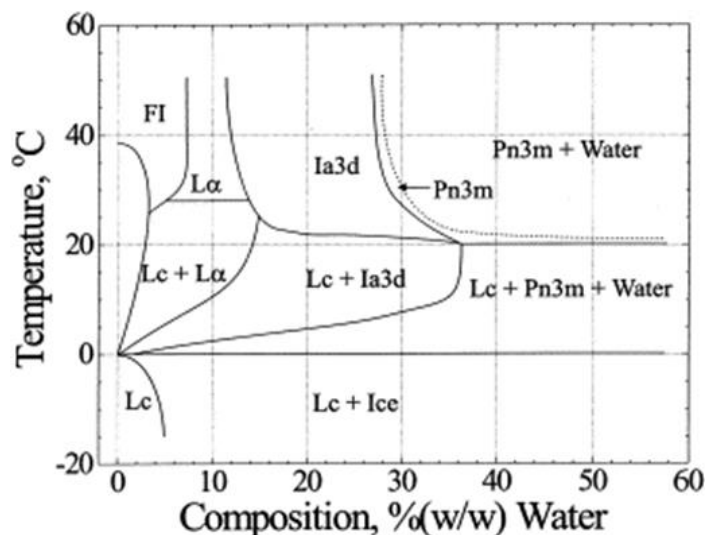


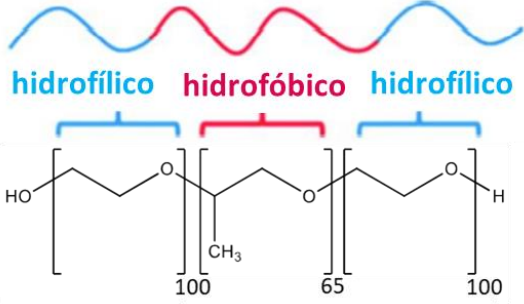
Figura 8: Diagrama de fase do myverol 18-99K em solução aquosa a diferentes temperaturas. Fonte: (CLOGSTON et al., 2000)

1.4 Pluronic F127®

Pluronic® F127 é um polímero tribloco linear (tabela 4), não-iônico, que contém um bloco de óxido de polipropileno (PPO) entre dois blocos de óxido de polietileno (PEO) e atua como estabilizador através da adsorção e incorporação de seus blocos hidrofóbicos na superfície das nanopartículas lipídicas, ou ainda embebido na região hidrofóbica. (FORNASIER et al., 2020)

O F127 é uma molécula biocompatível, atóxico e aprovado pelo FDA (KHATTAK; BHATIA; ROBERTS, 2005) (DUMORTIER et al., 2006). Ele também é bastante utilizado no ramo farmacêutico, na forma de hidrogéis, através de vias parenterais ou não parenterais, devido a sua ampla compatibilidade com diferentes substâncias. (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006) (DOMÍNGUEZ-DELGADO et al., 2016)

Tabela 4: Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas do Pluronic® F127 (massa molecular; coeficiente de partição octanol/água – LogP; balanço hidrofílico/lipofílico – HLB; ponto de fusão - PF).

Fórmula Estrutural	Massa Molecular	LogP	HLB	PF
	9840-14600	-	18-23	50°C

As moléculas de F127 interagem com as bicamadas lipídicas de diferentes formas, inserindo-se entre os lipídios, o que pode reorganizar a estrutura dessas bicamadas (PATEL et al., 2009). O polímero também tem características anfifílicas, portanto, em cubossomos de PHY, acredita-se que esteja no lado externo da superfície, uma vez que os parâmetros cristalográficos estruturais do sistema coloidal com ou sem polímero não mudam. Por outro lado, para cubossomos de GMO, foi observada uma interação do F127 no interior da bicamada lipídica, indicada por alterações no parâmetro cristalográfico e na estrutura interna das nanopartículas. Essas interações são observadas na figura 9 (DONG et al., 2012).

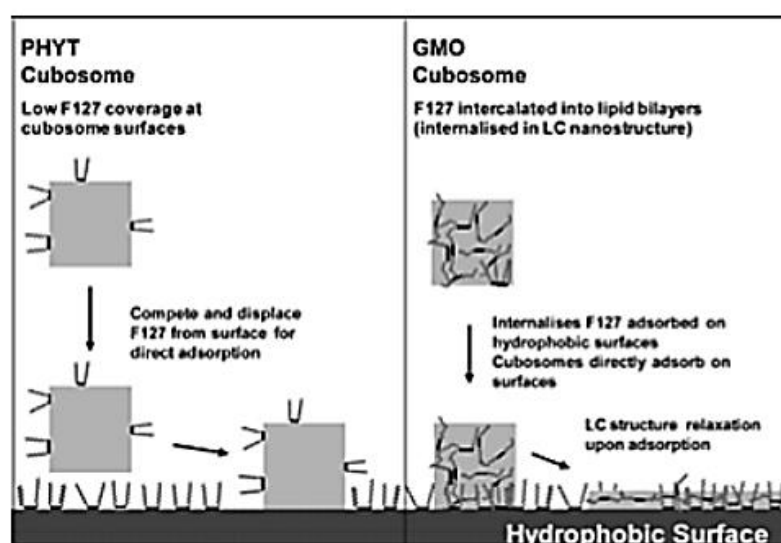
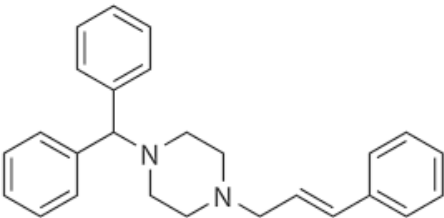


Figura 9: Interação do polímero estabilizador F127 com os cubossomos de PHY e GMO, mostrando que para PHY o polímero permanece adsorvido na superfície da nanopartícula e para GMO o polímero interage com a bicamada lipídica dentro da nanoestrutura. Fonte: (DONG et al., 2012).

1.5 Cinarizina

A cinarizina (CNZ, tabela 5) foi sintetizada pela primeira vez pela Janssen Pharmaceutica em 1955. Este fármaco é um derivado da piperazina, com ação anti-histamínica, antisserotonérgica, antidopaminérgica, que apresenta baixa solubilidade em solução aquosa (cerca de $\sim 20 \times 10^{-3}$ g/l ou cerca de 54 μM). (SWEETMAN, 2002) Atualmente é utilizada para o tratamento de náuseas, vômitos e vertigens causadas pela doença de Ménière e outros distúrbios vestibulares. (BRITAIN, 2015)

Tabela 5: Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas da Cinarizina (massa molecular; coeficiente de partição octanol/água – LogP; balanço hidrofílico/lipofílico – HLB; ponto de fusão - PF).

Fórmula Estrutural	Massa Molecular	LogP	HLB	PF
	368,51	5,77	-	120°C

A CNZ pertence à família dos anti-histaminicos, antagonistas do cálcio com ação cerebral, que inibe as contrações das células musculares lisas dos vasos sanguíneos, através do bloqueio do transporte de íons de cálcio entre as membranas celulares. Além deste antagonismo direto ao cálcio, a cinarizina diminui a atividade de contração das substâncias que agem nos vasos sanguíneos, como a norepinefrina e a serotonina, através do bloqueio do receptor dos canais de cálcio. O bloqueio da entrada de cálcio nas células é tecido-seletivo, e resulta em propriedades antivasoconstritoras, sem efeito na pressão sanguínea e na frequência cardíaca (DRUGBANK, 2005).

Além disso a CNZ pode melhorar, também, a microcirculação deficiente através do aumento da deformabilidade dos glóbulos vermelhos do sangue e diminuição da viscosidade sanguínea. Outra ação deste fármaco é a estimulação do sistema vestibular, resultando em supressão do nistagmo (movimentos rápidos e não controlados dos

olhos), outros distúrbios autonômicos e diminuição ou suspensão de episódios agudos de vertigem (DRUGBANK, 2005).

A cinarizina é administrada por via oral na forma de comprimidos ou cápsulas, o que pode resultar em biodisponibilidade muito lenta e ampla variação de concentração plasmática. A administração intravenosa da cinarizina é uma alternativa à administração oral que proporciona maior biodisponibilidade, efeito terapêutico mais rápido e menor diferença de concentração plasmática. No entanto, qualquer dose injetável pode causar dor local, irritação venosa e possível precipitação do fármaco após administração, devido a sua baixa solubilidade aquosa, resultando em restrição de suas aplicações clínicas e baixa adesão do paciente ao tratamento. (BASU et al., 2011)

Outros estudos também relatam a utilização de nanopartículas lipídicas diminuindo a precipitação da CNZ, e melhorando sua absorção, inclusive pela via oral, para a qual já foi relatado anteriormente que os cubossomos resistem bem a alteração de pH, mostrando aumentar significativamente a exposição à droga em comparação com um sistema convencional. (ILIE et al., 2021) (MULLER; SALONEN; GLATTER, 2010) (NAZARUK; MAJKOWSKA PILIP; BILEWICZ, 2017) Ainda, existe evidências na literatura de que nanopartículas lipídicas podem aumentar a solubilidade da CNZ em até 8 vezes, em comparação com o fármaco livre. (FORD et al., 2020)

Por se tratar de uma droga extremamente hidrofóbica e tendo os cubossomos um alto volume hidrofóbico (> que 50%) existe a possibilidade de se utilizar essas nanopartículas para o carreamento da CNZ. Em outras palavras, os cubossomos se tornam uma abordagem promissora para resolver os problemas de atividade farmacológica relacionados à solubilidade da molécula.

Assim, nesse trabalho, estudamos a influência da presença de cinarizina em cubossomos compostos por PHY ou MYV, com o objetivo de aumentar a capacidade de carrear este fármaco. Esta influência foi elucidada neste trabalho através de uma série de análises biofísicas, como espalhamento de raios-X a baixos ângulos, espalhamento de luz dinâmico, dentre outras. Além dessa encapsulação, nosso intuito foi também elucidar a capacidade citotóxica através de testes hemólise de eritrócitos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterizar cubossomos de PHY ou MYV em ausência e presença de CNZ. As formulações foram desenvolvidas a fim de se avaliar o melhor lipídio que poderia ser utilizado para o preparo de cubossomos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência estrutural de diferentes lipídios na composição de cubossomos (PHY e MYV);
- Testar a influência de diferentes solventes orgânicos na fase cúbica cristalina (esta etapa é importante para a posterior encapsulação da CNZ);
- Preparar formulações de cubossomos contendo CNZ em diferentes concentrações;
- Avaliar a estrutura cúbica da formulação por SAXS;
- Caracterizar as formulações quanto a morfologia, tamanho, polidispersidade e potencial zeta;
- Verificar a estabilidade das formulações;
- Avaliar a eficácia de encapsulação da CNZ nos cubossomos;
- Avaliar o efeito hemolítico dos cubossomos em eritrócitos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

- Myverol/Monoleína – Myverol 18-99k foi cedido pela Kerry® Bio-Science Inc. (Campinas - Brasil)
- Fitantriol – (2S,3S)-3,7,11,15-tetramethylhexadecane-1,2,3-triol >99% da Avanti Polar Lipids Inc.
- Cinarizina – 1- (Difenilmetil)-4-(3-fenil-2-propenil) piperazina - SigmaAldrich®.
- Pluronic® F-127 - Sigma-Aldrich®.
- Ácido fosfotúngstico (H₃[P(W₃O₁₀)₄]) - Sigma-Aldrich®.
- Álcool etílico 99.5% - Dinâmica Química Contemporânea Ltda.
- Álcool metílico 99.8% - CAQ – Casa da Química Ind. e Comp. Ltda.
- Acetona 99,5% - CAQ – Casa da Química Ind. e Comp. Ltda.
- Clorofórmio 99,8% - LABSYNTH Produtos para laboratório Ltda.
- Octano (C₈H₁₈) – LABSYNTH Produtos para laboratório Ltda.
- Água ultrapura Milli-Q® - Merck Millipore - Integral Water Purification System for Ultrapure Water
- Acetonitrila HPLC LICHROSOLV - Merck Millipore

3.2 Equipamentos

- Balança de Precisão - modelo BEL Engineering M124A
- Banho Térmico - Novatécnica Equipamentos para Laboratório - NL1225
- Roto-evaporador - modelo Fisatom 804 70-130W 60Hz
- Agitador Magnético - LGI Scientific - 0-2500rpm 500W
- Pipetas - LabmatePro - HTL Lab Solutions
- Malvern ZetaSizer Nano-ZS90
- pHmetro - Bel engineering modelo W3B
- Prominence HPLC – Shimadzu
- Centrifuga GS-15R – BECKMAN
- Picodrop™ Espectrofotômetro de microlitro – Avantor™

3.3 Preparo de amostra

As amostras de cubossomos foram preparadas seguindo o protocolo Bottom up (BU) descrito na literatura (AKHLAGHI et al., 2016) e aprimorado pelo nosso grupo de pesquisa, devido a alta variabilidade do tamanho de partícula obtido por diferentes

usuários. (LOTIERZO et al., 2020) (MALHEIROS et al., 2020) Este método é essencialmente baseado na dispersão de lipídio (que inicialmente está solubilizado em etanol) em excesso de água, na presença de F127 como estabilizador. No entanto, esta metodologia depende do uso de uma molécula de hidrótopo, como o etanol (LYNCH; SPICER, 2004), para solubilizar o lipídio, evitando assim o uso de alta energia mecânica externa para quebrar partículas grandes (conhecidas como fase *bulk*) em uma dispersão de partículas menores. Os protocolos estão descritos a seguir. Ao final do processo, todas as amostras apresentaram aspecto visual semelhante, uma solução leitosa e opaca.

3.3.1 Cubossomos de Fitantriol (PHY)

Resumidamente, duas soluções distintas foram preparadas: (1) contendo 100 mg de PHY solubilizado em 10 mL de etanol e (2) uma outra contendo 25 mg de F127 solubilizado em 22,5 mL de água ultrapura (água Milli-Q®). Então, ambas as soluções foram termicamente equilibradas a 45°C. A solução (1) foi gotejada vagarosamente sobre a solução (2), enquanto estava em um agitador magnético. A solução final mista (33 mL) foi mantida sob agitação por 10 minutos a 45°C, e posteriormente, levada a um rotoevaporador até o atingir o volume final de aproximadamente 5 mL. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro à temperatura ambiente. As concentrações finais foram ~75 mM PHY e ~0,4 mM F127.

Para a encapsulação da CNZ nos cubossomos, foram testados dois métodos de preparação, co-solubilização e adição: 1) no método de co-solubilização, o fármaco foi primeiramente solubilizado em um solvente orgânico (acetona ou clorofórmio) e adicionado ao béquer contendo o PHY, utilizado no preparo da amostra. Após este processo, o preparo da amostra seguiu conforme descrito acima; 2) o método de adição a CNZ foi adicionada em pó ao frasco de vidro contendo a amostra de cubossomos pronta.

Devido às dificuldades iniciais de se incorporar a CNZ aos cubossomos, por conta da sua alta hidrofobicidade, um segundo estudo surgiu dentro do projeto, a fim de estudar as interferências dos solventes orgânicos, que estavam sendo utilizados, na estrutura das nanopartículas (LOTIERZO et al., 2020). Os solventes utilizados foram escolhidos devido a sua versatilidade e ampla utilização.

Desta forma, alguns solventes orgânicos (acetona, clorofórmio, octano e etanol) foram adicionados após os cubossomos serem preparados, usando diferentes proporções volumétricas (v/v), conforme a tabela 6, na qual, também calculamos a proporção molecular para cada uma das proporções. As quantidades de solvente eram adicionadas à solução de cubossomos com o auxílio de uma pipeta volumétrica e agitada no vórtex até atingir uma emulsão estável, antes de medidas.

Tabela 6: Identificação da amostra incluindo o solvente orgânico e proporção utilizada em valores teóricos. A proporção volumétrica é a quantidade de solvente em relação à solução de cubossomos. A concentração (solvente %, v/v) é a quantidade de solvente com respeito a solução final de cubossomos. O número de moléculas é a proporção molar de moléculas de solvente em relação as moléculas de fitantriol (PHY).

Razão Volumétrica (v/v)	Concentração (v/v %)	Número de moléculas de solvente orgânico em relação ao fitantriol (relação solvente: PHY, mol/mol)			
		Acetona	Clorofórmio	Etanol	Octano
1:1	50,0%	44,664	-	56,516	-
1:2	33,3%	22,332	-	28,258	10,155
1:5	16,6%	8,933	-	11,303	4,062
1:7	12,5%	6,381	-	0,8074	-
1:10	9,1%	4,466	0,4132	0,5652	0,2031
1:25	3,8%	-	-	0,2261	0,0812
1:35	2,9%	-	-	-	0,0580
1:50	2,0%	0,893	0,0826	0,1130	0,0406
1:100	1,0%	0,447	0,0413	0,0565	0,0185
1:250	0,4%	-	0,0165	-	0,0081
1:350	0,3%	-	0,0118	-	0,0058
1:500	0,2%	-	0,0083	-	0,0041
1:1000	0,1%	-	0,0041	-	0,0020

As amostras foram analisadas por SAXS em duas condições diferentes: primeiro, imediatamente após a mistura do solvente com a solução coloidal de cubossomos, e algumas concentrações foram analisadas uma segunda vez após 24h, após evaporação em temperatura ambiente, para verificar a interferência do solvente ao longo do tempo.

3.3.2 Myverol (MYV)

Para as amostras de myverol (MYV), uma mistura de lipídios que contém pelo menos 80% de monoleína em sua composição, conforme descrito anteriormente (tabela 3), foi necessário realizar a padronização do protocolo BU, testando 4 diferentes condições, alterando os solventes utilizados para o MYV e o F127, similares as metodologias encontradas na literatura.

Condição 1: 156 mg de MYV solubilizadas em 100 µL de clorofórmio e 25 mg de F127 solubilizadas em 125 mL de água Milli-Q®

Condição 2: 156 mg de MYV solubilizadas em 100 µL de clorofórmio e 100 µL de propilenoglicol; e 25 mg de F127 solubilizadas em 125 mL de água Milli-Q®

Condição 3: 156 mg de MYV solubilizadas em 5mL de acetona e 25 mg de F127 solubilizadas em 50 mL de água Milli-Q®

Condição 4: 156 mg de MYV solubilizadas em 5 mL de etanol e 25 mg de F127 solubilizadas em 40 mL de água Milli-Q®

Finalmente, o protocolo foi padronizado, considerando a condição 4 como a melhor entre todas, a metodologia completa é descrita da seguinte forma:

A produção de cubossomos começa com duas soluções distintas preparadas: (1) contendo 156 mg de MYV (aproximadamente 100 mg de GMO) solubilizado em 5 mL de etanol e (2) contendo 25 mg de F127 solubilizado em 40 mL de água ultrapura (água Milli-Q®). Então, ambas as soluções foram termicamente equilibradas a 45°C. A solução (1) foi gotejada vagarosamente sobre a solução (2), enquanto esta estava em um agitador magnético. A solução final mista (45 mL) foi mantida sob agitação por 10 minutos a 45°C, e posteriormente, levada a um rotoevaporador até o atingir o volume

final de aproximadamente 5 mL. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro à temperatura ambiente.

Desta forma, as amostras incorporadas com CNZ foram produzidas por co-solubilização, onde o fármaco foi solubilizado em etanol junto com o MYV no início do protocolo. Após este processo, o preparo da amostra segue conforme descrito acima.

3.4 Espalhamento de Raios-X em Baixos Ângulos (SAXS, *Small-angle X-ray scattering*)

O espalhamento de raios-X em baixos ângulos é uma técnica importante para identificar sistemas cristalográficos e suas estruturas. Neste trabalho, iremos focar na capacidade de se utilizar a técnica de espalhamento no estudo de nanoestruturas periódicas, como os cristais líquidos.

A técnica de SAXS é capaz de gerar padrões de difração que podem ser usados para determinar o grupo espacial e o parâmetro de rede do cristal líquido de qualquer sistema que possua uma estrutura periódica, em qualquer direção. Outra característica importante desta técnica é a capacidade de realizar medições de sistemas em solução, simulando as condições ambientais naturais em que as dispersões de cristal líquido seriam utilizadas. Variações de parâmetros ambientais importantes, como temperatura, pH e força iônica podem adicionar novas informações sobre o comportamento do sistema. (RADAIC et al., 2016)

Com o objetivo de analisar padrões de espalhamento de amostras, revelando características estruturais e interações entre nanopartículas ou proteínas (KHATUN et al., 2016) (PILLON; GUARNÉ, 2017), a técnica de SAXS oferece como vantagem uma visão geral estatística das características da amostra, quando comparado, por exemplo, com técnicas de análise de partícula única. (PILZ; GLATTER; KRATKY, 1979)

A técnica de SAXS é baseada em fenômenos físicos, onde os raios-X interagem com a amostra para formar padrões de interferência e difração no detector. Este recurso é realizado medindo as flutuações na densidade do elétron em um material na faixa de tamanho de 1 a 100 nm. (LYNCH; SPICER, 2004) Os padrões de ondas são analisados posteriormente por um detector, sendo completamente dependentes da organização das

moléculas dentro da amostra. Para medir os dados SAXS, os detectores ficam em uma faixa de até 5° relacionados com o feixe primário. A figura 10 mostra uma representação esquemática do aparelho.

