

Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico para incorporação de rapamicina no tratamento do câncer de mama

Camila Fernanda Rodero

Orientador: Marlus Chorilli

ARARAQUARA - SP

2022

CAMILA FERNANDA RODERO

**Avaliação do potencial de carreadores lipídicos
nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico para
incorporação de rapamicina no tratamento do câncer de mama**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e
Medicamentos, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

ARARAQUARA - SP

2022

R355a Rodero, Camila Fernanda.
Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico para incorporação de rapamicina no tratamento do câncer de mama / Camila Fernanda Rodero. – Araraquara: [S.n.], 2021.
116 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marlus Chorilli.

1. Câncer de mama. 2. Carreadores lipídicos nanoestruturados. 3. Funcionalização. 4. Ácido fólico. 5. Rapamicina. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico para incorporação de rapamicina no tratamento do câncer de mama

AUTORA: CAMILA FERNANDA RODERO

ORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Prof. Dr. GUILHERME MARTINS GELFUSO (Participação Virtual)
Faculdade de Farmácia / Universidade de Brasília

Profa. Dra. STEPHANIA FLEURY TAVEIRA (Participação Virtual)
Faculdade de Farmácia / Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. IRENE CLEMES KULKAMP GUERREIRO (Participação Virtual)
Departamento de Produção de Matéria-Prima / Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. PRISCYLA DANIELY MARCATO GASPARI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

Araraquara, 10 de dezembro de 2021

Agradecimentos

Inicialmente, agradeço a Deus e aos bons espíritos por toda a ajuda, me encorajando sempre a ser forte e persistente.

À minha família Schirley, Mariangela, Dodo, Pamela, Mariana, Manuela e Everaldo, que sempre me apoiaram e incentivaram aos estudos. Esses anos foram de muitas batalhas e muitas vitórias, e tenho certeza que se não fosse pelo amor da minha família não teria conseguido vencer e chegar até o fim ainda mais forte.

Ao meu noivo Ivan Veloso que em toda essa trajetória me ajudou a superar os maiores desafios da minha vida. E que nesse um ano separados por um oceano, o nosso amor ficou ainda mais fortalecido. Obrigada por estar mais de dez anos ao meu lado e me fazer muito feliz. Te amo infinitamente.

Muito obrigada a essa família do coração, Nene, Sandra, Heloisa, Alan, Fernando e Vera, que nos momentos de maior dificuldade me estenderam a mão e me ensinaram a levantar e seguir no caminho do bem. Amo muito vocês.

Agradeço com enorme carinho a Professora Dra. Tais Maria Bauab por sempre acreditar e torcer por mim nesta longa trajetória.

Para meu estimado orientador e Professor Dr. Marlus Chorilli, pela benevolência ao corrigir mil vezes meus relatórios, dedicação de sempre estar disponível e ajudando de todas as formas possíveis e impossíveis a todos seus alunos, que são muitos, pelo carinho e preocupação que sempre teve comigo, pois nesses anos de mestrado e doutorado juntos aprendi muito com o senhor. Muito obrigada por nunca me deixar desistir.

Realizei muitas novas amizades na UNESP com os funcionários e gostaria de deixar aqui meus agradecimentos por todos esses anos que me ajudaram, me receberam muito bem, com um enorme sorriso, um bom dia com alegria, um ombro amigo quando necessitava conversar. Levarei vocês no meu coração, muito obrigada.

Às meninas da pós-graduação que sempre com muito carinho me receberam até mesmo fora dos horários, vocês contribuíram muito com meu trabalho e só tenho a agradecer por tudo.

Por todos os colaboradores do meu trabalho que foram muitos, o Laboratório de Química Farmacêutica, Laboratório CMAF, Laboratório de Análise Térmica e Laboratório de Patologia geral/bucal.

Ao Professor Dr. Juan Manuel Irache Garreta, por todo o conhecimento adquirido nesse um ano em seu laboratório na Universidade de Navarra, Pamplona, Espanha realizando meu doutorado sanduiche.

Às grandes amigas que fiz no laboratório trabalhando, aprendendo, ajudando, rindo, chorando, não importava o que precisasse nós sempre estávamos todos os dias juntos, e sempre nos ajudando. Obrigada Kaio, Mariana, Jéssica, Fernanda, Natália, Leda, Matheus, Luciana, Francesca, Paula e Maurício por todo o conhecimento transmitido.

Obrigada a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão inicial de bolsa, código de financiamento 001.

Agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de doutorado (2017/22758-3) e pela bolsa BEPE (2019/18211-4).

De um modo geral, deixo minha imensa gratidão a todas as pessoas da UNESP que me auxiliaram a realizar esta tese, meus agradecimentos.

“As pessoas acreditam que o mais importante é saber o que possuímos, que cargo ocupamos, porém o que mais importa na vida é a luz que fazemos brilhar em nós mesmos.”

Chico Xavier

Resumo

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo. Dentre os fármacos candidatos à utilização no tratamento deste tipo de câncer tem-se a rapamicina que é capaz de inibir a proteína mTOR, controlando seu crescimento e progressão no ciclo celular. No entanto, é um fármaco lipofílico, sofre sequestro por eritrócitos e dispõe de instabilidade química, fatores que comprometem sua biodisponibilidade. Desta maneira, sua incorporação em carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico pode ser uma estratégia interessante, pois este sistema pode proteger o fármaco de possíveis degradações, além de proporcionar ação mais lenta e sustentada. A funcionalização dos carreadores com ácido fólico possibilita a liberação do fármaco no local-alvo mediante ligação com receptores de folato que são expressos em grande quantidade por uma variedade de células tumorais, dentre elas as de mama. Frente ao exposto, o objetivo foi desenvolver e caracterizar carreadores funcionalizados com ácido fólico para incorporação de rapamicina e avaliar o seu potencial no tratamento do câncer de mama. Foram desenvolvidos seis diferentes carreadores, que apresentaram valores de diâmetro hidrodinâmico médio de $97,29 \pm 0,79$ a $119,05 \pm 0,23$ nm respectivamente, e valores de potencial zeta de $-12,45 \pm 0,48$ a $-28,75 \pm 0,16$ mV, respectivamente. Todas as formulações apresentaram morfologia esférica e em nanoescala, segundo análises de microscopia eletrônica de transmissão. As análises térmicas apresentam um evento de fusão em 50°C , o qual é endotérmico, mostrando um novo composto. A funcionalização do lipídio com ácido fólico foi confirmada por análises de espectrofotometria no ultravioleta visível, por ressonância magnética nuclear e espectroscopia vibracional na região do infravermelho. A quantificação da rapamicina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, mostrando estar dentro dos parâmetros requeridos e preconizados pela ANVISA e ICH, apresentando linearidade de $R^2=0,99$, precisão e robustez. Os ensaios de eficiência de encapsulação evidenciaram que o carreador consegue encapsular cerca de 95% do fármaco. O ensaio de liberação evidenciou para os carreadores funcionalizados a liberação de 82% de rapamicina após 16 horas, já o carreador não funcionalizado liberou cerca de 45% do fármaco no mesmo período. Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade evidenciaram que carreadores não apresentaram toxicidade frente às linhagens celulares LEWIS, MCF-7 e MCF10-A. Para o sistema, observou-se IC_{50} de 84, 176 e 110nM, respectivamente e para a rapamicina livre o IC_{50} frente às mesmas linhagens celulares foram 81,8, 141 e 95nM, respectivamente. A microscopia confocal evidenciou a internalização celular do sistema incorporada com DiO em linhagens MCF-7 e LEWIS. Os dados de citometria de fluxo corroboram os de microscopia confocal, sugerindo que a internalização da formulação. O modelo alternativo de *Caenorhabditis elegans*, demonstrou que a formulação não apresenta toxicidade. O modelo xenográfico *in vivo* de câncer de mama evidenciou que sistema, tanto administrado pela via intravenosa quanto intraperitoneal, no período de 18 dias de tratamento, levou a regressão do tumor, apresentando diferença estatística em relação aos controles. Os resultados sugerem que o carreador contendo rapamicina e funcionalizado com ácido fólico apresenta potencial promissor para o tratamento de câncer de mama.

Palavras-chave: câncer de mama; carreadores lipídicos nanoestruturados; funcionalização; ácido fólico; rapamicina.

Abstract

Breast cancer is the second most common type of cancer in the world. Among the candidate drugs for use in the treatment of this type of cancer is rapamycin, which is capable of inhibiting the mTOR protein, controlling its growth and progression in the cell cycle. However, it is a lipophilic drug, undergoes sequestration by erythrocytes and has chemical instability, factors that compromise its bioavailability. Thus, its incorporation in nanostructured lipid carriers functionalized with folic acid can be an interesting strategy, as this system can protect the drug from possible degradation, in addition to providing slower and more sustained action. Functionalization of carriers with folic acid enables drug release at the target site by binding to folate receptors that are expressed in large amounts by a variety of tumor cells, including breast cells. Based on the above, the objective was to develop and characterize carriers functionalized with folic acid for incorporation of rapamycin and to evaluate its potential in the treatment of breast cancer. Six different carriers were developed, which presented mean hydrodynamic diameter values from 97.29 ± 0.79 to 119.05 ± 0.23 nm respectively, and zeta potential values from -12.45 ± 0.48 to $-28, 75 \pm 0.16$ mV, respectively. All formulations showed spherical and nanoscale morphology, according to transmission electron microscopy analyses. Thermal analysis shows a fusion event at 50°C , which is endothermic, showing a new compound. The functionalization of the lipid with folic acid was confirmed by spectrophotometric analysis in the visible ultraviolet, by nuclear magnetic resonance and vibrational spectroscopy in the infrared region. Quantification of rapamycin was performed by high-performance liquid chromatography, showing that it was within the parameters required and recommended by ANVISA and ICH, with linearity of $r^2=0.99$, precision and robustness. Encapsulation efficiency tests showed that the carrier can encapsulate about 95% of the drug. The release assay showed for the functionalized carriers the release of 82% of rapamycin after 16 hours, while the non-functionalized carrier released about 45% of the drug in the same period. In vitro cytotoxicity assays showed that carriers did not show toxicity against LEWIS, MCF-7 and MCF10-A cell lines. For the system, it was observed IC_{50} of 84, 176 and 110nM, respectively, and for free rapamycin the IC_{50} against the same cell lines were 81.8, 141 and 95nM, respectively. Confocal microscopy evidenced the cellular internalization of the system incorporated with DiO in MCF-7 and LEWIS lines. Flow cytometry data corroborate those from confocal microscopy, suggesting the internalization of the formulation. The alternative model of *Caenorhabditis elegans* demonstrated that the formulation does not present toxicity. The in vivo xenographic model of breast cancer showed that the system, both administered intravenously and intraperitoneally, within 18 days of treatment, led to tumor regression, showing a statistical difference in relation to controls. The results suggest that the carrier containing rapamycin and functionalized with folic acid has promising potential for the treatment of breast cancer.

Keywords: breast cancer; nanostructured lipid carriers; functionalization; folic acid; rapamycin.

Lista de Figuras

Figura 1. Molécula da rapamicina.	17
Figura 2. Mecanismos de ação da rapamicina na célula.	18
Figura 3. Esquema representativo da síntese de funcionalização do lipídio DSPE-PEG-NH ₂ juntamente com o ácido fólico, formando uma nova molécula sintetizada.	37
Figura 4. Fotomicrografias das células estudadas MCF-7, LEWIS e MCF10-A, respectivamente.	44
Figura 5. <i>C. elegans</i> corado com vermelho do Nilo no estágio L4.	46
Figura 7. Espectrofotometria UV/Visível mostrando os tempos de 12, 24, 36, 48, 60h da síntese de DSPE-PEG-NH ₂ juntamente com ácido fólico, possibilitando verificar a perda de ácido fólico ao longo dos tempos e obtendo o lipídio DSPE-PEG-AF.	49
Figura 8. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho podendo verificar as bandas do ácido fólico (AF), do lipídio DSPE-PEG-NH ₂ e o lipídio funcionalizado (DSPE-PEG-AF).	50
Figura 9. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho das formulações CLN, CLN -AF, e os CLN contendo fármaco de 1% a 5% (CLN-AF-RAP1, CLN-AF-RAP3, CLN-AF-RAP5) e CLN 1% (não funcionalizado com 1% rapamicina).	51
Figura 10. Espectros de RMN de ¹ H representando o lipídio livre (DSPE-PEG-NH ₂), ácido fólico livre (AF) e a síntese do lipídio ligado ao ácido fólico (DSPE-PEG-AF).	53
Figura 11. Tamanho PDI e potencial zeta dos CLN versus tempo em dia (média ± desvio padrão; n = 5). As letras iguais representam similaridade.	55
Figura 12. Microscopia eletrônica de transmissão obtida para as amostras A (CLN), B (CLN-AF), C (CLN-AF-RAP1), D (CLN-AF-RAP3) e E (CLN-RAP1).	59
Figura 13. Termogramas de DSC (A) e TG (B) dos componentes utilizados no preparo dos CLN (OE, EP, P-407, TGACC, RAP, DSPE-PEG-AF, DSPE-PEG-NH ₂ e ác. Fólico).	60
Figura 14. Termogramas de DSC (A) e TG (B) das formulações com e sem o fármaco incorporado (CLN-AF-RAP1, CLN-AF-RAP3, CLN-AF-RAP5, CLN-RAP1, CLN e CLN-AF).	62
Figura 15. Curva analítica da RAP para quantificação do fármaco por CLAE, médias versus concentrações (µg/mL).	64
Figura 16. Cromatograma da CLAE de 100 µg/mL RAP em 277 nm.	65
Figura 17. Cromatogramas analisados por CLAE da fase móvel proposta, fármaco livre e formulações vazias.	68
Figura 18. Perfil de liberação da rapamicina livre (RAP1%, RAP3% e RAP5%) e das formulações CLN-AF-RAP 1%, CLN-AF-RAP 3%, CLN-AF-RAP 5% e CLN -RAP 1%, em meio tampão fosfato de sódio pH=7,4 com LSS.	73

Figura 19. Viabilidade celular nas células MCF-7, LEWIS e MCF-10A, utilizando formulações vazias (CLN-AF), formulações encapsuladas com rapamicina (CLN-AF-RAP) e rapamicina livre (RAP) em várias concentrações.....	77
Figura 20. Captação intracelular de CLN em células MCF-7 e células de LEWIS para imagens de microscópio de varredura a laser confocal. Controle de células azuis por DAPI, NLC-AF-RAP (DiO-verde) foram usados para esta experiência.	79
Figura 21. Perfil de citometria de fluxo de CLN-AF-RAP tratado com células cancerosas MCF-7, LEWIS e células de mama normais (MCF-10A).....	81
Figura 22. Teor de gordura em <i>C. elegans</i> . NMG:controle; orlistat; RAP75; CLN-AF: nanopartículas vazias; CLN-AF-RAP75: nanopartículas carregadas com rapamicina (dose: 75 µM). Os resultados mostram a média ± SEM e a estatística com anova, ** p <0,01; *** p <0,001.	83
Figura 23. Vida útil de <i>C. elegans</i> N2 de tipo selvagem em meio de crescimento normal na ausência de nanopartículas e após 48 h de tratamento com RAP e CLN-AF-RAP.	85
Figura 24. Peso corporal de todos os animais que foram medidos a cada 2 dias por até 3 semanas.	87
Figura 25. Volume tumoral de camundongos tratados com CLN-AF, CLN-AF-RAP, Rap e Taxol®. Valores da média e desvio padrão (n = 5), estatística com anova, * p<0.05 (A) intravenoso e (B) intraperitoneal.....	87
Figura 26. Peso dos tumores do camundongo após o sacrifício dos animais. Os dados correspondem a valores médios com desvio padrão (n = 5), a estatística com anova, ****p< 0.001, *** p <0,005. ..	90
Figura 27. Análise dos órgãos de camundongos Swiss com tumor de 4T1 com tratamentos de solução salina, rapamicina, Taxol®, CLN-AF, CLN-AF-RAP.	92

Lista de Tabelas

Tabela 2. Valores de índice de polidispersão obtidos durante os 90 dias de armazenamento das formulações.	56
Tabela 3. Valores de potencial zeta obtidos durante 90 dias de armazenamento das formulações.	57
Tabela 4. Valores das áreas dos picos com média e desvio padrão em sua respectiva concentração do analito.	64
Tabela 5. Análise de variância ANOVA dos valores das áreas da curva analítica.	65
Tabela 6. Determinação das médias da precisão intracorrida para quantificação de RAP por CLAE. .	66
Tabela 7. Tabela 7. Determinação da precisão intermediária para quantificação de RAP por CLAE. .	66
Tabela 8. Percentual entre as concentrações teóricas e experimentais das soluções de RAP.....	67
Tabela 9. Alterações dos parâmetros analíticos para a avaliação da robustez.	69
Tabela 10. Estabilidade da solução analítica de RAP contendo 150 µg/mL, CLN e CLN-AF incorporado 50 e 100 µg/mL, analisada por 24, 48, 72 e 96 horas.	70
Tabela 11. Solubilidade (mg/mL) da rapamicina.	71
Tabela 12. Valores dos coeficientes dos diferentes modelos matemáticos.	75

Lista de abreviaturas e siglas

ACS	Sociedade Americana de Câncer
AF	Ácido fólico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLN	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSPE-PEG-NH ₂	1,2desteroilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000-anima
DCC	Diciclo-hexilcarbodiimida
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DPR	Desvio Padrão Relativo
DLS	Dispersão da Luz Dinâmica
EP	Estearato de Polioxietileno 40
EPR	Efeito da Permeabilidade e Retenção
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite Quantificação
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mTOR	alvo da rapamicina em mamíferos
OE	Óleo de rícino hidrogenado e Etoxilado 40OE
OXPHOS	Fosforilação Oxidativa
POE	Polioxietileno
POP	Polioxipropileno
P-407	Poloxamer
RAP	Rapamicina
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TGACC	Triglicérides do Ácido Cáprico/Caprílico
TG	Termogravimetria
UV-vis	Espectrofotometria no ultravioleta Visível

Sumário

1. Introdução	16
2. Revisão Bibliográfica.....	22
2.1. Câncer de mama	22
2.2. Formação do câncer de mama	23
2.3. Tipos de Câncer de mama.....	25
2.4. Estágios dos tumores mamários e fatores de riscos	26
2.5. Tratamentos	27
2.6. Rapamicina	28
2.7. Sistemas nanoestruturados.....	30
2.8. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)	31
2.9. Estratégia de direcionamento dos CLN com o ácido fólico	33
3. Objetivos.....	35
3.1. Objetivos gerais.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. Material e Métodos	36
4.1. Material – Principais reagentes e matérias-primas	36
4.2 Principais equipamentos.....	36
4.3 Métodos.....	37
4.3.1 Funcionalização do ácido fólico com CLN.....	37
4.3.2. Espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-vis) para identificação da ligação do ácido fólico com o lipídio DSPE-PEG-NH ₂	37
4.3.3. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho para identificação da funcionalização com ácido fólico no CLN	38
4.3.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para detectar a funcionalização com ácido fólico no CLN	38
4.3.5. Desenvolvimento do carreador lipídico nanoestruturado (CLN).....	38
4.3.6. Incorporação da rapamicina no CLN.....	39
4.4. Caracterização físico-química dos CLN	39

4.4.1. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (Z-Ave) e do potencial zeta	39
4.4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	39
4.4.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	40
4.4.4. Termogravimetria (TG).....	40
4.4.5. Validação analítica para quantificação da rapamicina por CLAE	40
4.4.5.1. Linearidade	40
4.4.5.2. Precisão	41
4.4.5.3. Exatidão/Recuperação.....	41
4.4.5.4. Especificidade/Seletividade	41
4.4.5.5. Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)	41
4.4.5.6. Robustez.....	42
4.4.6. Eficiência de Encapsulação (EE%) da rapamicina	42
4.5. Estudos de liberação <i>in vitro</i> do fármaco.....	42
4.5.1 Avaliação da solubilidade da rapamicina.....	42
4.5.2. Ensaio de liberação <i>in vitro</i> da rapamicina em carreadores lipídicos nanoestruturados	43
4.6. Citotoxicidade <i>in vitro</i> dos CLN.....	43
4.7. Avaliação da internalização celular do CLN incorporado com rapamicina funcionalizado com ácido fólico por meio de citometria de fluxo (CF)	44
4.8. Avaliação da internalização celular de CLN incorporado com rapamicina funcionalizado com ácido fólico através da técnica de microscopia confocal	44
4.9. Metodo alternativo usando <i>C. elegans</i>	45
4.9.1. Cepas de <i>C. elegans</i>	45
4.9.2. Tratamento com CLN carregado com rapamicina e funcionalizado com AF	46
4.9.3. Quantificação do teor de gordura.....	46
4.9.4. Tempo de vida	47
4.10. Modelo xenográfico de atividade antitumoral <i>in vivo</i>	47
4.10.1. Histologia de tecidos de camundongo após tratamento com rapamicina	48
4.11. Análises estatísticas.....	48

5. Resultados e Discussão	48
5.1. Caracterização do lipídio funcionalizado por espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-vis)48	
5.2. Caracterização por espectroscopia vibracional na região do infravermelho para identificação da funcionalização com ácido fólico no CLN	49
5.3. Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para identificação da funcionalização com ácido fólico no CLN	51
5.4. Preparação dos CLN	54
5.5. Caracterização físico-química dos CLN	54
5.5.1. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e do potencial zeta dos CLN	54
5.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão	58
5.5.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e termogravimetria (TG)	59
5.5.4. Validação da metodologia analítica para quantificação da RAP por CLAE	63
5.5.4.1. Curva Analítica (Linearidade)	63
5.5.4.2. Precisão	65
5.5.4.3. Exatidão/Recuperação.....	66
5.5.4.4. Especificidade/Seletividade	67
5.5.4.5. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	68
5.5.4.6. Robustez.....	68
5.5.5. Eficiência de Encapsulação (EE%) da rapamicina	70
5.6. Estudos de liberação <i>in vitro</i> do fármaco.....	71
5.6.1. Avaliação da solubilidade da rapamicina	71
5.6.2. Ensaio de liberação <i>in vitro</i> da rapamicina em carreadores lipídicos nanoestruturados.....	72
5.7. Citotoxicidade <i>in vitro</i> dos CLN.....	76
5.8. Avaliação da internalização celular de CLN incorporado com rapamicina funcionalizado com ácido fólico através da técnica de microscopia confocal	78
5.9. Avaliação da internalização celular de CLN incorporado com rapamicina funcionalizado com ácido fólico por meio de citometria de fluxo (CF)	80
5.10. Modelo alternativo usando <i>C. elegans</i>.....	82

5.10.1. Tratamento com CLN carregados com rapamicina	82
5.10.2. Vida útil	84
5.11. Modelo xenográfico da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	85
5.12. Histologia.....	90
6. Conclusões	94
7. Referências Bibliográficas.....	96
8. Produção científica no período do doutorado	113

1. Introdução

Segundo dados da Agência Internacional para a Investigação do Câncer, o câncer de mama é o segundo tipo de câncer com maior incidência no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020 foram diagnosticados mais de 2,2 milhões casos de câncer de mama, 11,7% do total. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) do Brasil calculou cerca de 60 mil novos casos para os anos de 2020-2022 (INCA, 2020). Como formas de controle, devem ser feitas mamografias a cada dois anos em mulheres entre 50 a 69 anos de idade, autoexame das mamas, exame clínico das mamas, ultrassonografia e ressonância nuclear magnética, conforme recomendado pelo Ministério de Saúde, tendo como base o manuscrito do Conselho para o Controle do Câncer de Mama de 2020 (INCA, 2020).

O carcinoma mamário teve um aumento tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (ACS, 2018), pois os recursos para prevenção, diagnóstico e tratamento são escassos ou inexistentes. Sendo assim, a maior taxa de mortalidade ocorre em regiões menos desenvolvidas, abrangendo regiões como América Latina, África e Ásia. Países mais desenvolvidos, como Estados Unidos, Holanda, Canadá, Noruega, Dinamarca e Reino Unido apresentam casos consideráveis de carcinoma mamário, porém são detectados mais precocemente e tratados adequadamente (FERLAY et al., 2015; WHO, 2017).

Segundo o INCA, em 2020 a taxa de sobrevida média da população acometida após cinco anos do diagnóstico foi de 61%, e a *American Cancer Society* (ACS) adverte que pode

ser ainda menor essas taxas, diante dos pacientes que apresentam câncer de mama na presença de metástases em gânglios linfáticos, dentre outras (ACS, 2018; FERLAY et al., 2015).

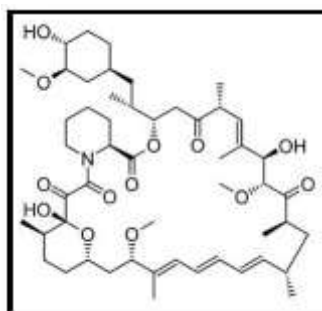
Estudos mostram que a progressão do câncer de mama está relacionada com uma mutação no DNA mitocondrial, que leva a uma alteração na geração de produção de energia para célula normal via fosforilação oxidativa (OXPHOS), que gera energia via glicólise aeróbia (efeito Warburg), resultando em crescimento celular descontrolado e dano no DNA (BRANDON; BALDI; WALLACE, 2006; MA et al., 2010; SANTIDRIAN et al., 2013). Esta progressão pode provocar consequências, como retirada da mama, transtornos emocionais, comprometimento da funcionalidade do membro devido ao surgimento do linfedema e, por fim, a morte (SANTOS et al., 2011; WHITE, 2002).