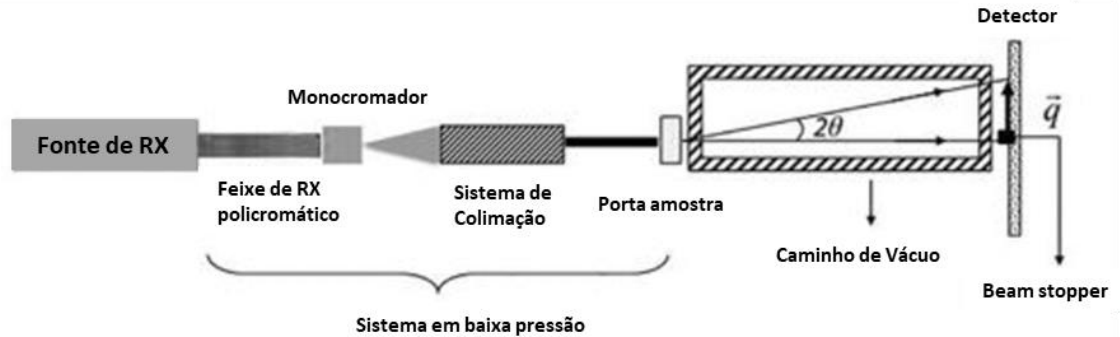


Figura 2: Esquema de configuração típica de um sistema de SAXS. Uma fonte de raios-X produz o feixe primário e monocromador seleciona o comprimento de onda utilizado. O sistema de colimação define o volume do feixe. Um suporte de amostra está localizado no caminho do feixe, então, quando os raios X passam, eles são espalhados pela amostra em todas as direções. O detector, localizado à distância da amostra, lê os fótons de entrada em um ângulo máximo de 2θ . Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Esquema-da-linha-de-SAXS-do-Laboratorio-Nacional-de-Luz-Sincrotron-LNLS_fig6_323902876

A periodicidade do sistema, dada pela organização da amostra, está relacionada a planos cristalográficos, conhecidos como planos de Bragg. (TYLER; LAW; SEDDON, 2015) Cada estrutura apresenta um padrão de disposição entre os planos cristalográficos. A distância entre os planos pode ser relacionada a cada família de planos cristalográficos e a distância de repetição das células unitárias na rede cristalina, o chamado parâmetro de rede α , pela equação (1) e (2), onde h , k e l são os índices de Miller que especificam o plano da rede onde ocorreu o espalhamento.

$$\alpha_{cub} = \frac{2\pi}{q_{hkl}} \sqrt{\{h^2 + k^2 + l^2\}} \quad (1)$$

$$\alpha_{hex} = \frac{2}{\sqrt{3}} \frac{2\pi}{q_{hko}} \sqrt{\{h^2 + k^2 + hk\}} \quad (2)$$

Para cada pico observado na curva SAXS, pode-se indexar uma família de planos de difração, para uma amostra com arranjo periódico. De acordo com as posições dos picos, pode-se encontrar a simetria cristalográfica do sistema. No caso de estruturas cristalinas cúbicas, a base de monooleína e fitantriol, podemos encontrar em seus

diagramas de fase as seguintes simetrias cristalográficas: Pn3m e Ia3d (QIU; CAFFREY, 2000) (BARAUSKAS; LANDH, 2003) (MARIANI, LUZZATI, DELACROIX, 1988). Porém, na presença de um polímero estabilizante, encontramos uma nova fase cristalina para cubossomos de GMO, chamada Im3m, que surge da transição da Ia3d. (FRASER et al., 2013) (CHONG et al., 2012) (DONG et al., 2012).

A figura 11 apresenta um exemplo de gráfico de SAXS, típico para uma estrutura cúbica, retratando vários picos, cada um com índices de Miller. A interpretação desses números pode levar à identificação do grupo espacial relacionado à estrutura cristalina da amostra.

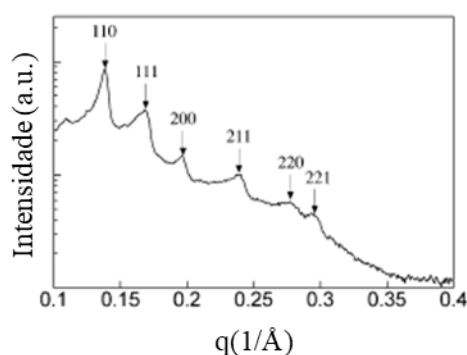


Figura 3: Dados de SAXS para a fase volumétrica cúbica PHY a 25 ° C mostrando simetria Pn3m. Adaptado de: (BARAUSKAS; LANDH, 2003)

Para a análise e determinação do grupo de simetria em cada amostra, todos os picos que aparecem nos dados SAXS são avaliados, e calculamos as razões entre os picos de difração.

$$\frac{q_i}{q_1} = \frac{\sqrt{h_i^2 + k_i^2 + l_i^2}}{\sqrt{h_1^2 + k_1^2 + l_1^2}} \quad (3)$$

A tabela 7 apresenta as possíveis simetrias espaciais presentes nos diagramas de fase dos lipídios (PHY, figura 3; GMO, figura 4; MYV, figura 5) e seus respectivos planos de reflexão. Assim, conseguimos relacionar as curvas de SAXS, através da razão entre picos, com valores definidos em literatura (GARTI, 2012). Desta forma, apenas com a diferenciação do primeiro e segundo picos, já é possível distinguir as simetrias

das nanopartículas presentes na amostra. Portanto, as razões entre os outros picos são apenas para confirmar a estrutura cristalográfica do sistema e calcular o parâmetro de rede.

Tabela 7: Simetrias espaciais cristalinas possíveis para cubossomos

Reflexão	Simetria espacial			
	Pn3m	Im3m	Ia3d	Hexagonal
100	-	-	-	1
110	$\sqrt{2}$	$\sqrt{2}$	-	-
111	$\sqrt{3}$	-	-	$\sqrt{3}$
200	$\sqrt{4}$	$\sqrt{4}$	-	$\sqrt{4}$
210	-	-	-	$\sqrt{5}$
211	$\sqrt{6}$	$\sqrt{6}$	$\sqrt{6}$	-
220	$\sqrt{8}$	$\sqrt{8}$	$\sqrt{8}$	-
221	$\sqrt{9}$	-	-	-
310	$\sqrt{10}$	$\sqrt{10}$	-	-
311	$\sqrt{11}$	-	-	-
222	$\sqrt{12}$	$\sqrt{12}$	-	$\sqrt{12}$

Os experimentos de SAXS foram realizados no laboratório nacional de luz síncrotron, LNLS, em Campinas, São Paulo/Brasil, na linha de luz SAXS-1. Utilizando um suporte de mica, cerca de 300 μ L de cada amostra foi medido por \sim 100 s. O detector era um Pilatus 300 k, distante por aproximadamente \sim 1000 mm da amostra. As análises foram realizadas em temperatura ambiente. Para analisar os padrões SAXS, uma plataforma baseada na web denominado SCryPTA foi empregada (CASTRO et al., 2019). SCryPTA (SmallAngle Scattering Crystallographic Peak Treatment and Analysis) é capaz de ler as curvas de SAXS, desta forma o usuário pode escolher, entre as simetrias disponíveis no software, a mais próxima a estrutura presente na sua curva e analisar o padrão de difração. O software então encontra os picos no espalhamento da curva anexada pelo usuário e calcula os parâmetros estruturais em relação à simetria cristalina escolhida anteriormente.

3.5 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, *Dynamic light scattering*)

O espalhamento de luz dinâmico (do inglês Dynamic Light Scattering, DLS) é uma técnica amplamente aplicada na caracterização de sistemas coloidais (HASSAN; RANA; VERMA, 2015). Este método é baseado na dispersão da luz visível através da interação de um feixe monocromático (LASER) com partículas em uma solução. A técnica supõe que as partículas difundem apenas por conta do movimento browniano, como vemos na figura 12 (EISER, 2014).

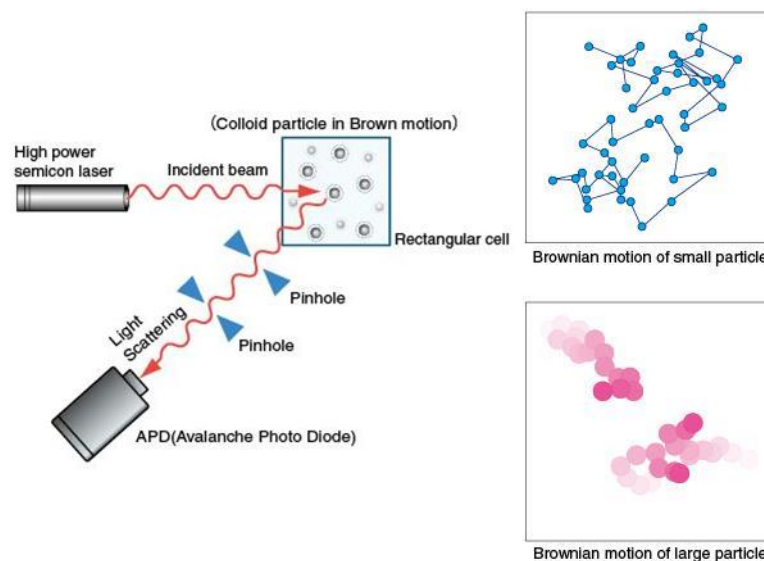


Figura 4: Esquema da técnica de DLS. Fonte:

<http://www.otsukael.com/product/detail/productid/23/category1id/2/category2id/2/category3id/32>

Quando este feixe de luz incide sobre as partículas é possível detectar as flutuações na intensidade de luz dispersa devido ao movimento browniano. Essas flutuações que dependem fortemente da difusão translacional das moléculas no meio, sendo que seu coeficiente de difusão depende do seu tamanho. Partículas pequenas têm maior coeficiente de difusão, enquanto partículas maiores têm valores menores de coeficiente de difusão. (ZHOU; SU; CAI, 2017).

Desta forma, obtemos o coeficiente de difusão das partículas analisadas pela análise das flutuações da intensidade da luz espalhada. O software interpreta o sinal de entrada como uma função de correlação, que relaciona o coeficiente de difusão a um diâmetro hidrodinâmico, supondo algumas aproximações, como a esfericidade das

partículas. Fatores como temperatura e viscosidade da amostra também interferem na medida, mostrando que a técnica depende das condições experimentais e da amostra (CHIARI et al., 2017).

Na figura 13, verificamos um esquema entre a intensidade detectada pelo equipamento, a correlação calculada pelo software, e o tamanho das nanopartículas. Observa-se que para partículas maiores a função de correlação é deslocada para tempos de correlação mais elevados, enquanto para partículas menores a função correlação exibe uma queda rápida para tempos de correlação intermediários.

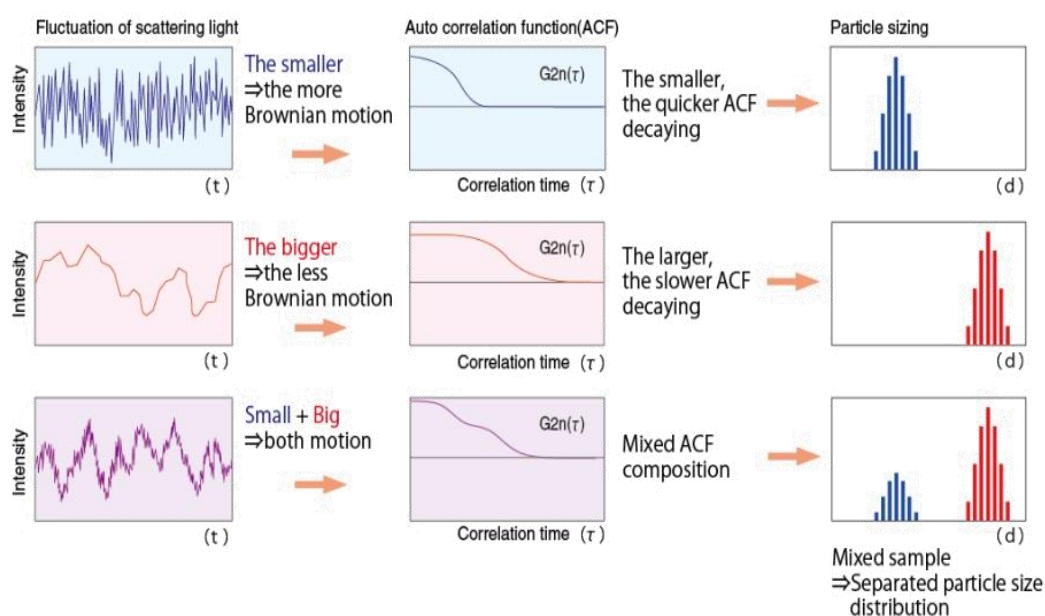


Figura 5: Funções de correlação e relação com populações de tamanho de partícula a partir de um experimento de DLS. Fonte:

<http://www.otsukael.com/product/detail/productid/23/category1id/2/category2id/2/category3id/32>

Através da técnica de DLS também obtemos uma estimativa da polidispersão de tamanho das nanopartículas presentes na amostra. O índice de polidispersividade (PDI) fornece informações sobre a distribuição geral do tamanho da amostra. Portanto, se a amostra tiver partículas apenas de tamanhos semelhantes ($PDI \leq 0,2$) ela é considerada monodispersa, ou se a amostra tiver populações de partículas de diferentes tamanhos ($PDI > 0,4$) ela será considerada polidispersa. (KHATUN et al., 2016)

Uma grande desvantagem do DLS é que este experimento não é adequado para amostras com alto índice de polidispersão ($PDI > 0,5$) e para partículas que possuem formas variadas, como cubossomos. Ainda assim, o DLS oferece uma visão geral

estatística da amostra, e por isso, utilizando as devidas aproximações, é amplamente utilizado como caracterização técnica para dispersão de cubossomos (KUMAR; BAPPADITYA; MUHAMMAD, 2017). Outra desvantagem é que amostras opacas, precisam ser diluídas previamente, a fim de evitar o espalhamento múltiplo, dentro da cubeta, durante a realização dos experimentos.

Para este trabalho, as amostras foram diluídas na proporção 1:20 para garantir que não houvesse espalhamento múltiplo dentro da cubeta durante o experimento, essa proporção foi otimizada através de uma curva de diluição onde pudemos verificar o valor de diluição onde encontrávamos a maior contagem de partículas.

As medidas de DLS foram realizadas utilizando o equipamento ZetaSizer ZS90 (Marvern Instruments Ltda., UK) com o detector posicionado a 90° e um laser He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm) como fonte de luz, em temperatura ambiente. As medidas foram realizadas, no laboratório de pesquisa de biofísica do IFUSP.

3.6 Potencial Zeta (ζ)

O potencial Zeta (ζ) é definido como o potencial elétrico no plano de cisalhamento de uma partícula movendo-se em uma solução sob a influência de um campo elétrico externo, ou seja, é o potencial elétrico ao final da camada iônica que rodeia a partícula em estudo, logo após a camada de Stern (figura 14). (KASZUBA et al., 2010).

A camada de Stern é definida por íons próximos à partícula que formam uma superfície fixa carregada. Quando uma partícula carregada se move em uma solução, contra-íons formam uma superfície carregada chamada camada difusa (figura 14). Portanto, o potencial Zeta é medido no plano deslizante, localizado em algum lugar entre a camada Stern e a camada difusa. (REMINGTON, 2006)

De um ponto de vista mais pragmático, o potencial zeta depende não somente da superfície da partícula, mas também do meio dispersante além de suas propriedades físico-químicas, como pH, força iônica e temperatura. Já do ponto de vista experimental, este valor é calculado através da medida da mobilidade eletroforética, que

é definida como a razão entre a velocidade de uma partícula e o campo elétrico externo aplicado a ela. (MISHRA et al., 2009)

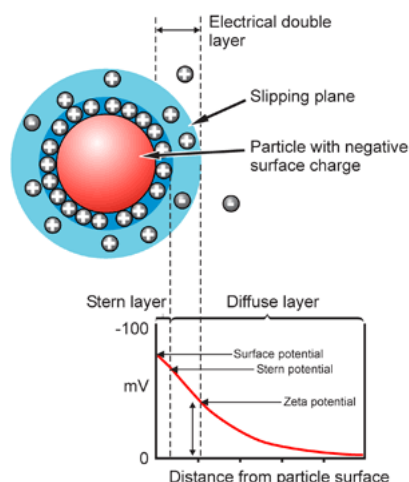


Figura 6: Representação gráfica das camadas iônicas e do potencial elétrico relacionado a cada região em torno da partícula. Fonte: <https://nanocomposix.com/pages/nanoparticle-characterization-techniques#target>

O potencial zeta é frequentemente considerado uma medida de estabilidade de sistemas coloidais, pois em muitos casos este sistema depende em grande parte das repulsões eletrostáticas existentes entre as partículas. Um sistema coloidal é considerado estável, ou seja, livre de agregação, se o módulo do potencial zeta for maior que 30mV. (MISHRA et al., 2009) No entanto, devemos avaliar cada sistema individualmente.

Cubossomos são nanopartículas que utilizam polímeros auto associados para manter sua estabilidade estérica em solução coloidal, portanto, o potencial Zeta não é responsável pela estabilidade das partículas em solução. Ainda assim, esta medida pode nos revelar outras características sobre a nanopartícula, visando verificar possíveis mudanças devido à encapsulação da CNZ.

As medidas de potencial Zeta foram realizadas no equipamento ZetaSizer ZS90 (Marvern Instruments Ltda., UK), diluindo a amostra 200 vezes (volume/volume) em H₂O MilliQ para garantir um meio eletrolítico mais propício para a medida. As análises foram feitas a 25 °C, em cubetas de poliestireno, no laboratório de pesquisa de biofísica do IFUSP.

3.7 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA, *Nanoparticle Tracking Analysis*)

A análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) é uma técnica complementar para tamanho de nanopartículas, com limite de detecção de 30 a 1000 nm, e com a menor detecção limite sendo dependente do índice de refração das nanopartículas. (FILIPE et al., 2010) (VARENNE et al., 2016)

Esta técnica inovadora combina microscopia de espalhamento de luz a laser com uma câmera de dispositivo de carga acoplada (CCD), que permite a visualização e registro de nanopartículas em solução. O software NTA é então capaz de identificar e rastrear nanopartículas individuais movendo-se sob o movimento browniano e relaciona o movimento a um tamanho de partícula. (FILIPE et al., 2010)

Como vemos na figura 15, o feixe refrata em um ângulo baixo ao entrar na amostra, resultando em um feixe fino de laser que ilumina as partículas através da amostra. As partículas iluminadas pela luz laser são visualizadas por meio de um microscópio óptico convencional, equipado com uma câmera de vídeo, que coleta a luz espalhada por todas as partículas no campo de visão. Um vídeo com duração típica de 60 segundos é feito, com uma média de 30 quadros por segundo, e o movimento das partículas é analisado pelo software do equipamento. Este software é otimizado para identificar e rastrear cada partícula do vídeo e seu movimento. A velocidade do movimento das partículas é usada para calcular o tamanho das mesmas. (DRAGOVIC et al., 2011) (JARZEBSKI et al., 2017)

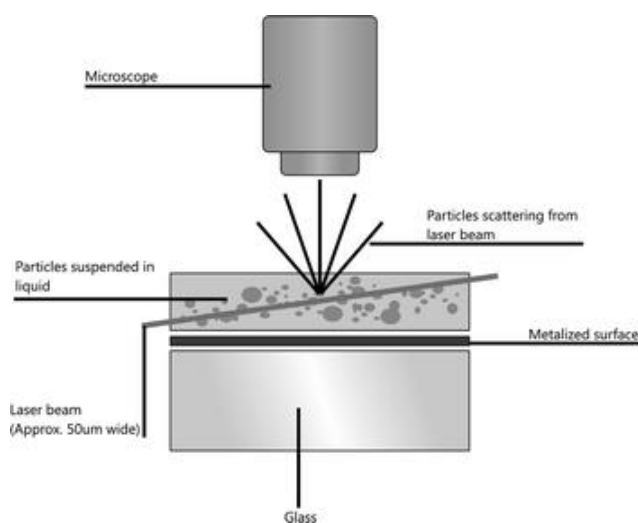


Figura 7: Esquema do aparato experimental de um equipamento de NTA. Fonte: (HOLE et al., 2013)

As medidas de NTA foram realizadas no equipamento nanoSight NS300 (Malvern Instruments) equipado com um laser verde (532 nm) e uma câmara de amostra (bombeamento manual). As amostras foram diluídas 5000x e medidas em triplicata à temperatura ambiente (25°C) no Laboratório de Biomembranas da UNICAMP/Campinas.

A média e o desvio padrão dessas medições foram usadas para estimar o tamanho médio e a concentração total de partículas das amostras. Posteriormente, os dados foram comparados com os valores obtidos por DLS, a fim de levantar as vantagens e desvantagens de cada técnica para o sistema estudado.

3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM, *transmission electron microscopy*) e Crio Microscopia Eletrônica de Transmissão (Crio-TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é uma técnica que usa um feixe de elétrons para estudar uma certa amostra. Os elétrons do feixe são acelerados a 120 keV ou 200 keV e interagem com os elétrons da amostra por espalhamento elástico ou inelástico. (FRANKEN; BOEKEMA; STUART, 2017) Os elétrons do feixe podem ser espalhados ou absorvidos na amostra e a detecção dos elétrons transmitidos é geralmente feito por um dispositivo CCD ou CMOS, no qual a intensidade dos fótons é detectada em cada pixel. (TAHERI et al., 2016). Devido ao comprimento de onda dos elétrons, é possível verificar a estrutura das nanopartículas. (DUDKIEWICZ et al., 2011)

Diferentemente das técnicas apresentadas anteriormente, TEM é uma técnica que avalia as partículas individualmente, dando informações sobre as partículas em um campo de visão específico e uma posição estática. (CHIARI- et al., 2017) Portanto, para que este experimento tenha um caráter estatístico sobre a amostra, é necessário registrar várias imagens em diferentes condições e em diferentes regiões do *grid*. (NAGAYAMA, 2011)

No caso dos cubossomos é possível utilizar TEM e Crio-TEM para verificar sua estrutura morfológica interna, o tamanho das nanopartículas, e investigar possíveis agregados na dispersão coloidal. (DANINO, 2012)

O diferencial das amostras analisadas por Crio-TEM é que são preparadas de tal forma que o gelo amorfo é formado no *grid*, este recurso permite que as amostras estejam em seu ambiente aquoso natural sem ter as distorções de vácuo como TEM (BURROWS; PENN, 2013).

Foram utilizados *grids* de cobre revestidos de formvar-carbono com malha 200 (Eletron Microscopy Sciences®), para as análises de TEM. Inicialmente os *grids* foram submetidos a um procedimento de descarga luminescente de plasma negativo de 14 mA por 20 segundos, a fim de obter uma superfície mais hidrofílica para melhor aderência da amostra. Resumidamente, 5µL de a amostra foram colocados no *grid* por 1min e 30seg, o excesso foi seco com papel absorvente. Em seguida foram utilizados 5 µl de ácido fosfotúngstico a 2% (p/v), usado como contraste negativo e 5 µl de água para lavar o excesso de ácido. Um intervalo de 60 segundos foi respeitado entre cada etapa. Ao final, o *grid* totalmente seco foi armazenado em temperatura ambiente até a realização das medidas.

Para as medidas de Crio-TEM, foram utilizados *grids* Holey Lacey 300 mesh da Ted Pella®. Os *grids* foram submetidos a uma descarga negativa de 25 mA por 25 segundos, antes da deposição da amostra. Em um Vitrobot®, 3 µL de amostra foram depositados no *grid*, dando 20s para fixação da amostra. Um blotting automático foi realizado para secar o excesso de amostra com uma força negativa de -5. Posteriormente, o *grid* foi rapidamente mergulhado em etano líquido envolto em um ambiente de nitrogênio líquido. Finalmente, as grades foram transportadas em uma caixa com nitrogênio líquido até que as medições fossem realizadas.

Os experimentos de TEM foram realizados em um FEI Tecnai G2 F20 a 200 kV com uma câmera CCD Eagle 4 k HS, no Instituto de Biociências da USP. Já os experimentos de Crio-TEM foram realizados em um microscópio Talos Arctica (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) a 200 kV com uma câmera CMOS OneView 4kx4k no laboratório LNNano, pertencente ao conjunto de laboratórios do CNPEM, em Campinas.

O software ImageJ® foi usado para análise de imagem de micrografias TEM e Cryo-EM. Os tamanhos foram avaliados e as estruturas internas das nanopartículas podem ser avaliadas e analisadas por meio da transformação rápida de Fourier (FFT).

3.9 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high performance liquid chromatography*)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das técnicas analíticas mais utilizadas atualmente para identificação e quantificação, devido a sua adaptabilidade e alta sensibilidade. Esta técnica pode ser utilizada para quantificar uma infinidade de substâncias, incluindo drogas encapsuladas em nanopartículas. (TONHI et al., 2002)

O sistema do HPLC consiste em uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto a fase normal tem as polaridades invertidas, ou seja, fase reversa. Esta técnica apresenta diversas vantagens, podendo utilizar como fases móveis solventes menos tóxicos e de menor custo, como metanol, acetonitrila e água; as fases estacionárias são estáveis e de características distintas, que variam de acordo com a coluna adquirida comercialmente e com a necessidade da aplicação. Esta técnica ainda apresenta maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção. (LAMIE, MONIR, 2016)

Para que pudéssemos determinar a porcentagem de encapsulação fez-se necessário utilizar uma técnica que possibilitasse a quantificação da CNZ em pequenos volumes e de forma exata. Neste sentido, foi utilizada a técnica de HPLC para quantificação da CNZ em cubossomos.

A CNZ foi quantificada por HPLC em um equipamento Prominence HPLC (Shimadzu®) através da metodologia analítica baseada em Lamie e Monir (2016), visando à obtenção de um pico simétrico e dentro dos padrões exigidos pela Farmacopeia Americana (USP, 2009). A Tabela 8 mostra as condições empregadas no desenvolvimento da metodologia para determinação do teor de CNZ nas formulações.

Tabela 8: Condições cromatográficas para quantificação de CNZ nas formulações, segundo a metodologia Lamie e Monir (2016).

Amostra	As amostras de cubossomos com CNZ foram previamente centrifugadas em filtro Amicon® Ultra-4 10K por 5 min, a 5000 rpm, para separar a CNZ não encapsulada. Após a centrifugação, 20µl de amostra da parte superior do filtro foi coletada e acrescentada a um tubo vial contendo 500µL de metanol.
Fase móvel	Mistura de metanol, acetonitrila e água ultrapura na proporção 70:20:10 (v/v). A fase móvel foi preparada conforme a proporção referida e posteriormente filtrada usando membrana de 0,45 µm (Millex®) e sonicada em banho antes de sua utilização.
Volume de injeção	40 µL
Fluxo	1,2 mL/min
Temperatura	Ambiente (25°C)
Detector	UV-Vis em 254 nm
Coluna	Luna® 5µm, C18 fase reversa, 100 Å, LC Column 150 x 4mm

Uma curva analítica foi previamente construída tomando-se concentrações crescentes de CNZ entre 10 e 60,0 µg/mL em metanol. O experimento foi realizado no Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, no laboratório da Profa. Juliana Ract da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

A eficiência de encapsulação (%EE) foi determinada utilizando-se o método de centrifugação em filtros Amicon® Ultra-4 10K (MerckMillipore®). Nesta técnica, a formulação foi transferida para um tubo com filtro e centrifugada durante 5 minutos (5000 rpm, Centrifuga GS-15R - BECKMAN). Desse modo, separou-se a fração de CNZ encapsulada nos cubossomos da CNZ livre em solução. A CNZ foi quantificada, por HPLC, através do sobrenadante de Cub-CNZ diluído em metanol. Este solvente é capaz de solubilizar lipídios, desestabilizando o sistema e liberando a CNZ. Portanto, seguindo a equação 4 foi possível calcular a eficiência de encapsulação, expressa em porcentagem (SCHAFFAZICK et al., 2003).

$$\%EE = \frac{\text{área total do pico} - \text{área do pico [CNZ não encapsulada]}}{\text{área total do pico}} \times 100 \quad (4)$$

3.10 Hemólise em meio isosmótico

A hemólise é definida como o rompimento da membrana da hemácia, causando o extravasamento do seu conteúdo interno como hemoglobina e outros componentes. Ela pode ser originada *in vivo* e/ou *in vitro*. Enquanto a hemólise *in vivo* sugere uma condição clínico patológica, que pode ser gerada pela utilização de alguns fármacos, a *in vitro* pode ser simulada para verificar possíveis efeitos colaterais de drogas e sistemas nanoencapsulados. (OMS, 1998)

Desenvolvido por WOLFGANG et al., (1987) o ensaio de hemólise avaliava somente o fenômeno ocasionado pela substância teste. Em 1990, os autores padronizaram a metodologia a fim de estimar o potencial de irritação de tensoativos e outras substâncias, avaliando não só o dano causado na membrana dos eritrócitos (hemólise), mas podendo verificar também os danos causados nas proteínas celulares liberadas. (WOLFGANG, PFANNENBECKER, HOPPE, 1990)

A fim de verificar a atividade hemolítica do nosso sistema, e avaliar a possível viabilidade de uso interno, foi realizado um teste de hemólise em meio isosmótico. Os eritrócitos foram suspensos em PBS (pH 7,4) e centrifugados por 3 min a 2400 rpm por 3 vezes. A suspensão de eritrócitos em tampão foi incubada com diferentes concentrações de cubossomos puros e cubossomos com CNZ durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 3 min a 3500 rpm e o teor de hemoglobina liberada foi determinado por espectrofotometria a 412 nm. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, no laboratório de biosistemas do Instituto de Física da USP.

Os seguintes controles foram utilizados: negativo (controle da hemólise mecânica = eritrócitos em PBS mM, pH 7,4); e positivo (eritrócitos em água MilliQ, resultando em 100% de hemólise). A porcentagem de hemólise (%H) foi obtida a partir da equação 5:

$$\%H = \frac{A_a - A_{cn}}{A_{cp} - A_{cn}} \times 100 \quad (5)$$

Onde Aa, Acn e Acp são as absorvâncias das amostras e dos controles negativo e positivo respectivamente, em 412 nm. (PRETÉ et al., 2011) A partir da %H obtém-se uma curva hemolítica para cada hematócrito testado.

4. Resultados e Discussão

4.1 Cubossomos de PHY na presença de solventes

4.1.1 Influência imediata

Avaliamos a influência de quatro diferentes solventes, comumente usados para solubilizar moléculas hidrofóbicas (acetona, clorofórmio, etanol e octano) na estrutura interna dos cubossomos de PHY. As curvas de SAXS de cubossomos de PHY em ausência de solventes orgânicos, estão apresentadas na figura 16 e como podemos observar, elas apresentam vários picos agudos e bem definidos. Fazendo uso do software SCryPTA (CASTRO et al., 2019), fomos capazes de identificar que cubossomos a base de PHY tem uma simetria cristalográfica cúbica do tipo Pn3m e parâmetro de célula unitária de $6,81 \pm 0,05$ nm. Este resultado está de acordo com os dados relatados para a mesma nanopartícula na literatura. (HARTNETT et al., 2014)

A figura 16 mostra as curvas SAXS de cubossomos PHY na presença de concentrações crescentes de diferentes solventes orgânicos: acetona (figura 16a), clorofórmio (figura 16b), etanol (figura 16c) e octano (figura 16d).

De acordo com a figura 16a, a presença de acetona em até 16,6% (1:5 em v/v conforme a tabela 6) não altera a estrutura cúbica interna de cubossomos de PHY, que se mantém Pn3m. A figura 17a mostra os valores do parâmetro de célula unitária para as amostras com acetona que têm picos de difração visíveis nas curvas SAXS. O parâmetro de célula unitária (figura 17a) nessas concentrações se mantém relativos aos valores na ausência do solvente, em torno de $6,85 \pm 0,04$ nm. A adição de maiores volumes de acetona leva ao desaparecimento dos picos de estrutura cúbica característicos, levando a uma curva de espalhamento com perfil semelhante ao de micelas isotrópicas em solução a 33,3% (ou 1: 2 em v/v). Outras transições de fase não foram observadas nessas concentrações para este solvente específico.

A figura 16b mostra perfis de SAXS para os cubossomos na presença de concentrações crescentes de clorofórmio, onde os picos de espalhamento indicam uma fase cúbica Pn3m em concentrações de até 0,2% (ou 1:500 em v/v). Nas concentrações entre 0,3 e 1,0%, a presença do clorofórmio induz uma transição de fase cúbica para

hexagonal. Em 2%, a ausência dos picos característicos revela a transição para uma fase micelar, que é caracterizada por um pico largo. Finalmente, para concentrações acima desse 9,1%, não existem nanopartículas com uma estrutura interna organizada detectável por SAXS, uma vez que não observamos picos de difração nas curvas de espalhamento. Curiosamente, o clorofórmio revelou um forte efeito sobre os cubossomos, indicando que mesmo em pequenas concentrações pode induzir importantes mudanças estruturais.

Os valores de parâmetro de rede para amostras com clorofórmio (figura 17b) apresentaram duas transições principais. A primeira em concentrações menores que ~ 0,25%, onde é possível ver uma diminuição significativa no parâmetro de célula unitária e em seguida uma mudança estrutural na simetria interna das nanopartículas, de Pn3m para a estrutura hexagonal inversa. Os valores obtidos para o parâmetro de rede para a estrutura hexagonal foram de $4,75 \pm 0,02$ nm, $4,66 \pm 0,01$ nm, e $3,90 \pm 0,02$ nm para 0,3%, 0,4% e 1,0% de clorofórmio, respectivamente. Esses valores são consideravelmente menores quando comparados à estrutura cúbica Pn3m (~ 6,85 nm), mas semelhantes a valores relatados para fases hexagonais na literatura. (DONG et al., 2008)

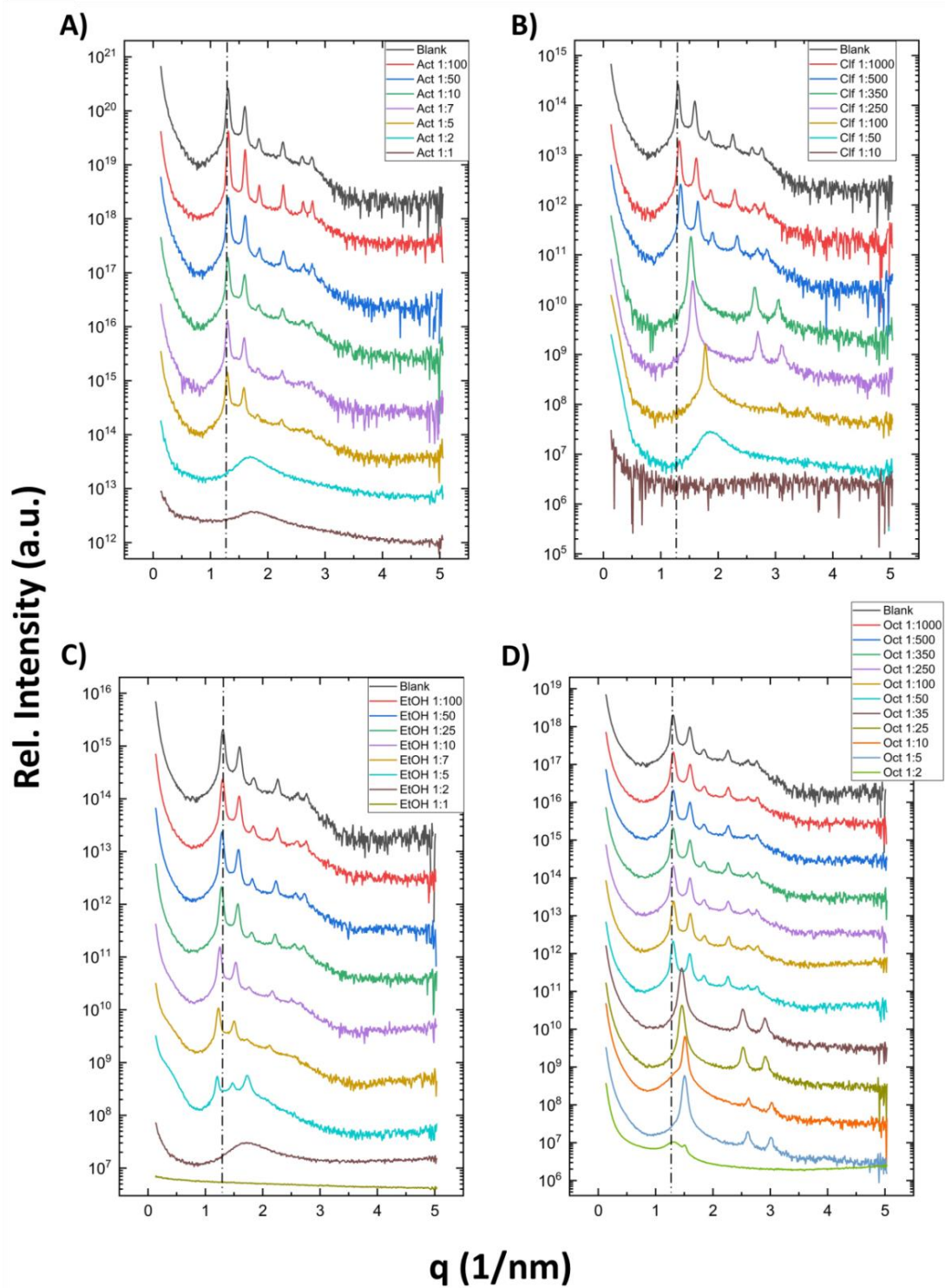


Figura 8: Curvas SAXS de cubossomos na ausência (linhas pretas) e presença de concentrações crescentes de solvente orgânico. Os sistemas estudados foram acetona (a), clorofórmio (b), etanol (c) e octano (d).

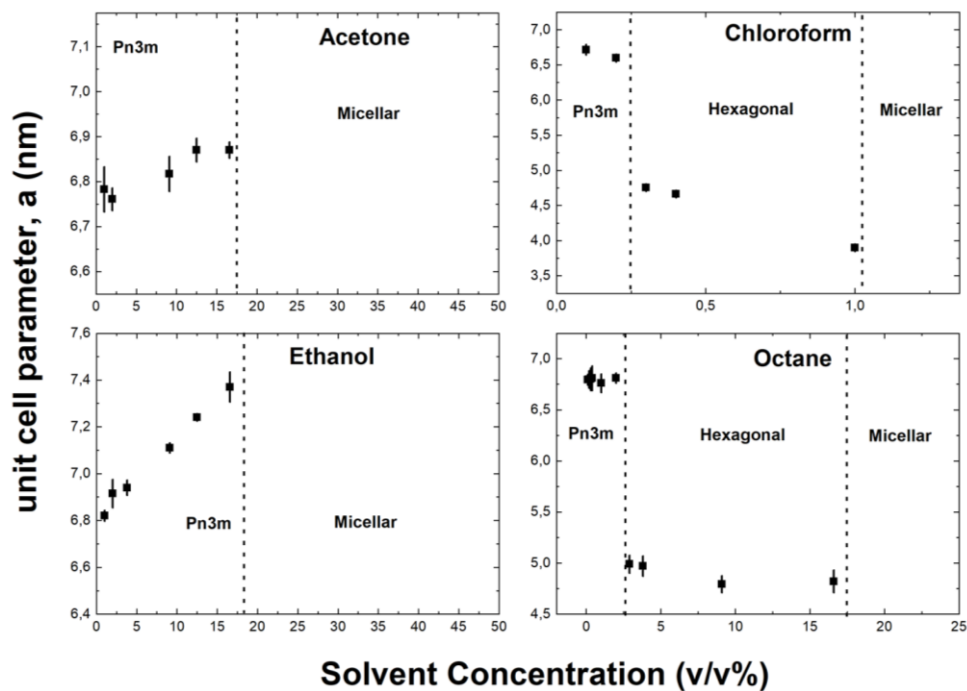


Figura 9: Valores dos parâmetros da célula unitária calculados usando SCryPTA. Dentro de cada quadrado, pode-se encontrar a fase estrutural observada para cada sistema. As barras representam os desvios padrão que também foram calculados usando SCryPTA. As fases micelares são isotrópicas e não têm picos de difração.