A ACS 2019-2020 estima que cerca de um terço dos cânceres de mama na pós-menopausa estejam relacionados a fatores de risco como obesidade, inatividade física, uso de hormônios, consumo de álcool, não amamentação, menarca precoce, menopausa tardia, acúmulo de excesso de gordura na região abdominal, idade avançada na primeira gravidez, doença proliferativa da mama sem atipia (ductal usual hiperplasia, fibroadenoma), família com câncer de mama, pacientes com histórico de câncer de ovário ou endometrial, dentre outros (DALL; BRITT, 2017; GAUDET et al., 2018; TAMIMI et al., 2016).

O tratamento irá depender das condições em que o tumor for diagnosticado. Assim, o paciente poderá ser tratado com diferentes procedimentos, tais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia (MEDEIROS et al., 2015). Dentre os fármacos empregados na terapia, o paclitaxel é o mais utilizado na quimioterapia. Contudo, possui desvantagens, tais como baixa solubilidade, baixo índice terapêutico e resistência ao tratamento. Desta forma, tem-se buscado novos fármacos que podem ser empregados para o tratar o câncer de mama, como a rapamicina (ELOY et al., 2016a, 2017a; MONDESIRE, 2004; VANDERWEELE; ZHOU; RUDIN, 2004).

A rapamicina (Figura 1), antibiótico macrolídeo lipofílico, foi originalmente isolada da bactéria *Streptomyces hygroscopicus* em meados da década de 1970 (MONDESIRE, 2004).

Figura 1. Molécula da rapamicina.

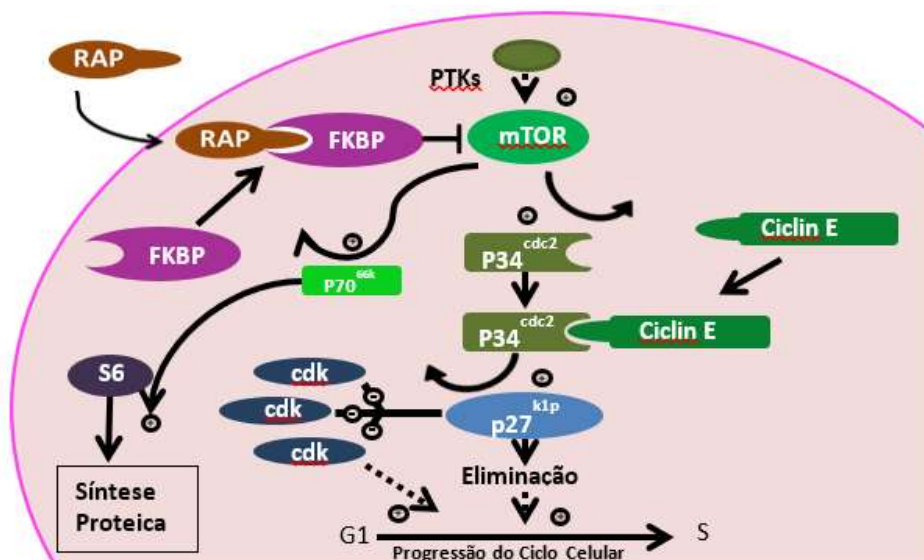


Fonte: Setti, 2016

A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma serina treonina quinase que possui 289 kDa, pertencente à família das proteínas PI3k (fosfatidil inositol-3-quinase). A mTOR se localiza no citoplasma celular, ajustando o crescimento e progressão no ciclo celular por fatores de crescimento e fatores nutricionais (aminoácidos e energia) (FAIVRE; KROEMER; RAYMOND, 2006; FORREST et al., 2006).

Estudos demonstram que a rapamicina tem a capacidade de formar um complexo intracelular com FKBP-12 (FK506-binding Protein-12) e este se liga ao domínio FRB (FKB12-rapamycin binding) da proteína mTOR, que reduz os fatores de crescimento e induz a apoptose celular, conforme Figura 2 (H. et al., 2012; LIU et al., 2009; ZHOU; HUANG, 2010).

Figura 2. Mecanismos de ação da rapamicina na célula.



Fonte: autoria própria

Shapira e colaboradores (2006) realizaram estudos com a rapamicina objetivando avaliar a concentração necessária que inibe o crescimento da linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231. Os resultados revelaram que após 24h, a concentração de 100 nM de

rapamicina em contato com a célula MDA-MB-231 (5×10^5 cels/mL) causou 85% de inibição da cascata e diminuição da fase celular G1, demonstrando que a rapamicina possui uma atividade significativa sobre as células cancerígenas (ADVANI, 2010; SHAPIRA et al., 2006).

Entretanto, a rapamicina apresenta baixa solubilidade aquosa, que diminui sua biodisponibilidade (HURVITZ et al., 2013; YOSHIKAWA et al., 2014). Assim, uma estratégia atraente para contornar essa desvantagem é a sua incorporação em sistemas nanoestruturados. Esses sistemas possuem a capacidade de encapsular fármacos lipofílicos e hidrofóbicos e têm sido usados para elevar a solubilidade aparente, a estabilidade, a biodisponibilidade de fármacos, reduzir os efeitos colaterais, aumentar o tempo de circulação no sangue e reduzir a dose, garantindo maior adesão do paciente ao tratamento (AHMED et al., 2012; DURÁN et al., 2010; HENNINK; NOSTRUM, 2012; KAWABATA et al., 2011; LIN et al., 2014).

Dentre os diversos sistemas nanoestruturados que estão sendo pesquisados para o tratamento de neoplasias, destacam-se os lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, sistemas poliméricos, micelas, dendrímeros, nanocápsulas, nanoesferas, sistemas inorgânicos e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs).

Os CLNs têm como característica serem constituídos por uma matriz composta de dois lipídios, um líquido e um sólido a temperatura ambiente, formando estruturas muito desordenadas e cristais imperfeitos, permitindo incorporar mais moléculas de fármaco. Essa desorganização da matriz pode apresentar vantagem em relação aos demais sistemas, pois permitem incorporar uma grande quantidade de fármacos, podendo minimizar a toxicidade, reduzir e/ou evitar a degradação e as possíveis reações adversas adquiridas pelo fármaco, promovendo uma liberação controlada do fármaco ao seu sítio de ação, além de poderem ser produzidos em larga escala (FAROKHZAD et al., 2009; YANG et al., 2014).

Além dessas vantagens, os CLNs podem ser desenvolvidos utilizando polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol, cujos estudos evidenciam a capacidade de evitar o reconhecimento e a fagocitose do nanosistema pelo sistema mononuclear fagocitário, permanecendo por mais tempo na circulação sanguínea e ocasionando um acúmulo na região tumoral pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentados (do inglês - *Enhanced Permeability and Retention effect* (EPR)). Este efeito está ligado ao rápido processo de angiogênese no ambiente tumoral, pois os vasos sanguíneos formam fenestrações, que permitem maior permeação das partículas de 20 a 200nm no tecido tumoral, e nesta região

também se observa menos vasos linfáticos e com isso o acúmulo maior das formulações (LUONG et al., 2017; SADZUKA et al., 2006; TOMASINA et al., 2013; VALE et al., 2015).

Rouf e colaboradores (2009) avaliaram um sistema nanoestruturado revestido com polietilenoglicol contendo rapamicina para potencial aplicação em câncer de mama. Os resultados revelaram que o sistema peguilado mostrou melhor estabilidade e o estudo *in vitro* realizado em célula MCF-7 mostrou maior captação em relação ao sistema não peguilado (ROUF et al., 2009).

Outra vertente tecnológica que tem despertado um grande interesse dos pesquisadores para aumentar a seletividade dos CLN com o alvo é a sua funcionalização com moléculas sinalizadoras, que possibilita o direcionamento de fármacos às células tumorais. A funcionalização permite acoplar à superfície da partícula algumas moléculas como proteínas, peptídeos, dentre outras, que irão interagir com receptores na superfície da célula tumoral (NOGUEIRA et al., 2016).

No caso do câncer, um dos marcadores mais utilizados é o ácido fólico, que pode se ligar facilmente em receptores de folato que são expressos em baixa quantidade por células normais e em grande quantidade por células tumorais (ovário, próstata e mama) (A; LEE, 2000; MENG et al., 2011; ZHOU; HUANG, 2010).

O ácido fólico é uma vitamina de baixo peso molecular que pode se acoplar seletivamente aos receptores de folato frequentemente superexpressos nas superfícies de células de câncer de mama, porém não são agressivos aos tecidos normais. Além disso, é uma molécula essencial na via de síntese do DNA, que é altamente necessária para a duplicação de células cancerígenas que apresentam expressão de receptores de folato superior às células normais, e esse fato é a base da estratégia de direcionamento com ácido fólico (SAMADIAN et al., 2016).

Desta forma, CLN funcionalizados com ácido fólico podem possivelmente entrar na célula cancerígena por meio da endocitose mediada pelo receptor de folato (ZHAO; LI; LEE, 2008). Além disso, a funcionalização com o ácido fólico possibilita a potencialização da internalização do CLN na célula-alvo, ocorrendo uma liberação selecionada do fármaco (MUHAMMAD et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

Outros autores como Zang e colaboradores (2011) avaliaram nanopartículas poliméricas híbridas contendo paclitaxel funcionalizadas ou não com ácido fólico (NP-PTX-FA) e compararam com a formulação comercial Taxol® com o objetivo de tratar o câncer de

mama. Os autores verificaram a atividade citotóxica em células com baixa expressão de receptor de folato (MCF-7) comparando com as células resistentes a adriamicina (MCF-7 ADR). Os resultados evidenciaram que NP-PTX-FA promoveram maior captação celular *in vitro* na célula MCF-7 ADR quando comparado com outros sistemas (LIU et al., 2010; TU et al., 2012; ZHANG et al., 2011).

Patil e colaboradores (2009) desenvolveram nanopartículas de PLGA (poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) contendo paclitaxel funcionalizadas com ácido fólico (NP-PLGA-FA-PTX) para tratar o câncer de mama e compararam os efeitos com solução de paclitaxel. O modelo xenográfico utilizando a célula MCF-7 revelou que após 21 dias de tratamento com o sistema NP-PLGA-FA-PTX e o fármaco livre, ocorreu um aumento no volume do tumor em 200% e 500%, respectivamente. Este resultado mostra a capacidade do sistema retardar o crescimento do câncer de mama (PATIL et al., 2009).

Dubey e colaboradores (2015) desenvolveram sistemas lipídicos com soro bovino contendo gemcitabina funcionalizados com ácido fólico (NP-SB-Gem-FA) e avaliaram sua eficácia em linhagens tumorais de mama, comparando com nanopartículas não funcionalizadas com ácido fólico (NP-SB-Gem). Experimentos *in vitro* utilizando linhagens celulares MCF-7 (baixa expressão de receptores de folato), Ovar-5 (superexpressão de receptor de folato) e MIAPaCa-2 (células de carcinoma pancreático) revelaram que NP-SB-Gem-FA apresentou atividade anticancerígena superior em comparação com NP-SB-Gem em células MCF-7 e Ovar-5, sem eficácia sobre a célula MIAPaCa-2. Este aumento foi observado após 48h de incubação em concentrações de 1 μ M e 100 μ M do fármaco nos sistemas, levando a uma diminuição da citotoxicidade de 66% e 86%, respectivamente. O estudo conclui que os sistemas lipídicos funcionalizados com ácido fólico possibilitaram um aumento da absorção celular e diminuição da citotoxicidade causada pela gemcitabina (DUBEY et al., 2015).

Assim, a presente proposta visou o desenvolvimento de CLN funcionalizados com ácido fólico e incorporados com rapamicina, podendo ser uma formulação promissora no combate ao câncer de mama.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Câncer de mama

Nas últimas duas décadas, o número total de pessoas diagnosticadas com câncer quase dobrou, de cerca de 10 milhões em 2000 para 19,3 milhões em 2020. Hoje, uma em cada 5 pessoas em todo o mundo desenvolverá câncer durante sua vida. As projeções sugerem que o número de pessoas com diagnóstico de câncer aumentará ainda mais nos próximos anos e serão quase 50% maior em 2040 do que em 2020 (WHO 2020).

As mudanças no estilo de vida podem estar sendo muito prejudiciais. Dietas não saudáveis, atividade física insuficiente, uso de tabaco e uso prejudicial de álcool têm contribuído para o aumento da incidência de câncer. Uma proporção significativa também pode ser atribuída ao aumento da longevidade, à medida que o com o aumento da idade pode-se desenvolver o câncer. Isso reforça a necessidade de investir na prevenção e controle do câncer, dentre eles os de mama (WHO 2020).

Desta forma, quando pensamos na mama, observa-se um papel muito importante pois além de alimentar outros indivíduos, também tem um significado social, pessoal e cultural. Quando pensamos na sua estrutura e tecido celular mamário podemos sugerir que sofrem alterações frequentes, como durante a gravidez, e que irão evoluindo com o passar da idade (KOTHARI; DIORIO; DUROCHER, 2020).

O tecido celular mamário saudável possui células epiteliais normais, as quais estão organizadas em células tronco/basais mamárias bipotentes (Mascas), progenitoras luminais e células luminais maduras/diferenciadas (KUMAR et al., 2018).

Já o tecido adiposo e o fibroglandular também fazem parte da mama, neles encontram-se os lóbulos e ductos mamários. O tecido adiposo está em grande parte da mama, atingindo as regiões da clavícula, axila e ao redor do centro da caixa torácica. É responsável por realizar a comunicação de todas as estruturas do microambiente mamário e armazenar energia que é liberada de acordo com a necessidade do organismo. Essa energia auxilia na progressão do câncer de mama, pois o tecido adiposo secreta fatores de crescimento usados para sobrevivência do tumor. O câncer de mama tem início nas células epiteliais presentes ao redor dos tecidos ductal e lobular. Posteriormente, forma um microambiente complexo, envolvendo todas as células circundantes da mama (KOTHARI; DIORIO; DUROCHER, 2020).

No Brasil, o Ministério da Saúde através da Portaria conjunta nº 04, de 23 de janeiro de 2018, aprovou as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama. De acordo com o documento, o tratamento medicamentoso mais efetivo para os casos avançados deve ser realizado como quimioterápicos antracíclicos (doxorubicina ou epirrubicina) e taxanos (paclitaxel, docetaxel), e outros agentes (capecitabina, gencitabina, metotrexato, 5- fluorouracila, vinorelbina, vimblastina, mitomicina, etoposido, ciclofosfamida, cisplatina, irinotecano). Além disso, a doxorubicina lipossomal, eribulina, ixabepilona, nabpaclitaxel vêm sendo empregada para tratamento antineoplásicos segundo a Resolução Normativa nº 465, de 24 de Fevereiro de 2021 (BRASIL, 2018; RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 465, 2021).

2.2. Formação do câncer de mama

O ciclo celular está integrado em cinco fases: G1, S, G2, M e G0. A G1 faz com que a célula aumente de tamanho e produza as proteínas cópias do seu DNA. Na S ocorre a cópia do DNA e a duplicação dos seus cromossomos, na G2 a célula se prepara para a mitose, que é a divisão de duas cópias idênticas de si mesma. Na G0 o ciclo das células apresenta menor atividade metabólica, sendo um longo período de repouso, em que neste período as células não respondem aos estímulos que frequentemente iniciam a síntese de DNA (MINISTÉRIO DA SAÚDE & INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER 2008).

O desenvolvimento do tumor se origina em uma lesão da etapa do DNA, levando a célula a perder o controle da proliferação, diferenciação, apoptose e reparo do DNA (FARBER, 1984; VOLGESTEIN et al., 1993). O processo de carcinogênese resulta nessas alterações genéticas, com o crescimento rápido dessas populações, conferindo heterogeneidade ao tumor, podendo ser mais ou menos agressivo. Uma das hipóteses é que essas alterações modificam células normais que se transformam em células hiperplásicas, tomando forma atípica e transformando-se em carcinomas (FARBER, 1984; SANTOS et al., 2011; VOGELSTEIN et al., 1993).

As células cancerígenas podem ter um crescimento em torno de 72 a 120 horas, podendo ter uma duplicação em torno de 100 dias, enquanto que as células normais têm um crescimento de 24 a 48h. Quando consegue-se detectar o tumor pelos métodos disponíveis, ele já deve apresentar um tamanho com cerca de 1cm de diâmetro, podendo levar à metástase se não tratado (INCA, 2011 ABC DO CÂNCER, 2011).

A metástase ocorre normalmente quando não se trata o câncer de mama e pode afetar principalmente os ossos, pulmões e fígado. A metástase se origina porque as células perdem a adesão entre elas e ganham mobilidade para invadir outros tecidos. As células tumorais também podem penetrar através do vaso sanguíneo ou ducto linfático e entrar na corrente circulatória (INCA 2020; SCULLY et al., 2012).

A neoplasia mamária é uma patologia heterogênea e com o avanço da biologia molecular consegue-se identificar perfis de expressão gênica dos cânceres através dos estudos moleculares e reconhecimentos de alguns receptores importantes como os HER (Presença de Fator de Crescimento Epidérmico Humano Receptor 2, do inglês “*Human Epidermal growth factor Receptor*”). Esses receptores estão na superfície das células como monômeros, e quando há ligação com domínios extracelulares, sofrem dimerização e transfosforização intracelular (CITRI; YARDEN, 2006; MOASSER, 2007; OLAYIOYE, 2001; PEROU et al., 2000; SØRLIE et al., 2001).

Os receptores da família ErbB, como os denominados HER, são proteínas transmembrana cujos domínios intracelulares estão ligados à tirosina quinase. A cascata de reações ocasionada pela ativação desses receptores é reconhecida como parte no processo de proliferação celular e carcinogênese (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001).

Historicamente, nos anos de 1970 o câncer de mama foi classificado em subconjuntos com base na expressão do receptor de progesterona (RP), fator de crescimento epidérmico humano receptor 2 (HER-2) e receptor de estrogênio (RE) (REIS-FILHO; PUSZTAI, 2011). Cerca de 15 a 25% são classificados como HER-2 positivo, ou seja, células tumorais apresentam mutação no gene HER-2 ou superexpressão dessa proteína em suas membranas plasmáticas, e os tumores que apresentam uma alteração molecular podem ter fenótipo clínico mais agressivo e com piores diagnósticos quando comparados com cânceres luminais HER-2 negativo, pois isto pode ocorrer pelo crescimento desordenado e sobrevida celular anormal pela hiperexpressão desse receptor HER-2 nas células neoplásicas (ROSS et al., 2009; ROWE, R. C. SHESKEY, P. J. QUINN, 2009; SLAMON et al., 2016; WOLFF et al., 2018; YAZIJI et al., 2004).

A partir de meados dos anos 2000, a testagem da expressão ou amplificação do receptor HER-2 tornou-se o padrão ouro, devendo ser utilizada em todos os casos de tumores primários de mama com componente invasor (ROSS et al., 2009; WOLFF et al., 2018). Esta caracterização é importante em virtude de terem sido desenvolvidos fármacos genericamente denominados de “inibidores da via HER-2”, que mudaram a história natural

da doença. Sendo assim, estes fármacos aumentam em aproximadamente 36% a chance de cura de pacientes com tumores iniciais de mama. Atualmente, existem vários inibidores da via HER conhecidos e aprovados para uso clínico como os afatinibe, lapatinibe, neratinibe, pertuzumabe, TDMA-1 e trastuzumabe (LIN et al., 2012; MOJA et al., 2012; SWAIN et al., 2015).

2.3. Tipos de Câncer de mama

Os tumores de mama podem ser classificados de acordo com as características das células mamárias a partir das quais se desenvolve, da extensão da doença e da sua evolução ao longo do tempo.

Cerca de 20% das pacientes que descobrem o câncer no estágio inicial, como o carcinoma ductal in situ, podem ser curados. Os sarcomas têm origem do tecido conjuntivo entre as glândulas mamárias. São raros, mas podem crescer rapidamente e atingir a corrente sanguínea. Já os carcinomas ductais infiltrantes são os mais comuns e acometem cerca de 70 a 80% dos casos, originam-se nas células que formam os ductos, onde estão os canais por onde o leite passa até chegar no mamilo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019).

Outros cânceres que podem ser invasivos são o triplo negativo, que representa cerca de 15% dos cânceres de mama, sendo um tipo de câncer de difícil tratamento, e o câncer de mama inflamatório, um tipo raro, mas representa cerca de 1 a 5% dos cânceres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

Outros tipos de cânceres, porém menos comuns são os que afetam outros tipos de células na mama e precisam as vezes de outros tratamentos, como: Doença de Paget que acomete ductos mamários e se dissemina para a pele do mamilo e aréola, representando cerca de 1 a 3% dos casos; angiossarcoma, que são raros, pois revestem os vasos sanguíneos ou linfáticos, com cerca de 1% dos casos; tumor Filoide, que também é um tumor raro, envolvendo tecido conjuntivo, em contraste com os carcinomas, que se desenvolvem nos ductos ou lóbulos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

Dentre os vários de tratamento para o câncer tem-se cirurgias, radioterapias e quimioterapias. Atualmente, a nanotecnologia vem sendo empregada em tratamentos contra o câncer de mama (CHADAR; AFSANA; KESHARWANI, 2021; TRAN et al., 2020).

Dentre os diversos sistemas nanotecnológicos que estão sendo estudados em terapias contra o câncer de mama destacam-se os carreadores lipídicos nanoestruturados.

Diversos trabalhos vêm mostrando a capacidade dos CLN de encapsulação de fármacos e moléculas com potencial anticâncer. A encapsulação de antineoplásicos em CLN aumentou a atividade citotóxica *in vitro* dos compostos (BONDÌ et al., 2014; SHAO et al., 2015; YUAN et al., 2013), a atividade antitumoral *in vivo* (MUSSI et al., 2015; SHAO et al., 2015; SHI et al., 2013; YUAN et al., 2013), diminuiu a toxicidade *in vivo* (SHI et al., 2013; YUAN et al., 2013) e aumentou o tempo de meia-vida (MUSSI et al., 2015; SHI et al., 2013) frente às substâncias na forma livre.

Na década de 80, cientistas também descobriram que a rapamicina inibiu o crescimento de tumores e, desde 2007, dois derivados da rapamicina que são o Temsirolimus da Pfizer e o Everolimus da Novartis foram aprovados contra vários tipos de câncer, administrado isoladamente ou em combinação com outros fármacos (HUMBER; JAHANSOUZ, 2007).

2.4. Estágios dos tumores mamários e fatores de riscos

Os sinais mais comuns de câncer de mama são nódulos indolores, duros, irregulares ou também edemas cutâneos, retenção cutânea, dor, inversão dos mamilos, hiperemia, descamação secreção papilar, entre outras (SILVA et al., 2011).

Estudos verificaram que o estresse oxidativo crônico e a inflamação têm sido indicados como principais mediadores durante a carcinogênese e a progressão do câncer. Um estudo conduzido por Lee et al. (2012) evidenciou que cerca de 20% dos pacientes no Brasil foram diagnosticados com câncer de mama no estágio I, que caracteriza um tumor pequeno, 46% e 24% nos estágios II e III, respectivamente, que são tumores com cerca de 2 a 5 cm, respectivamente, e 4,4% no estágio IV, sendo o mais grave e que possivelmente já atingiu metástase (LEE et al., 2012; PANIS et al., 2012; INCA 2018).

Por isso, inúmeros são os fatores de risco que estão relacionados ao desenvolvimento desta doença, como a idade (mulheres acima de 50 anos tem mais riscos), fatores endócrinos relacionados a estímulos estrogênicos, história reprodutiva como a menopausa tardia, menarca, obesidade na pós-menopausa, gravidez após 30 anos, fatores comportamentais como bebida alcoólica, sobrepeso, exposição à radiação ionizante, tabagismo, fatores genéticos como mutações em determinados genes (BRCA1 e BRCA2), casos de cânceres na

família e os cânceres de caráter hereditário, que correspondem de 5 a 10% dos casos. Desta forma, os riscos estabelecidos para o câncer de mama podem estar associados aos hormônios receptores do câncer de mama (ANOTHAISINTAWEE et al., 2013; DE MATOS; PELLOSO; DE BARROS CARVALHO, 2010; WORD HEALTH ORGANIZATION, 2021; HUNTER et al., 2008).

2.5. Tratamentos

A mama é um símbolo da sexualidade, da maternidade, da sensualidade, pode acometer mulheres a desencadear problemas emocionais, estéticos, psicológicos, que leva a falta de adesão ao tratamento, podendo ter um aumento do índice de mortalidade (FERREIRA et al., 2015; SALAZAR et al., 2011).

As principais formas de tratamento para o câncer são cirurgia, radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia dependendo do tipo de tumor os tratamentos podem ser utilizados em conjunto (INCA, 2020).

A cirurgia de retirada do tumor mamário, buscam conservar o máximo da mama possível, e essas cirurgia também pode ser nomeada de quadrantectomia, mastectomia parcial ou segmentar e tumorectomia, que representa a retirada de uma porção da mama e pode-se retirar tecidos próximos, como os linfonodos e nesse caso faz-se a mastectomia radical. No entanto, a reconstituição da mama pode ser realizada no mesmo momento da retirada do tumor ou após (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; PLESCA et al., 2016).

A radioterapia é um tratamento local ou locorregional, com a finalidade de irradiar áreas do organismo humano, cuidadosamente demarcadas, esse tratamento se difere quanto a sua finalidade, podendo ser curativa: quando é o principal tratamento, não necessita estar associado a outro tipo de tratamento; pré-operatória: tratamento antecede a cirurgia, com intuito de reduzir o tumor e facilitar o procedimento operatório; pós-operatória ou pós-quimioterapia: tratamento após outros tratamentos, com a finalidade de atingir possíveis focos microscópicos do tumor; paliativa: finalidade de tratamento local do tumor primário ou de metástase, utilizadas em circunstâncias como redução de dor (antiálgica) e controlar sangramentos (anti-hemorrágica) (INCA, 2020).