Foi demonstrado que a presença de clorofórmio pode induzir alterações interessantes na estrutura interna dos cubossomos. Ao investigar sua ação em membranas, podemos inferir o efeito do clorofórmio na estrutura cúbica. De acordo com resultados da literatura, sobre a interferência de clorofórmio em biomembranas compostas por DPPC na presença de colesterol, o solvente induz uma menor interação molecular entre colesterol-DPPC de cerca de ~ 30 cal/mol em concentrações de $\sim 2\%$. (TURKYILMAZ, ALMEIDA, REGEN, 2011) Assim, essa menor interação molecular induzida pelo clorofórmio entre os fosfolipídios nas membranas modelo pode ser o que influencia a transição de fase observada em cubossomos, da mesma forma que diminui sua cristalinidade, dada pela diminuição observada na altura do primeiro pico das curvas de SAXS, conforme aumenta a concentração de clorofórmio.

O efeito do etanol na estrutura dos cubossomos é bastante diferente daqueles observados para acetona e clorofórmio. A figura 16c mostra as curvas SAXS para cubossomos na presença de etanol em concentrações crescentes. Podemos observar uma transição de fase cúbica para micelar na presença de $\sim 33\%$ de etanol (1:2 em v/v), nesse caso, há um amplo pico na curva SAXS, que é característica de sistemas micelares. Em concentrações 1:5 em v/v, pode-se notar a coexistência de micelas e cubossomos,

evidenciada pela presença de três picos de difração, indicando a coexistência dessas duas estruturas. Os dois primeiros picos encontrados são característicos da estrutura Pn3m, no entanto, o terceiro pico não pôde ser indexado pelo SCryPTA, desta forma, supomos que este pico pertence a outra estrutura cúbica que coexiste com as micelas e os cubossomos Pn3m.

Além disso, há um ligeiro aumento no parâmetro de célula unitária de $6,81 \pm 0,05$ nm para $7,37 \pm 0,07$ nm na ausência e presença de 16,6% de etanol, diretamente proporcional ao aumento na concentração de solvente estudada. Portanto, o etanol faz com que o parâmetro de rede aumente conforme mais moléculas são adicionadas ao sistema. O aumento na concentração de etanol também induz uma leve diminuição da intensidade dos picos de difração, principalmente no primeiro pico. Este processo pode ocorrer devido a uma diminuição da concentração de nanopartículas em solução, ou devido a uma diminuição na cristalinidade da mesma. Para concentrações mais altas, acima de 16,6%, há uma transição de fase evidente de Pn3m para a estrutura micelar, conforme descrito anteriormente.

Estudos da literatura apontam que a temperatura de fusão (TF) de fosfolípidios, independentemente do tamanho de sua cadeia de hidrocarbonetos, diminuiu na presença de etanol, mesmo que em baixas concentrações, indicando que o etanol foi capaz de desestabilizar a bicamada lipídica, reduzindo a TF. (ROWE, 1983) Provavelmente, as moléculas de etanol interferiram na interface polar/apolar da bicamada, induzindo uma desestabilização e, como consequência, diminuindo a TF. No entanto, altas concentrações do solvente causaram o efeito oposto, ou seja, as moléculas de etanol interagem com o grupo da cabeça polar do fosfolípido em estudo. (ROWE, 1983)

Para as nossas amostras, observamos que o etanol diminuiu a cristalinidade dos cubossomos devido à interação das moléculas com a região polar/apolar do cubossomo. De acordo com nossos resultados, o etanol, em concentrações menores, mudou a estrutura interna do cubossomo diminuindo sua cristalinidade. Na concentração 1:2 de etanol, ficou evidente a ausência de cubossomos e a presença de micelas na solução.

A figura 16d mostra a influência do octano na estrutura dos cubossomos. Da mesma forma que o clorofórmio, há uma transição da fase cúbica Pn3m para a hexagonal inversa, seguida por outra transição da fase hexagonal para a micelar isotrópica. Curiosamente, o octano pode ser considerado um solvente menos agressivo

para a estrutura do cubossomo, quando comparado ao clorofórmio, já que necessita de concentrações mais altas de solvente para induzir as transições estruturais. Os valores obtidos para o parâmetro de rede de amostras com octano também foram semelhantes aos obtidos para clorofórmio entre as mesmas estruturas (Pn3m ou hexagonal inversa).

Para este solvente, também se evidenciou a presença de duas transições de fase bem definidas. A primeira, semelhante ao clorofórmio, da simetria cúbica Pn3m para hexagonal inversa na concentração de 1:35 em v/v. Porém, os valores para o parâmetro de célula unitária são ligeiramente maiores quando comparados aos resultados obtidos para o clorofórmio. Outra diferença interessante em relação a esses dois sistemas (octano e clorofórmio) é a quantidade de moléculas capaz de induzir tais mudanças estruturais. Para o clorofórmio, a transição de fase de Pn3m para hexagonal inversa foi evidenciada na razão molar de 100:0,83, o que significa que este sistema tem 100 moléculas PHY para cerca de 0,83 moléculas de clorofórmio (equivalente a concentração 0,2%). É bastante surpreendente que uma quantidade tão pequena de moléculas de clorofórmio seja capaz de induzir tal transição. Quando se trata do octano, as razões molares são 100:4,06, o que significa que o sistema é composto por 100 moléculas de PHY para ~4 de octano. Este número calculado é 4 vezes menor quando comparado ao obtido para o clorofórmio, mostrando que uma quantidade tão pequena de solvente orgânico é capaz de induzir uma mudança dramática na estrutura dos cubossomos, alterando a estrutura interna das nanopartículas.

Considerando o LogP dos solventes orgânicos, e o empacotamento dos lipídios nas transições de fase relatadas na literatura. (MARIANI, LUZZATI, DELACROIX, 1988), esses resultados sugerem que tanto o clorofórmio quanto o octano foram incorporados ao núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica, aumentando o empacotamento do grupo apolar e a fluidez das cadeias alquílicas. Assim, nossos resultados sugerem que a área da seção transversal dos constituintes aumenta nas regiões da cadeia alquil e diminui nas regiões do grupo apolar, induzindo uma maior curvatura espontânea negativa e, portanto, a formação da fase hexagonal invertida.

4.1.2 Influência após 24h

Uma das principais dificuldades da utilização de solventes orgânicos para encapsulação de drogas hidrofóbicas em sistemas nanométricos é a presença residual de solventes na amostra. (RIZWAN et al., 2011) (DESHPANDE et al., 2016) Desta forma, resolvemos estudar algumas amostras de cubossomos com solvente após 24 horas de interação, para verificar a reversibilidade da interferência de solventes orgânicos após evaporação. Os dados de SAXS desse estudo são apresentados na figura 18 abaixo.

Na figura 18a, representando os dados para amostras com acetona, apenas esse sistema apresentou o notável efeito de uma interferência estrutural completamente reversível em comparação com o sistema sem solvente. Todas as amostras testadas em diferentes concentrações de acetona retornaram a estrutura Pn3m após 24h.

O sistema de clorofórmio exibiu um comportamento diferente (figura 18b), tendo uma interferência parcialmente reversível na estrutura do cubossomo. Após 24 h, foi possível ver duas transições de fase bem definidas, uma de cúbica para hexagonal na concentração de 1,0% e uma hexagonal para micelar, sendo agora na concentração de 2,0%. Quanto aos parâmetros de célula unitária, eles são compatíveis com os obtidos na seção anterior, sendo iguais a $6,50 \pm 0,04$ nm e $4,60 \pm 0,02$ nm para cúbico e hexagonal, respectivamente (figura 19b).

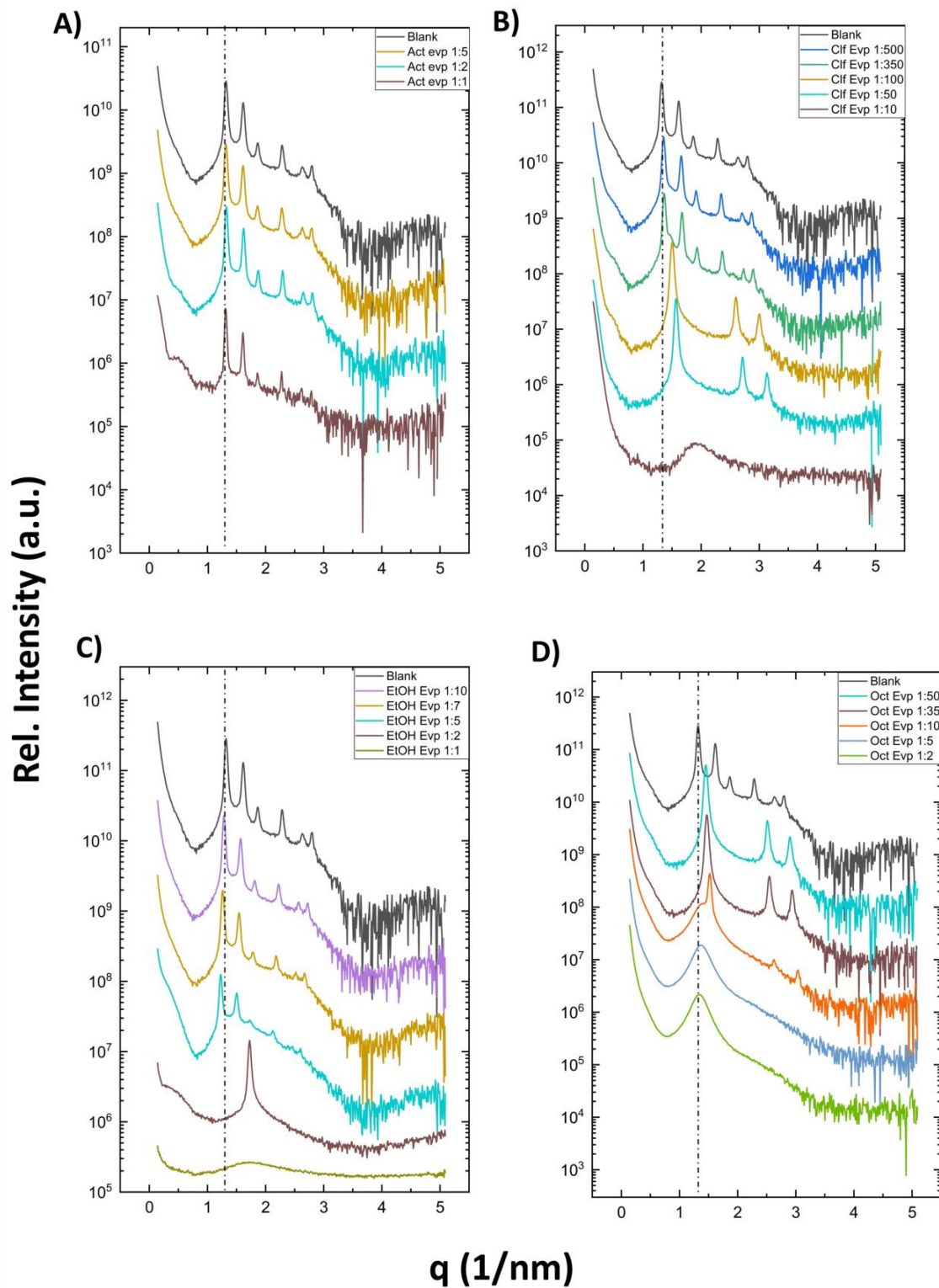


Figura 10: Curvas de SAXS de cubossomos na ausência (preto linha) e presença de aumento concentrações de solvente orgânico após 24 h de interação com o solvente. Os sistemas estudados foram acetona (a), cloróformio (b), etanol (c), e octano (d).

Devido à característica do etanol de formar uma mistura eutética com água, é importante verificar a interferência residual desse solvente após sua evaporação. Na

figura 18c, verificou-se que as interações dos cubossomos com etanol são parcialmente reversíveis, ou seja, a 17% (que inicialmente estava na fase micelar, figura 18c) a estrutura voltou a ser cúbica Pn3m, apresentando um parâmetro de rede de $7,20 \pm 0,05$ nm (figura 19c). Outras transições também foram dependentes do tempo, as amostras na concentração 1:2 que inicialmente tinham uma estrutura micelar, após 24h apresentaram um pico único bem definido. Esta curva de SAXS representa um sistema composto por cilindros dispersos aleatoriamente e, portanto, não mostra outro pico de difração característico, conforme descrito na literatura. (LEWIS et al., 1999) O parâmetro de rede para este sistema específico é $\sim 4,20 \pm 0,02$ nm (figura 19c), corroborando com os valores encontrados em literatura para estruturas hexagonais inversas. (DONG et al., 2008)

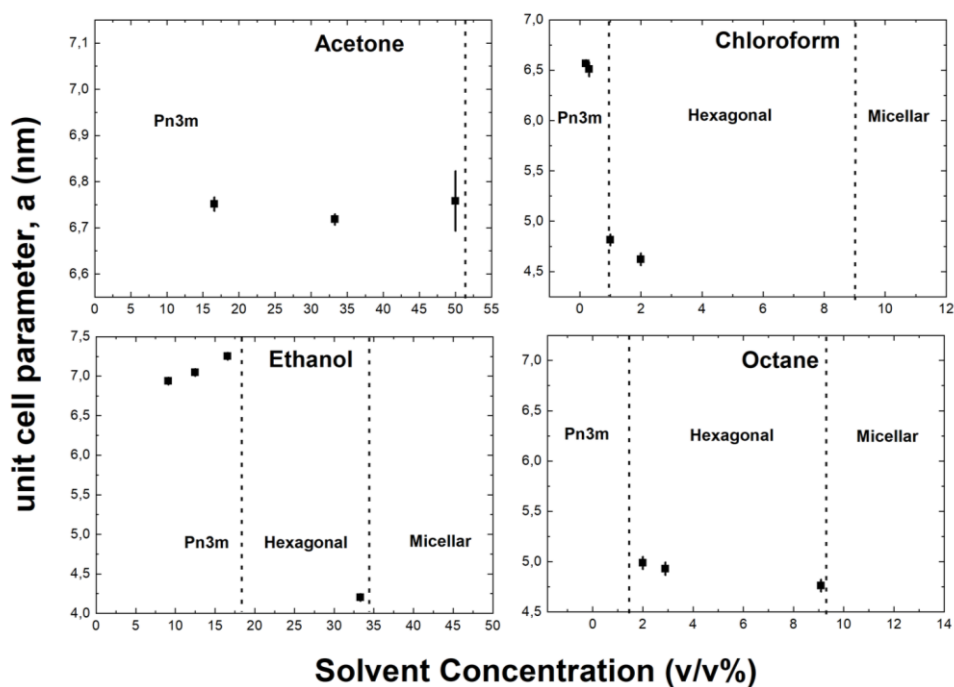


Figura 11: Valores dos parâmetros de rede da célula unitária calculados usando SCryPTA. Dentro de cada quadrado, pode-se encontrar a fase estrutural observada para cada sistema após 24h. As barras representam os desvios padrão que também foram calculados usando SCryPTA. As fases micelares são isotrópicas e não têm picos de difração.

Dong et al. (2008) estudaram o efeito de marcas comerciais de PHY disponíveis no mercado, para investigar os efeitos de impurezas no diagrama de fase anfifílico. Eles relataram que, para ambas as marcas utilizadas nesse estudo, a fase hexagonal é encontrada quando as amostras são aquecidas. Tal fato pode refletir em mudanças drásticas nos lipídios e parâmetros estruturais. Curiosamente, esta fase hexagonal,

evidenciada na presença de etanol e após 24 h de interação, não foi constatada na análise realizada imediatamente após a adição dos solventes, sugerindo que pode haver uma transição rápida entre as fases cúbica e micelar, passando pela fase hexagonal.

Os resultados da adição de octano foram bastante surpreendentes após 24h, como pode ser visto na figura 18d. A interferência deste solvente era mais drástica, induzindo uma transição da simetria cúbica para a hexagonal inversa em concentrações inferiores a 2%. Por outro lado, a literatura relata a preparação de nanopartículas livres de solvente com o uso de octanol (que tem a mesma cadeia de hidrocarbonetos que o octano), resolvendo problemas fundamentais da presença residual de solvente. (WHITE, 1976) (DYRDA et al., 2019) Os valores obtidos para o parâmetro de célula unitária dos cubossomos em presença de octano após 24h foram bastante compatíveis com aqueles encontrados inicialmente para estruturas hexagonais e o resultado é consistente com os dados relatados na literatura. (LEWIS et al., 1999)

A intensidade com que os solventes orgânicos influenciam na estrutura interna dos cubossomos pode ser explicada em termos de polaridade de cada um dos solventes estudados. Solventes não polares, como clorofórmio e octano exibem maior capacidade de interagir com regiões hidrofóbicas das nanopartículas, e assim modificá-las em concentrações mais baixas. A acetona, sendo um solvente aprótico, e o etanol sendo um solvente prótico, têm interações muito semelhantes com as estruturas lipídicas. No entanto, a capacidade do solvente de formar interações químicas mais fortes com lipídios, pode interferir em sua reversibilidade da influência na estrutura cristalográfica após evaporação. (LEWIS et al., 1999)

A fim de se obter maiores informações sobre a interação dos solventes com membranas lipídicas, Rowe (1983) também estudou por EPR a influência de dimetilsulfóxido, metanol, acetona, etanol, N,N-dimetilformamida (DMF) e nujol nos lipossomos biomiméticos. Como esperado, cada solvente teve uma interação específica com a membrana. De acordo com seus resultados, alguns solventes podem aumentar a fluidez da membrana, como a acetona, no interior da bicamada. Por outro lado, o etanol, diminuiu consideravelmente a fluidez na parte interna da membrana. Todos esses achados corroboram os efeitos dos diferentes solventes na estrutura interna dos cubossomos e podem iluminar o porquê de tais transições ocorrerem.

A microscopia eletrônica de transmissão criogênica (Crio-TEM) também foi realizada a fim de se avaliar a morfologia das nanopartículas de forma individual. Com base nas curvas de SAXS, as seguintes amostras foram escolhidas para esta análise: cubossomos em ausência e presença de: clorofórmio 1:100, etanol 1:2 e octano 1:50; todas as amostras foram medidas após 24 horas de interação com os solventes. Como mostrado na figura 20, pode-se ver partículas individuais de tamanhos variados, de 200 a 650 nm, apresentando estrutura interna organizada. A análise por FFT nos permite analisar estas estruturas internas, mas nem todos os eixos de zona foram encontrados. Na amostra controle de cubossomos é possível verificar eixos característicos, através de sua FFT, que confirmam a estrutura cúbica $Pn3m$ e o parâmetro de rede medido é $6,5 \pm 0,5$ nm, compatível com as medidas anteriores de SAXS. Para a amostra em presença de clorofórmio (1:100), não foi possível indexar os planos de reflexão devido a qualidade das imagens e a baixa cristalinidade das nanoestruturas; por outro lado, as arestas retas das partículas são uma indicação da presença de planos cristalográficos. A FFT revelou alguma estrutura interna que é considerada hexagonal, de acordo com dados SAXS. Curiosamente, o cubossomo na presença de etanol exibiu as mesmas bordas retas e afiadas, indicando planos cristalográficos bem definidos. A própria partícula se assemelha a uma forma hexagonal, infelizmente não confirmada pela sua FFT devido ao alto ruído na imagem. Finalmente, a amostra de octano revelou uma nanopartícula com FFT hexagonal, indicando como esta partícula está orientada. Acredita-se que esta nanopartícula apresenta estrutura hexagonal devido ao conhecimento prévio dos dados de SAXS.

Na literatura, encontramos relatos de cubossomos e hexossomos de monooleína, mostrando hexossomos com formato hexagonal e arestas em linhas retas acentuadas, muito parecidas as nanopartículas encontradas na figura 20. Nesse trabalho não houve menção sobre a análise FFT. (NGUYEN et al., 2011) (BESSONE et al., 2021)

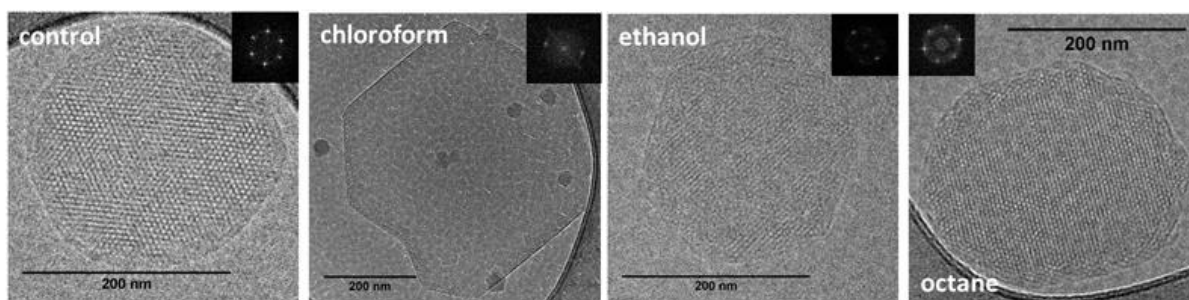


Figura 12: Micrografias de Cryo-TEM de cubossomos de fitantriol na ausência de solventes (controle), e na presença de clorofórmio 1: 100, etanol 1: 2, e octano 1:50. Todas as partículas encontradas apresentam alguma estrutura interna evidenciada pelas FFTs inseridas. Barras de escala são apresentadas em cada figura.

4.2 Cubossomos de PHY com CNZ

Cubossomos de fitantriol (PHY) foram produzidos a partir do protocolo BU descrito anteriormente na sessão de métodos (3.3.1). A caracterização estrutural de cubossomos em ausência e presença de concentrações crescentes de cinarizina (CNZ) foram realizadas. A encapsulação da CNZ se mostrou um problema no início do desenvolvimento deste trabalho, já que todas as amostras produzidas por ambos os métodos (co-solubilização e adição) apresentaram precipitado, independente da concentração de CNZ adicionada, característica não encontrada em amostras de cubossomos em ausência de CNZ. Tal situação é um forte indício de que a maior parte do fármaco não estava sendo incorporada pelas nanopartículas.

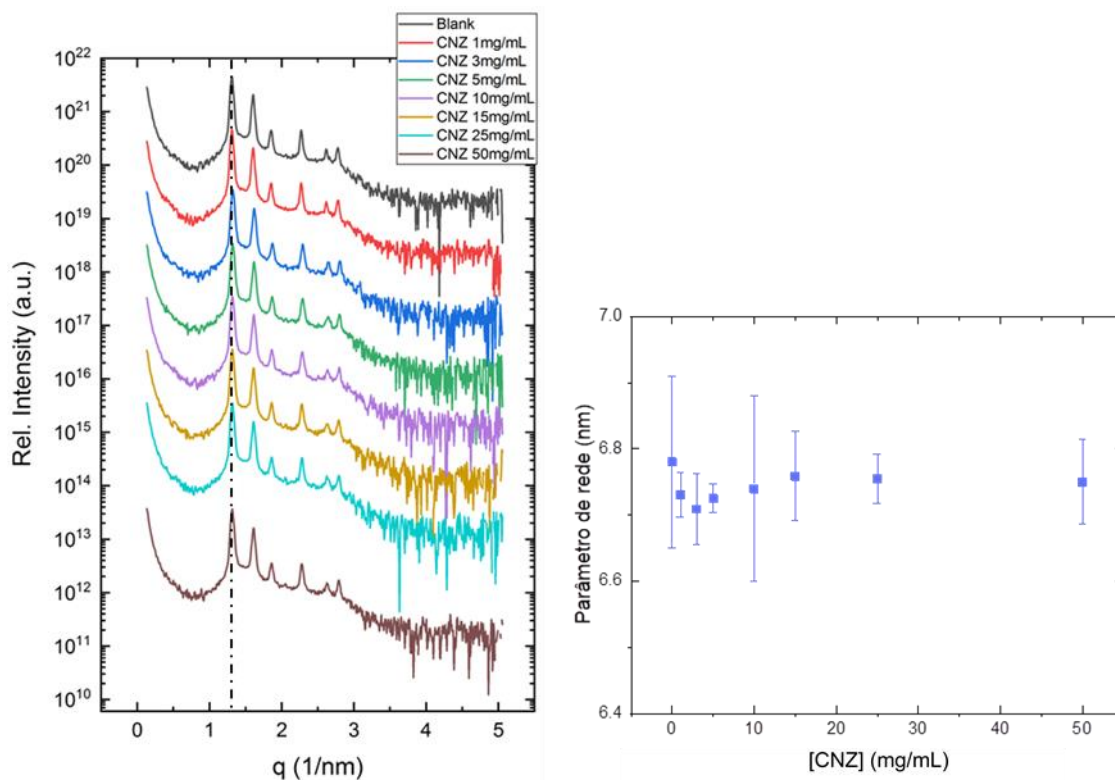


Figura 13: A esquerda temos dados de SAXS para cubossomos de PHY brancos e com CNZ produzidos pelo método de adição. A direita o parâmetro de rede, calculado através do software SCryPTA, para as mesmas amostras analisadas por SAXS.

As curvas de SAXS para amostras preparadas pelo método de adição, apresentadas na figura 21, exibem 4 picos agudos e bem definidos, característicos para a estrutura Pn3m, que pode ser confirmada pelo software SCryPTA, uma estrutura cúbica presente no diagrama de fases de PHY (figura 21). (MAZZONI et al.,2016)

Ao analisarmos as curvas de SAXS, nota-se que há uma semelhança entre elas na posição do primeiro pico de difração, além de uma significativa semelhança nas intensidades de cada um dos picos entre os sistemas em ausência ou presença de CNZ. Esta semelhança é mais uma forte evidência que a CNZ não estava sendo encapsulada. O parâmetro de rede obtido para todas as amostras estava entre 6,71 nm e 6,78 nm, sendo todos similares considerando-se o desvio padrão deste conjunto de dados. Os resultados evidenciaram que a CNZ não interferiu no tamanho do parâmetro de célula unitária dos cubossomos, provavelmente por não ser encapsulada por esse método.

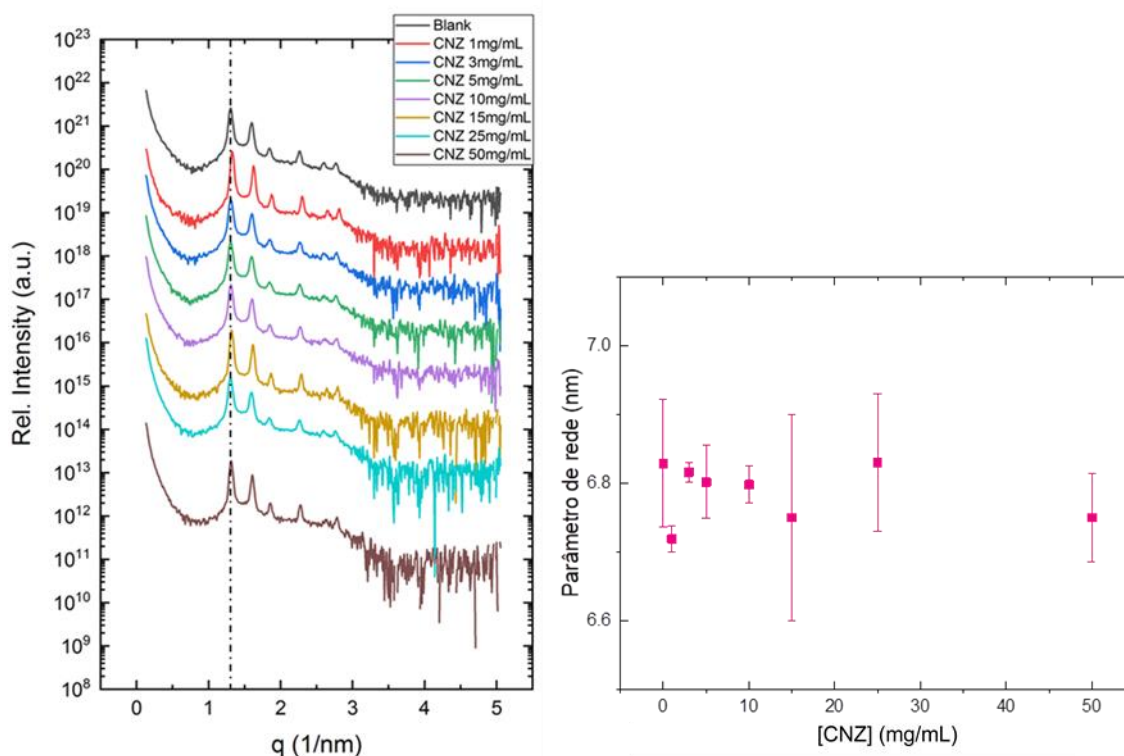


Figura 14: A esquerda temos dados de SAXS para cubossomos de PHY brancos e com CNZ produzidos pelo método de co-solubilização. A direita o parâmetro de rede, calculado através do software SCryPTA, para as mesmas amostras analisadas por SAXS.

Na figura 22 temos as curvas de SAXS para amostras de cubossomos em ausência e presença de concentrações crescentes de CNZ, preparados pelo método de co-solubilização. Utilizando a análise do SCryPTA, detectou-se que todas as curvas apresentaram simetria cúbica do tipo Pn3m, assim como as amostras produzidas por adição mostradas na seção anterior. Através do método de co-solubilização verificamos uma diferença sutil entre as curvas de espalhamento, indicando que a CNZ pode ter sido encapsulada, mesmo que em pequenas concentrações.

As alterações no parâmetro de célula unitária também foram mais significativas utilizando o método de co-solubilização. Os valores variaram em 6,72 nm e 6,83 nm, podendo ter ainda mais amplitude se considerarmos os desvios padrões apresentados por cada amostra. No entanto, os resultados obtidos para ambas as metodologias estão dentro do esperado, de acordo com a literatura onde o parâmetro de rede é de ~6,4 nm para cubossomos com simetria cristalográfica Pn3m. A literatura também relata cubossomos de PHY com parâmetros de rede na ordem de 6 nm a 7 nm, para diferentes

protocolos de produção. (ALCARAZ et al., 2018) (ASTOLFI et al., 2017) (SHI et al., 2015)

Os dados de DLS revelaram um sistema monodisperso com partículas de ~200 nm para o sistema de cubossomos de PHY, passando para um tamanho médio de cerca de ~300 nm, em presença de CNZ de até 1mg/mL, como mostrado na figura 23. Para estas concentrações vemos um aumento do tamanho das nanopartículas, diretamente proporcional ao aumento da concentração de CNZ. Nas concentrações a partir de 3 mg/mL, verificou-se que o PDI da amostra era superior a 0,4, sendo, portanto, não adequada à análise por esta técnica. (KHATUN et al., 2016) Esse aumento do valor de PDI indica que provavelmente o acúmulo de CNZ não incorporada pelos cubossomos interferiu na análise.

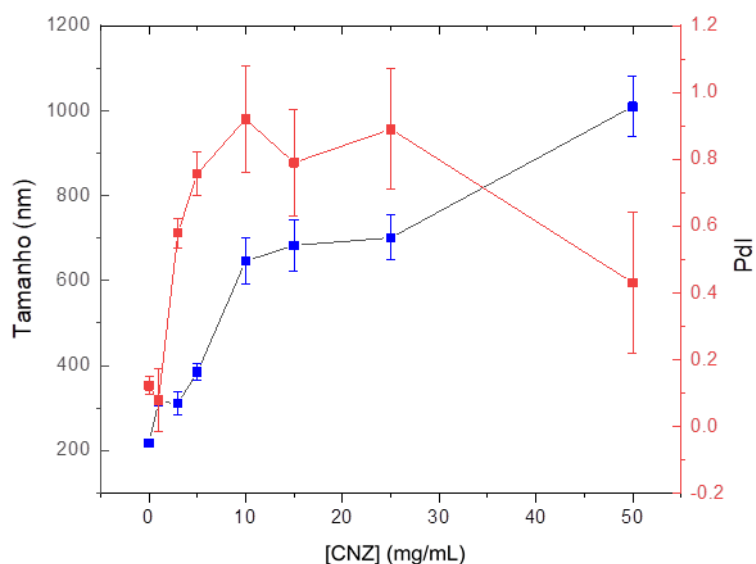


Figura 15: Dados de DLS para cubossomos de PHY brancos e com CNZ produzidos por co-solubilização.

As micrografias das nanopartículas isoladas, analisadas através de TEM, figura 24, apresentaram cubossomos brancos com tamanho entre ~480nm e ~380 nm, com bordas arredondadas e forma amorfa, mas que remeteu bastante ao formato cúbico. Para as micrografias de cubossomos contendo 1mg/mL de CNZ encontramos partículas com ~450 nm e ~230 nm, uma variedade de tamanhos superior a encontrada sem CNZ. As partículas têm formato quadrado com bordas bastante arredondadas como anteriormente, característica de cubossomos de fitantriol, conforme observado em outros trabalhos. (GABALLA et al., 2020) As micrografias apresentaram algumas

manchas ao fundo, não necessariamente por conta da composição da amostra, mas sim pelo processo de fabricação dos *grids* ou pelo contraste aplicado ao obter as imagens.

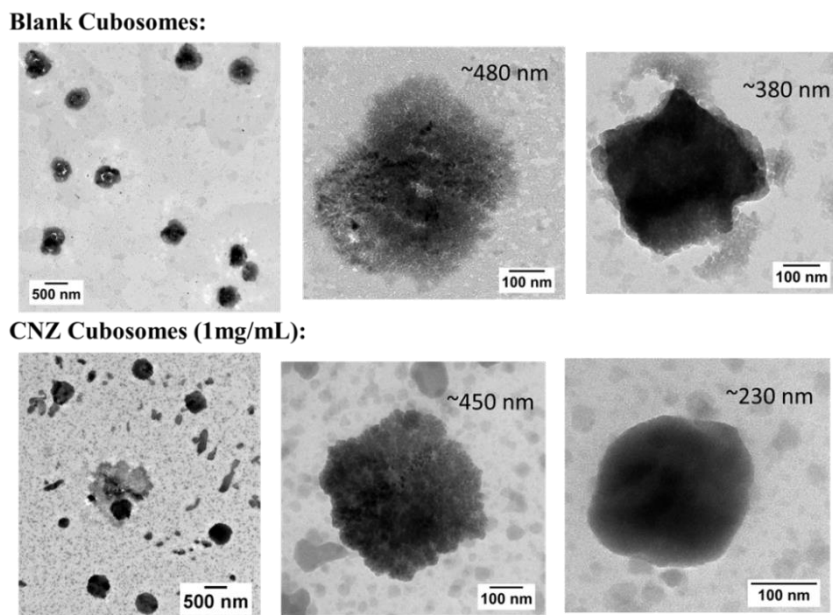


Figura 16: Micrografias de TEM para cubossomos de PHY brancos e com 1 mg/mL de CNZ.

Existe uma diferença entre os tamanhos encontrados nas micrografias (figura 24) e nos resultados de DLS (figura 23). Isso ocorre devido ao tipo de análise de cada uma das técnicas. Ao passo que na técnica de DLS analisamos o conjunto de nanopartículas como um todo, as micrografias geradas por TEM apresentam uma pequena população de partículas isoladas. Outra diferença que vale salientar é que as nanopartículas analisadas por DLS estão em solução, ao passo que, o processo de secagem da amostra na produção de *grids* para TEM também pode influenciar no tamanho dos cubossomos. Na literatura, não há grande variedade de dados para micrografias de cubossomos de PHY. Alguns trabalhos relatam tamanhos de partículas maiores do que as medidas por DLS. (LUO et al., 2015) (NASR, GHORAB, ABDELAZEM, 2015)

Ao compararmos os protocolos de adição e co-solubilização verifica-se que o protocolo de co-solubilização aparenta ser mais eficiente e, portanto, mais adequado para a produção de cubossomos com CNZ. A eficiência de encapsulação foi um grande desafio deste trabalho, portanto, foram realizados ensaios para melhorá-la. A solubilidade da CNZ em lipídios, dentre eles fitantriol e monoleína (GMO), foi obtida na literatura. A solubilidade de CNZ em PHY foi bem inferior, $\sim 7,7 \pm 0,1$ mg/g, quando comparada a GMO de $\sim 29,9 \pm 0,7$ mg/g. (NGUYEN et al., 2010) Portanto, foi

testada a incorporação da CNZ em cubossomos de myverol (composição lipídica com ~ 80% de GMO) para tentar obter melhores resultados.

4.3 Cubossomos de MYV com CNZ

Considerando os resultados anteriores para cubossomos de PHY que não obtiveram êxito em encapsular a CNZ, resolvemos testar outro lipídio disponível e que apresenta auto agregação em simetria cúbica, o myverol (MYV).

Para iniciar os testes de encapsulação de CNZ, foi necessário, primeiramente, padronizar os protocolos de produção de cubossomos de MYV. Desta forma, 4 diferentes condições foram testadas, conforme descrito na sessão 3.3.2. Na figura 25 é possível observar as curvas de SAXS obtidas a partir de cada um dos protocolos. Através do padrão de difração, considerando a posição dos picos analisadas pela plataforma SCryPTA, a simetria $Im3m$ foi observada para todas as amostras analisadas. Esta simetria é típica para cubossomos de monoleína, e esperada para cubossomos de MYV, devido a sua composição, como relatado em literatura. (MURGIA et al., 2010)

Os protocolos 1 e 3 não apresentaram picos de difração bem definidos, indicando uma sobreposição e até possivelmente uma coexistência de mais de uma simetria na mesma amostra. Essa coexistência de fase pode ser confirmada pelo SCryPTA no protocolo 1, onde observamos a presença de cubossomos $Im3m$ e $Pn3m$. Portanto, esses protocolos foram descartados inicialmente. O protocolo 2 apresentou uma curva de SAXS com picos bem definidos e com alta intensidade, no entanto esta preparação utiliza propilenoglicol, que não pode ser retirado ao final do processo, dificultaria aplicações farmacêuticas. Por fim, o protocolo 4 apresentou picos bem definidos, no entanto, com menor intensidade que os exibidos pelo protocolo 2.

Os valores obtidos para o parâmetro de célula unitária para os 4 protocolos testados não apresentaram diferença significativa entre eles, quando se tratava da mesma estrutura. Todos que apresentavam cubossomos $Im3m$ foram de ~11 nm, e o protocolo 1, que apresentou cubossomos $Pn3m$, obteve um parâmetro de célula unitária de ~9 nm. Os cubossomos de MYV têm uma simetria cristalográfica diferente dos cubossomos de PHY e parâmetro de rede consideravelmente maior quando comparados.

Este é um ponto interessante, uma vez que a geometria da nanopartícula pode definir a capacidade de encapsulação de drogas. (NILSSON et al., 2013)

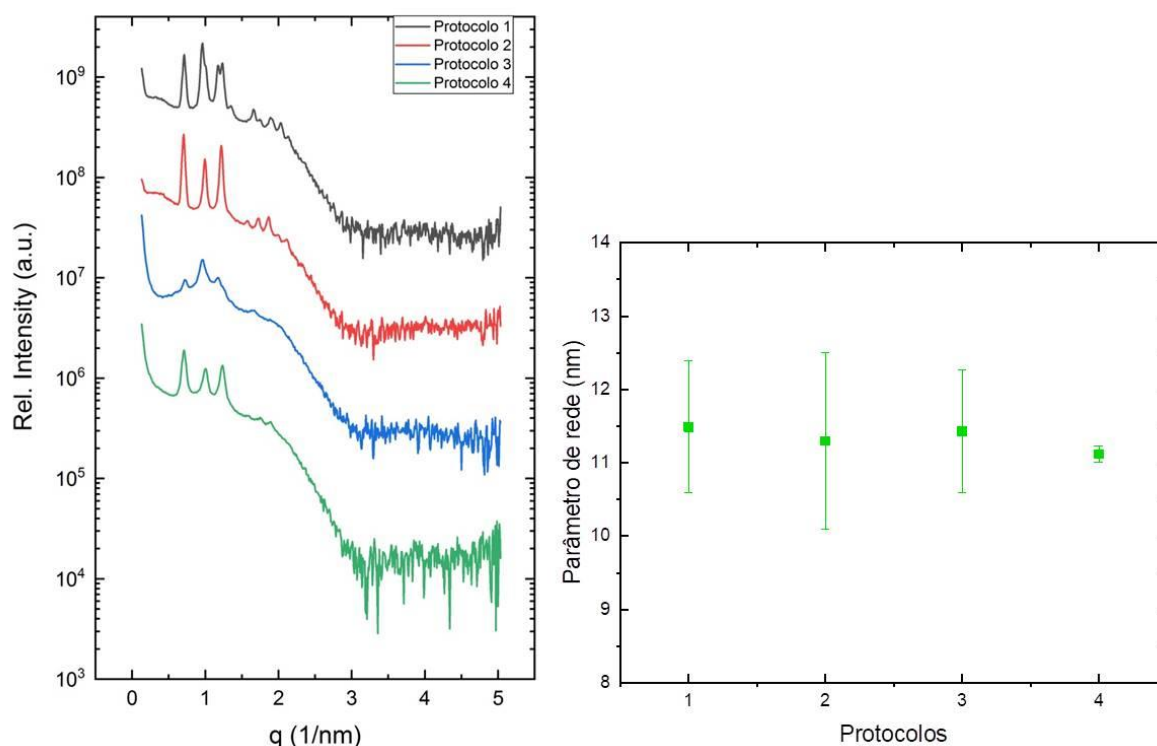


Figura 17: A esquerda temos dados de SAXS para as 4 diferentes condições de protocolos testados para MYV. A direita o parâmetro de rede, calculado através do software SCryPTA, para as mesmas amostras analisadas por SAXS.