A quimioterapia é uma forma de tratamento sistêmico administrado em intervalos regulares, esse tratamento também se difere quanto a sua finalidade, sendo: neoadjuvante: utilizada na redução de tumores locais e regionalmente avançados, com finalidade de tornar

os tumores ressecáveis ou melhora do prognóstico; adjuvante ou profilática: indicada após tratamento cirúrgico curativo, porém o paciente não apresenta qualquer evidência de neoplasia maligna detectável; curativa: quando é o principal tratamento, não necessita estar associado a outro tipo de tratamento; controle temporário de doença: indicada para sólidos, avançados ou recidivados de evolução crônica, com finalidade de aumentar sobrevida; e paliativa: utilizada para palição de sinais e sintomas que comprometem a capacidade funcional do paciente, a administração é de duração limitada, devido a incurabilidade do tumor (INCA, 2020).

A hormonioterapia também é considerado um tratamento sistêmico (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; INCA, 2020), com finalidade de melhorar a sobrevida global, sobrevida livre de doença local e a distância de recidiva tumoral (REY-VARGAS et al., 2020), tratamento que consiste no uso de substâncias semelhantes ou bloqueadoras de hormônios, com a finalidade de tratamento das neoplasias dependentes de hormônios (INCA, 2020) e eficaz nas neoplasias que expressam receptores de estrogênio e progesterona no exame de imuno-histoquímica (REY-VARGAS et al., 2020).

Desta forma, acredita-se que a rapamicina pode apresentar uma atividade antitumoral eficaz e com menos reações adversas.

2.6. Rapamicina

Uma bactéria do solo chamada *Streptomyces hygroscopicus* foi isolada pela primeira vez a partir de uma amostra de solo coletada na Ilha de Páscoa (Rapa Nui) em 1965, e em 1970 foi gerado um metabólito secundário, a rapamicina. Este fármaco apresenta propriedades antifúngicas, atividade antitumoral e imunossupressoras.

Com essa gama de atividades antiproliferativas, tornou-se um fármaco de interesse em virtude do seu mecanismo de ação. A rapamicina, quando se liga ao receptor celular Rbp1/FKBP1, interage com o domínio FRB (*Fragment Rapamycin Binding*). Pode-se encontrar a quinase TOR em dois complexos diferentes, TORC1 e TORC2. O TORC1 é composto por TOR1 ou TOR2, LST8, KOG1 e TCO89, que está encarregado de organizar o crescimento temporal, isto é, indicar se as células estão crescendo ou não. Os alvos incluem a regulação da biogênese de ribossomos, o controle da tradução, a renovação de transportadores de nutrientes, a inibição da autofagia e da transcrição de genes de resposta a estresse. Já o TORC2 é formado por TOR2, LST8, AVO1-3 e BIT61, e realiza o controle do

crescimento por meio do citoesqueleto de actina (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). A rapamicina inibe somente o complexo TORC1, porém como os mecanismos de ação desta inibição ainda não são completamente conhecidos, a literatura nos traz que a rapamicina pode atingir mais alvos de quinase do que a atividade enzimática (BENJAMIN et al., 2011; PANWALKAR; VERSTOVSEK; GILES, 2004; PETROULAKIS et al., 2006; XU et al., 2004).

A rapamicina bloqueia o ciclo celular fase G1 para a fase S, por diferentes mecanismos: (1) diminuição e/ou anulação da ciclina D1, resultando em deficiência de complexos de ciclina D1-CDK4 (*cyclin-dependent kinases 4*), necessárias para fosforilação de RB (proteínas retinoblastoma) e transição de fase G1 para S; (2) bloqueio da eliminação da proteína p27, facilitando a formação de complexos de ciclina/CDK-p27; (3) aumento da expressão da proteína p27 ao nível do RNAm e proteína; (4) inibição das RNA polimerases I e III, que controlam a transcrição da subunidade ribossomal 5S e do RNAt, podendo ser um efeito secundário por bloquear a RB; (5) bloqueio da ativação da proteína STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*), mediada por fosforilação pelo mTOR (PANWALKAR; VERSTOVSEK; GILES, 2004).

O mTOR pode formar dois tipos de complexos interagindo com três outras proteínas: Raptor (*regulatory-associated protein of TOR*), GβL e Rictor (*rapamycin insensitive component of TOR*). O complexo Raptor-mTOR-GβL (complexo mTORC1) é responsável pela inativação das 4E-BP, dentre elas a proteína de ligação eIF4E e ativação das proteínas ribossômicas quinases (S6K), enquanto o Rictor forma o complexo Rictor-mTOR-GβL (complexo mTORC2) que fosforila a proteína quinase B (Akt) e quinase fosfoinosítideo 3-quinase (PI3K), que são capazes de modular a atividade metabólica de células do sistema imune, através de sensores metabólicos como a proteína alvo da rapamicina (OKKENHAUG; VANHAESEBROECK, 2003; PETROULAKIS et al., 2006; SARBASSOV et al., 2005; SHIMOBAYASHI; HALL, 2014; YAN; ZHANG; JIANG, 2011). Uma proteína chamada GβL liga-se ao domínio catalítico do mTOR, independentemente de Raptor e de Rictor, e estimula a sua atividade quinase em relação aos substratos S6K e 4E-BP (KIM et al., 2003; PANWALKAR; VERSTOVSEK; GILES, 2004; PETROULAKIS et al., 2006).

O mTOR complexado com Rictor é insensível à inibição por rapamicina, ao contrário do que acontece quando o mTOR está ligado a Raptor. A rapamicina, quando em contato com células tumorais, aumenta a ativação da proteína Akt, através de dois

mecanismos: (1) fosforilação da Ser473 da Akt pelo complexo Rictor-mTOR; (2) alívio da inibição do receptor de insulina substrato-1 (IRS-1), exercida pelas S6K que fosforilam a Ser302 do IRS-1 e pelo mTOR que fosforila a Ser312 do IRS-1. Com isso, a via mTOR é capaz de regular o crescimento, proliferação e sobrevivência celular por meio do aumento da atividade glicolítica. Os inibidores de mTOR estão associados a taxas reduzidas de câncer de pele e infecção por citomegalovírus em receptores de transplante renal (FANTUS et al., 2016; KNOLL et al., 2014).

Ademais, alguns estudos farmacocinéticos evidenciaram que a rapamicina liga-se nos eritrócitos (K_d ca. 20), não deixando os eritrócitos chegarem até os tumores sólidos rapidamente. Todavia, a rapamicina também apresenta muitos problemas, como praticamente insolúvel em água, coeficiente de partição (log P) de 5,77, biodisponibilidade oral baixa (<15%) e não contém grupos funcionais ionizáveis dentro da faixa de pH de 1 a 10. A rapamicina pode ser parcialmente solúvel em alguns excipientes parenterais, como etanol, propilenoglicol, glicerina, polissorbato 80 e polietilenoglicol 400 (WARANIS, R. P.; CHAZY, N. Y.; THOMAS, W. L.; WILMINGTON, 1997). Sendo assim, é extremamente difícil o desenvolvimento de formulações injetáveis clinicamente e comercialmente aceitáveis de rapamicina (BUECH et al., 2007; CHOLKAR et al., 2015; FORREST et al., 2006; YATSCOFF et al., 1993).

2.7. Sistemas nanoestruturados

Muitos estudos são encontrados atualmente na literatura relacionados à sistemas de liberação controlada de fármacos, dentre eles microemulsões, nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas e dispersões sólidas (ALEXIS et al., 2010; CHOI et al., 2016; SUN et al., 2014).

Estes sistemas podem ser utilizados para veicular agentes quimioterápicos, realizando um maior direcionamento e liberação desses fármacos, possibilitando apresentar menores efeitos colaterais desses agentes quimioterápicos e menor toxicidade (KRUKEMEYER et al. 2015; LIANG et al. 2010). As nanopartículas, de forma geral, possuem pequenos tamanhos, facilitando assim alguns tipos de administração e um efetivo transporte de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos até as células, possibilitando uma melhor adesão para a terapia do câncer (THAKOR; GAMBHIR, 2013).

Dentre os sistemas nanoestruturados, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) passaram a atrair interesse por apresentarem vantagens em relação aos sistemas coloidais convencionais, como maior estabilidade física, entrega direcionada, prevenção de degradação dos fármacos, dentre outras (GABA et al., 2015; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007; SLOAT et al., 2011; WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004).

2.8. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

Os CLN pertencem à segunda geração das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Os CLN são misturas de lipídios líquidos e sólidos, que apresentam uma forma menos ordenada e estável do que as NLS, sendo assim conseguem incorporar uma maior quantidade de fármaco (CHEN et al., 2010).

Os CLN podem apresentar três diferentes tipos de formação de matrizes, como os cristais imperfeitos, nos quais a mistura de ácidos graxos promove uma maior distância nas cadeias dos glicerídeos, podendo encapsular mais fármaco; sistema amorfo, quando não ocorre a recristalização dos lipídios após o resfriamento e por fim os chamados de tipo múltiplo, nos quais mistura-se os lipídios líquidos e sólidos em água, formando um nanocompartimento de lipídios líquidos dentro de uma matriz de lipídios sólidos (MARCATO, 2009a; SOUTO; ALMEIDA; MÜLLER, 2007).

Partindo desses conceitos de formação de matrizes, a escolha dos constituintes da mistura lipídica é de grande importância para formar os CLN. Os aspectos físico-químicos podem influenciar na estabilidade da formação, na eficiência de encapsulação, na degradação de fármaco sensível a agente externo (oxidação, hidrólise) e na biocompatibilidade (TAMJIDI et al., 2013).

Desta maneira, a forma e o tamanho das cadeias lipídicas da mistura dos lipídios líquidos e sólidos devem ser o mais heterogêneo possível, para que essa mistura origine uma matriz mais desordenada nos CLN. Sendo assim, também está diretamente ligada às proporções dessa mistura lipídica, pois elevadas concentrações de lipídios líquidos podem promover saturação no momento de solidificação (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002).

Os lipídios líquidos mais utilizados para formar os CLN são os monos, di e triglicerídeos, ácidos graxos e as ceras. Os triglicerídeos de cadeia média formam uma mistura de triglicerídios de ácidos graxos saturados, como ácido caprílico e ácido cáprico.

Eles apresentam pelo menos 95% de ácidos graxos saturados e tem vantagens, pois tem baixa viscosidade, propriedades emulsificantes e nas formulações farmacêuticas mostram propriedades de penetração, compatibilidade e estabilidade de oxidação (ROWE, R. C. SHESKEY, P. J. QUINN, 2009).

Já o óleo de rícino polioxilado 40 hidrogenado é constituído de componentes hidrofóbicos e hidrofílicos. O oxiestearato de glicerol polietilenoglicol junto com ésteres de ácidos graxos com glicerol formam a parte hidrofóbica. A porção hidrofílica consiste em polietilenoglicol e etoxilado de glicerol. Este óleo tem como característica o fato de ser uma pasta semi-sólida, branca, solubilizante não iônico e agente emulsificante, podendo ser utilizado para produtos farmacêuticos orais, tópicos e parenterais (ROWE, R. C. SHESKEY, P. J. QUINN, 2009).

Como lipídio sólido pode-se utilizar o estearato de polioxietileno 40, que possui uma cadeia de 40 unidades de derivados de polietoxilados de ácido esteárico em sua porção hidrofílica (RIGON, 2013). Há relatos na literatura que mostram que o estearato de polioxietileno 40 pode ampliar a atividade de agentes quimioterápicos e ajudar a reverter a resistência de alguns fármacos (LUO et al., 2007).

As CLN na maioria das vezes são estabilizadas por meio de tensoativo, sendo uma estratégia para promover a maior estabilidade da formulação. Além disso, um outro fator muito importante é a determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) requerida na mistura lipídica (KIM et al., 2014; MÄDER; MEHNERT; MÄDER, 2001 TAMJIDI et al., 2013).

Tais carreadores podem apresentar também uma resistência a alteração de pH e quantidade de eletrólitos; desta maneira, pode ocorrer uma menor irritação e toxicidade quando comparados com tensoativos iônicos (ATTAMA; MOMOH; BUILDERS, 2012; TAMJIDI et al., 2013).

Dentre os tensoativos empregados na obtenção de CLN tem-se o Poloxamer 407, que tem EHL = 22. São de uma família de copolímeros que consiste em triblocos, um central de polioxipropileno na porção hidrofóbica e dois de polioxietileno na porção hidrofílica (DUMORTIERET al., 2006). Não apresentam toxicidade e têm sido utilizados como transportador de fármacos. O poloxamer após aquecimento estabelece um equilíbrio entre monômeros e micelas. Essas micelas são esféricas, com núcleo de polioxipropileno, pois esta porção é menos solúvel em água e a porção exterior constituída de polioxietileno por ter alta solubilidade em água, pode formar um filme na superfície dos CLN e melhorar assim a

estabilidade e aglomeração (DUMORTIER et al., 2006; LEE; SHIN; OH, 2003; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Segundo Amiji et al. (2002), uma formulação de poloxamer 407 contendo paclitaxel foi injetada em animais com melanoma. Observou-se que a taxa de crescimento do tumor foi diminuída em 67% quando administrada a formulação e o tempo de duplicação do volume do tumor aumentou em 72% no controle, o que sugere que o poloxamer ajuda a controlar a liberação do fármaco (KADAKIA et al., 2019).

Segundo estudos do nosso grupo de pesquisa, CLN podem apresentar na sua composição o lipídio DSPE-PEG-NH₂, de forma a promover um maior direcionamento para células cancerígenas, e, conseqüentemente, um melhor tratamento (SATO et al., 2017a).

O lipídio DSPE-PEG-NH₂ proporciona uma melhor captação intracelular e maior direcionamento nas células cancerígenas de mama, possibilitando prolongar o tempo de circulação, pois ele ajuda a evitar a absorção por proteínas plasmáticas e conseqüentemente ocorre uma maior liberação nos tecidos alvos (ZHANG, Y.; KOHLER, N.; ZHANG, 2002; ZHANG et al., 2004). Além disso, pode também ter grupos terminais como -NH₂, possibilitando a utilização deste grupo para funcionalização com ligantes como o ácido fólico, e este lipídio funcionalizado estará na superfície dos CLN, para que ocorra o direcionamento deles até um sítio específico, podendo tratar células cancerosas (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; WANG et al., 2012).

2.9. Estratégia de direcionamento dos CLN com o ácido fólico

O ácido fólico (AF) é uma vitamina solúvel do complexo B, encontrada em produtos de uma alimentação saudável, como folhas verde escuras, feijão, lentilhas, abacate, dentre outras. Ao ser ingerido, o AF é convertido a diidrofolato e tetraidrofolato no organismo, sendo envolvido em complexas vias e vários processos bioquímicos com as enzimas incluídas na biossíntese de nucleotídeos. Desta forma, o folato é consumido por células em proliferação (COZZOLINO et al., 2006).

As células normais do sistema fisiológico transportam folato através de duas proteínas associadas à membrana, sendo elas o transportador de folato reduzido que está em todas as células e é a principal via de captação de folato, e o receptor de folato (RF), que se apresenta nas células epiteliais e em macrófagos ativados (BELOQUI; DES RIEUX; PRÉAT, 2016; LOUREIRO et al., 2016; SAMADIAN et al., 2016), possibilitando a ligação

e internalização dos folatos oxidados por endocitose (BELOQUI; DES RIEUX; PRÉAT, 2016). As células normais necessitam de baixas quantidades de folato para exercerem sua função, já os RF são superexpressos nas células cancerígenas e permitem que estas células captem mais suprimentos de folato (BELOQUI; DES RIEUX; PRÉAT, 2016; SAMADIAN et al., 2016). Por isso, esse RF é um potente direcionador de ligantes a células cancerígenas (LOUREIRO et al., 2016; YANG et al., 2016).

Desta maneira, CLN funcionalizados com ácido fólico podem apresentar uma maior afinidade pelos receptores de folato, pois eles estão superexpressos na superfície das células cancerígenas, dentre elas de mama, ovário, pulmão, renal e cólon (KUO; LEE, 2015; WANG; et al., 2015).

Kiliçay et al. (2011) desenvolveram nanopartículas poliméricas funcionalizadas com ácido fólico contendo etopósido com ação antitumoral. Experimentos realizados em células Hela e L929 evidenciaram maior captação das nanopartículas em células Hela do que em células fibroblásticas normais, sugerindo que a funcionalização ajudou no direcionamento para a linhagem tumoral. Desta forma, os autores sugerem que nanopartículas funcionalizadas com ácido fólico podem ser promissoras para direcionamento de fármacos em tumores (KILIAY et al., 2011; ZHANG et al., 2016).

Estudos de Wu et al. (2010) empregaram CLN funcionalizados com ácido fólico e polietilenoglicol encapsulados com paclitaxel para tratar câncer de mama. Comparando os tratamentos de paclitaxel livre, os carreadores funcionalizados contendo paclitaxel apresentaram maior atividade antitumoral em células S-180. Experimentos *in vivo* evidenciaram uma inibição no tumor tratado com carreadores (45%) frente ao paclitaxel livre (37%), sugerindo que os carreadores funcionalizados podem melhorar a atividade antitumoral (WU; TANG; YIN, 2010).

Portanto, os receptores de folato são considerados muito significativos para alvos terapêuticos para entrega específica de alguns fármacos para tratamento de câncer de mama. Desta forma, CLN funcionalizados com ácido fólico e incorporados com rapamicina podem ter um grande potencial para tratar o câncer, visto que esta formulação pode acumular na região do tumor e ocorrer o efeito de permeação e retenção aumentados, também chamado de efeito EPR e maior interação com receptores de folato e maior internalização. Diante disso, esta formulação apresenta um grande potencial para terapia contra o câncer de mama.

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

Desenvolver e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico contendo rapamicina para o tratamento do câncer de mama.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar o desenvolvimento e caracterizar os CLN incorporados com rapamicina;
- Realizar a síntese do lipídio com o ácido fólico para utilizar no sistema;
- Avaliar se a funcionalização com o ácido fólico foi eficaz por essas metodologias de espectrofotometria no UV-Vis, RMN e FTIR;
- Validar metodologia analítica para quantificação de rapamicina por Cromatografia líquida de Alta Eficiência;
- Verificar a eficiência da encapsulação da rapamicina nos CLNs;
- Caracterizar os carreadores lipídicos nanoestruturados por determinação do tamanho, potencial zeta, eficiência de encapsulação, microscopia eletrônica de transmissão, análise de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria;
- Realizar estudos de liberação *in vitro* da rapamicina a partir dos carreadores lipídicos nanoestruturados;
- Avaliar a citotoxicidade e internalização *in vitro* dos carreadores lipídios nanoestruturados;
- Avaliar a eficácia *in vivo* do sistema obtido em modelo de câncer de mama.

4. Material e Métodos

4.1. Material – Principais reagentes e matérias-primas

Água ultrapura (tipo I); Ácido fólico (Sigma Aldrich[®], USA); Brometo de Potássio (KBr) (Neon, São Paulo, Brasil); Cloreto de Sódio (Synth[®], Brasil); Diciclohexilcarbodiimida (DCC); DMSO-d6 (Sigma Aldrich[®], USA); 1,2desteroilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000-anima (Avanti Polar Lipids; Alabaster, AL, USA); Estearato de polioxietileno 40 (Sigma Aldrich[®], USA); Fosfato de sódio dibásico anidro (Synth[®], Brasil); Fosfato de sódio monobásico (Synth[®], Brasil); Lauril sulfato de sódio (Chem Impex, USA); Membrana de celulose (D9402-100FT, avg. flat width 76mm/3in. (Sigma Aldrich[®], USA); Metanol grau CLAE (J.T. Baker[®], USA); Óleo de rícino hidrogenado e etoxilado 40 OE (PharmaSpecial, Brasil); PEG400 (Synth[®], Brasil); Poloxamer 407 (Sigma Aldrich[®], USA); Piridina (Sigma Aldrich[®], USA); Rapamicina (Hangzhou APiChem Technology Co., Ltd.; China) Triglicérides do ácido cáprico/caprílico (Via Farma, Brasil); tween 80 (Synth[®], Brasil); ultrafiltros amicon 50.000 Da (Sigma Aldrich[®], USA); Dulbecco's Modified Eagle (DMEM), Gibco[™]; *Mammary Epithelial Cell Growth Medium Bullet Kit* (MEGM) Lonza.

4.2 Principais equipamentos

Agitador magnético com aquecimento (Fisatom, modelo 752^a); Amicon[®] Ultra-4 Centrifugal Filter Units; Balança semi-analítica (Shimadzu, modelo AW220); Banho ultrassônico – Ultrasonic Cleaner (Unique); Citometro Attune[®] (Thermo Fisher Scientific) Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent[®]); Coluna C18-E (250 mm x 4.6mm 5µm, Phenomenex, EUA); Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent[®]); Coluna C18-E (250 mm x 4.6mm 5µm, Phenomenex, EUA); Dissolutor SR-8 Plus Hanson Research[®]; Differential Scanning Calorimetry (Jade DSC PerkinElmer equipment); Estufa modelo 702.780 (Quimis[®]); IR Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (shimadzu, modelo Prestige 21); Liofilizador Edwards Vácuo (Edwards, Brasil); Microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-100CX2; microplaca Thermo Multiskan EX; Microscópio Confocal (Zeiss LSM 800); Nuclear Magnetic Resonance Bruker FOURIER 600 MHz (Bruker AVANCE III 600 MHz, Switzerland); pHmetro (Gehaka[®], Brasil); Q700 Sonicator (Qsonica, Newtown, CT, USA); Rotaevaporador RV[®] digital (IKA[®], Alemanha);

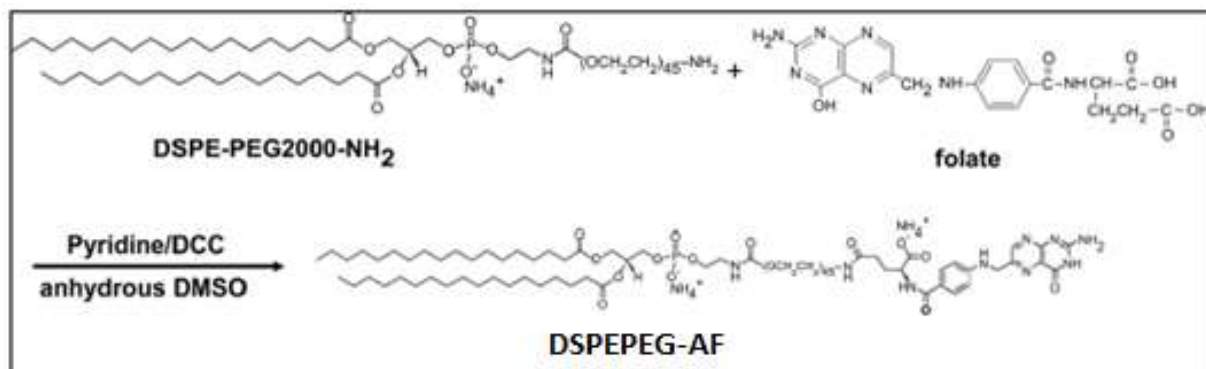
Spectraforce™ 16M Microcentrifuge (Labnet®, USA); Thermogravimetric Analyzer (TGA 4000, PerkinElmer); Zetasizer Nano NS Malvern Instruments (Malvern, UK).

4.3 Métodos

4.3.1 Funcionalização do ácido fólico com CLN

O DSPE-PEG-ácido fólico foi obtido de acordo com metodologia descrita por GAO et al. (2013). Diluiu-se 16,7mg de ácido fólico em 2mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, adicionou-se 66,7 mg de DSPE-PEG-NH₂ (1,2desteroilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000-anima) e 333μL de piridina. Logo em seguida adicionou 21,7mg de diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) e a mistura foi incubada por 24 horas com agitação no escuro. Após este tempo, essa solução foi rotaevaporada por 30 minutos à temperatura de 25°C, para remover a piridina e o filme formado foi hidratado com 16,7mL água. O produto foi dialisado com membrana de diálise de peso molecular 300.000 (MWCO) utilizando uma solução de cloreto de sódio 50mM e depois com água, respectivamente, conforme ilustra a Figura 3. Posteriormente, o composto purificado foi liofilizado. O lipídio funcionalizado (DSPE-PEG-AF) foi um constituinte da fase oleosa do CLN (GAO et al., 2013).

Figura 3. Esquema representativo da síntese de funcionalização do lipídio DSPE-PEG-NH₂ juntamente com o ácido fólico, formando uma nova molécula sintetizada.



Fonte: Gao, 2013

4.3.2. Espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-vis) para identificação da ligação do ácido fólico com o lipídio DSPE-PEG-NH₂

A reação de funcionalização do DSPE-PEG-NH₂ com ácido fólico (AF) foi confirmada por espectrofotometria no ultravioleta visível. As análises de UV-vis foram

analisadas ao longo da purificação da síntese, sendo realizadas leituras do sobrenadante do produto dialisado, em um comprimento de onda de 290nm.

4.3.3. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho para identificação da funcionalização com ácido fólico no CLN

Para as análises de infravermelho, foi utilizado um espectrômetro Perkin Elmer modelo Spectrum 2000, realizando as análises na região de 4000 a 370 cm^{-1} e resolução de 1 cm^{-1} . As amostras de ácido fólico, DSPE-PEG-NH₂, e DSPEPEG-AF foram diluídas com KBr e preparadas na forma de pastilha, utilizando-se uma proporção 3:1 (KBr:DSPE-PEG-NH₂; KBr:AF; KBr:DSPE-PEG-AF).

4.3.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para detectar a funcionalização com ácido fólico no CLN

As análises foram realizadas em um espectro de ressonância magnética nuclear de ¹H obtido em um espectrômetro Brucker–Advance DRX600, operando em 600 MHz. As amostras de ácido fólico, DSPE-PEG-NH₂, e DSPE-PEG-AF foram preparadas em solvente deuterado DMSO-d₆ (Sigma Aldrich).

4.3.5. Desenvolvimento do carreador lipídico nanoestruturado (CLN)

Os CLN foram desenvolvidos segundo Sato et al. (2017a), com adaptações, sendo constituídos de 0,88% p/v de óleo de rícino hidrogenado etoxilado 40OE (OE), 2,05% p/v de triglicérides do ácido cáprico/caprílico (TGACC), 2,07% p/v de estearato de polioxietileno 40 (EP), 5% DSPE-PEG-NH₂ m/m (1,2-desteroilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000-amina) (ou DSPE-PEG-ácido fólico, sintetizado previamente, no caso do preparo de CLN funcionalizado), na fase lipídica, 3,5% m/m de poloxamer 407 (P-407) e água ultrapurificada p/v qsp, na fase aquosa.

As duas fases (aquosa e lipídica) foram pesadas em béqueres separados. A fase aquosa contendo tensoativo, foi aquecida a 70 °C e a fase lipídica a 65 °C. Desta forma, verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa em agitação magnética constante, originando uma pré-emulsão. A pré-emulsão foi levada ao sonicador com amplitude de 35%, por 1 minuto com intervalo de 30 segundos, repetindo esse ciclo 5 vezes. Todo esse processo de sonicação ocorreu em banho de gelo para a cristalização lipídica e a formação dos CLN.

Mais tarde, os CLN foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos para eliminar resíduos de titânio desprendidos da haste durante o processo de sonicação (AGAYAN et al., 2004), e posteriormente acondicionados em frascos âmbar e mantidos em $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.3.6. Incorporação da rapamicina no CLN

A rapamicina (RAP) foi incorporada tanto no CLN funcionalizado com ácido fólico quanto no CLN não funcionalizado. A incorporação da RAP no CLN aconteceu da seguinte forma: a RAP foi adicionada na fase lipídica a uma concentração de 1%, 3% e 5% (m/v) e a fase aquosa foi vertida na fase lipídica fundida sob agitação, originando uma pré-emulsão e posteriormente submetida à sonicação, como já descrito anteriormente (LIMA et al., 2013; SIMAMORA, 2001a).

4.4. Caracterização físico-química dos CLN

4.4.1. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (Z-Ave) e do potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico médio e o potencial zeta foram determinados pela técnica de correlação de fótons (conhecida como *quasi-elastic light scattering*) e mobilidade eletroforética das nanopartículas, respectivamente, empregando o equipamento Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, Malvern, UK). As análises foram realizadas em temperatura ambiente e as amostras diluídas em água ultra-purificada (1:100); mantidas em frasco fechado. As amostras foram vertidas em uma cubeta e colocadas na célula eletroforética. Foram determinadas 6 replicatas de diâmetro e de potencial zeta, calculando a média e o desvio padrão entre cada análise. As formulações foram analisadas nos tempos de 1, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias para avaliar a estabilidade das formulações (NEMEN, 2011).

4.4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As fotomicrografias foram registradas em diferentes ampliações utilizando um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-100CX2, operando a uma voltagem de aceleração de 200 kV. As amostras do CLN funcionalizado ou não acrescidas de RAP foram depositadas sobre grids de cobre revestidas com uma fina camada de carbono (Cu grid 200 mesh), que posteriormente foram secas à pressão atmosférica e temperatura ambiente. Os

diâmetros foram determinados pela média de no mínimo 100 partículas de uma micrografia representativa.

4.4.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Todas as matérias-primas utilizadas para o preparo dos CLN, assim como as formulações, foram analisadas por DSC (DSC-TA Instruments, modelo DSC Q10), para verificar informações estruturais das partículas, uma vez que as alterações estruturais são acompanhadas de trocas de calor, nas temperaturas de 0 a 900 °C, com aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio, a um fluxo de 50 mL/min. Para isso, utilizou-se cerca de 5 mg de amostra em um cadinho de alumínio selado colocado no calorímetro.

4.4.4. Termogravimetria (TG)

A técnica de TG foi utilizada para verificar a estabilidade térmica dos materiais para preparar os CLN e as formulações prontas. O equipamento utilizado foi um SDT 600 Simultaneous DTA-TG da TA Instruments. Todas as amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina e aquecidas até 600 °C com uma taxa de 5 °C/min sob fluxo de nitrogênio de 100 mL/min.

4.4.5. Validação analítica para quantificação da rapamicina por CLAE

O método analítico foi desenvolvido mediante adaptação da metodologia de Bougueon et al. (2016), utilizando uma coluna C18, volume de injeção de 20µL e a fase móvel constituída de metanol e água (80:20 v/v, 40 ±0,5 °C, detector de 277nm). Foram determinados parâmetros como linearidade, precisão, seletividade, exatidão, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação e robustez (ANVISA, 2017; BOUGUÉON et al., 2016; ELOY et al., 2016b; LIMA et al., 2013).

4.4.5.1. Linearidade

A linearidade foi obtida como uma média de três curvas analíticas, expressas em área do pico *versus* a concentração de fármaco, obtendo o coeficiente de correlação (r^2). Foram testados oito pontos com as concentrações do fármaco (1, 2.5, 5, 10, 30, 50, 70 e 100 µg/mL).

4.4.5.2. Precisão

Realizou-se a precisão de duas maneiras: a intracorrida, indicada pela repetibilidade do método, sendo injetadas seis vezes as amostras na concentração de 50 µg/mL, no mesmo dia e nas mesmas condições de trabalho, e a precisão intermediária, realizada por analista diferente, sendo também injetadas seis vezes as amostras, sob as mesmas condições experimentais.

4.4.5.3. Exatidão/Recuperação

A exatidão foi estabelecida a partir de uma solução estoque de RAP, diluída em fase móvel, obtendo as concentrações 5, 50, 100 µg/mL (baixa, média e alta, respectivamente). Foram injetadas cinco vezes cada concentração de amostra e a exatidão foi calculada por meio da equação 1.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{C}{CO} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

em que: *CO* é a concentração teórica e *C* é a concentração média determinada experimentalmente.

4.4.5.4. Especificidade/Seletividade

A especificidade e seletividade garantem ao método analítico que não ocorra interferentes na análise cromatográfica, permitindo a quantificação do fármaco sem que constituintes da formulação e da fase móvel coeluem no pico cromatográfico do fármaco. A concentração de fármaco injetada foi de 100 µg/mL e as amostras de CLN-AF livre, metanol, água, foram filtradas, injetadas e analisadas em triplicata.

4.4.5.5. Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Esses parâmetros foram determinados utilizando solução de fármaco em três concentrações, baixa, média e alta, 1, 2.5 e 5 µg/mL, respectivamente. As áreas foram calculadas em triplicata seguindo as equações 2 e 3.

$$LD = \frac{3 \times DP_a}{IC} \quad \text{Equação 2}$$

$$LQ = \frac{10 \times DP_a}{IC} \quad \text{Equação 3}$$

em que: LD = limite de detecção, DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo do y, IC = inclinação da curva de calibração e LQ = limite de quantificação.

4.4.5.6. Robustez

Para verificar se o método é robusto, foi verificada a estabilidade da solução analítica de RAP 150 µg/mL, CLN e CLN-AF incorporado 50 e 100 µg/mL, a fim de verificar a estabilidade por 24, 48, 72 e 96h, alterando alguns parâmetros analíticos tais como: comprimento de onda de 276 e 278, fluxo da fase móvel 0.90 e 1.1 mL/min., concentração da fase móvel (metanol : água nas proporções 79:21 e 81:19) e temperatura de 39°C e 40°C.

4.4.6. Eficiência de Encapsulação (EE%) da rapamicina

As análises de %EE do CLN foram realizadas conforme Fachinetti et al. (2018), com algumas modificações. Para realizar a %EE foi utilizada a ultra-filtração empregando ultrafiltros amicon 50.000 Da, centrifugados por 3600 rpm por 15 min., com a intenção de separar o fármaco não encapsulado, do CLN. As amostras foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme método analítico anteriormente validado. Os cálculos da eficiência de encapsulação (EE %) foram realizados segundo a equação 4:

$$EE\% = \frac{\text{Fármaco incorporado no CNLs } (\mu g) - \text{Fármaco livre } (\mu g)}{\text{quantidade de fármaco total no CNLs } (\mu g)} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

4.5. Estudos de liberação *in vitro* do fármaco

4.5.1 Avaliação da solubilidade da rapamicina

A determinação da solubilidade da rapamicina foi realizada empregando método de equilíbrio (BOUGUÉON et al., 2016; SIMAMORA, 2001b) em tampão fosfato pH 7,4 contendo lauril sulfato de sódio (tensoativo) nas concentrações de 0,2%; 0,5%; 1,0%.

Adicionou-se a rapamicina em excesso nas diferentes soluções, para garantir a saturação, e as mesmas foram mantidas sob agitação em um homogeneizador por 72h. As amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi filtrado e quantificado por CLAE.

A concentração de fármaco foi quantificada a partir das curvas analíticas previamente validadas.

4.5.2. Ensaio de liberação *in vitro* da rapamicina em carreadores lipídicos nanoestruturados

O estudo *in vitro* do perfil de liberação, visando avaliar a quantidade de fármaco liberada pelo tempo, foi realizado a partir do estudo de Eloy e colaboradores (2016), empregando um dissolutor com cuba reduzida (100 mL), uma membrana de diálise (D9402-100FT, avg. flat width 76mm/3in. Sigma Aldrich®), com auxílio de aparato 1 (cesto) do dissolutor (SR8PLUS, Hanson), na temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em meio de dissolução tampão fosfato, pH 7,4, acrescido de 1,0 % (v/v) de lauril sulfato de sódio para manter as *sink conditions* com agitação de 50 rpm. As amostras foram coletadas do dissolutor nos tempos 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12 e 16h, filtradas e quantificadas por CLAE (ELOY et al., 2016b).

4.6. Citotoxicidade *in vitro* dos CLN

A linhagem tumoral de mama MCF-7 (baixa expressão de receptor de folato) (SONVICO et al., 2005), a linhagem tumoral de câncer de pulmão (LEWIS) e a linhagem humana não cancerosa MCF-10A (CALERO et al., 2015), de acordo com a Figura 4, foram cultivadas em DMEM (meio Dulbecco's Modified Eagle) e MEGM (*Mammary Epithelial Cell Growth Medium Bullet Kit*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico/solução antimicótica, a 37°C e incubadas com 5% de CO_2 . Após atingir 90% de confluência, as células foram tripsinizadas e transferidas para placas de 96 poços ($2,5 \times 10^5$ células/mL) e incubadas por 24 horas a 37°C . Após a remoção completa do meio de cultura, os poços foram lavados com PBS, pH 7,4, e os grupos experimentais diluídos em meio de cultura (rapamicina livre, CLN-AF, CLN-AF-RAP) foram aplicados às placas, as quais foram incubadas novamente a 37°C por 24h.

Após a incubação, lavou-se os poços com PBS e a solução de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) foi adicionada e incubada por 4 horas a 37°C . A absorbância foi lida a 540 nm em um fotômetro de microplaca Thermo Multiskan EX. A concentração resultante de 50% de morte celular (IC_{50}) foi calculada usando curvas de viabilidade celular

e os experimentos foram realizados em triplicata (SEO et al., 2015a; VENUGOPAL; HAI, 2012; ZHANG et al., 2008).

Figura 4. Fotomicrografias das células estudadas MCF-7, LEWIS e MCF10-A, respectivamente.



4.7. Avaliação da internalização celular do CLN incorporado com rapamicina funcionalizado com ácido fólico por meio de citometria de fluxo (CF)

Para citometria de fluxo, CLN funcionalizado com ácido fólico contendo 0,5% molar de DiO (3,3-diocetadeciloxacarbocianina perclorato), um corante fluorescente de camadas lipídicas, foi preparado. A avaliação foi realizada em células LEWIS, MCF-7 e MCF-10A. Para este estudo, foi necessário o crescimento das células ($2,5 \times 10^5$) em placas de 24 poços por 24h, após a incubação as formulações foram incubadas por 6h e 24h. Após lavagem com PBS, os poços foram tripinizados, o meio completo foi adicionado, centrifugado e ressuspensão com meio, sendo as amostras analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto I, com $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 530/30 \text{ nm}$ para Dio e $\lambda_{exc} = 588 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 670$ para iodeto de propídio (DAL MAGRO et al., 2018; ELOY et al., 2017b).

4.8. Avaliação da internalização celular de CLN incorporado com rapamicina funcionalizado com ácido fólico através da técnica de microscopia confocal

O ensaio de internalização celular *in vitro* foi realizado por microscopia confocal, utilizando um corante fluorescente (perclorato de 3,3-diocetadeciloxacarbocianina - 0,5 mol% DiO) encapsulado no CLN funcionalizado, preparado conforme descrito anteriormente (ELOY et al., 2017). Para este estudo, foram utilizadas as linhagens LEWIS, MCF-7 e MCF-

10A. As células foram cultivadas em lâminas de vidro com DMEM e MEBMTM suplementado com o kit, contendo 1×10^6 cel/mL em placas de 6 poços, incubadas por 24 horas a 37 ° C com 5% de CO₂. Sequencialmente, as células foram lavadas com PBS e as formulações foram incorporadas e incubadas novamente por 24 horas. Após o tratamento, as formulações foram removidas e as células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído (1%) e incubadas a 4 °C. Finalmente, eles foram lavados novamente com PBS e antes de adicionar as lamínulas, 1µL de DAPI (4', 6-Diamidino-2-Fenilindol, Dicloridrato) foi adicionado para marcar o núcleo, Empreou-se na análise microscópio usando $\lambda_{exc} = 405$ nm, $\lambda_{em} = 413-472$ nm (DAPI) e $\lambda_{exc} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 503-588$ nm (Dio).

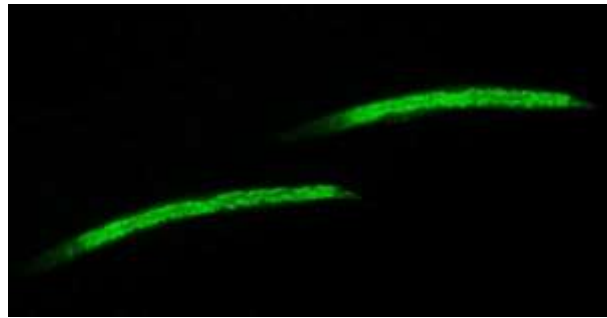
4.9. Metodo alternativo usando *C. elegans*

O estudo deste método alternativo usando *C. elegans* foi realizado durante estágio sanduíche no período de 30/11/2019 a 01/12/2020, na Universidade de Navarra, Espanha, sob supervisão do Prof. Dr. Juan Manuel Irache Garreta. Este método visa verificar toxicidade do sistema, diminuição de gordura, mostrando eficácia do fármaco e verificar o tempo de vida útil dos *C. elegans*.

4.9.1. Cepas de *C. elegans*

A cepa usada para os ensaios foi o tipo selvagem N2 Bristol fornecido pelo Caenorhabditis Genetics Center (CGC, EUA) e *C. elegans* foi cultivado conforme descrito por Brenner et al., 1974. *Escherichia coli* OP50 foi usada como uma dieta normal de nematóides. Todos os experimentos foram realizados em vermes cultivados e mantidos em meio de crescimento de nematóides (NGM) sem glicose a 20 ° C (BRENNER et al., 1974). A Figura 5 mostra um *C. elegans* no estágio L4.

Figura 5. *C. elegans* corado com vermelho do Nilo no estágio L4.



4.9.2. Tratamento com CLN carregado com rapamicina e funcionalizado com AF

Os experimentos foram realizados em triplicata em placas de 6 poços contendo 4 mL de NGM por poço. Como controle positivo, utilizamos o orlistat (6 µg/mL) para verificar a redução da gordura (MARTORELL et al., 2012; OLSEN, 2011). As concentrações testadas de rapamicina (RAP) foram 150, 75 e 37,5 µM, as quais foram dissolvidas em DMSO. As nanopartículas foram adicionadas às placas contendo uma concentração de 75 µM de rapamicina. Após adição de CLN-AF-RAP e CLN-AF, as placas foram solidificadas e secas por dois dias em ambiente escuro para protegê-las da oxidação leve. As placas foram solidificadas e após dois dias, 100 µL de suspensão de *E. coli* OP50 foram adicionados a cada poço. Todos os vermes foram sincronizados e os ovos foram obtidos em meio M9 (STIERNAGLE et al., 1999). Cerca de 300 a 500 larvas em estágio L1 e L2 foram adicionadas às placas, e essas placas foram incubadas por 46 horas a 20 °C até que as larvas atingissem o estágio L4 (LUCIO et al., 2017; PINO et al., 2013).

4.9.3. Quantificação do teor de gordura

Para quantificar os níveis de gordura de *C. elegans*, foi utilizado corante vermelho do Nilo conforme descrito por Pino et al. (2013). Os vermes foram retirados das placas com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato com 0,01% de triton-x (PBST) e lavados duas vezes com PBST. Em seguida, para interromper a atividade faríngea, os vermes foram deixados por 15 minutos em gelo e fixados em isopropanol 40%, foram adicionados 150 µL de vermelho do Nilo para corar os vermes por 30 minutos na incubadora a 20 °C. Por fim, os

vermes foram lavados novamente com PBST e fixados em lâminas de agarose 2% para visualização em microscópio de fluorescência. As lâminas dos vermes foram submetidas a um microscópio de fluorescência com ampliação de 80x no SMZ18 da Nikon (Nikon Instruments Inc., Japão) contendo um sistema de epi-fluorescência, um filtro GFP (Ex 480-500; DM 505; BA 535-550) e um digital câmera anexada. As imagens foram obtidas a partir de uma triplicata de experimentos, todos nas mesmas condições. Os controles utilizados foram vermes não tratados (denominados NGM) e o controle positivo tratado com Orlistat, onde foram calculadas as porcentagens de redução de gordura (PINO et al., 2013).

4.9.4. Tempo de vida

O efeito da administração das nanopartículas na vida útil de *C. elegans* foi observado por 46 horas. As larvas L1 foram sincronizadas e transferidas para placas NGM contendo CLN vazio (grupo de controle) ou CLN-AF-RAP por 46h, para permitir que *C. elegans* se desenvolva até a idade adulta. Os vermes foram recolhidos no estado L4 e aproximadamente 50 vermes foram transferidos para novas placas contendo 40 mmol/L de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (FUDR) para prevenir o crescimento de novos vermes. O número de vermes vivos foi contado diariamente e os vermes mortos foram removidos das placas para facilitar a contagem. O experimento teve duração de 26 dias.

4.10. Modelo xenográfico de atividade antitumoral *in vivo*

Para comprovar a ação terapêutica do CLN-AF incorporados com rapamicina e funcionalizado com ácido fólico (CLN-AF-RAP), tumores subcutâneos com células de 4T1 (células cancerosas de mama de camundongos) foram desenvolvidos em camundongos Swiss, após aprovação do experimento pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP (protocolo número 26/2020).

Quando os tumores atingiram aproximadamente 100mm³ (após 10 dias da inoculação), os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos diferentes, contendo 6 animais por grupo, sendo: grupo negativo (administração de solução PBS), controle positivo (administração de Taxol[®]), Rap livre (administração de solução de rapamicina livre), CLN-AF e CLN-AF-RAP. A solução de rapamicina livre continha 4% de etanol, 5,2% de tween 80 e 5,2% de PEG400 em solução salina (CHEN et al., 2013a).

Os animais foram tratados com administração intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV) de 0,2 mL de solução de rapamicina livre e CLN-AF-RAP contendo dose de rapamicina de 15 mg/kg a cada três dias, sendo o controle negativo tratado com 0,2 mL de solução salina a cada 4 dias e o controle positivo tratado com 0,15 mL de RAP administrada por via intravenosa a cada 4 dias contendo uma dose de 10mg/kg.

O tumor foi monitorado a cada dois dias com um paquímetro. O volume do tumor foi calculado da seguinte forma: $V = (hb)^2/2$ (onde hb são indicados pela altura e base do tumor). Após a conclusão do estudo, os tumores foram removidos e submetidos à análise histológica (BLANCO et al., 2014; CHEN et al., 2013b; JOSIMAR; O. ELOY; RAQUEL PETRILLI; DEISE; L. CHESCA; FABIANO; P. SAGGIORO; ROBERT; J. LEE, 2017; LUYIMBAZI et al., 2010; MERAZ et al., 2014).

4.10.1. Histologia de tecidos de camundongo após tratamento com rapamicina

Após 24 horas do último tratamento Ip e IV, os animais de todos os grupos foram sacrificados e os principais órgãos foram coletados para exame histológico. Os rins, fígado, pulmões e tumor foram excisados e fixados em formaldeído 3,7 - 4% p / v tamponado a pH = 7 e estabilizado com metanol para diagnóstico clínico (Applichem) durante a noite antes de preservar em etanol 70%. Amostras de órgãos de tamanho apropriado foram então embebidas em parafina, cortadas em fatias de tecido com 5 µm de espessura em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Os tecidos corados com H&E foram então estudados ao microscópio para alterações histológicas (DHANDHUKIA et al., 2017).

4.11. Análises estatísticas

Os dados estatísticos foram tratados segundo o software *GraphPad Prisma*, versão 5.01, e foi analisado por ANOVA com pós-teste de Turkey. Os valores foram considerados estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

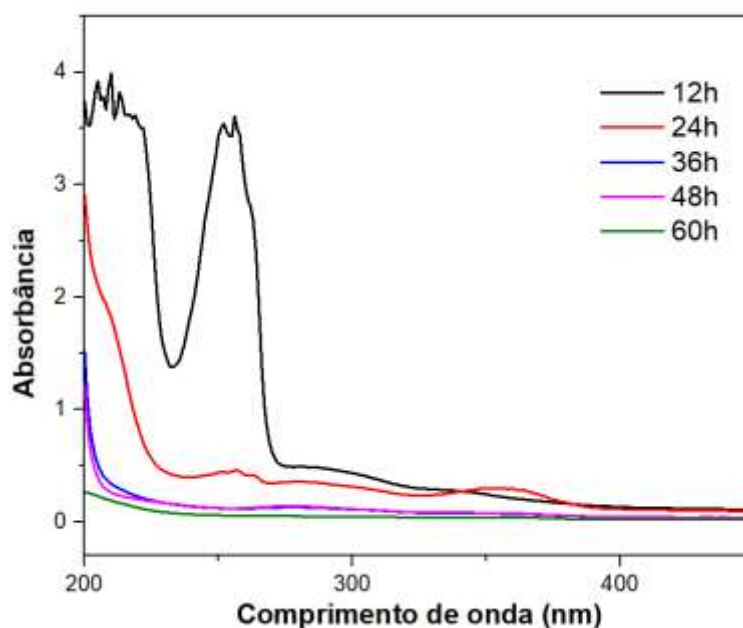
5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização do lipídio funcionalizado por espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-vis)

Por meio de monitoramento no UV-vis do ácido fólico em 290 nm, nos tempos de 12, 24, 36, 48, 60h de diálise (Figura 7), observou-se que com o passar do tempo a

concentração do ácido fólico livre diminuiu. Portanto, esses dados sugerem que o ácido fólico que inicialmente estava livre na reação passou a se ligar ao lipídio disponível na síntese, originando o DSPE-PEG-AF (DEVANAND VENKATASUBBU et al., 2013).

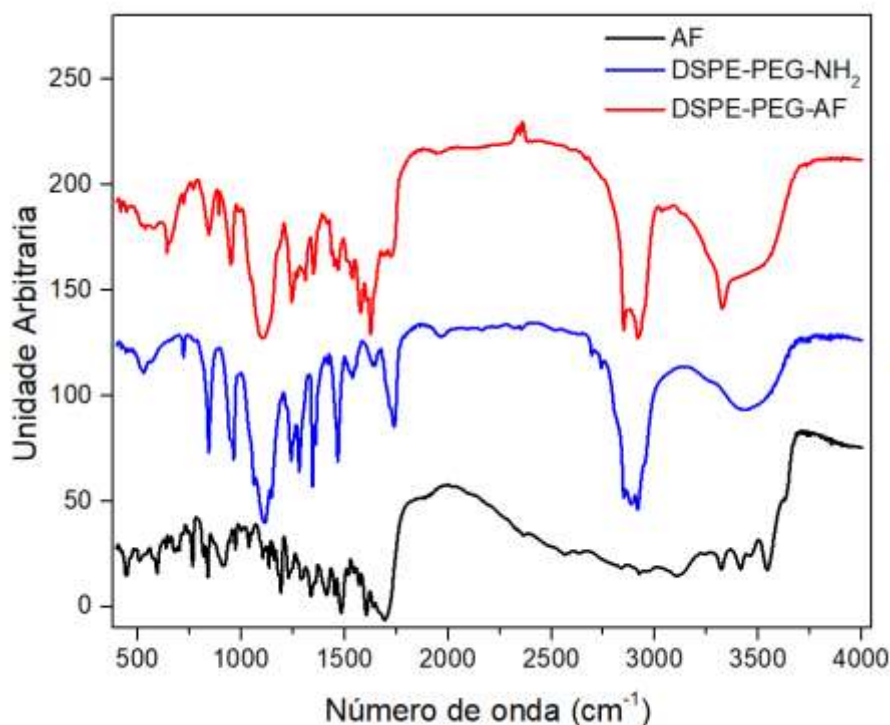
Figura 6. Espectrofotometria UV/Visível mostrando os tempos de 12, 24, 36, 48, 60h da síntese de DSPE-PEG-NH₂ juntamente com ácido fólico, possibilitando verificar a perda de ácido fólico ao longo dos tempos e obtendo o lipídio DSPE-PEG-AF



5.2. Caracterização por espectroscopia vibracional na região do infravermelho para identificação da funcionalização com ácido fólico no CLN

A técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho é importante, pois possibilita a identificação estrutural das moléculas. Desta forma, essa análise foi realizada para demonstrar que as ligações da molécula apresentam sua própria frequência de vibração e podem variar entre diferentes compostos (SCHOLKMANN et al., 2014). Os espectros de ácido fólico, do lipídio DSPE-PEG-NH₂ e do lipídio funcionalizado podem ser observados na Figura 8.