Foram considerados também os valores obtidos por DLS (figura 26) para garantir a viabilidade do protocolo. Os tamanhos das nanopartículas obtidas por cada protocolo testado foram bastante variados, entre aproximadamente 170 nm e 570 nm, porém todas as populações eram adequadas ao tipo de análise ($PdI < 0,4$). Ao compararmos os resultados, os protocolos 3 e 4 apresentaram o menor tamanho de nanopartícula. Tamanhos menores de cubossomos são favoráveis, pois partículas menores possuem melhor aplicabilidade no campo farmacêutico. (SHERIF, BENDAS, BADAWEY, 2014)

Assim, como o protocolo 3 já havia sido inviabilizado anteriormente, o protocolo 4 foi o de melhor condição e reprodutibilidade para o preparo das amostras e aplicação final, de forma que este protocolo foi o escolhido.

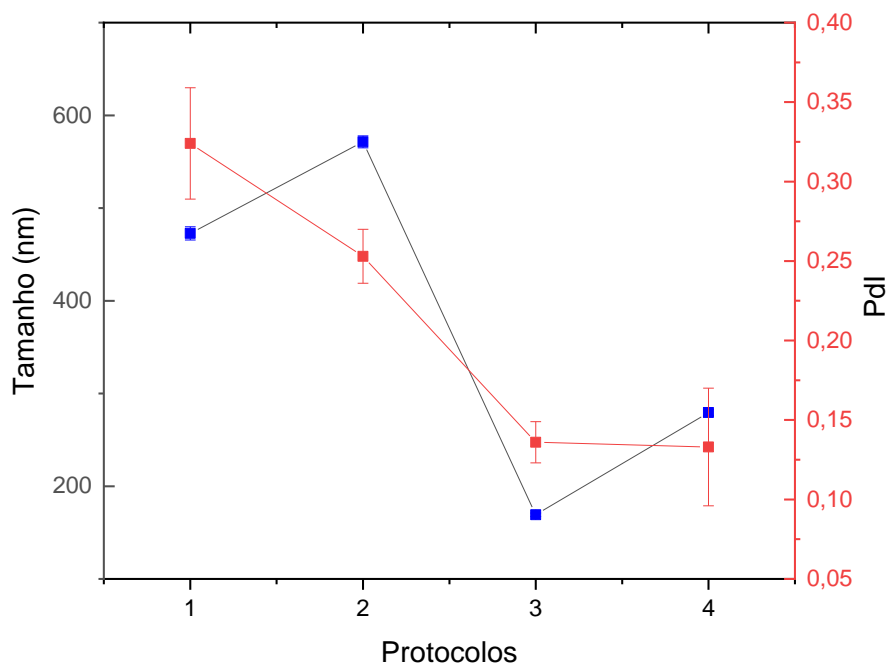


Figura 18: Dados de DLS para os 4 diferentes protocolos testados para MYV.

Seguindo o protocolo escolhido, as amostras de cubossomos de MYV com CNZ foram produzidas por co-solubilização, nas concentrações 0,2 mg/mL, 0,6 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL de CNZ. Estas concentrações foram determinadas com base na solubilidade máxima da droga no lipídio, conforme descrito por NGUYEN et al., (2010).

As curvas de SAXS, apresentadas na figura 25, demonstram que a CNZ interferiu na estrutura cristalográfica dos cubossomos. Uma transição de Im3m para Pn3m foi observada em concentrações crescentes de CNZ. Em 0,2 mg/mL de CNZ, observa-se uma coexistência de fases de ambas as estruturas apresentadas. Em concentrações superiores de CNZ, foi verificada a existência da estrutura Pn3m, e o primeiro pico apresentado nas curvas destes casos pode ser um resquício de cubossomos ainda na estrutura Im3m, porém o volume dessas nanopartículas na amostra foi tão pequeno que não foi possível identificar outros picos característicos dessa estrutura por SAXS.

O parâmetro de célula unitária (figura 27, a direita) se altera de acordo com a estrutura interna encontrada nos cubossomos. Na concentração 0,2 mg/mL, podemos calcular os valores para as duas estruturas (Pn3m e Im3m) em solução. Não houve

diferenças significativas de tamanho quando se trata da mesma estrutura, sugerindo que a CNZ não interferiu no parâmetro de rede, e sim na reorganização estrutural da nanopartícula. Os valores obtidos através do SCryPTA foram, ~ 12 nm e $\sim 8,8$ nm para as estruturas Im3m e Pn3m respectivamente. Em literatura são descritos cubossomos com parâmetro de rede de ~ 12 nm para estruturas Im3m, compatível com o encontrado. (SHERIF, BENDAS, BADAWY, 2014) Apesar da estrutura Pn3m não fazer parte do diagrama de fase da GMO, lipídio com maior concentração na mistura de MYV, alguns estudos recentes relataram a presença dessa estrutura induzida por peptídeos antimicrobianos ou pela mudança de pH. (ZABARA et al., 2019) (MULLER et al., 2010)

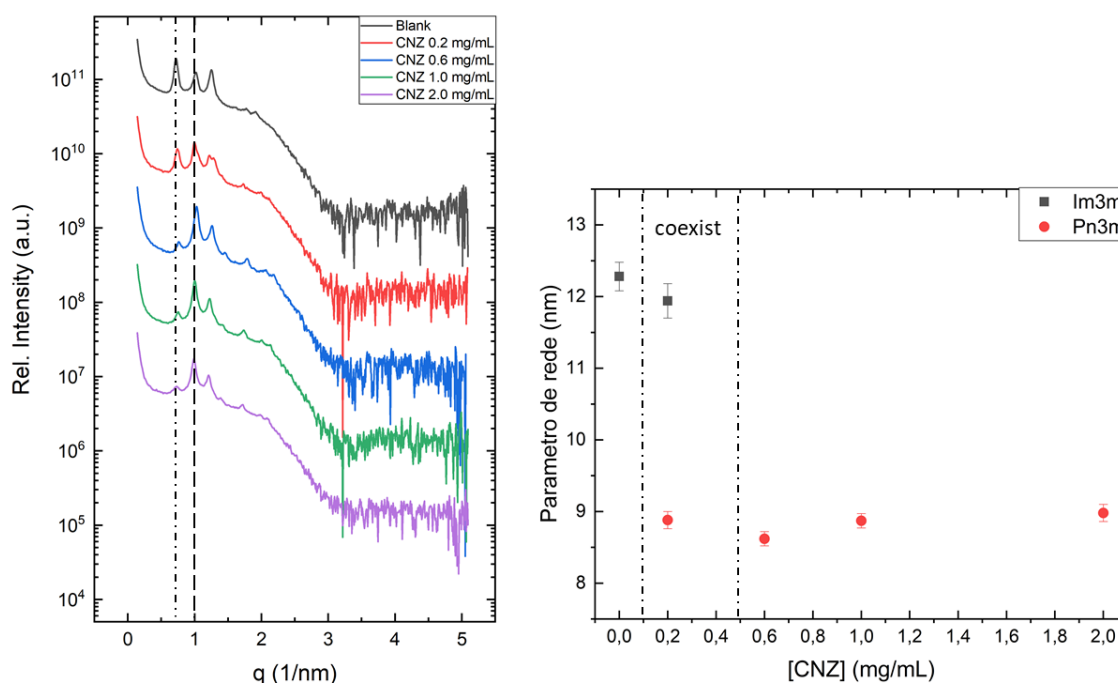


Figura 19: A esquerda temos dados de SAXS para cubossomos de MYV brancos e com CNZ produzidos pelo método de co-solubilização. A direita o parâmetro de rede, calculado através do software SCryPTA, para as mesmas amostras analisadas por SAXS, separadas de acordo com a estrutura apresentada Pn3m ou Im3m.

O DLS revelou partículas com tamanhos entre 180 nm a 280 nm, dependentes da concentração de CNZ. O gráfico da figura 28 aponta que a CNZ interferiu significativamente no tamanho dos cubossomos. Algumas alterações podem ocorrer de acordo com a execução do protocolo, principalmente na etapa de gotejamento. De forma geral, todas as amostras foram monodispersas, com PdI inferior a 0,4, adequado a técnica. Os resultados encontrados são ótimos fatores para a aplicação de *drug delivery*,

conforme a literatura, partículas com tamanho entre 70 nm e 200 nm são adequados para essa finalidade. (GAUMET et al., 2008) (FERRARI, 2008)

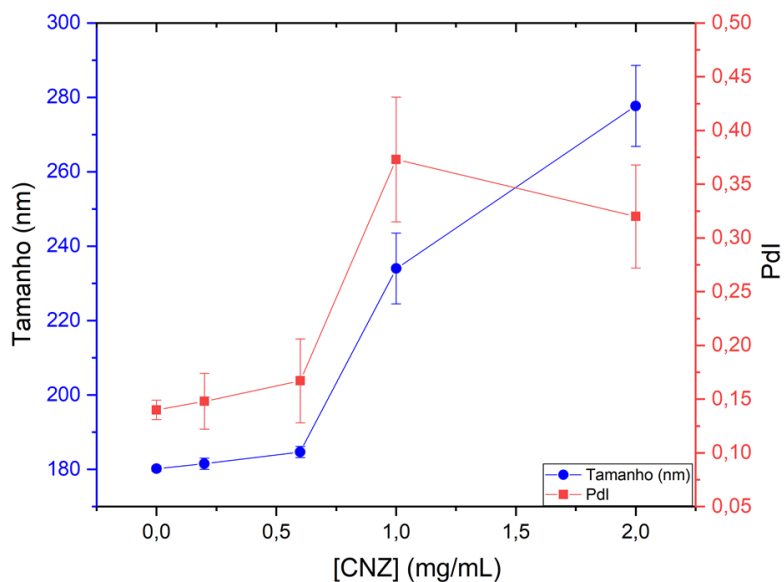


Figura 20: Dados de DLS para cubossomos de MYV brancos e com CNZ produzidos por co-solubilização.

As amostras foram analisadas por NTA a fim de se verificar o tamanho e concentração das nanopartículas em solução. A tabela 9, mostra o resultado desse experimento. Os cubossomos apresentaram uma pequena variação de tamanho entre ~130 nm e ~185 nm. Valores bem diferentes dos encontrados anteriormente no DLS. Esta discrepância é bem explicada pelas limitações das medições DLS que são altamente influenciadas pela dispersão de luz de partículas maiores, enquanto o NTA mede cada partícula individualmente para depois calcular uma média ponderada em função da concentração e da polidispersão. (RIBEIRO et al., 2018)

Tabela 9: Dados de NTA para amostras de cubossomos brancos e com CNZ. Foi avaliado o tamanho das nanopartículas e sua concentração na amostra.

Amostra	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/ml)
CNZ 0,0 mg/mL	146,3 ± 4,9	$1,62 \times 10^{13} \pm 0,32 \times 10^{13}$
CNZ 0,2 mg/mL	130,2 ± 0,9	$2,16 \times 10^{13} \pm 0,06 \times 10^{13}$
CNZ 0,6 mg/mL	138,3 ± 5,1	$1,14 \times 10^{13} \pm 0,16 \times 10^{13}$
CNZ 1,0 mg/mL	168,4 ± 0,6	$1,09 \times 10^{13} \pm 0,07 \times 10^{13}$
CNZ 2,0 mg/mL	184,9 ± 4,8	$1,03 \times 10^{13} \pm 0,02 \times 10^{13}$

Embora haja um pequeno aumento no tamanho das nanopartículas com maiores concentrações de CNZ (1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL), não se pode afirmar que a droga interfere no tamanho dos cubossomos, como na análise anterior por DLS.

Também é possível determinar a concentração de partículas em solução, que variou de $1,03 \times 10^{13} \pm 0,02 \times 10^{13}$ a $2,16 \times 10^{13} \pm 0,06 \times 10^{13}$ partículas/mL de forma não linear e não relacionada à concentração de CNZ da amostra. Esta concentração total de partículas é calculada a partir da estimativa do software de partículas na amostra diluída, portanto, leva em consideração o fator de diluição, neste caso de 10^4 . Infelizmente, não existem muitos dados na literatura sobre a análise de cubossomos por NTA. MALHEIROS et al. (2021), apresenta amostras com tamanhos superiores a 200 nm e uma concentração de partículas 10 vezes inferior as encontradas para cubossomos com CNZ. (MALHEIROS et al. 2021)

As amostras também foram analisadas por TEM e Crio-TEM (figura 29). As micrografias de TEM apresentaram nanopartículas com morfologia quadrada e bordas bem definidas, dentro do esperado para cubossomos de MYV. (SHARMA, DHAWAN, NANDA, 2020) No entanto, os tamanhos obtidos tanto nas micrografias de TEM quanto por Crio-TEM foram bastante polidispersos, diferindo bastante do encontrado nas análises anteriores de DLS e NTA. Tal fato decorre do tipo de análise realizada, que é feita de partículas individuais, sem considerar a população como um todo. Outro fator de interferência é o processo que as amostras passam para a produção dos *grids*. Neste caso, as amostras passam pelo processo de secagem, não estando em solução como nas demais análises. Na literatura são relatados cubossomos de MYV com tamanhos de

partículas maiores do que as medidas por DLS. (LUO et al., 2015) (NASR; GHORAB; ABDELAZEM, 2015)

No entanto, comparando os tamanhos apresentados nas micrografias entre si, vemos que eles se mantêm, de forma que não foi possível verificar a interferência da CNZ no tamanho dos cubossomos, assim como na análise por NTA. Tal fato nos leva a refletir se a influência encontrada anteriormente na análise por DLS é um fator real ou ocorre devido a aproximações utilizadas pela técnica.

As micrografias de Crio-TEM (figura 29) apresentaram partículas com forma bastante similar ao visto anteriormente em TEM, porém, através da análise de FFT, é possível verificar sua estrutura interna. Também foi possível verificar nas micrografias de Crio-TEM algumas vesículas em solução. Todas as concentrações de CNZ apresentaram cubossomos com estrutura interna bem definida, características de organizações cúbicas, mesmo que em diferentes planos, como vemos na análise de FFT. Na concentração 0,2 mg/mL de CNZ não foi possível obter uma FFT com resolução desejável, devido ao baixo contraste da imagem, o software ImageJ teve dificuldade de realizar os cálculos necessários. Ainda assim é possível identificar que as nanopartículas apresentam estrutura interna. As imagens encontradas estão de acordo com o relatado em literatura. (KLUZEK et al, 2017) (FORNASIER et al., 2020)

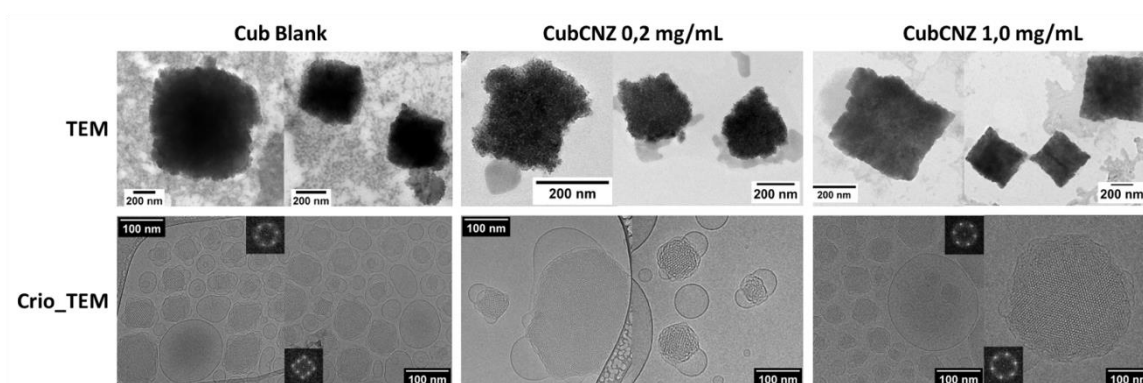


Figura 21: Micrografias de TEM e Crio-TEM para cubossomos brancos e com CNZ nas concentrações 0,2 mg/mL e 1,0 mg/mL. Bem como o cálculo de FFT referente as micrografias de Crio-TEM.

Apesar da Crio-TEM ser relatada na literatura como a técnica mais adequada para a análise estrutural de cubossomo, podemos verificar que na falta dela, encontramos resultados bem consistentes de TEM, uma técnica mais barata e acessível. Possibilitando verificar a estrutura cúbica das nanopartículas com clareza.

O potencial zeta de formulações é um dos fatores que determina a estabilidade física de suspensões coloidais, quanto maior a repulsão eletrostática entre as partículas maior será a sua estabilidade. No caso dos cubossomos, estabilizantes com alta massa molecular, como o Pluronic F127, confere alta estabilidade mesmo em amostras com potencial zeta menor que 20 mV. (MISHRA et al., 2009) A estabilização estérica pelo tensoativo não-iônico Pluronic F127 na superfície das nanopartículas forneceu valores de potencial zeta entre -33 e -10 mV nas nanopartículas (figura 30). Após a encapsulação de CNZ, houve um aumento nos valores, sugerindo que a droga interferiu ativamente na carga dos cubossomos. (REMINGTON, 2006)

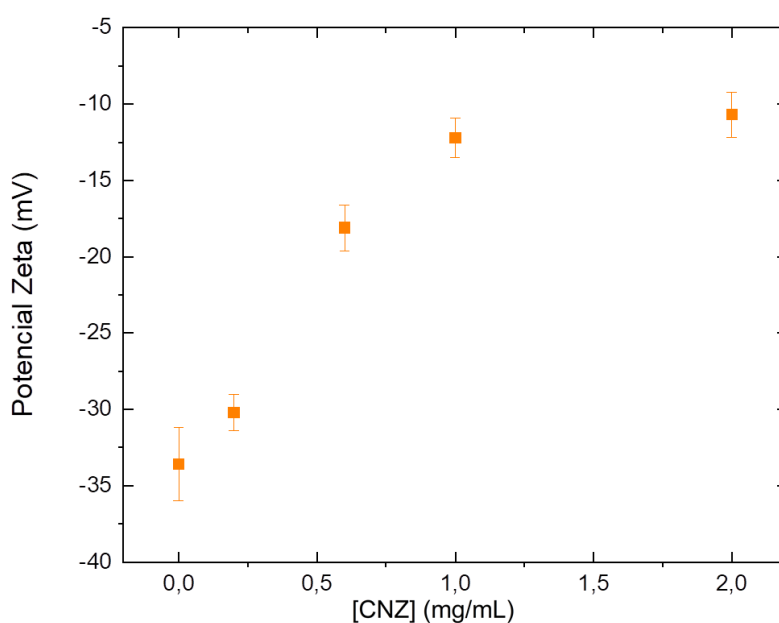


Figura 22: Dados de potencial zeta obtidos para cubossomos de MYV brancos e com CNZ nas concentrações 0,2 mg/mL, 0,6 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL

Foi realizada também a análise de pH, a fim de verificar a estabilidade e aplicabilidade das nanopartículas, os resultados são apresentados na figura 31. Todas as amostras apresentaram valores de pH de ~5,5. Não foi verificada grandes alterações de pH entre as amostras, mesmo após a encapsulação de CNZ. Porém, este pH é muito ácido para aplicação intravenosa, e precisaria ser corrigido para valores próximos a 7,4, valor do pH sanguíneo. Alterações abruptas de pH no sangue podem gerar alterações metabólicas, limitando a aplicação das nanopartículas. (KELLUM, 2000)

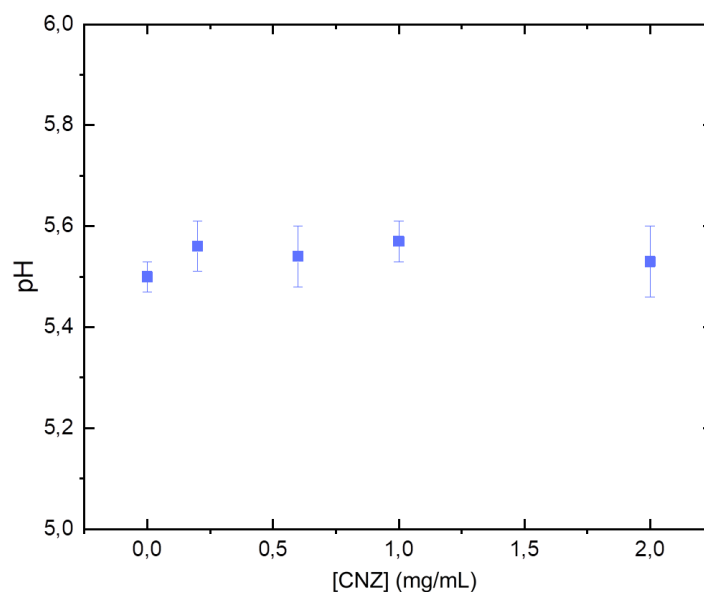


Figura 23: pH de amostras de MYV para cubossomos branco e com diferentes concentrações de CNZ

A encapsulação da CNZ foi quantificada através de HPLC. A figura 32 apresenta o cromatograma das amostras analisadas a esquerda, cujos picos são visualizados em um tempo de retenção de 7,5 minutos. Não foram observados outros picos em tempo de retenção similar que pudessem interferir na quantificação da amostra. Os cubossomos brancos também foram analisados nas mesmas condições e não houve picos de impurezas dos componentes que pudessem gerar interferência na análise. Desta forma, a especificidade da técnica foi determinada.