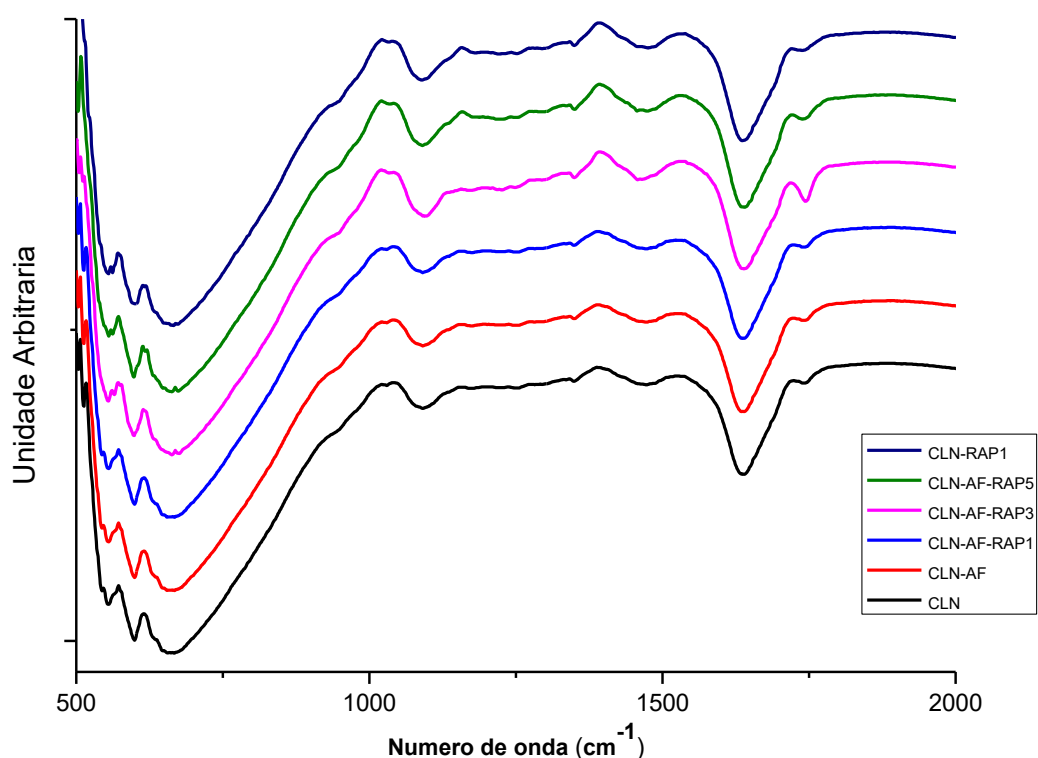
Figura 7. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho podendo verificar as bandas do ácido fólico (AF), do lipídio DSPE-PEG-NH₂ e o lipídio funcionalizado (DSPE-PEG-AF).



Na Figura 8 pode-se observar uma modificação da região entre 3400 e 3150 cm⁻¹, referente ao estiramento N-H da amina primária alifática e a hidroxila (OH) do ácido carboxílico. Por volta de 1650 cm⁻¹ observou-se uma banda que se refere ao estiramento C=C do anel aromático e em 1608 cm⁻¹ e uma banda referente a N-H da amida. Em 1641 cm⁻¹ observa-se uma banda referente a C=O, em 1240 cm⁻¹ um estiramento C-N e por fim em 1470 cm⁻¹ os anéis aromáticos (DEVANAND VENKATASUBBU et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2016).

As análises dos compostos separadamente evidenciam que o espectro do DSPE-PEG-AF apresenta uma banda entre 3500 e 3250 cm⁻¹ característica de um estiramento de grupo OH e em 1680 cm⁻¹ uma banda característica de (-CO)NH₂ da amida primária. Sugere-se que esse novo evento caracteriza uma nova substância, a DSPE-PEG-AF, conforme demonstrado na Figura 9.

Figura 8. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho das formulações CLN, CLN -AF, e os CLN contendo fármaco de 1% a 5% (CLN-AF-RAP1, CLN-AF-RAP3, CLN-AF-RAP5) e CLN 1% (não funcionalizado com 1% rapamicina).



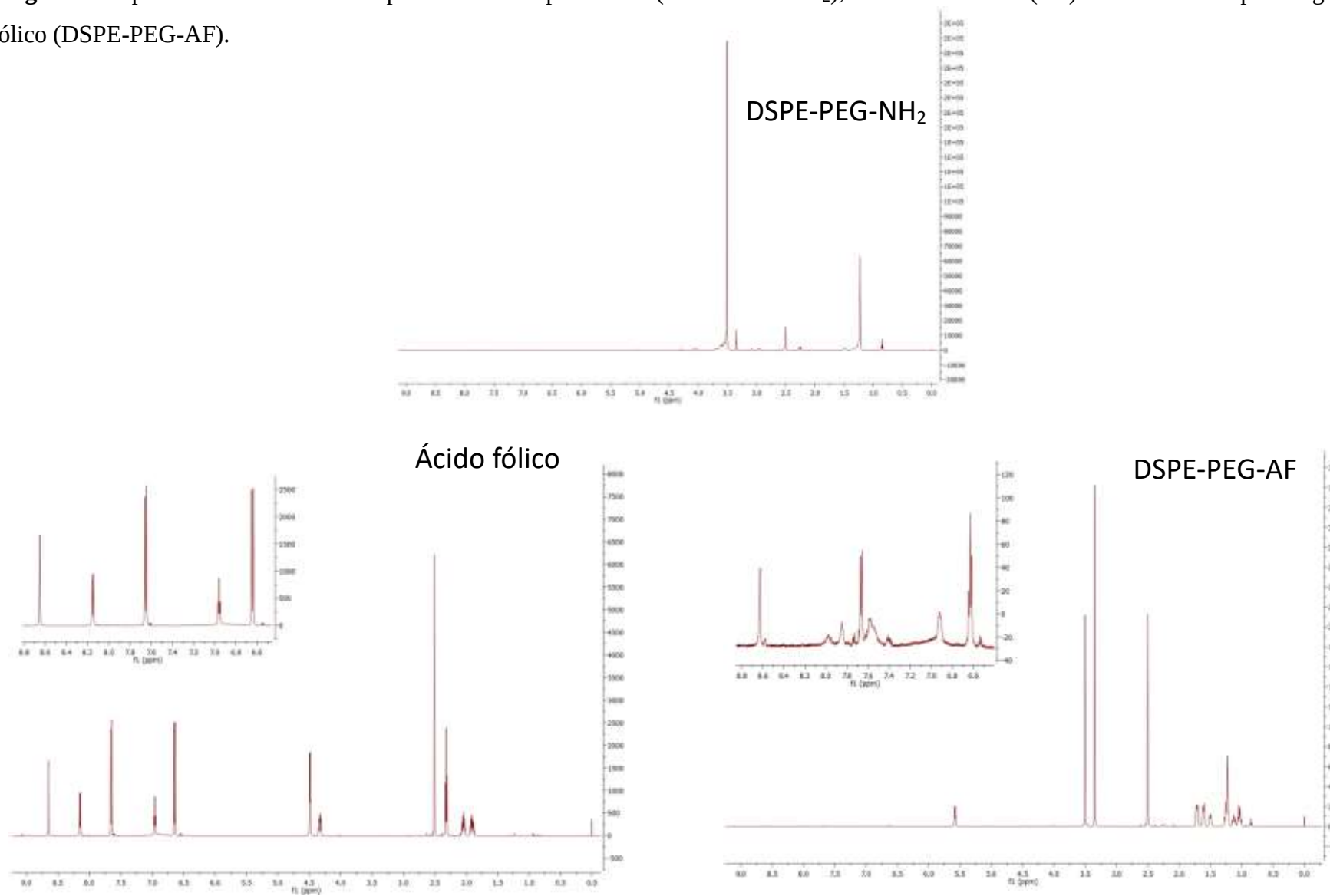
5.3. Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para identificação da funcionalização com ácido fólico no CLN

Após constatar que o ácido fólico foi ligado e não está mais em excesso no meio, realizou-se a análise de espectroscopia por RMN, que possibilita a determinação de interações supramoleculares, obtendo informações em relação à estrutura e dinâmica de complexos supramoleculares no nível atômico. A Figura 10 exibe os espectros de RMN, lipídio DSPE-PEG-NH₂, ácido fólico e do lipídio funcionalizado (DSPE-PEG-AF) de ¹H sendo comparados para a verificação da funcionalização (GAO et al., 2013).

Nos espectros da Figura 10 observa-se que para o lipídio DSPE-PEG-NH₂ não se verificou a presença de picos na região de 9 a 4.5 ppm. Já no espectro do ácido fólico livre observa-se vários picos nesta mesma região. Desta forma, ao analisar o espectro do lipídio funcionalizado com o ácido fólico (DSPE-PEG-AF), verificou-se que os sinais atribuídos na

região de 8,64, 7,64 e 6,64 ppm provavelmente são atribuídos à formação de uma nova ligação química entre o ácido fólico e o lipídio, mostrando que a reação de síntese foi eficiente, originando um lipídio funcionalizado (LATTIN et al., 2015).

Figura 9. Espectros de RMN de ^1H representando o lipídio livre (DSPE-PEG-NH₂), ácido fólico livre (AF) e a síntese do lipídio ligado ao ácido fólico (DSPE-PEG-AF).



5.4. Preparação dos CLN

O método do desenvolvimento dos CLN foi adaptado de Sato et al. (2017) (SATO et al., 2017b). Foram desenvolvidas 6 formulações: CLN, CLN-AF, CLN-RAP1%, CLN-AF-RAP1%, CLN-AF-RAP3%, CLN-AF-RAP5%. Após o preparo, os sistemas foram armazenados em frascos e mantidos sob refrigeração (4 ± 2 °C).

Estas condições foram extremamente importantes nesta etapa inicial de desenvolvimento do sistema, posto que influenciam diretamente no diâmetro hidrodinâmico médio e no índice de polidispersidade das nanopartículas, e consequentemente, na estabilidade final do sistema (TAN et al., 2010).

5.5. Caracterização físico-química dos CLN

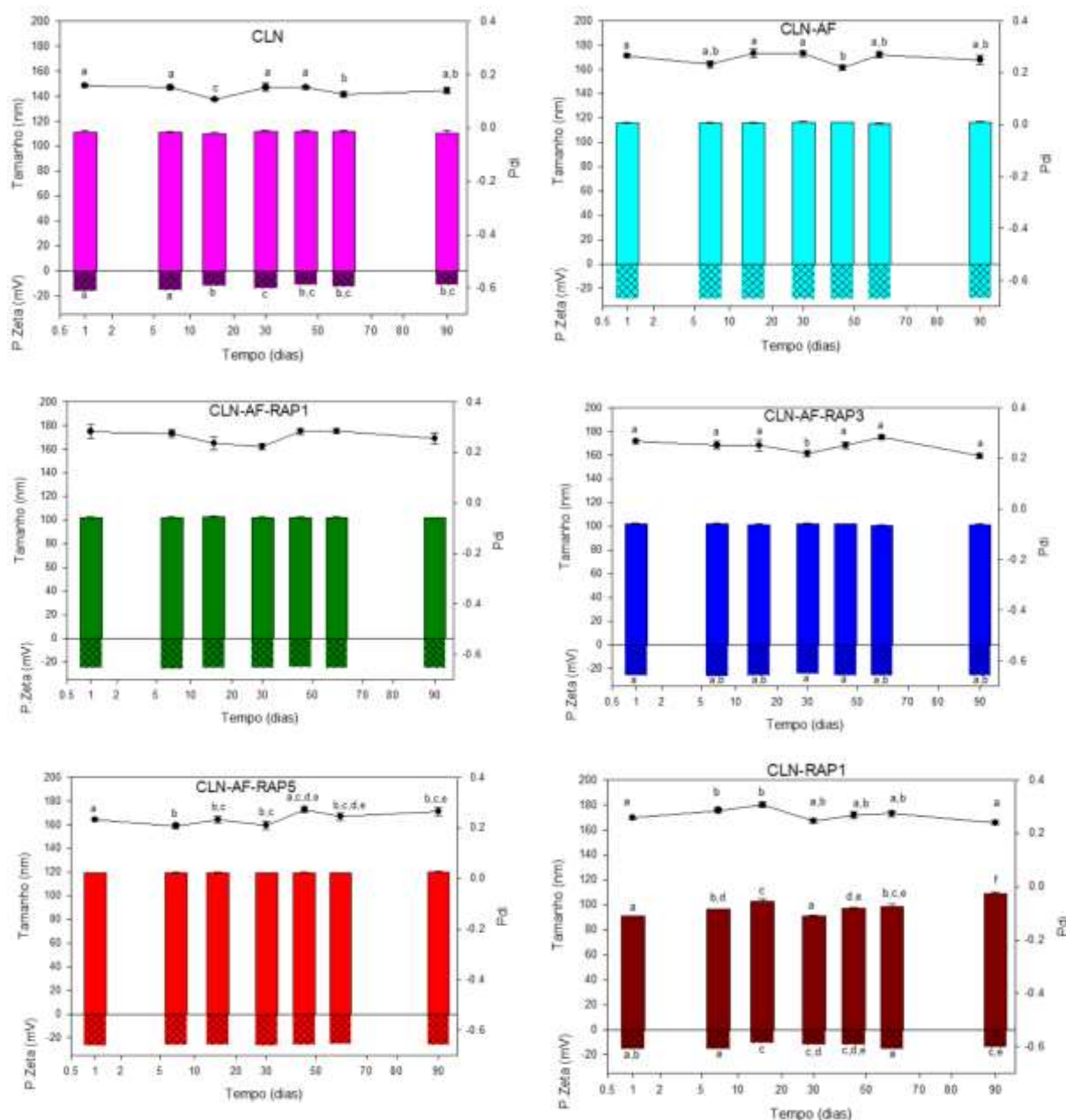
5.5.1. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e do potencial zeta dos CLN

As seis formulações foram avaliadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersidade e potencial zeta durante 90 dias. Os resultados foram avaliados pelo método estatístico Anova, utilizado para medidas repetidas no nível de significância de $p < 0,05$.

O tamanho das partículas é o primeiro parâmetro que pode sofrer alteração tanto em função dos componentes utilizados quanto da metodologia empregada (temperatura, tempo e pressão) (GUIMARÃES; RÉ, 2011).

Outro parâmetro necessário para determinar a distribuição do tamanho das partículas é o índice de polidispersidade. Os valores de índice de polidispersão quando estão abaixo de 0,5 indicam tamanhos de partículas distribuídos homogeneamente, porém quando esse índice é maior que 0,3, sugere-se uma distribuição heterogênea (LIFSON; CARTER; MILLER, 2015), o que pode indicar a presença de sistemas misto, como micelas (KRAUSE et al., 2010; LIU et al., 2007; NEMEN, 2011).

Figura 10. Tamanho PDI e potencial zeta dos CLN versus tempo em dia (média $\pm$ desvio padrão; n = 5). As letras iguais representam similaridade.



Os gráficos representados na Figura 11 mostram as seis formulações (CLN, CLN-AF, CLN-AF-RAP1, CLN-AF-RAP3, CLN-AF-RAP5 e CLN-RAP1) ao longo de 90 dias de armazenamento com os valores médios de diâmetro entre $90,68 \pm 0,475$ a $119,60 \pm 0,671$ nm, índice de polidispersidade $0,107 \pm 0,005$ a $0,307 \pm 0,01$ e potencial zeta $10,46 \pm 0,587$ a $28,95 \pm 0,496$.

A maioria das formulações não apresentou diferença estatística em relação ao diâmetro hidrodinâmico médio durante os 90 dias de armazenamento, exceto a formulação que não continha o lipídio funcionalizado (CLN-RAP1), para a qual pode-se observar uma variação no diâmetro hidrodinâmico médio todos os dias, no primeiro dia (T1) 90,68±0,475 nm, 7 dias (T7) 96,15±0,646 nm, 15 dias 102,75±1,70 nm, 30 dias 91,20±0,514 nm, 45 dias 97,29±0,465 nm, 60 dias 98,32±2,54 nm e 90 dias 109,20±0,842 nm, o que sugere que a funcionalização está contribuindo para a estabilidade das formulações.

Todas as formulações apresentaram índice de polidispersão menor que 0,3 após 90 dias de análise, resultado este que indica partículas com distribuição homogênea, caracterizando estabilidade durante todo período analisado. A análise estática evidenciou que não houveram diferenças nos valores de índice de polidispersidade ($p < 0,05$) ao longo do tempo de análise. Portanto, o índice de polidispersidade nos indica distribuição monodispersa das partículas no sistema, conforme mostra a Tabela 2 (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

Tabela 1. Valores de índice de polidispersão obtidos durante os 90 dias de armazenamento das formulações.

Tempo (dias)	T1	T7	T15	T30	T45	T60	T90
CLN	0,158±0,006	0,151±0,008	0,107±0,005	0,153±0,014	0,152±0,007	0,125±0,010	0,140±0,014
CLN-AF	0,266±0,006	0,233±0,012	0,275±0,017	0,274±0,011	0,220±0,010	0,270±0,037	0,250±0,027
CLN-RAP1	0,258±0,005	0,286±0,007	0,307±0,010	0,247±0,008	0,269±0,014	0,274±0,011	0,240±0,008
CLN-AF-RAP1	0,283±0,026	0,276±0,039	0,236±0,025	0,223±0,041	0,284±0,043	0,283±0,035	0,255±0,038
CLN-AF-RAP3	0,267±0,007	0,253±0,014	0,253±0,024	0,219±0,013	0,253±0,013	0,283±0,009	0,264±0,019
CLN-AF-RAP5	0,293±0,021	0,208±0,012	0,233±0,014	0,211±0,039	0,273±0,011	0,245±0,014	0,265±0,027

Abreviações: carreador lipídico nanoestruturado sem funcionalização (CLN), carreador lipídico funcionalizado (CLN-AF), carreador lipídico não funcionalizado com rapamicina (CLN-RAP1) e carreador lipídico funcionalizado com diferentes porcentagens de fármacos (CLN-AF-RAP1, CLN-AF-RAP3, CLN-AF-RAP5).

Os valores de índice de polidispersidade mostram que com o passar dos dias as formulações funcionalizadas apresentaram homogeneidade das dispersões. Já para o carreador que não contém o lipídio funcionalizado (CLN e CLN-RAP1) observou-se uma variação muito maior, sugerindo uma desestabilização quando observado o diâmetro hidrodinâmico médio, dados estes que corroboram os dados de potencial zeta que serão discutidos abaixo (ELOY et al., 2017a; SLAVCEV, 2013).

A análise do potencial zeta indica a estabilidade física dos sistemas coloidais, e avalia o potencial elétrico entre a superfície das partículas (OBEIDAT et al., 2010; ZHANG; YEE;

WANG, 2008). Este estudo ainda analisa o grau de repulsão/atração entre as partículas, originando valores numéricos de potencial zeta, sendo consideradas partículas mais estáveis em valores maiores de potencial zeta, pois ocorre uma maior força eletrostática, enquanto que em valores menores observa-se uma tendência de desestabilização (DAS; CHAUDHURY, 2011; FREITAS; MÜLLER, 1998; SAUPE; GORDON; RADES, 2006). A Figura 11 mostra os dados de diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersidade e potencial zeta analisados nos dias 1, 7, 15, 30, 45, 60, 90.

Assim como na análise de diâmetro hidrodinâmico médio e de índice de polidispersidade, todas as formulações foram avaliadas quanto ao potencial zeta, como mostra a Tabela 3.

Tabela 2. Valores de potencial zeta obtidos durante 90 dias de armazenamento das formulações.

Tempo (dias)	T1	T7	T15	T30	T45	T60	T90
CLN	-15,80±0,301	-15,45±0,635	-11,80±1,296	-14,00±1,296	-11,65±0,404	-12,45±1,46	-11,50±0,356
CLN-AF	-28,55±0,723	-28,95±0,496	-28,90±0,480	-28,50±0,403	-28,75±0,454	-28,75±0,647	-27,80±0,207
CLN-RAP1	-15,70±0,863	-15,67±1,608	-10,46±0,587	-11,75±0,783	-11,95±0,451	-15,70±1,009	-13,90±0,592
CLN-AF-RAP1	-25,50±0,446	-25,70±0,397	-25,10±0,605	-24,85±0,462	-24,60±0,666	-25,25±0,836	-25,10±0,446
CLN-AF-RAP3	-25,90±0,574	-26,30±0,657	-26,00±0,662	-24,70±0,607	-25,90±0,423	-25,90±0,489	-25,90±0,306
CLN-AF-RAP5	-26,65±0,717	-25,85±0,459	-25,95±0,432	-26,20±0,565	-26,05±0,542	-25,25±0,484	-25,75±0,566

Abreviações: carreador lipídico nanoestruturado sem funcionalização (CLN), carreador lipídico funcionalizado (CLN-AF), carreador lipídico não funcionalizado com rapamicina (CLN-RAP1) e carreador lipídico funcionalizado com diferentes porcentagens de fármacos (CLN-AF-RAP1, CLN-AF-RAP3, CLN-AF-RAP5).

A maioria das formulações exibiu potencial zeta maior que $|24\text{mV}|$, o que sugere estabilidade física adequada, provocada por interações eletrostáticas entre a superfície das partículas e o meio, durante 90 dias (OBEIDAT et al., 2010; SAUPE; GORDON; RADES, 2006).

Os valores negativos de potencial zeta podem ser justificados devido às estruturas químicas dos lipídios EP, TGACC, OE e DSPE-PEG-NH₂, contidos na fase lipídica dos CLN, visto que todos contêm em suas estruturas grupamentos carboxílicos livres na superfície da partícula responsáveis pela negatividade dos valores de potencial zeta (REDHEAD; DAVIS; ILLUM, 2001; VALE et al., 2015).

O P-407 adicionado na fase aquosa é constituído por copolímeros formados por blocos de polioxipropileno (POP) de caráter hidrofóbico e de polioxietileno (POE), hidrofílico, e age como um estabilizante estereoquímico de caráter não iônico, proporcionando que seus

monômeros se arranjam em micelas esféricas contendo POP no núcleo e POE em sua superfície, as quais se encaixam na superfície dos CLN por arranjo estérico, formando um filme na superfície da partícula, e assim, contribuindo para a estabilização dos CLN (LEE; SHIN; OH, 2003; LOURENCO et al., 1996; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

As análises estatísticas indicaram que as formulações sem a funcionalização exibiram diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores de potencial zeta em função do tempo armazenado, apresentando valores de potencial zeta relativamente baixos, indicando formulações pouco estáveis. Contudo, as formulações com a presença da funcionalização obtiveram valores de potencial zeta elevados quando comparadas as não funcionalizadas, não mostrando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre CLN-AF, CLN-AF-RAP1 e CLN-AF-RAP5, indicando alta estabilidade entre todas as formulações funcionalizadas, durante o período analisado (90 dias).

Desta forma, sugere-se que o fármaco não influenciou no diâmetro hidrodinâmico médio das partículas e tampouco no potencial zeta, sugerindo que as formulações apresentam partículas homogêneas e monodispersas, possibilitando uma menor interferência no processo de liberação e absorção do fármaco (MARCATO, 2009b; SCHAFFAZICK ET AL., 2003).

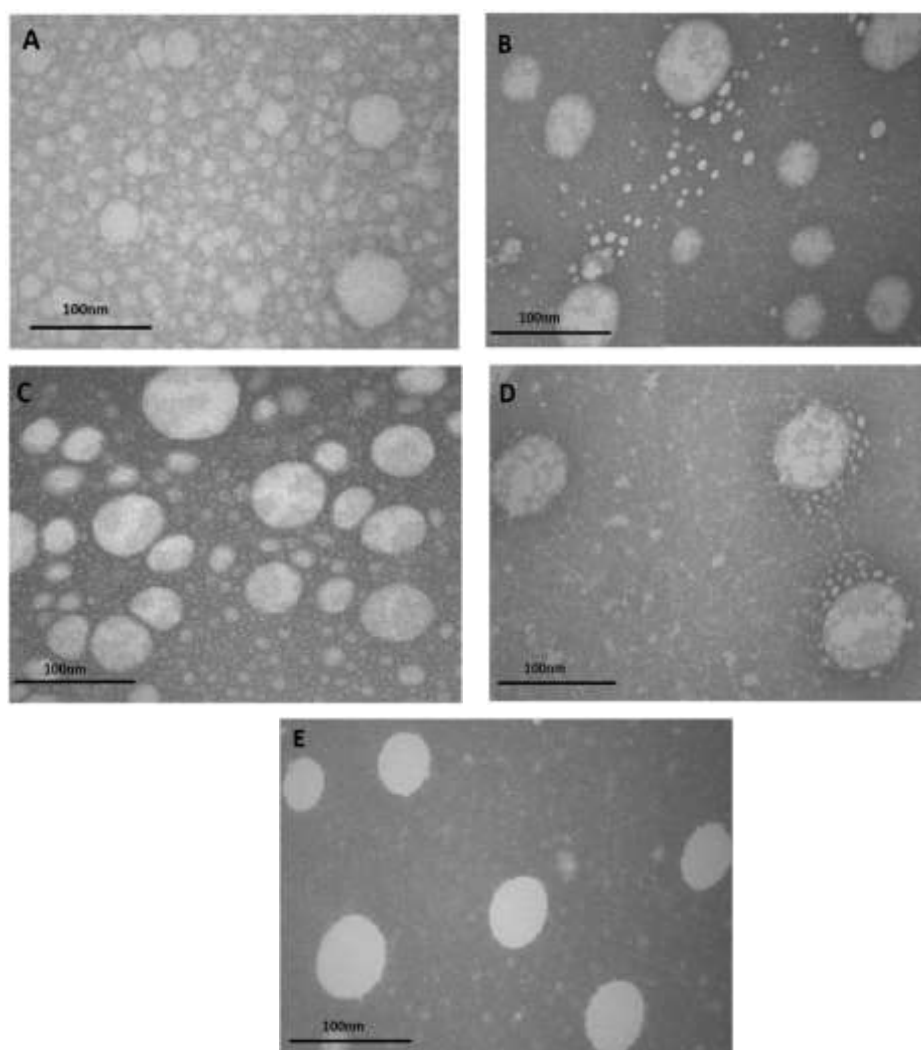
Concomitantemente, foram realizadas análises macroscópicas de estabilidade com avaliação a olho nu durante esses 90 dias de armazenamento, podendo-se observar que as dispersões permaneceram homogêneas, translúcidas e sem precipitados ou separação de fases durante os 90 dias de análises.