A curva analítica (figura 32, a direita) também foi gerada a partir de padrões de CNZ diluídos em metanol, nas concentrações de 10 a 60 $\mu\text{g/mL}$, para verificar a linearidade do método e quantificar a CNZ efetivamente encapsulada. Todas as medidas foram realizadas em triplicata para obter melhores estatísticas. O coeficiente de correlação (r) foi 0,998.

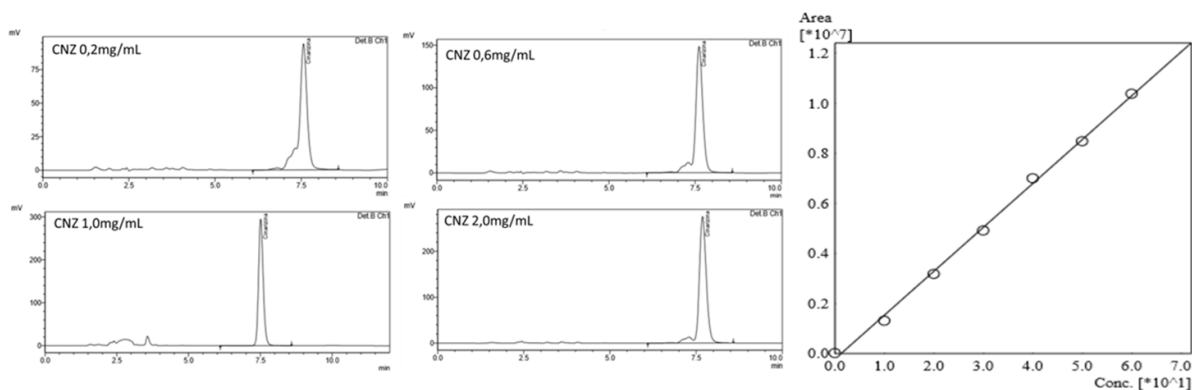


Figura 24: A esquerda temos o cromatograma para amostras de cubossomos com diferentes concentrações de CNZ, obtidos por HPLC. A direita, Curva analítica padrão para quantificação de CNZ, na faixa de concentração de 10-60 $\mu\text{g/mL}$.

Regressões lineares foram utilizadas para calcular a concentração de CNZ encapsulada, a partir da área dos picos das amostras (figura 33), geradas pelo próprio software do equipamento de HPLC. Com os valores de concentração foi possível calcular o percentual efetivo de encapsulação. Os valores percentuais de eficiência de encapsulação (%EE) variaram bastante, indo de 98% a 27%. O limite superior de encapsulação de CNZ foi de 0,55 mg/mL. Conforme descrito em literatura, a solubilidade da CNZ em GMO é de $\sim 29,9 \pm 0,7$ mg/g, ao calcularmos a solubilidade da CNZ em relação ao percentual de GMO em solução nas amostras, obtemos um valor de 0,6 mg/ml, compatível com os valores experimentais observados. (NGUYEN et al., 2010)

A concentração de CNZ encapsulada aumenta no sentido a atingir um platô de valor máximo, enquanto o percentual de encapsulação é bastante variável, conforme vemos na figura 33, a seguir. Essa variação é dada devido ao fato de após atingir a concentração máxima de encapsulação, a CNZ excedente fica livre em solução. O cálculo percentual depende ativamente da concentração inicial que se deseja encapsular, assim, esse percentual acaba tendo grandes variações. Portanto, não importa a concentração de CNZ inicial da amostra, após atingir o limite máximo superior, não haverá diferença na concentração final encapsulada efetivamente.

Variações no percentual de CNZ encapsulada também podem ocorrer devido a perdas no processo de obtenção da amostra ou mesmo no processamento prévio que a amostra passa para análise por HPLC. Este fator deve ser considerado por conta da sensibilidade da técnica.

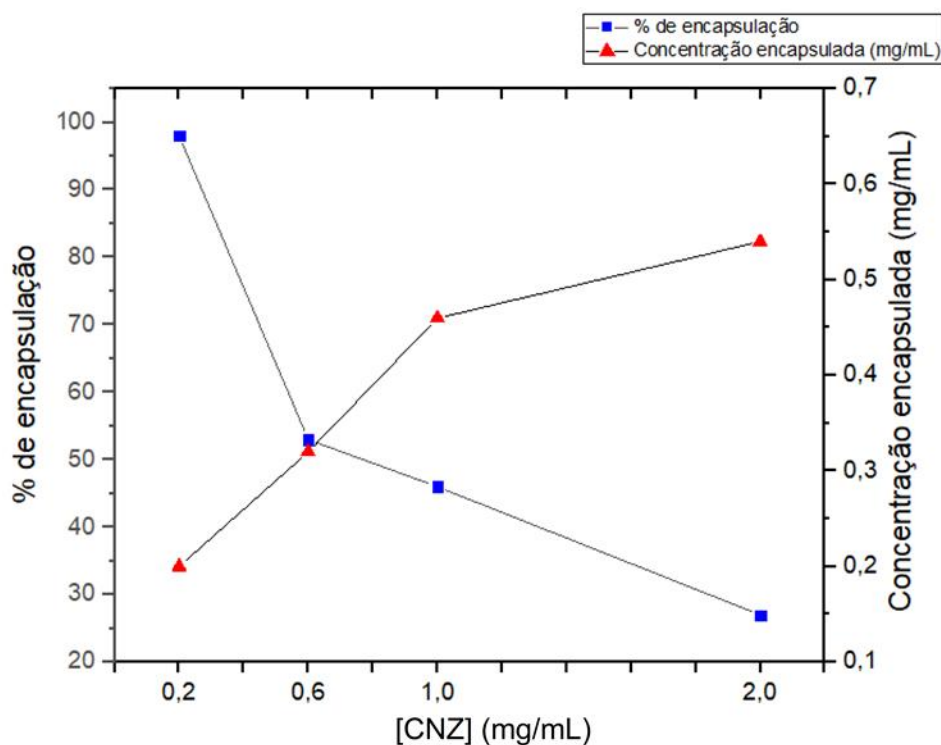


Figura 25: Gráfico de correlação entre o percentual de encapsulação, concentração encapsulada e concentração inicial de CNZ. Os valores foram obtidos a partir de regressões lineares da área a baixo dos picos do cromatograma, obtido por HPLC.

Cabe ressaltar que o estudo da liberação de CNZ, que seria complementar a análise de HPLC, estava em andamento. Esses dados seriam importantes para a conclusão do trabalho, mas, devido a pandemia de Covid-19, e tendo em vista que estes ensaios eram feitos em parcerias com outros grupos de pesquisa, os resultados ainda não estão disponíveis no presente momento.

A figura 34 representa a curva hemolítica obtida para cubossomos em ausência e presença de CNZ em diferentes concentrações, sob condições isotônicas, pH 7,4 e 37°C. Através desses experimentos foi possível determinar a hemocompatibilidade dos nanocarreadores. A atividade hemolítica da CNZ livre não pode ser testada devido a sua baixíssima solubilidade em água ($\log P = 5,77$). Todas as análises foram realizadas em triplicata, possibilitando maior precisão e cálculo do desvio padrão.

As curvas hemolíticas obtidas (figura 34) descrevem um comportamento característico, onde se observa inicialmente uma alta atividade hemolítica de cubossomos brancos, sempre superior a 60%. Quando testamos amostras com CNZ, uma queda da atividade hemolítica é nítida, sendo inferior a 30% em todas as

concentrações. Isso provavelmente ocorre devido a alteração da estrutura cristalina dos cubossomos quando a CNZ é encapsulada (lembrando que a CNZ induz uma transição de fase de Im3m para Pn3m, de acordo com nossas análises de SAXS), levando a uma diminuição da hemólise em pelo menos 50%. Na concentração de 0,6 mg/mL de CNZ, concentração considerada ótima segundo dados anteriores de HPLC, a taxa de hemólise cai tanto, chegando a ser inferior a 10%, evidenciando ainda mais essa diminuição.

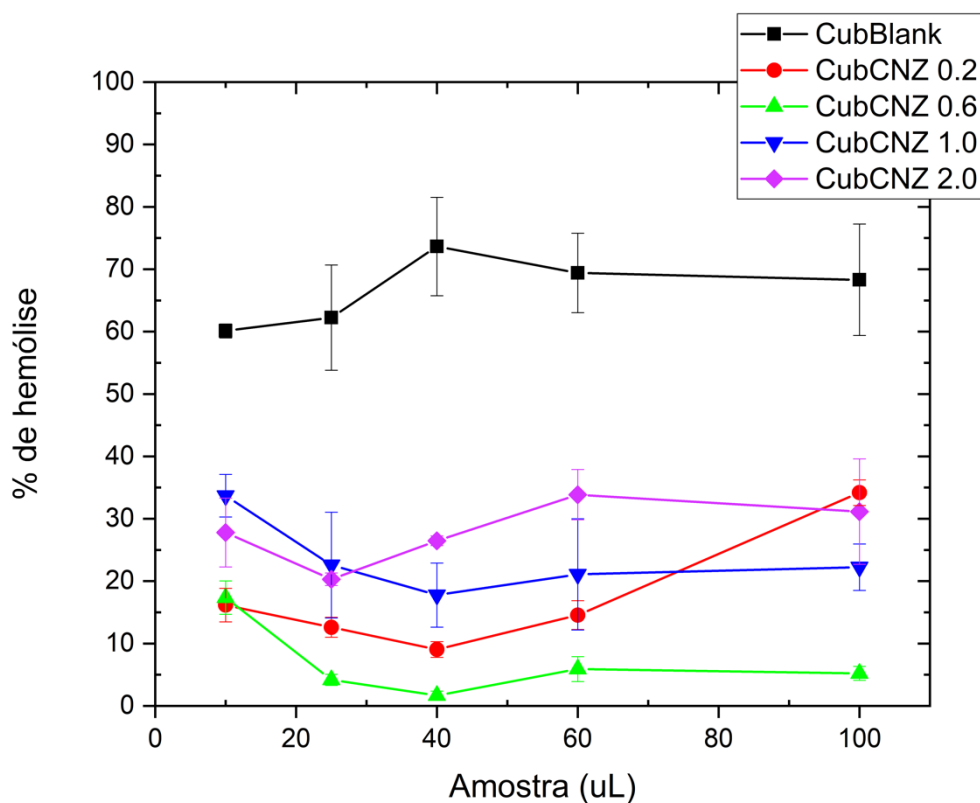


Figura 26: Efeito hemolítico de cubossomos brancos e com CNZ sobre eritrócitos. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Ao analisarmos a curva de citotoxicidade em relação à concentração de CNZ (figura 35), percebemos que a atividade hemolítica decai inicialmente e depois volta a se elevar até atingir um valor máximo que se mantém. Ainda assim, o percentual máximo da atividade hemolítica de cubossomos com CNZ, ~30%, é bastante inferior a cubossomos brancos.

Essa estrutura da curva hemolítica, apresentada na figura 35, reafirma a hipótese de a fase cristalográfica Pn3m ser menos agressiva aos eritrócitos. Inicialmente, na concentração 0,2 mg/mL de CNZ, ainda apresentamos uma coexistência de ambas as

fases, Pn3m e Im3m, assim sua atividade é superior a amostras com a concentração 0,6 mg/mL de CNZ. Quando aumentamos a concentração do fármaco, o percentual de hemólise volta a subir ligeiramente, mas ainda bastante inferior as amostras de cubossomos brancos.

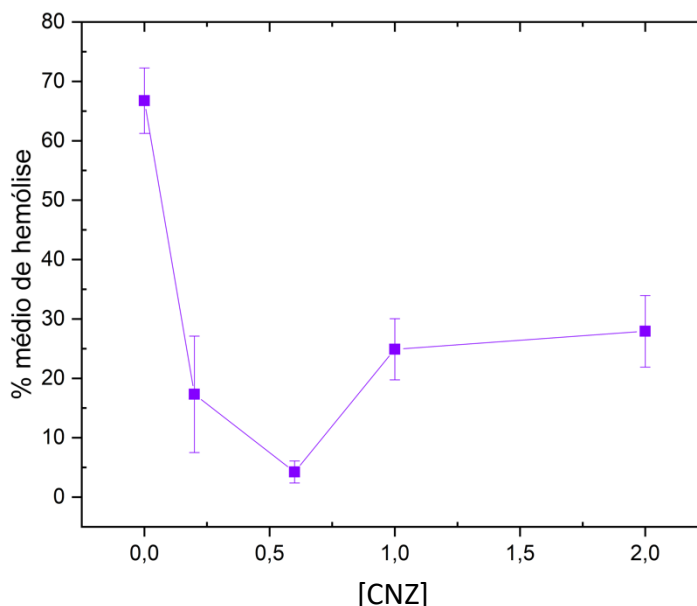


Figura 27: Efeito hemolítico médio de cubossomos brancos e com CNZ sobre eritrócitos, correlacionados diretamente a concentração de CNZ presente na amostra.

A citotoxicidade do nanocarreador representa uma das complicações mais importantes que os pesquisadores que trabalham na área de *drug delivery* têm que resolver. No caso dos cubossomos, essa toxicidade é exercida principalmente para os eritrócitos, conforme apontado por diversos estudos. (BARAUSKAS et al.,2010) (BODE et al , 2013) (FORNASIER et al., 2020)

Há evidências que a morfologia da fase cúbica e a arquitetura da superfície podem afetar a citotoxicidade dos cubossomos. Descobriu-se que os cubossomos à base de PHY são mais tóxicos que GMO, já que a fase cúbica e o lipídio constituinte são as principais fontes de toxicidade, e não o F127. (HINTON et al., 2014) A incorporação de drogas em cubossomos ou proteínas, segundo a literatura, influenciam nessa citotoxicidade, conforme observado na figura 35, assim como o esperado. Inicialmente, se imaginava que cubossomos com CNZ seriam menos hemolíticos, devido a sua

atividade impactante na microcirculação e diminuição da viscosidade sanguínea. (BARRIGA, HOLME, STEVENS, 2018)

5. Conclusão

No presente estudo, primeiramente, avaliamos a influência de diferentes solventes (acetona, clorofórmio, etanol e octano) nas propriedades estruturais de cubossomos de PHY, em relação às mudanças nos parâmetros estruturais internos, a fim de minimizar os efeitos do solvente utilizados para a encapsulação da CNZ. Para amostras com acetona, descobriu-se que na presença de quantidades inferiores a 17% não foram capazes de alterar significativamente nem a estrutura interna dos cubossomos, nem o parâmetro de célula unitária. Em concentrações mais altas (superior a 17%), uma transição da fase cúbica para micelar foi observada. O etanol fez com que o parâmetro de rede aumentasse de 10-15% conforme mais moléculas eram adicionadas ao sistema. Tais diferenças foram atribuídas à posição do solvente orgânico na bicamada do cubossomo. O clorofórmio e o octano tiveram efeitos diferentes sobre cubossomos de PHY em comparação com a acetona e o etanol; ambos induziram uma transição cúbico-hexagonal-micelar. A principal diferença está sobre a quantidade de moléculas que foram necessárias para induzir cada transição, 4 vezes maior para o octano.

Quanto à reversibilidade da interferência dos solventes, constatamos que ela é parcial, devendo ser avaliada caso a caso. Desta forma, salientamos que os pesquisadores devem tentar usar solventes menos prejudiciais para produzir ou incorporar drogas hidrofóbicas em cubossomos. Esta medida auxilia também em outras pesquisas, facilitando a determinação se as alterações foram provocadas pelo solvente, ou pela droga introduzida no sistema.

Como segunda parte do projeto, verificamos a encapsulação de CNZ em cubossomos de dois lipídios diferentes, fitantriol e myverol. Devido a problemas com a baixa solubilidade de CNZ em PHY, e conseqüentemente sua baixa eficiência de encapsulação, concluímos que este lipídio não era adequado para a produção do sistema proposto, e desta forma este protocolo foi abandonado durante o projeto.

Os cubossomos foram produzidos a base de MYV, considerado o lipídio mais adequado para esse projeto, por ser análogo a GMO, na qual o fármaco possuía maior solubilidade e apresentar um custo reduzido.

Para cubossomos livres, sem CNZ, as nanopartículas apresentaram estrutura cristalográfica $Im3m$, diferentemente das amostras de PHY. O parâmetro de rede calculado neste caso foi de $11,12 \pm 0,11$ nm. Ao encapsular a CNZ, verificamos através de DLS a influência direta da droga no tamanho dos cubossomos, o mesmo não aconteceu para as análises por TEM/Crio-TEM e NTA, nos levando a questionar se o aumento do tamanho aconteceu ou foi alguma aproximação relacionada atécnica. As micrografias apresentaram nanopartículas quadradas, com estrutura interna bem definida e característica dos cubossomos. Todas as amostras eram monodispersas e as alterações de pH não foram significativas.

Em uma concentração de 0,2 mg/mL de CNZ existe uma coexistência de estruturas cúbicas $Im3m$ e $Pn3m$. Concentrações superiores mantêm sua estrutura cubica apenas $Pn3m$. O potencial zeta aumenta de acordo com o aumento da concentração de CNZ, mas as amostras não perderam sua estabilidade coloidal. A encapsulação de CNZ também foi dosada por HLPC em cubossomo de MYV, obtendo um limite superior de 0,6 mg/mL. A atividade citotóxica dos cubossomos foi testada em eritrócitos, revelando que a estrutura $Pn3m$ apresentada em cubossomos com CNZ foi menos hemolítica.

6. Perspectivas

No futuro, cubossomos devem ser avaliados quanto à taxas de liberação da CNZ encapsulada. Além disso, um teste de citotoxicidade em células humanas deve ser feito para investigar se essas nanopartículas são adequadas para *drug delivery*. Ensaio *in vitro* e *in vivo* devem ser feitos para avaliar a eficiência de entrega da CNZ. E finalmente, as etapas de interação de cubossomos com os solventes orgânicos devem evoluir, estudando também outros lipídios e cubossomos com composições diferenciadas.

7. Referências

- AKBAR, S. et al. Phytantriol based smart nano-carriers for drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 1, p. 31–42, 2017.
- AKHLAGHI, S. P.; RIBEIRO, I. R.; BOYD, B. J.; LOH, W. Impact of preparation method and variables on the internal structure, morphology, and presence of liposomes in phytantriolpluronic® {F127} cubosomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 845 – 853, 2016.
- AKHLAGHI, S.P., LOH, W. Interactions and release of two palmitoyl peptides from phytantriol cubosomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 117, p. 60–67, 2017.
- AKHTER, M. H. et al. Nanocarriers in advanced drug targeting: setting novel paradigm in cancer therapeutics. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. 5, p. 873–884, 2018.
- ALCARAZ, N. et al. Clickable Cubosomes for Antibody-Free Drug Targeting and Imaging Applications. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 149–157, 2018.
- ASTOLFI, P. et al. Lyotropic Liquid-Crystalline Nanosystems as Drug Delivery Agents for 5-Fluorouracil: Structure and Cytotoxicity. **Langmuir**, v. 33, n. 43, p. 12369–12378, 2017.
- ATKINS, P.W., Jones, L., Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5ª ed., Porto Alegre: Ed. **Bookman**, 2012.
- AZHARI, H. et al. Cubosomes enhance drug permeability across the blood–brain barrier in zebrafish. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 600, 2021.
- AZMI, I. D. M.; MOGHIMI, S. M.; YAGHMUR, A. Cubosomes and hexosomes as versatile platforms for drug delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 6, n. 12, p. 1347–1364, 2015.
- BARAUSKAS, J. et al. Interactions of lipid-based liquid crystalline nanoparticles with model and cell membranes. **Int. J. Pharm.**, v. 391, p. 284-291, 2010.
- BARAUSKAS, J.; LANDH, T. Phase Behavior of the Phytantriol/Water System. **Langmuir**, v. 19, n. 23, p. 9562–9565, 2003.
- BARRIGA, H. M. G.; HOLME, M. N.; STEVENS, M. M. Cubosomes: The Next Generation of Smart Lipid Nanoparticles? **Angew. Chem. Int**, v. 57, p. 2 – 23, 2018.
- BASU, B., et al. Formulation and evaluation of fast dissolving tablets of cinnarizine using superdisintegrant blends and subliming material. **J Adv Pharm Technol**. v. 2, n. 4, p. 266-273, 2011.
- BESSONE, C. D. V. et al. Latanoprost-loaded phytantriol cubosomes for the treatment of glaucoma. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 160, 2021.
- BHOSALE, R. R. et al. Cubosomes: The Inimitable Nanoparticulate Drug Carriers. **Scholars Academic Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 6, p. 481-486, 2013.

- BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 941–951, 2015.
- BODE, J. C. et al. Interaction of dispersed cubic phases with blood components. **Int. J. Pharm.**, v. 448, p. 87-95, 2013.
- BRITAIN, H. G. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. **Academic Press**. v. 40, 2015.
- BURROWS, N. D.; PENN, R. L. Cryogenic Transmission Electron Microscopy: Aqueous Suspensions of Nanoscale Objects. **Microscopy and Microanalysis**, v. 19, n. 6, p. 1542–1553, 2013.
- CASTRO, R.D. d, et al. SCryPTA: a web-based platform for analyzing small-angle scattering curves of lyotropic liquid crystals. **bioRxiv**. 791848, 2019.
- CFR - **Code of Federal Regulations**. Title 21 - Sec. 184.1323 Glyceryl monooleate. 2008 revisado 2020
- CHEREZOV LAB. LCP Resources. Disponivel em <<https://cherezov.usc.edu/resources.htm>> Acesso em 14 jan. 2021. 15hs 57mins
- CHIARI-, B. G. et al. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 4991–5011, 2017.
- CHONG, J. Y. T. et al. High-throughput discovery of novel steric stabilizers for cubic lyotropic liquid crystal nanoparticle dispersions. **Langmuir**, v. 28, n. 25, p. 9223–9232, 2012.
- CHONG, J. Y. T. et al. Steric stabilisation of self-assembled cubic lyotropic liquid crystalline nanoparticles: high throughput evaluation of triblock polyethylene oxide-polypropylene oxide-polyethylene oxide copolymers. **Soft Matter**, v. 7, n. 10, p. 4768–4777, 2011.
- CLOGSTON, J. et al. Phase behavior of a monoacylglycerol: (Myverol 18-99K)/water system. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 107, n. 2, p. 191–220, 2000.
- DANINO, D. Cryo-TEM of soft molecular assemblies. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 6, p. 316–329, 2012.
- DESHPANDE, S. et al. Octanol-assisted liposome assembly on chip. **Nat Commun**, v. 7, p. 1–9, 2016.
- DESHPANDE, S.; SINGH, N. Influence of Cubosome Surface Architecture on Its Cellular Uptake Mechanism. **Langmuir**, v. 33, n. 14, p. 3509–3516, 2017.
- DOMÍNGUEZ-DELGADO, C. L. et al. Chitosan and Pluronic® F-127: Pharmaceutical Applications. **Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials**, p. 1513-1535, 2016.
- DONG, Y.D. et al. Impurities in commercial phytantriol significantly alter its lyotropic liquid-crystalline phase behavior. **Langmuir**, v. 24, p. 6998–7003, 2008.

- DONG, Y.-D. et al. Nonequilibrium Effects in Self-Assembled Mesophase Materials: Unexpected Supercooling Effects for Cubosomes and Hexosomes. **Langmuir**, v. 26, n. 11, p. 9000–9010, 2010.
- DONG, Y.-D. et al. Understanding the Interfacial Properties of Nanostructured Liquid Crystalline Materials for Surface-Specific Delivery Applications. **Langmuir**, v. 28, n. 37, p. 13485–13495, 2012.
- DRAGOVIC, R. A. et al. Sargent, Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 6, p. 780-788, 2011.
- DRUGBANK. Cinnarizine. Disponível em: < <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00568> >. Acesso em 19 mar. 2018. 15hs 34mins. Drug created on June 13, 2005 13:24 / Updated on February 21, 18:50, 2021.
- DUDKIEWICZ, A. et al. Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 28–43, 2011.
- DUMORTIER, G. et al. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006.
- DYRDA, G. et al. The effect of organic solvents on selected microorganisms and model liposome membrane. **Mol Biol Rep**, v. 46, n. 32, p. 25–32, 2019.
- EISER, E. Dynamic light scattering. **Multi Length-Scale Characterisation**. John Wiley & Sons, Ltd, p. 233–282, 2014.
- ERICSSON, E. M. et al. Glycerol monooleate–blood interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, n. 1, p. 20–26, 2009.
- ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J. et al. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 339-5, 2006.
- ESPOSITO, E. et al. Lipid-based supramolecular systems for topical application: A preformulatory study. **AAPS PharmSci**, v. 5, n. 4, p. 62, 2015.
- FERRARI, M. Beyond drug delivery. **Nature Nanotech**, v. 3, p. 131–132, 2008.
- FILIPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W.. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, 2010.
- FONG, C. et al. Micellar Fd3m cubosomes from monoolein – long chain unsaturated fatty acid mixtures: Stability on temperature and pH response. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 566, p. 98-106, 2020.
- FORD L. et al. API ionic liquids: probing the effect of counterion structure on physical form and lipid solubility. **RSC Adv.**, v. 10, p. 12788-12799, 2020.

FORNASIER, M. et al. Cubosomes stabilized by a polyphosphoester-analog of Pluronic F127 with reduced cytotoxicity. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 580, p. 286-297, 2020.

FRANKEN, L. E.; BOEKEMA, E. J.; STUART, M. C. A. Transmission Electron Microscopy as a Tool for the Characterization of Soft Materials: Application and Interpretation. **Advanced Science**, v. 4, n. 5, p. 1600476, 2017.

FRASER, S. J. et al. Controlling nanostructure and lattice parameter of the inverse bicontinuous cubic phases in functionalised phytantriol dispersions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 408, n. 1, p. 117–124, 2013.

GABALLA, S.A. et al. Preparation and Evaluation of Cubosomes/Cubosomal Gels for Ocular Delivery of Beclomethasone Dipropionate for Management of Uveitis. **Pharm Res**, v. 37, 2020.

GARTI, N. Self-assembled supramolecular architectures: lyotropic liquid crystals. **John Wiley & Sons**, v. 3, 2012.

GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p 1-9, 2008.

GPG. Research interests <<http://www.theonislabs.com/research/>> Acesso em 23 mar. 2021. 15hs 34mins

HARTNETT, T.E. et al. Size and phase control of cubic lyotropic liquid crystal nanoparticles. **J Phys Chem B**, v. 118, n. 9, p. 7430, 2014.

HASSAN, P. A; RANA, S.; VERMA, G. Making sense of brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 31, n. 1, p. 3–12, 2015.

HEDEGAARD, S. F. et al. Nanostructured aqueous dispersions of citrem interacting with lipids and PEGylated lipids. **RSC Advances**, v. 3, n. 46, p. 24576–24585, 2013.

HINTON, T. M. et. al. Bicontinuous cubic phase nanoparticle lipid chemistry affects toxicity in cultured cells. **Toxicol. Res.** v. 3, p. 11 – 22, 2014.

ILIE, A.-R. et al. Exploring precipitation inhibitors to improve in vivo absorption of cinnarizine from supersaturated lipid-based drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 159, 2021.

JARZĘBSKI, M. et al. Particle tracking analysis in food and hydrocolloids investigations. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 90–101, 2017.

JURJ, A. et al. The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 2871–2890, 2017.

KARAMI, Z.; HAMIDI, M. Cubosomes: remarkable drug delivery potential. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 5, p. 789–801, 2016.

KASZUBA, M.; CORBETT, J.; WATSON, F. M.; JONES, A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical Transactions of*

the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, **The Royal Society**, v. 368, n. 1927, p. 4439–4451, 2010

KELLUM, J. A. Determinants of blood pH in health and disease. **Critical Care**, v. 4, n. 1, 2000.

KHATTAK, S. F.; BHATIA, S. R.; ROBERTS, S. C. Pluronic F127 as a Cell Encapsulation Material: Utilization of Membrane-Stabilizing Agents. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 5–6, p. 974–983, 2005.

KHATUN, Z. et al. Elucidating diversity of exosomes: biophysical and molecular characterization methods. **Nanomedicine**, v. 11, n. 17, p. 2359–2377, 2016.

KLUZEK, M., et al. Influence of a pH-sensitive polymer on the structure of monoolein cubosomes. **Soft Matter**, v. 13, n. 41, p. 7571–7577, 2017.

KUMAR, M. U.; BAPPADITYA, C.; MUHAMMAD, T. Advanced characterizations of nanoparticles for drug delivery: investigating their properties through the techniques used in their evaluations. **Nanotechnology Reviews**, v. 6, p. 355, 2017.

LAMIE, N. T.; MONIR, H. H. Simultaneous Determination of Cinnarizine and Dimenhydrinate in Binary Mixture Using Chromatographic Methods. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 1, p. 36–42, 2016.

LARKIN, T. J. et al. Na⁺ and solute diffusion in aqueous channels of Myverol bicontinuous cubic phase: PGSE NMR and computer modelling. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 464–471, 2016.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 3, p. 259-269, 2007.

LEWIS, R.N.A.H. et al. Fourier transform infrared spectroscopic studies of the interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid micelles and with lipid monolayer and bilayer membranes. **Biochemistry**, v. 38, n. 15, p. 193–203, 1999.

LOTIERZO, M.C. G. et al. Cubic-to-inverted micellar and the cubic-to-hexagonal-to-micellar transitions on phytantriol-based cubosomes induced by solvents. **Drug Deliv. and Transl. Res.** v. 10, p. 1571–1583, 2020.

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

LYNCH, M.; SPICER, P. Cubic liquid crystalline compositions and methods for their preparation. **US Patent** 6,773,627. 2004.

MALHEIROS, B. et al. Design and manufacturing of monodisperse and malleable phytantriol-based cubosomes for drug delivery applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, 2021.

- MARIANI, P.; LUZZATI, V.; DELACROIX, H. Cubic phases of lipidcontaining systems. Structure analysis and biological implications. **J Mol Biol**, 1988.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Bioquímica básica. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara **Koogan**, 2007.
- MAZZONI, S. et al. Cytochrome-c Affects the Monoolein Polymorphism: Consequences for Stability and Loading Efficiency of Drug Delivery Systems. **Langmuir**, v. 32, n. 3, p. 873–881, 2016.
- MENG, H. et al. Walking the line: The fate of nanomaterials at biological barriers. **Biomaterials**, v. 174, p. 41– 53, 2018.
- MISHRA, P. R. et al. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1-2, p. 182-189, 2009.
- MO, J.; MILLERET, G.; NAGARAJ, M. Liquid crystal nanoparticles for commercial drug delivery. **Liquid Crystals Reviews**, v. 5, n. 2, p. 69–85, 2017.
- MULLER, F.; SALONEN, A.; GLATTER, O. Monoglyceride-based cubosomes stabilized by Laponite: Separating the effects of stabilizer, pH and temperature. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 358, n. 1, p. 50–56, 2010.
- MUNTIMADUGU, E.; KOMMINENI, N.; KHAN, W. Exploring the Potential of Nanotherapeutics in Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. **Pharmacological Research**, v. 126, p. 109–122, 2017.
- MURGIA, S. et al. Nanoparticles from Lipid-Based Liquid Crystals: Emulsifier Influence on Morphology and Cytotoxicity. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 10, p. 3518–3525, 2010.
- NAGAYAMA, K. Another 60 years in electron microscopy: development of phase-plate electron microscopy and biological applications. **Journal of Electron Microscopy**, v. 60, n. suppl_1, p. S43–S62, 2011.
- NANOCOMPOSIX. Nanoparticle Characterization Techniques. <<https://nanocomposix.com/pages/nanoparticle-characterization-techniques#target>> Acesso em 27 mar. 2021. 14hs 00mins
- 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.
- NAZARUK, E.; MAJKOWSKA-PILIP, A.; BILEWICZ, R. Lipidic Cubic-Phase Nanoparticles—Cubosomes for Efficient Drug Delivery to Cancer Cells. **ChemPlusChem**, v. 82, n. 4, p. 570–575, 2017.
- NESRINE, T. L.; HANY, H. M. Simultaneous Determination of Cinnarizine and Dimenhydrinate in Binary Mixture Using Chromatographic Methods. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 1, p. 36–42, 2016.

NGUYEN, T.-H. et al. Nanostructured liquid crystalline particles provide long duration sustained-release effect for a poorly water soluble drug after oral administration. **Journal of Controlled Release**, v. 153, n. 2, p. 180–186, 2011.

NGUYEN, T.-H. et al. Phytantriol and glyceryl monooleate cubic liquid crystalline phases. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, p. 844–855, 2010.

NIKALJE, A. P., et al. Nanotechnology and its Applications in Medicine. **Medicinal chemistry**, v. 5, n. 2, p. 81-89, 2015.

NILSSON, C. et al. SPECT/CT imaging of radiolabeled cubosomes and hexosomes for potential theranostic applications. **Biomaterials**, v. 34, n. 33, p. 8491–8503, 2013.

OTSUKA ELECTRONICS CO.,LTD. Dynamic Light Scattering Spectrophotometer DLS-8000 series. Disponivel em <<http://www.otsukael.com/product/detail/productid/23/categorylid/2/category2id/2/category3id/32>> Acesso em 27 mar. 2021. 14hs 00mins

PAN, X., et al. Nanostructured Cubosomes as Advanced Drug Delivery System. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 35, 2013.

PATEL, B.; THAKKAR, H.P. Cubosomes: Novel Nanocarriers for Drug Delivery. In: Shah N. (eds) *Nanocarriers: Drug Delivery System*. **Springer**, 2021.

PATEL, H. R. et al. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 2, p. 299–303, 2009.

PHAM, A. C. et al. Examining the gastrointestinal transit of lipid-based liquid crystalline systems using wholeanimal imaging. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 5, n. 6, p. 566–574, 2015.

PILLON, M. C.; GUARNÉ, A. Complementary uses of small angle X-ray scattering and X-ray crystallography. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 11, p. 1623–1630, nov. 2017.

PILZ, I.; GLATTER, O.; KRATKY, O. Small-angle x-ray scattering. In: **Enzyme Structure Part H. Methods in Enzymology**. [s.l.] Academic Press, v. 61p. 148–249, 1979.

PINTO, E. G.; COSTA-SILVA, T. A.; TEMPONE, A. G. Histamine H1-receptor antagonists against *Leishmania (L.) infantum*: an in vitro and in vivo evaluation using phosphatidylserine-liposomes. **Acta Tropica**. v.137, p. 206–210, 2014.

PRETÉ, P. S. et al. Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction a spin label study. **Biochim Biophys Acta**, v. 1808, p.164-170, 2011.

QIU, H.; CAFFREY, M. The phase diagram of the monoolein/water system: Metastability and equilibrium aspects. **Biomaterials**, v. 21, n. 3, p. 223–234, 2000.

RADAIC, A. et al. Chapter one - how lipid cores affect lipid nanoparticles as drug and gene delivery systems. **Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly**. Academic Press, v. 24, p. 1, 2016.

REMYINGTON, J. P., Remington: **The Science And Practice Of Pharmacy**: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

RESEARCHGATE. Disponível em <https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Esquema-da-linha-de-SAXS-do-Laboratorio-Nacional-de-Luz-Sincrotron-LNLS_fig6_323902876> Acesso em 23 fev. 2021. 13hs 31mins

RIBEIRO, L. N. DE M. et al. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 982, 2018.

RIZWAN, S. B.; BOYD, B. J. Cubosomes: Structure, Preparation and Use as an Antigen Delivery System. Subunit Vaccine Delivery. **Springer New York**, p. 125–140, 2015.

RIZWAN, S.B. et al. Preparation of phytantriol cubosomes by solvent precursor dilution for the delivery of protein vaccines. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 79, p. 15–22, 2011.

ROWE, E.S. Lipid chain length and temperature dependence of ethanol-phosphatidylcholine interactions. **Biochemistry**, v. 22, n. 3, p. 299–305, 1983.

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

SERIEYE, S. et al. Interface tuning and stabilization of monoglyceride mesophase dispersions: Food emulsifiers and mixtures efficiency. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 496, p. 26–34, 2017.

SHARMA, P.; DHAWAN, S.; NANDA, S. Cubosome: A Potential Liquid Crystalline Carrier System. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, 2020.

SHERIF, S.; BENDAS, E. R.; BADAWY, S. The clinical efficacy of cosmeceutical application of liquid crystalline nanostructured dispersions of alpha lipoic acid as anti-wrinkle. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 251–259, 2014.

SHI, X. et al. Comparative studies on glycerol monooleate- and phytantriol-based cubosomes containing oridonin in vitro and in vivo. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 22, n. 3, p. 322–329, 2015.

SPICER, P. T. et al. Novel process for producing cubic liquid crystalline nanoparticles (cubosomes). **Langmuir**, v. 17, n. 19, p. 5748–5756, 2001.

SWEETMAN, S. C. Martindale: The Complete Drug Reference, 33rd ed., **Pharmaceutical Press**, p. 413, 2002.

TAHERI, M. L. et al. Current status and future directions for in situ transmission electron microscopy. **Ultramicroscopy**, v. 170, p. 86–95, 2016.

TAN, A. et al. Self-Assembled Nanostructured Lipid Systems: Is There a Link between Structure and Cytotoxicity?. **Advanced science**, v. 6, n. 3, 2019.

- TONHI, et al. Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE–FR). **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.
- TORCHILIN, V. P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 11, p. 813–827, 2014.
- TURKYILMAZ, S.; ALMEIDA, P.F.; REGEN, S.L. Effects of isoflurane, halothane, and chloroform on the interactions and lateral organization of lipids in the liquid-ordered phase. **Langmuir**, v. 27, n. 5, 2011.
- TYLER, A. I. I.; LAW, R. V; SEDDON, J. M. X-Ray Diffraction of Lipid Model Membranes BT. **Methods in Membrane Lipids**. Springer New York, p. 199–225, 2015.
- USP, 32–NF27 **United State Pharmacopeia**: v. 34, n. 2, p. 341, 2009.
- VAN ‘T HAG, L. et al. Lyotropic liquid crystal engineering moving beyond binary compositional space – ordered nanostructured amphiphile self-assembly materials by design. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 10, p. 2705–2731, 2017.
- VARENNE, F. et al. Multimodal Dispersion of Nanoparticles: A Comprehensive Evaluation of Size Distribution with 9 Size Measurement Methods. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 5, p. 1220–1234, 2016.
- WHITE, S.H. The lipid bilayer as a ‘solvent’ for small hydrophobic molecules. **Nature**, 262:421–2, 1976.
- WHO. O uso clínico do sangue. Disponível em: <
https://www.who.int/bloodsafety/clinical_use/en/Module_P.pdf?ua=1. Acesso em 12 mar. 2021. 18hs 08 mins.
- WOLFGANG, J. W. P.; PFANNENBECKER, U.; HOPPE, U. Standardization of in vitro Red Blood Cell Test for evaluation the acute cytotoxic potential of tensides. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 40(I), n. 4, p. 498-502, 1990.
- WOLFGANG, J. W. P.; PFANNENBECKER, U.; HOPPE, U. Validation of Red Blood Cell Test System as in Vitro Assay for the Rapid Screening of Irritation Potential of Surfactants. **Molecular Toxicology**, v. 1, p. 525- 536, 1987.
- YAGHMUR, A.; TRAN, B.V.; MOGHIMI, S.M. Non-Lamellar Liquid Crystalline Nanocarriers for Thymoquinone Encapsulation. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 16, 2020.
- YOUNUS, M. et al. Bulk and dispersed aqueous behaviour of an endogenous lipid, selachyl alcohol: Effect of Tween 80 and Pluronic F127 on nanostructure. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 135–142, 2018.
- ZABARA, M. et al. Multifunctional Nano-Biointerfaces: Cytocompatible Antimicrobial Nanocarriers from Stabilizer-Free Cubosomes. **Advanced functional materials**, v. 29, n. 35, 2019.
- ZHANG, L. et al. Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 83, n. 5, p. 761–769, 2008.

ZHOU, W.; SU, M.; CAI, X. Advances in nanoparticle sizing in suspensions: Dynamic light scattering and ultrasonic attenuation spectroscopy. **KONA Powder and Particle Journal**, v. 2017, n. 34, p. 168–182, 2017.