5.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As análises de MET evidenciam a morfologia e o tamanho dos CLN. Na Figura 12 observa-se as fotomicrografias obtidas para CLN, CLN-AF incorporados com RAP de 1 a 3% e não funcionalizado (CLN-RAP1), denominados de A, B, C, D e E respectivamente.

As fotomicrografias sugerem que todas as formulações apresentam tamanho de partícula próximo a $100 \text{ nm} \pm 0,9$ e que quando funcionalizadas e incorporadas com fármaco as formulações não apresentaram aumento significativo do tamanho, corroborando com os dados de diâmetro médio e potencial zeta, conforme mostra a Tabela 3, consequentemente com repulsão das partículas.

Figura 11. Microscopia eletrônica de transmissão obtida para as amostras A (CLN), B (CLN-AF), C (CLN-AF-RAP1), D (CLN-AF-RAP3) e E (CLN-RAP1).



Pela análise de DLS, as formulações apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de $111,30 \pm 0,437$ (CLN), $116,14 \pm 0,2914$ (CLN-AF), CLN-AF-RAP1 $119,05 \pm 0,237$, CLN-AF-RAP3 $102,10 \pm 0,119$ e CLN-RAP1 $97,29 \pm 0,795$ nm, respectivamente. A Figura 12 apresenta morfologia esférica das formulações e distribuídas em escala manométrica corroborando os dados por DLS (FANG et al., 2015).

5.5.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e termogravimetria (TG)

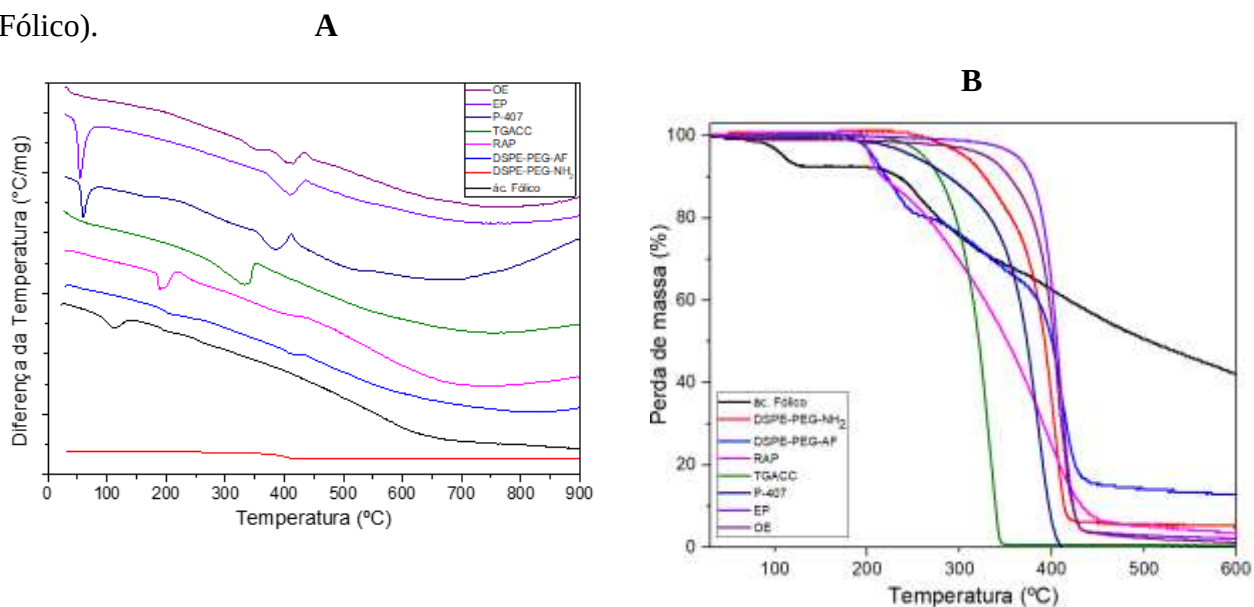
As curvas termogravimétricas (TG) apresentam perda de massa e massa residual em função da temperatura, ao passo que a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) demonstra o fluxo de calor em função do tempo, podendo assim determinar eventos

endotérmico e/ou exotérmico do material, como sua fusão, decomposição e transições de fase (CLÁUDIA BERNAL; ANDRÉA BOLDARINI COUTO, 2002; GAO et al., 2013; TIAN et al., 2013).

A Figura 13 mostra os termogramas de DSC (A) e TG (B) dos componentes utilizados no preparo dos CLN: óleo de rícino hidrogenado e etoxilado (OE), estearato polioxietileno 40 (EP), Poloxamer 407 (P-407), Triglicérides do ácido cáprico/caprílico (TGACC), rapamicina (RAP), DSPE-PEG-AF, DSPE-PEG-NH₂ e ácido fólico.

Deve-se destacar que a região demonstrada no termograma não contempla a faixa de 550°C a 900°C. Isso se deve ao fato de que a partir de 550°C só há a massa residual, sem nenhuma alteração na massa nem no fluxo de calor.

Figura 12. Termogramas de DSC (A) e TG (B) dos componentes utilizados no preparo dos CLN (OE, EP, P-407, TGACC, RAP, DSPE-PEG-AF, DSPE-PEG-NH₂ e ác. Fólico).



Na curva de TG do ácido fólico ocorre uma perda de massa na região de 100 °C que é relacionada à evaporação da água, consequente da umidade adsorvida ao material analisado. Quando se observa o DSPE-PEG-AF, sua decomposição começa em uma temperatura um pouco menor do que a do ácido fólico e do DSPE-PEG-NH₂, sugerindo que o novo composto tem uma estabilidade térmica um pouco menor que advém de uma nova molécula formada, podendo ser derivada da alteração estrutural cristalina ou amorfa.

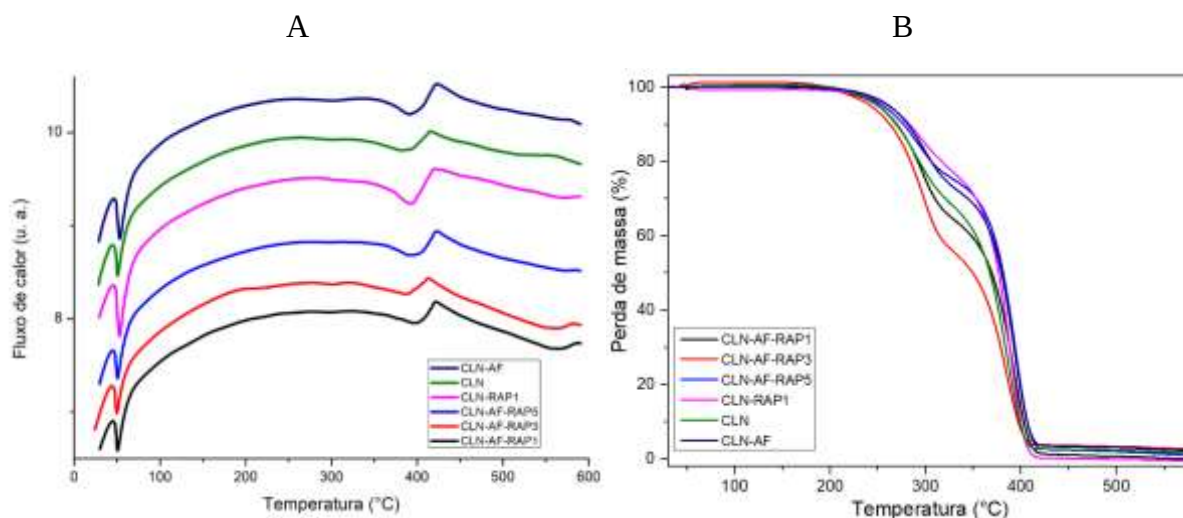
O P-407, TGACC, DSPE-PEG-NH₂, OE, EP são materiais com estabilidade térmica mais elevada, pois apresentam uma perda de massa em altas temperaturas. A decomposição é

um evento cinético de elevada complexidade, pois demanda de energia de ativação e são diversos os fatores que contribuem para aumento ou redução da estabilidade térmica, como: arranjo supramolecular, estrutura cristalina, tamanho dos poros do material, dentre outros, como descrito por Bikiaris et al. (2011) (BIKIARIS, 2011). O P-407 e o TGACC apresentam perdas de massa por volta da temperatura de 250 a 300 °C, e para o DSPE-PEG-NH₂ observa-se uma perda ainda maior.

O P-407 tem uma fusão de 55 °C, semelhante ao descrito por Rigon et al. (2016), que relataram um pico em 59 °C para o P-407. O DSPE-PEG-NH₂ tem um evento exotérmico que não está acompanhado de uma perda de massa, o ácido fólico também apresenta uma perda de massa que está relacionada à água e o fármaco RAP tem uma perda de massa associado a decomposição em torno de 200 °C, em relação ao descrito na literatura de 196 °C (RIGON et al., 2016a; SATO et al., 2017b).

A curva do componente EP apresentou um pico de fusão em 52 °C, e dados da literatura mostram um evento entre 38 a 54 °C, sugerindo que este componente está sendo fundido na formulação (RIGON et al., 2016b; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Já para o OE ocorreu um evento endotérmico com uma fusão em 16 °C, mesmo intervalo relatado pelo fabricante - 16-26°C (SATO et al., 2017b).

Figura 13. Termogramas de DSC (A) e TG (B) das formulações com e sem o fármaco incorporado (CLN-AF-RAP1, CLN-AF-RAP3, CLN-AF-RAP5, CLN-RAP1, CLN e CLN-AF).



Todas as formulações da Figura 14 apresentam um evento de fusão entre 45 a 48 °C, evento endotérmico em que não há perda ou ganho de massa associado a ele.

A decomposição ocorre em 2 etapas, que pode ser evidenciado pela primeira derivada da curva TG- a dTG – que demonstra 2 decaimentos de massa distintos. Todas as formulações apresentam massa residual zero, demonstrando que todo material foi decomposto.

Existem dois fatores importantes a se considerar: a temperatura inicial da decomposição – que se correlaciona com a estabilidade térmica, quanto menor o início da decomposição, menor é o *shelf-life* do material - e a quantia de massa decomposta na primeira decomposição – que correlaciona a fração mais susceptível a sofrer decomposição, quanto menos massa perde na primeira decomposição, mais estruturado está o “core” sistema (CHRISSAFIS; BIKIARIS, 2011).

A formulação contendo 5% de fármaco (CLN-AF-RAP5) teve a menor perda de massa, de 24,86%, podendo sugerir que a mesma tem maior termoestabilidade, ou seja, o fármaco está contribuindo com a integridade da formulação. Quando se compara o termograma referente à amostra CLN-AF-RAP3 observou-se uma perda de massa de 45,48%, sugerindo que concentrações maiores de RAP conferem uma organização estrutural mais estável ao sistema.

Nota-se que para a CLN-AF ocorreu a presença de um deslocamento em sua curva de termogravimetria, podendo sugerir uma maior estabilidade em relação à CLN não funcionalizada. Ao se comparar a estabilidade térmica dos constituintes isolados da formulação, observa-se que todos têm uma maior tolerância térmica, porém não pode-se correlacionar a estabilidade térmica desses constituintes isolados e esses mesmos constituintes em um sistema de liberação, pois em um sistema de liberação existem novas interações químicas e uma nova estrutura molecular, originando um novo perfil de estabilidade térmica, eventos estes que não acontecem com os constituintes isolados (CHADHA et al., 2013; CHADHA; BHANDARI, 2014).

5.5.4. Validação da metodologia analítica para quantificação da RAP por CLAE

Este estudo seguiu a normativa validada conforme as diretrizes de Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005) e a RDC 66/2017.

Neste contexto, o método testado foi adaptado de Bougueon et al. (2016) para análises cromatográficas de RAP por CLAE a 277 nm, e como fase móvel a mistura de metanol: água na proporção 80:20 (v/v), em que a curva analítica foi obtida em uma faixa de concentração de 1 a 100 µg/mL para RAP (BOUGUÉON et al., 2016).

Conforme descrito na literatura, a RAP apresenta uma clivagem do anel sendo uma reação típica que o RAP sofre sob condições experimentais. Os compostos do anel aberto exibem atividade imunossupressora. Este fármaco é constituído de uma mistura de dois isômeros conformacionais em várias soluções que são detectáveis por RMN. O componente principal é o isômero B (β) que contém 3-10% e menos de 0,5% do isômero C (γ) e A (α), respectivamente (SOBHANI et al., 2013).

Ao analisar o cromatograma deve-se garantir a aquisição de picos bem definidos (LLOYD SNYDER; JOSEPH J. KIRKLAND, 1997). Os resultados obtidos estão condizentes com as normativas e a literatura, uma vez que o espectro de absorção da RAP apresentou um pico nítido em 277 nm no tempo de retenção de 7,5 minutos (Figura 16).

5.5.4.1. Curva Analítica (Linearidade)

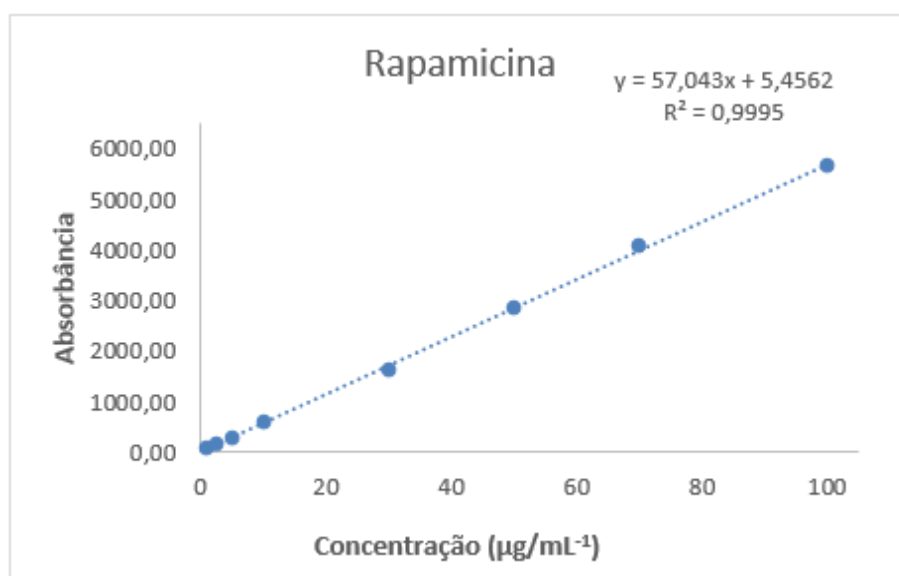
A linearidade nos mostra que o método analítico representa resultados diretamente proporcionais, dentro de um intervalo de concentrações definido. A Tabela 5 mostra a média obtida das áreas no comprimento de onda de 277 nm.

Tabela 3. Valores das áreas dos picos com média e desvio padrão em sua respectiva concentração do analito.

Concentração (µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	Desvio padrão
1	65.27	56.80	62.00	61.36	4.27
2.5	145.67	127.80	151.80	141.76	12.47
5	309.27	291.67	289.80	296.91	10.74
10	594.00	559.03	593.40	582.14	20.02
30	1694.83	1609.90	1672.17	1658.97	43.98
50	2946.97	2829.10	2856.67	2877.58	61.65
70	4133.17	4053.47	4070.57	4085.73	41.96
100	5709.33	5643.97	5612.43	5655.24	49.42

A Figura 15 apresenta a curva analítica obtida.

Figura 14. Curva analítica da RAP para quantificação do fármaco por CLAE, médias versus concentrações (µg/mL).



A curva analítica da RAP mostrou-se linear em uma faixa de concentração de 1 - 100 µg/mL, em que a equação da reta calculada: $y = 57,043x + 5,4562$ resultou em um coeficiente

de correlação de $R^2=0,9995$, condizente ao valor preconizado pela RDC 166/2017, indicando portanto, um alto grau de linearidade (ANVISA, 2017).

A partir da curva analítica de RAP os dados foram analisados estatisticamente pela variância ANOVA na Tabela 5, sendo possível um ajuste desse modelo, pois os valores de F calculados foram menores que os valores de F crítico.

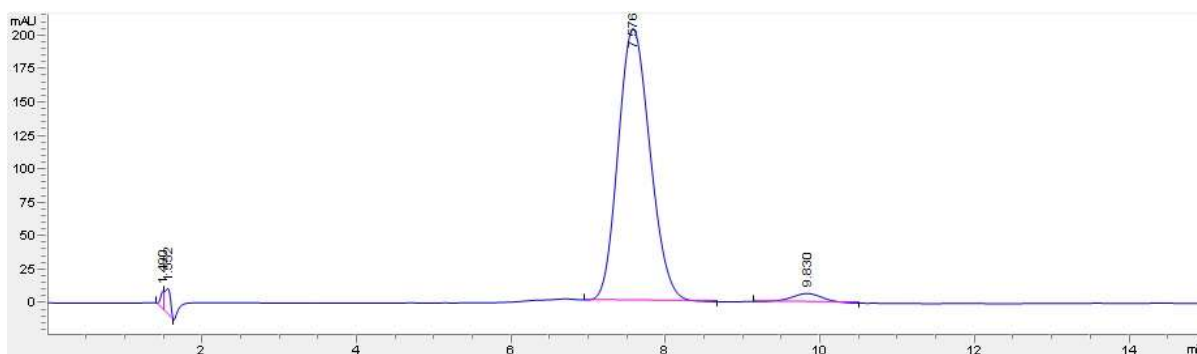
Tabela 4. Análise de variância ANOVA dos valores das áreas da curva analítica.

Variação	Graus de liberdade	Soma Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	1	9.25E+07	1.56E+04*	7.14931E-33
Resíduo	22	1.30E+05		
Total	23	9.26E+07		

*Significativo para $p<0,05$

Na Figura 16 observa-se um cromatograma obtido com a injeção teórica de 100 µg/mL de RAP, observando um pico bem definido, em seu respectivo tempo de retenção, mostrando que esse método foi eficaz para a quantificação de 100 µg/mL de rapamicina.

Figura 15. Cromatograma da CLAE de 100 µg/mL RAP em 277 nm.



Esses resultados da linearidade estão dentro dos parâmetros exigidos pela norma RDC 66/2017 da ANVISA, sendo satisfatórios e adequados para essa metodologia empregada.

5.5.4.2. Precisão

As análises intracorrida foram feitas em triplicata, conforme mostra a Tabela 6.

Tabela 5. Determinação das médias da precisão intracorrida para quantificação de RAP por CLAE.

Concentrações teóricas (µg/mL)	Média das áreas dos picos	%D.P.R
50	2903.03	0.28
50	2799.52	1.58
50	2813.05	0.42

Abreviações: % D.P.R, percentual de desvio padrão relativo.

Os resultados da precisão intermediária estão descritos na Tabela 7.

Tabela 6. Tabela 7. Determinação da precisão intermediária para quantificação de RAP por CLAE.

Concentrações teóricas (µg/mL)	Média das áreas dos picos	%D.P.R
50	2655.49	1,07
50	2615.53	0.28

Abreviações: % D.P.R, percentual de desvio padrão relativo.

Segundo a norma RDC 166/2017, preconiza-se uma porcentagem de D.P.R de 5% em ambos os parâmetros citados acima. Desta forma, os resultados obtidos mostraram estar dentro do preconizado, confirmando ser um método preciso.

5.5.4.3. Exatidão/Recuperação

Este parâmetro verifica a proximidade dos resultados alcançados no método analítico em relação ao valor teórico real. Os resultados encontram-se na Tabela 8.

Tabela 7. Percentual entre as concentrações teóricas e experimentais das soluções de RAP

Concentrações teóricas (µg/mL)	Concentração média experimental (µg/mL)	% Exatidão/recuperação
5	234.23	94.0
50	2473.97	96.9
100	5580.63	97.9

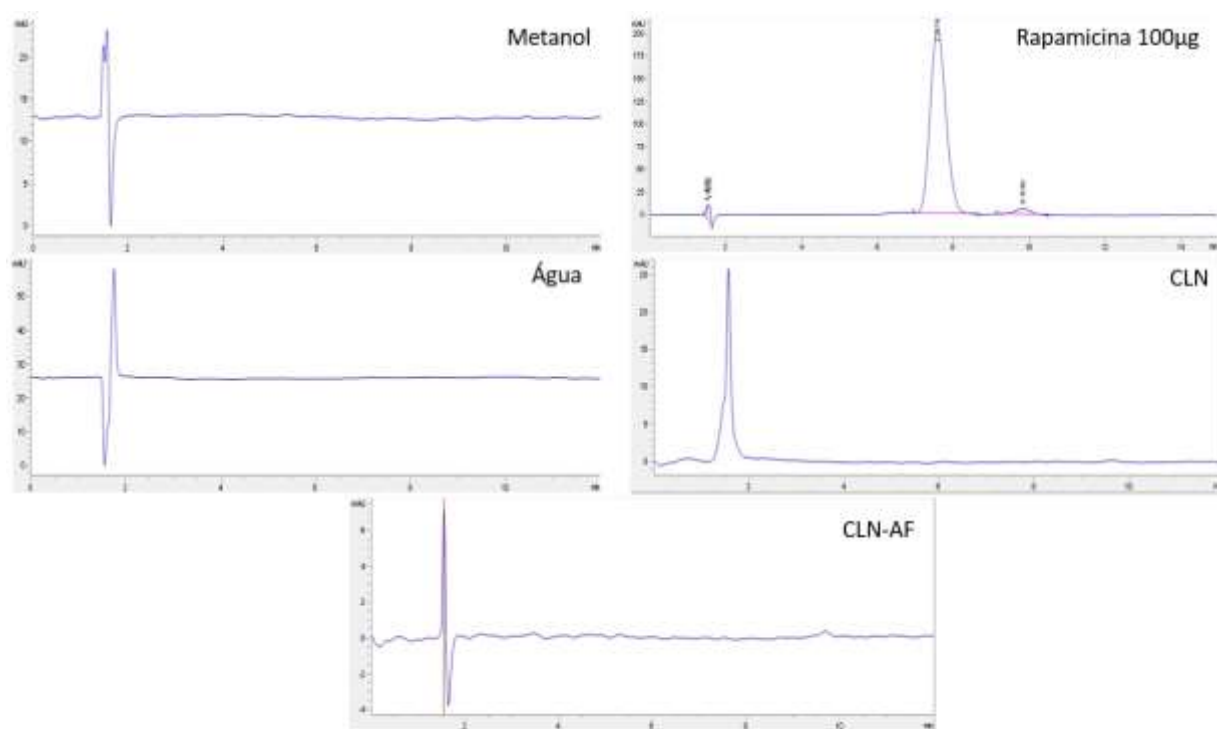
Deste modo, esses valores encontrados estão dentro da faixa limite, confirmando que as metodologias analíticas desenvolvidas se apresentam eficazes e aceitáveis para quantificação (ANVISA, 2017).

5.5.4.4. Especificidade/Seletividade

A especificidade/seletividade é um parâmetro extremamente relevante, pois determina a pureza do pico do fármaco, de modo que não apresente interferentes no mesmo tempo de retenção.

Portanto, foram analisados os constituintes da fase móvel (metanol e água), a RAP livre (rapamicina em solução de metanol), as formulações vazias (CLN e CLN-AF diluídas em metanol), as quais foram centrifugadas, os sobrenadantes filtrados e então injetadas em CLAE, como mostra a Figura 17.

Figura 16. Cromatogramas analisados por CLAE da fase móvel proposta, fármaco livre e formulações vazias.



Os cromatogramas (Figura 17) mostram que os componentes utilizados para a obtenção dos CLNDSPE-PEG-NH₂ e CLN-AF não apresentaram áreas de picos de absorção por CLAE que interferissem na quantificação da RAP. Sendo assim, não observou nenhum interferente no mesmo tempo de retenção, conseguindo garantir a especificidade deste método.

5.5.4.5. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os cálculos de LD e de LQ foram de 0.767 µg/mL e 0.253 µg/mL, respectivamente. Estes valores demonstraram que o método desenvolvido é sensível sendo capaz de detectar e quantificar baixas concentrações de RAP seguindo a RDC 166/2017 (ANVISA, 2017).

5.5.4.6. Robustez

Para verificar se o método é robusto, foram alterados alguns parâmetros analíticos na concentração média de 50 µg/mL, os quais estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 8. Alterações dos parâmetros analíticos para a avaliação da robustez.

Parâmetros Alterados	Concentrações teóricas (µg/mL)	Concentrações experimentais (µg/mL)	% Recuperações
λ de detecção 276	50	48,00	95,99
λ de detecção 278	50	48,16	96,33
Fluxo da FM 0.9	50	53,25	106,51
Fluxo da FM 1.1	50	44,21	88,41
FM 79:21	50	48,39	96,79
FM 81:19	50	49,22	98,45
Temperatura 39°C	50	48,57	97,14
Temperatura 41°C	50	48,05	96,08

Segundo a RDC 166/2017 os parâmetros de robustez podem atestar que esse método é robusto (ANVISA, 2017). A Tabela 10 apresenta as análises de estabilidade da rapamicina.

Tabela 9. Estabilidade da solução analítica de RAP contendo 150 µg/mL, CLN e CLN-AF incorporado 50 e 100 µg/mL, analisada por 24, 48, 72 e 96 horas.

Tempos (h)	Amostra/Concentrações teóricas (µg/mL)	Concentrações experimentais (µg/mL)	% Recuperações
24	RAP / 150	141.86	94.58
48		143.06	95.37
72		141.93	94.62
96		140.97	93.98
24	CLN / 50	43.80	97.61
48		42.73	95.46
72		41.80	93.60
96		48.16	96.33
24	CLN / 100	91.29	91.29
48		95.66	95.66
72		97.37	97.37
96		95.06	95.06
24	CLN-AF / 50	43.60	95.21
48		44.48	92.97
72		45.21	90.42
96		45.40	90.79
24	CLN-AF / 100	91.50	91.50
48		98.55	98.55
72		97.52	97.52
96		96.95	96.95

As análises realizadas nos tempos de 24, 48, 72 e 96h demonstraram que as formulações apresentaram estabilidade e não sofreram alterações significativas de degradação do fármaco (ANVISA, 2017).

5.5.5. Eficiência de Encapsulação (EE%) da rapamicina

A %EE da RAP foi obtida utilizando a técnica de ultra-centrifugação, conforme adaptação da metodologia de FACHINETTI et al. (2018).

Desta maneira, empregando esta técnica foi possível verificar a quantidade de fármaco livre disponível no sistema. O processamento da amostra se deu da seguinte forma: uma alíquota foi retirada e submetida a ultrafiltração utilizando ultrafiltro amicon e o filtrado foi analisado por CLAE (YADAV et al., 2012).

As análises quantitativas do filtrado mostraram que todas as formulações funcionalizadas (CLN-AF-RAP (1%, 3% e 5%) e não funcionalizadas (CLN-RAP 1%), contendo respectivamente 0,525mg/mL, 1,05mg/mL, 2,625mg/mL e 0,525mg/mL de fármaco, obtiveram uma eficiência de encapsulação de 94,92%.

Os altos índices de eficiência de encapsulação obtidos neste estudo corroboram os resultados já descritos na literatura para sistemas nanoestruturados contendo rapamicina (ELOY et al., 2017a; ZAHIR-JOUZDANI et al., 2019).

Para verificar se ocorreu uma retenção de fármaco no ultrafiltro amicon, foi preparada uma solução de RAP com concentração 2,625mg/mL em tampão com tensoativo LSS e submetida a ultracentrifugação; então o filtrado foi submetido a quantificação por CLAE nas mesmas condições já descritas anteriormente. Após a análise quantitativa desta solução, observou-se uma recuperação de 95% da concentração inicial do fármaco, evidenciando que o ultrafiltro amicon não interfere nos resultados de eficiência de encapsulação obtidos para os carreadores lipídicos nanoestruturados.

Estudos da literatura evidenciaram eficiência de encapsulação da rapamicina incorporada em lipossomas para tratamento de queimaduras de córneas de $97,66 \pm 0,57\%$. Já para lipossomas funcionalizados com DSPE-PEG para lesões na carótida e funcionalizados com anticorpo para câncer de mama a eficiência de encapsulação foi superior a 90% (ELOY et al., 2017a; HAERI et al., 2013; ZAHIR-JOUZDANI et al., 2019).

5.6. Estudos de liberação *in vitro* do fármaco

5.6.1. Avaliação da solubilidade da rapamicina

Este parâmetro permitiu avaliar a quantidade máxima de solubilidade de fármaco no meio, de forma a garantir a *sink conditions*. Os resultados estão expressos na Tabela 11.

Tabela 10. Solubilidade (mg/mL) da rapamicina.

Meio	Solubilidade (mg/mL)
Tampão fosfato pH 7,4 + Lauril sulfato de sódio 0,2%	0,05
Tampão fosfato pH 7,4 + Lauril sulfato de sódio 0,5%	0,12
Tampão fosfato pH 7,4 + Lauril sulfato de sódio 1%	0,23

Pela Tabela 11, observa-se aumento de solubilidade do fármaco em função do aumento da concentração do tensoativo no meio. O tensoativo utilizado, Lauril sulfato de sódio, foi escolhido, pois apresenta um EHL de 40 e a rapamicina demonstra um caráter básico ($pK_a \sim 10,4$) e um EHL 9,22, o que justifica a alta solubilidade deste fármaco neste tensoativo.

A solubilidade do fármaco aumentou devido ao aumento da concentração de tensoativo no meio. Todavia, deve-se ter cautela na adição de altas concentrações de tensoativo no meio, já que pode não representar com fidedignidade as condições fisiológicas. Adicionalmente, essas elevadas concentrações de tensoativo podem exibir um possível efeito tóxico (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Alguns autores como Jang et al. (2014) estudaram como melhorar as propriedades físico-químicas e a absorção oral da rapamicina por meio da sua incorporação em uma dispersão sólida. Para que o fármaco se tornasse solúvel no meio tamponante (pH 6,8), foi adicionado 0,4% de lauril sulfato de sódio, possibilitando não saturar o meio e realizar a liberação garantindo as *condições sink*. Neste pH de 6,8, os autores obtiveram uma liberação de aproximadamente 80%, não observando esta taxa de liberação quando não foi adicionado tensoativo no meio (JANG; KANG, 2014).

Nos estudos de Thapa et al. (2017), os autores avaliaram a eficiência de encapsulação da rapamicina e da doxorrubicina incorporada em uma oxido nano-grafeno peguado, utilizando 1% de tween 80 no meio receptor. Observou-se melhora na solubilidade de ambos os fármacos e a liberação em pH 5 foi de 55% para a rapamicina e 62% para a doxorrubicina (THAPA et al., 2017).

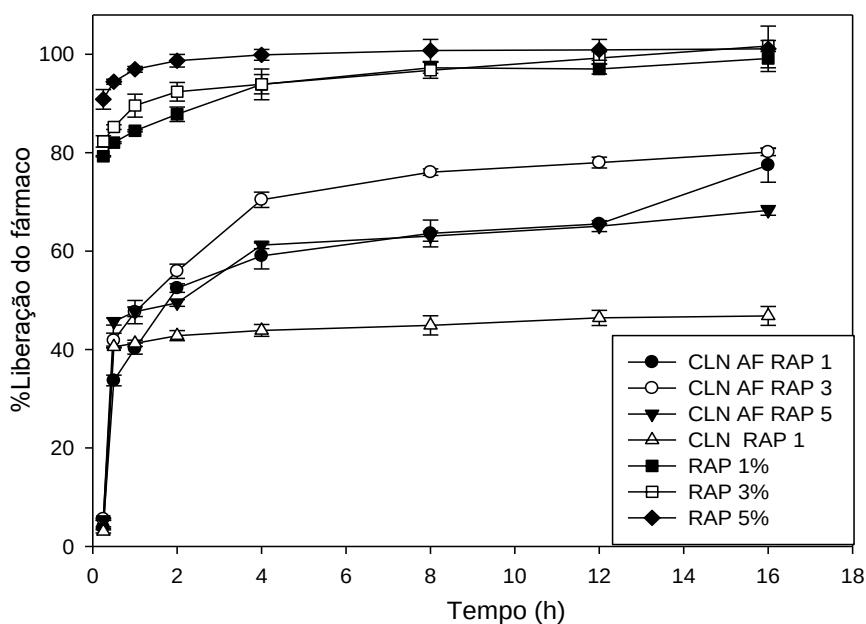
Yu et al. (2016) empregaram carreadores lipídicos nanoestruturados para melhorar a biodisponibilidade da rapamicina por via oral. Os autores adicionaram dodecil sulfato sódio no meio receptor e observou-se uma eficiência de encapsulação de 99,81% de rapamicina, sugerindo que os sistemas de liberação podem incorporar uma grande quantidade de fármaco e assim melhorar a biodisponibilidade da rapamicina (YU et al., 2016).

5.6.2. Ensaio de liberação *in vitro* da rapamicina em carreadores lipídicos nanoestruturados

No ensaio de liberação avaliou-se a velocidade de dissolução do fármaco no meio receptor, visando prever o comportamento *in vivo* do sistema, sendo um parâmetro

indispensável para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas (SATO et al., 2015; JAMBHEKAR et al., 2013). Na Figura 18 são apresentados os perfis de liberação das diferentes concentrações do fármaco livre e encapsulado nos CLN funcionalizados e não funcionalizados.

Figura 17. Perfil de liberação da rapamicina livre (RAP1%, RAP3% e RAP5%) e das formulações CLN-AF-RAP 1%, CLN-AF-RAP 3%, CLN-AF-RAP 5% e CLN -RAP 1%, em meio tampão fosfato de sódio pH=7,4 com LSS.



Foi realizado o ensaio de RAP livre, para garantir que a membrana de acetato de celulose utilizada não interfere na taxa de liberação do fármaco em função do tempo, assegurando a confiabilidade do ensaio, conforme mostrado na Figura 18. As três concentrações de RAP (1; 3 e 5%) foram solubilizadas em tampão com 1% de LSS. As soluções foram colocadas em contato com uma membrana de diálise e então depositadas dentro do aparato 1 e acondicionadas no dissolutor.

Conforme demonstrado na Figura 18 as soluções de RAP em 4h de ensaio já apresentavam uma taxa de liberação entre 80 a 90% de fármaco no meio receptor, sugerindo que a membrana de diálise não interfere significativamente na liberação do fármaco (MIAO et al., 2015).

As formulações contendo diferentes concentrações de fármaco mostram que as formulações CLN-AF-RAP 1, 3, 5% apresentam uma taxa de liberação após 4h de 68% de fármaco no meio receptor e em 16h essa taxa de liberação foi para 82%. Para o CLN-RAP 1% observou-se uma taxa de liberação de 45% a partir de 2h de liberação, a qual manteve-se constante até o final do experimento.

Os resultados mostraram que o carreador lipídico nanoestruturado não funcionalizado (CLN-RAP 1%) não foi capaz de apresentar uma taxa de liberação maior que 45%. Já as formulações com carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado (CLN-AF-RAP 1%, 3% e 5%) apresentaram uma taxa de liberação no meio receptor acima de 82% após 16 horas de liberação. Essa diferença na taxa de liberação provavelmente está relacionada com a presença do ácido fólico (funcionalização) na constituição do sistema. Estudos com a presença do ácido fólico em carreadores lipídicos nanoestruturados ainda são muito escassos na literatura, mas possivelmente esse aumento na taxa de liberação em sistemas com a presença deste funcionalizador está relacionada com forças intermoleculares e flexibilidade da superfície do sistema, conferindo uma superfície menos rígida, permitindo a saída do fármaco ao longo do tempo de forma mais eficiente (MIAO et al., 2015; SUN et al., 2011).

Estudos de Miao et al. (2015) observaram que sistemas de liberação nanoestruturados, como os lipossomas, tiveram uma taxa de liberação de 80% de rapamicina em 24h. Ainda, os autores relataram que houve uma taxa de liberação mais acentuada até 4 horas de experimento, após esse período essa taxa se manteve constante até o final do experimento. Segundo os autores isso pode estar correlacionado com uma fraca interação do fármaco com a superfície dos lipossomas. Após 4h, os autores relataram uma liberação mais lenta, possivelmente devido à saída dificultada do fármaco nas camadas do lipossoma. Provavelmente, este fenômeno também ocorre com as matrizes imperfeitas de um carreador lipídico nanoestruturado, justificando a taxa de liberação constante mostrada para os carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados deste trabalho (MIAO et al., 2015).

Desta maneira, não se tornou viável a realização do experimento com maiores concentrações de fármacos como 3% e 5% nas formulações sem a funcionalização; além do mais esses sistemas apresentaram a presença de precipitados, evidenciando pouca estabilidade.

Os ensaios realizados foram avaliados por diferentes modelos matemáticos como: Korsmeyer – Peppas, Weibull, Higuchi, Primeira ordem, Hixson – Crowell e Baker – Lonsdale.

De acordo com os valores dos coeficientes de determinação (r^2) (Tabela 12), os modelos matemáticos que mais se aplicam a esses dados de liberação foram os Korsmeyer – Peppas e Weibull (COSTA; SOUSA LOBO, 2001; MANADAS, 2002; MIAO et al., 2015).

O modelo de Korsmeyer – Peppas Lei das Potências correlaciona a liberação do fármaco (> 60%) com o tempo, segundo a equação 5.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K \times t^n$$

Equação 5

onde o M_t : quantidade de fármaco liberada no tempo t ; M_∞ : a quantidade total de fármaco liberado no tempo infinito; K : constante cinética e n : expoente de liberação (CURY et al., 2009; SIEPMANN; PEPPAS, 2000).

O modelo de Weibull se relaciona exponencialmente à fração do fármaco liberado em função do tempo, segundo a equação 6.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-at^b)$$

Equação 6

onde a : parâmetro de escala e b : parâmetro de forma.

O parâmetro de forma (b) é classificado como curva sigmoidal ($b > 1$), exponencial ($b = 1$) e parábola ($b < 1$), ou ainda indicando mecanismos de transporte do fármaco por meio da matriz polimérica, onde os valores de $b \leq 0.75$ a liberação acontece por difusão Fickiana, $0.75 < b < 1$ difusão Fickiana associada ao caso-II e para $b > 1$ mecanismos de liberação complexo (ARIFIN, 2006; PAPADOPOULOU et al., 2006).

Tabela 11. Valores dos coeficientes dos diferentes modelos matemáticos.

Modelos matemáticos		CLN-AF-RAP 1%	CLN-AF-RAP 3%	CLN-AF-RAP 5%	CLN-RAP 1%
Korsmeyer – Peppas	K	42,80	48,46	48,90	42,08
	r^2	0,987	0,979	0,980	0,995
	η	0,208	0,202	0,123	0,043
Weibull	K (a)	109,30	82,18	67,68	67,36
	r^2	0,988	0,995	0,983	0,81
	b	9,87	1,44	2,08	1,35

Os dados mostram que os modelos matemáticos aplicáveis para estes sistemas são Korsmeyer-Peppas e Weibull. Os valores observados na Tabela 12 mostram que os expoentes de liberação (η) de todos os sistemas foram menores que 0,43 (0,208; 0,202; 0,123; 0,043; respectivamente), caracterizando essa liberação como liberação de difusão Fickiana, sendo uma liberação controlada.

Os valores do coeficiente de correlação (r^2) mostraram estar dentro dos parâmetros aceitáveis dos modelos de Korsmeyer-Peppas e Weibull. Os valores de b (9,87; 1,44; 2,08; 1,35; respectivamente), sempre são superiores a 1, o que sugere uma liberação mais controlada pelo intumescimento das formulações testadas.

Estudos de Fang et al. (2015) mostram perfis de liberação muito similares aos da Figura 16, onde a liberação dos sistemas funcionalizados é prolongada, observando um platô em 15h nos sistemas com a funcionalização e do fármaco livre dentro de 8h, obtendo com isso uma liberação de aproximadamente 75% de docetaxel nos carreadores funcionalizados e 91% do docetaxel livre (FANG et al., 2015).

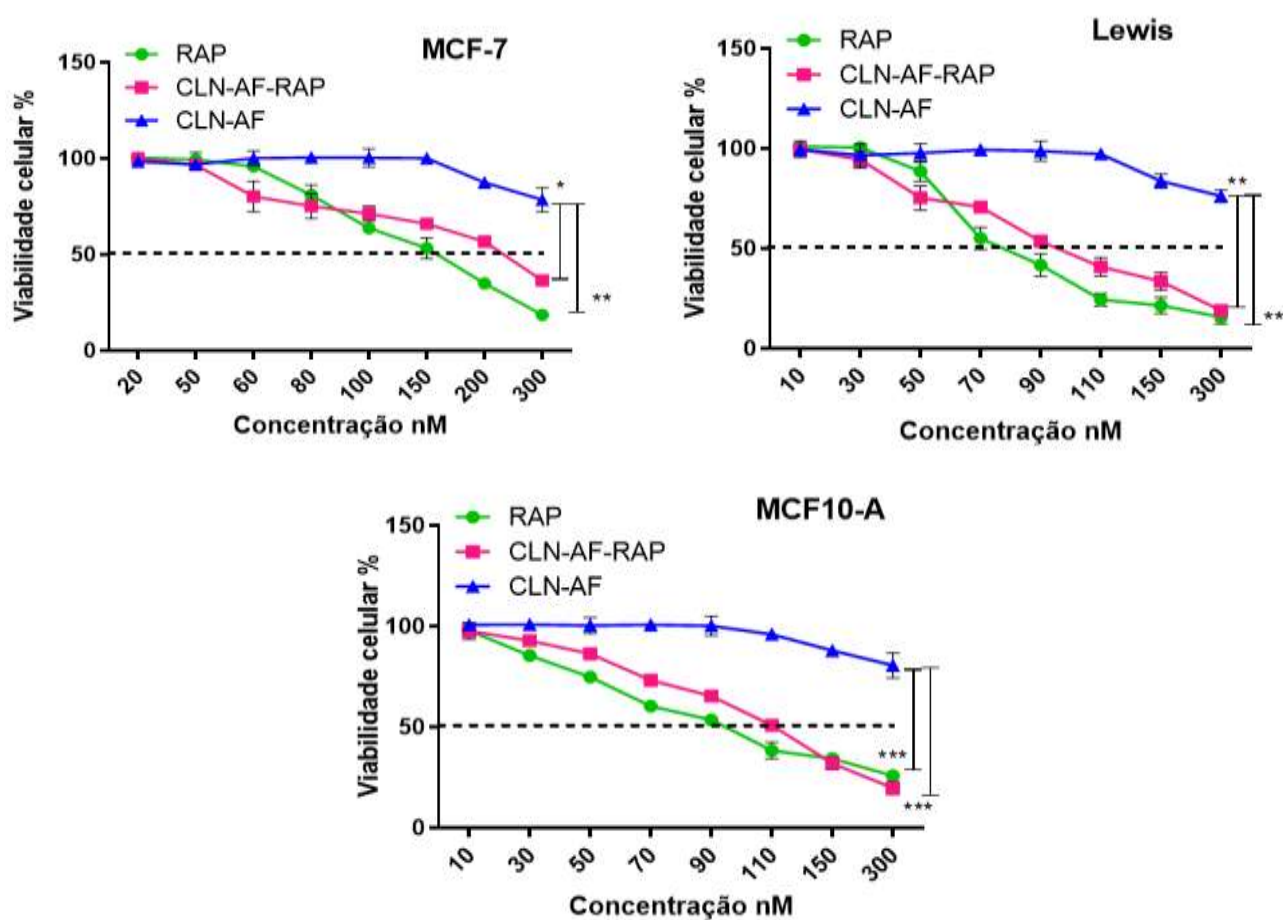
5.7. Citotoxicidade *in vitro* dos CLN

O ensaio de viabilidade celular depende da capacidade das células vivas de reduzir a resazurina (corante azul) à resofurina altamente fluorescente por células viáveis (rosa), que pode ser detectada medindo a absorbância a 540 nm usando um espectrofotômetro. Concentrações de rapamicina livre, CLN-AF e CLN-AF-RAP variando de 300 a 10 nM foram empregadas nos ensaios celulares usando linhagens LEWIS, MCF-7 e MCF-10A (HU et al., 2018). A formulação CLN-AF não apresentou citotoxicidade em nenhuma linhagem celular, como mostrado na Figura 19 e isso sugere que a citotoxicidade é atribuída ao fármaco, e não ao transportador. O CLN-AF-RAP não apresentou diferença estatística com o fármaco livre, porém tal resultado pode estar ocorrendo devido à maior afinidade entre o fármaco e a parte lipídica do sistema, com uma liberação mais prolongada, sugerindo que o carreador pode estar protegendo o fármaco de possível degradação.

O IC_{50} da rapamicina observado para as células LEWIS, MCF-7 e MCF10-A foi 81,8nM, 141nM e 95nM, respectivamente, e para a formulação CLN-AF-RAP foi 84,1nM, 176nM e 110nM, respectivamente. Assim, os resultados mostram que a proliferação celular foi inibida de maneira dose-dependente de rapamicina e que a formulação apresenta um IC_{50} maior do que o fármaco livre.

Quando se trata de tratamentos com períodos curtos, a rapamicina pode não ser tão eficaz, pois apenas inibe mTORC1, e uma vez incorporada em sistema de liberação controlada pode haver a liberação do fármaco por mais tempo e consequentemente, haver a inibição da via mTORC2, diminuindo a angiogênese e sobrevivência celular (FOSTER; TOSCHI, 2009; GAUBITZ et al., 2016; KATIYAR et al., 2016; NIU et al., 2011; RAD; MURRAY; TEE, 2018; SARBASSOV et al., 2006; SEO et al., 2015b).

Figura 18. Viabilidade celular nas células MCF-7, LEWIS e MCF-10A, utilizando formulações vazias (CLN-AF), formulações encapsuladas com rapamicina (CLN-AF-RAP) e rapamicina livre (RAP) em várias concentrações.



5.8. Avaliação da internalização celular de CLN incorporado com rapamicina funcionalizado com ácido fólico através da técnica de microscopia confocal

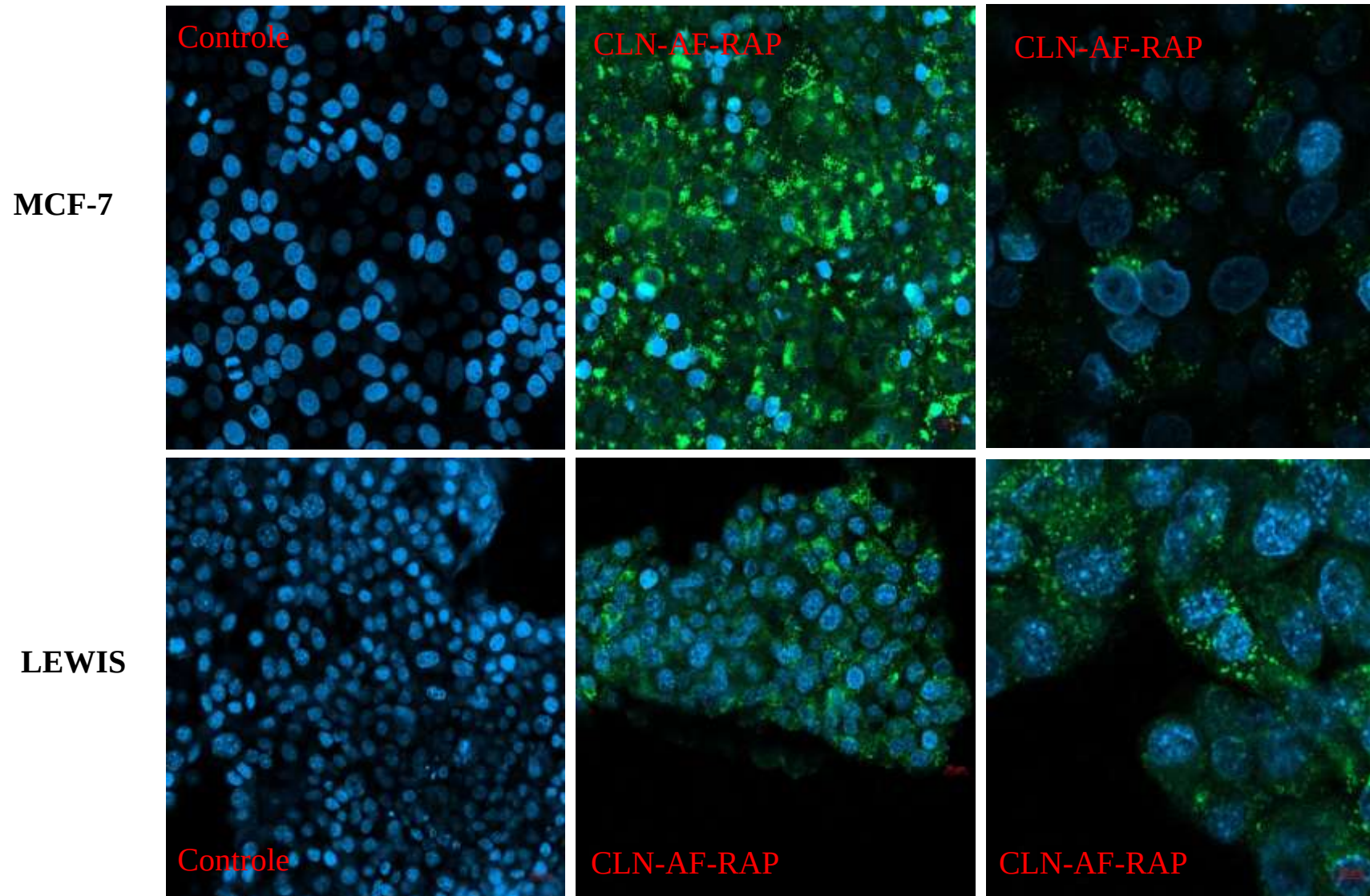
A captação de CLN-AF-RAP foi avaliada quantitativamente por microscopia confocal nas linhagens celulares MCF-7 e LEWIS, em triplicata. Para visualizar a captação celular, a formulação foi preparada com DiO (0,5% molar), corante fluorescente capaz de corar as camadas de lipídios. Já os núcleos celulares foram corados com DAPI, como podemos ver na Figura 20 (MORTENSEN et al., 2013). Ambas as linhagens foram cultivadas adequadamente e a formulação foi incubada com as células por 24h. As células de câncer apresentaram absorção de CLN-AF-RAP, possivelmente mediada por endocitose por meio da interação de receptores de ácido fólico.

Tran et al. (2016) desenvolveram nanocarreadores lipídicos com tamanho de 120-180nm, PDI 0,2 e potencial zeta de -28mV, sendo avaliada a internalização por microscopia confocal. Os ensaios utilizando células MCF-7 e LEWIS evidenciaram a presença de CLN no citoplasma e liberação controlada com ação em núcleos ou componentes celulares (TRAN et al., 2016).

A captação celular também pode ser atribuída à lipofilicidade do CLN, que pode melhorar a interação com as membranas celulares. Estudos de Doktorovova et al. (2014) e Mussi et al. (2013) mostram que algumas linhagens de células tumorais humanas resistentes e sensíveis capturaram mais nanopartículas lipídicas (DOKTOROVOVÁ et al., 2010); MUSSI et al. 2013).

Outro estudo utilizando a célula MCF-7 (SOE et al., 2018) foi verificado. Os autores desenvolveram nanopartículas funcionalizadas com ácido fólico e verificaram um aumento significativo na captação dessas nanopartículas em células cancerosas. No entanto, os autores realizaram um pré-tratamento com ácido fólico e observaram que quando esse composto foi adicionado às nanopartículas, a captação foi minimizada, sugerindo que a endocitose das nanopartículas estava ocorrendo devido aos receptores de ácido fólico (SOE et al., 2018).

Figura 19. Captação intracelular de CLN em células MCF-7 e células de LEWIS para imagens de microscópio de varredura a laser confocal. Controle de células azuis por DAPI, NLC-AF-RAP (DiO-verde) foram usados para esta experiência.



5.9. Avaliação da internalização celular de CLN incorporado com rapamicina funcionalizado com ácido fólico por meio de citometria de fluxo (CF)

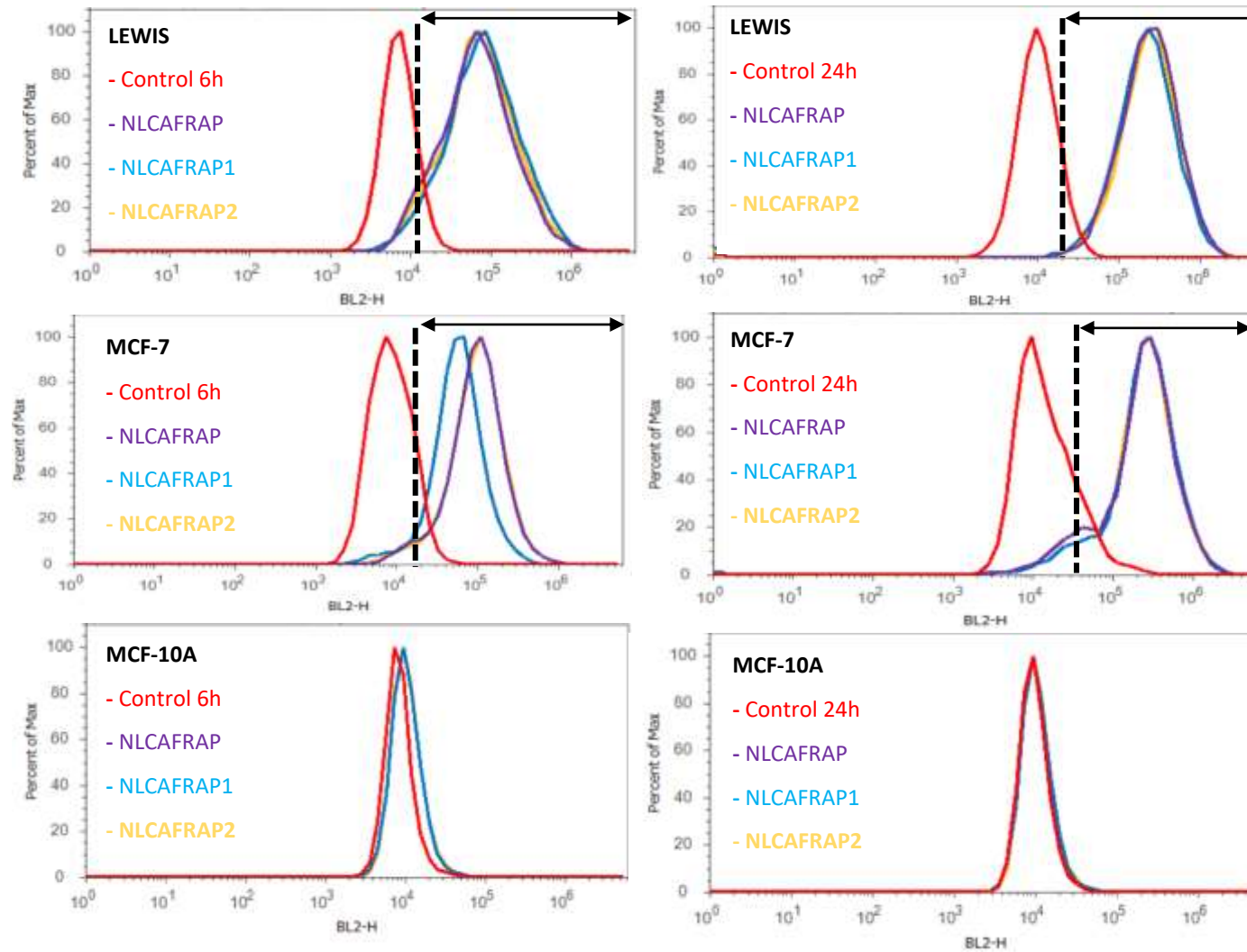
A análise de citometria de fluxo foi realizada para avaliar o direcionamento do carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com ácido fólico em linhagens celulares de câncer MCF-7 e LEWIS. Conforme mostrado na Tabela 13 e Figura 21, o perfil de citometria de fluxo mostra que as células cancerosas podem estar entrando na formulação endociticamente e, portanto, esse deslocamento do gráfico para a direita ocorre, então testamos uma célula de câncer de mama normal (MCF-10A) e não tem deslocamento, possivelmente porque não possui muitos receptores de ácido fólico, indicando a ausência de ligação do CLN-AF-RAP com as células normais (MCF-10A).

O resultado obtido indica claramente que o CLN-AF-RAP pode ter como alvo específico as células cancerígenas MCF-7 e LEWIS, o que o torna um potencial para distribuição de fármaco direcionada. As análises foram realizadas com 6h e 24h de contato das células com a formulação e não houve diferença estatística. Assim como já evidenciado por microscopia confocal, as análises de citometria de fluxo complementam essa ideia e mostram que os receptores de ácido fólico superexpressos em células cancerosas estão capturando CLN-AF-RAP, sugerindo morte celular por apoptose tardia e/ou necrose nas células cancerígenas (HUSSIEN; IŞIKLAN; TÜRK, 2018; TRAN et al., 2016; ZHOU et al., 2014).

Tabela 13. Valores de citometria de fluxo em células de Lewis, MCF-7 e MCF-10A

Células	% células positivas 6h	C- 6h	% células positivas 24h	C- 24h
Lewis	90,53 ±1,39	3,70	99,20±0,57	3,15
MCF-7	93,14±0,63	3,02	98,88±0,63	2,96
MCF-10A	99,84±0,63	99,98	99,78±0,407	99,95

Figura 20. Perfil de citometria de fluxo de CLN-AF-RAP tratado com células cancerosas MCF-7, LEWIS e células de mama normais (MCF-10A).



5.10. Modelo alternativo usando *C. elegans*

5.10.1. Tratamento com CLN carregados com rapamicina

A rapamicina inibe mTOR, e como resultado, podemos observar um atraso na progressão de algumas doenças, como câncer, neurodegeneração, doenças cardiovasculares e diabetes (Bishop e Guarente, 2007; Piper et al. 2008; Hartford e Ratain, 2007; Wullschlegler et al., 2006). Além disso, estudos na literatura, como Guertin e Sabatini et al., 2009, relatam que a rapamicina foi aprovada para uso em humanos como um fármaco imunossupressor e está atualmente em ensaios clínicos anticâncer (BLANCO et al., 2014; ELOY et al., 2016a, 2017a; VICIER et al., 2014).

O modelo do nematóide *Caenorhabditis elegans* pode ajudar a entender várias vias de sinalização, como a insulina (IIS), um alvo da rapamicina (mTOR), entre outros, e quando fármacos como a rapamicina são utilizados, podem atuar inibindo a atividade do mTOR, estendendo o vida útil de várias espécies (KAPAH et al., 2010). O mTOR atua em dois complexos, o TORC1 que interage nos sinais do mitógeno e nutrientes para controlar a proliferação e tamanho das células e o TORC2 que regula a forma das células (LAPLANTE; SABATINI, 2012). Como esses complexos operam em regiões diferentes, estudos sugerem que eles podem estar relacionados à longevidade, armazenamento de lipídios e tradução de mRNA de *C. elegans* (HANSEN et al., 2008; JONES et al., 2009; KAPAH et al., 2010; LONG et al., 2002; NI; LEE, 2010; ROBIDA-STUBBS et al., 2012; SOUKAS et al., 2009; ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2011).

O mTOR pode atuar regulando peptídeos semelhantes à insulina (ins-7) (HONJOH et al., 2009), aumentando a possibilidade de o mTOR poder, como o daf-2, modular o envelhecimento por meio de um efeito sistêmico sobre os hormônios. Além disso, o TORC1 regula a expressão de muitos genes alvo daf-16 / FOXO, incluindo genes de desintoxicação (ROBIDA-STUBBS et al., 2012).

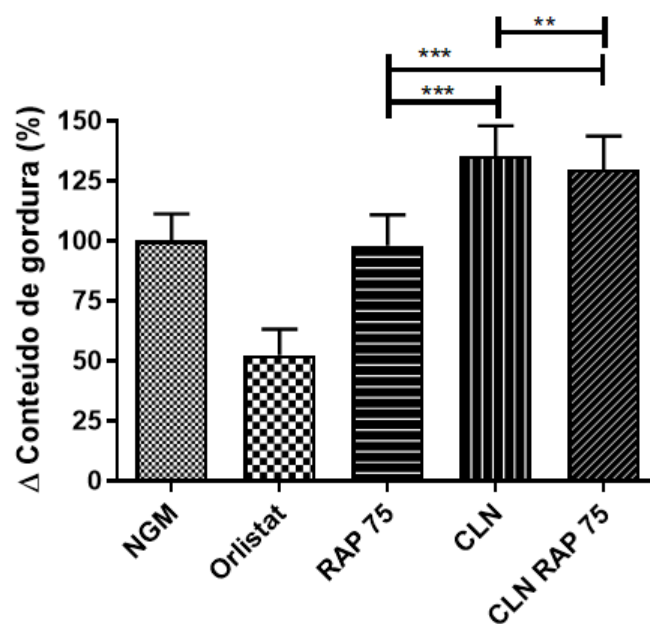
A inibição de mTOR também regula a expressão de lipase (LIPL-4) e aumenta a lipólise (LAPIERRE et al., 2011). Além disso, uma expressão de LIPL-4 em animais com níveis reduzidos de mTOR é menos reduzida quando mediada por daf-16/FOXO (LAPIERRE et al., 2011). Embora uma contribuição do LIPL-4 e de um metabolismo lipídico para a longevidade não estejam totalmente claros, pode parecer paradoxalmente um acúmulo de

gotículas de lipídeos (JIA; CHEN; RIDDLE, 2004; JONES et al., 2009; SOUKAS et al., 2009; VELLAI et al., 2003).

O mTOR também pode afetar a longevidade por mecanismos não transcricionais, incluindo fosforilação de S6 quinase (S6K) mediada por TORC1, um regulador chave da tradução de mRNA e, assim, aumentar a longevidade em *C. elegans* por meio da transcrição (KAPAH et al., 2010).

Por essas razões, a rapamicina livre e a formulação CLN-AF-RAP foram avaliadas em modelo experimental de *C. elegans* e verificado o teor de gordura. Desta forma, foram testadas três concentrações de fármaco livre (37, 75 e 150 μ M) e todas mostraram uma diminuição de 10% na gordura de *C. elegans*. A Figura 22 mostra que a formulação vazia e/ou com rapamicina aumentou o teor de gordura em *C. elegans*; esse comportamento pode ocorrer devido aos triglicerídeos da formulação, que podem ser metabolizados e armazenados por *C. elegans*. No entanto, os vermes tratados com CLN-AF-RAP75 mostraram um conteúdo de gordura significativamente menor do que aqueles tratados com formulação vazia, sugerindo que o fármaco está sendo liberado e agindo sobre os vermes.

Figura 21. Teor de gordura em *C. elegans*. NGM:controle; orlistat; RAP75; CLN-AF: nanopartículas vazias; CLN-AF-RAP75: nanopartículas carregadas com rapamicina (dose: 75 μ M). Os resultados mostram a média $\pm$ SEM e a estatística com anova, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

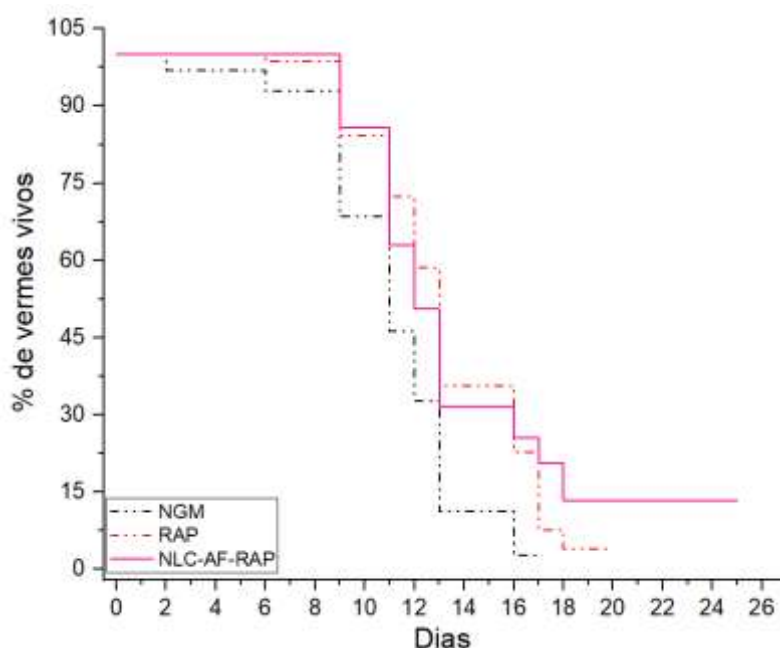


5.10.2. Vida útil

C. elegans é um nematóide que habita a porção líquida do solo, e tem sido descrito como uma alternativa para a avaliação bioquímica e toxicológica de diversos xenobióticos, além de ser considerado um modelo adequado para estudar o envelhecimento e longevidade (LI et al., 2011; MUSCHIOL; SCHROEDER; TRAUNSPURGER, 2009; HOPE, 1999; BOYD et al, 2003). A crescente utilização desta espécie como modelo experimental se deve ao fácil manuseio, transparência, ciclo de vida curto, facilidade de cultivo e rápido tempo de geração. Além disso, estudos envolvendo *C. elegans* são viáveis e promissores, pois esse nematóide possui um alto grau de genes homólogos aos humanos.

A Fig. 23 mostra o efeito do CLN com rapamicina e vazias na taxa de sobrevivência da cepa N2 de *C. elegans*. Em estudos anteriores, a expectativa de vida média de *C. elegans* foi de aproximadamente 20 dias (GARIGAN et al., 2002; SUTPHIN; KAEBERLEIN, 2009). Em nosso caso, os resultados mostrados na Figura 23 mostram que em 17 dias morreu *C. elegans* apenas em NGM. Além disso, CLNs vazios induziram alterações significativas na vida útil dos vermes. Todavia, pode-se constatar que a rapamicina, conforme discutido na literatura, apresenta um aumento da vida útil do *C. elegans*, em cerca de 23 dias. Nos tratamentos com as formulações encapsuladas com rapamicina, por outro lado, *C. elegans* vivem ainda mais, cerca de 26 dias. Esta observação seria uma evidência importante da ausência de efeitos de toxicidade devido à administração dessas nanopartículas por 48 h, confirmando os estudos de toxicidade *in vitro*.

Figura 22. Vida útil de *C. elegans* N2 de tipo selvagem em meio de crescimento normal na ausência de nanopartículas e após 48 h de tratamento com RAP e CLN-AF-RAP.



Dessa forma, a literatura mostra que pequenas moléculas, como a rapamicina, têm a capacidade de estender a vida útil em invertebrados e camundongos (ALAVEZ et al., 2011; EVASON et al., 2005; HARRISON et al., 2009; LEE et al., 2006; MCCOLL et al., 2010; ONKEN; DRISCOLL, 2010; PETRASCHECK; YE; BUCK, 2007; PIETSCH et al., 2009; KANG ET AL., 2002; EVASON ET AL., 2005; SRIVASTAVA ET AL., 2008).

5.11. Modelo xenográfico da atividade antitumoral *in vivo*

As terapias antineoplásicas enfrentam muitos problemas com fármacos de baixa solubilidade aquosa, e um estudo de Di et al., 2009, demonstrou que 75% das drogas candidatas são de baixa solubilidade e co-solventes ou surfactantes são frequentemente usados para aumentar a solubilidade, podendo observar precipitações nas soluções, além de alguns efeitos adversos como edema, reações de hipersensibilidade aguda e neuropatia periférica (RUGGIERO et al., 2013; SHEPHERD et al., 2003).

Assim, a aplicação da nanotecnologia farmacêutica pode ajudar a evitar esses problemas, e o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, além de proteger o fármaco contra possível degradação ou precipitação, permite sua liberação de forma controlada, com

redução de riscos para o paciente, como a citotoxicidade (PAGE; MAURER; WYTTEBACH, 2016).

Neste estudo *in vivo*, avaliou-se a eficácia antitumoral de um sistema nanoestruturado com rapamicina (CLN-AF-RAP), solução de rapamicina e Taxol[®], sendo este o primeiro medicamento para o tratamento do carcinoma. Pode-se observar na Figura 24 que o controle negativo, onde não houve tratamento, tem um crescimento exponencial do tumor, sendo que todos os animais permaneceram com os tumores até o final do experimento.

Os animais tratados a cada três dias ao longo de 18 dias, com solução de rapamicina e com CLN-AF-RAP, apresentaram crescimento do tumor muito lento, não havendo diferença significativa entre eles. Verifica-se que o fármaco encapsulado está sendo liberado no organismo de forma tão eficaz quanto a solução livre e ainda protegido de possível degradação e depuração. De acordo com os estudos de Freag et al. (2016), que desenvolve nanopartículas com rapamicina, mostrou um aumento de 3,35 vezes na biodisponibilidade em comparação com o fármaco livre, mostrando também que o sistema inibiu o crescimento do tumor, aumentou a sobrevivência dos animais e reduziu os efeitos nefrotóxicos (FREAG et al., 2016).

O tratamento com solução de Rap levou à perda de peso corporal dos animais (Figura 24) em comparação com camundongos dos outros grupos ao longo do estudo, o que pode significar que a rapamicina está sendo tóxica e quando encapsulada esta ação não foi verificada. Estudos na literatura mostram que a rapamicina pode induzir a parada do ciclo celular na fase G1-S e resultar em apoptose (AMORNPHIMOLTHAM et al., 2005, 2008; CHEN et al., 2013a).

Figura 23. Peso corporal de todos os animais que foram medidos a cada 2 dias por até 3 semanas.

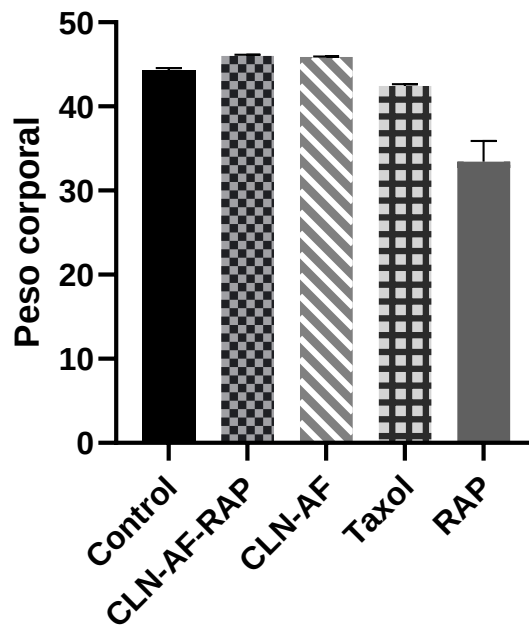
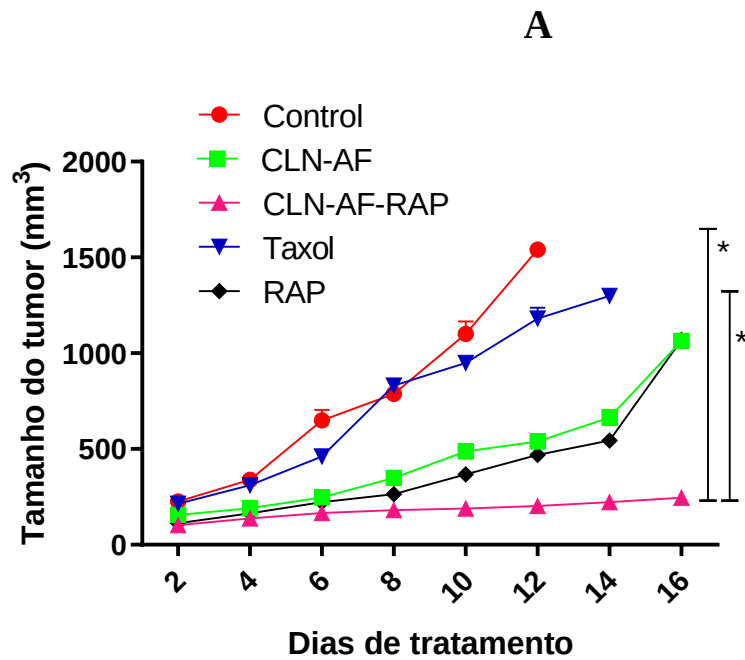
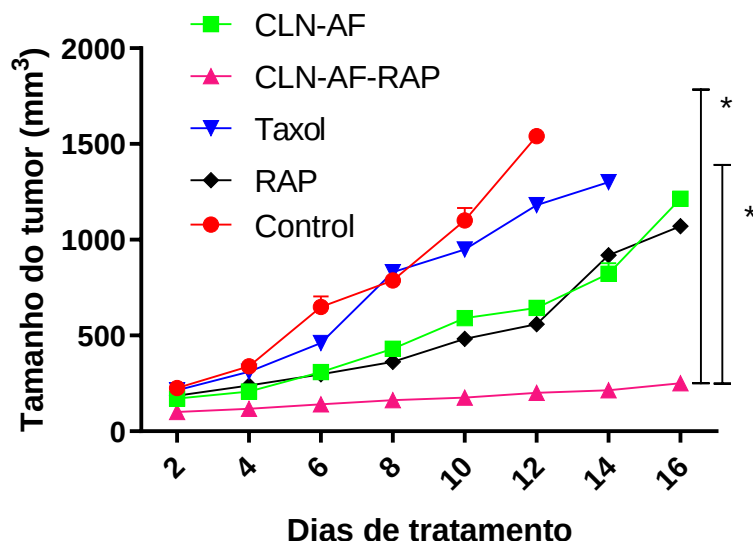


Figura 24. Volume tumoral de camundongos tratados com CLN-AF, CLN-AF-RAP, Rap e Taxol®. Valores da média e desvio padrão (n = 5), estatística com anova, * p<0.05 (A) intravenoso e (B) intraperitoneal.



B



O grupo Taxol[®], onde se esperava uma redução maior do tumor, por se tratar de um fármaco amplamente utilizado na terapia do câncer, nos mostrou exatamente o contrário, não sendo significativa a diferença entre ele e o controle negativo. A Figura 25B mostra que a administração das formulações, neste caso, intraperitoneal, pode resultar em uma ação maior, uma vez que o fármaco pode chegar em maior quantidade às células cancerosas, sendo mais eficiente e sugerindo menos efeitos adversos do que a administração intravenosa (BARRASA et al., 2009; GLEHEN et al., 2003; VERWAAL et al., 2008; WITKAMP et al., 2001; YAN et al., 2007).

A literatura nos mostra que as nanopartículas são rapidamente opsonizadas e removidas da circulação por macrófagos no sistema reticuloendotelial (HALEY; FRENKEL, 2008; SNEHALATHA et al., 2008).

No entanto, quando usa-se um modificador de superfície, neste caso polietilenoglicol (PEG), pode-se aumentar a meia-vida dos nanocarreadores, além do direcionamento fornecido pelo ácido fólico (BELOQUI et al., 2013; MENG et al., 2011). O uso de PEG é uma estratégia bem estabelecida na literatura, principalmente com lipossomas. O revestimento das nanopartículas com PEG resulta na formação de uma camada polimérica na superfície da partícula, evitando estereoquimicamente a interação e ligação dos hemocomponentes à sua

superfície, não ocorrendo assim a opsonização dos portadores pelo sistema fagocítico mononuclear (TORCHILIN, 2009; ZHANG et al., 2014).

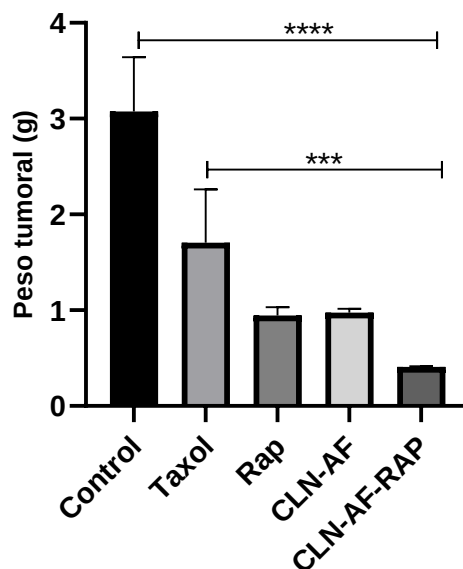
Desta forma, os carreadores lipídicos nanoestruturados e funcionalizados contribuem de forma alternativa e promissora para o transporte de fármacos até o local de ação e aumento da atividade tumoral. Além disso, o aumento da permeabilidade e retenção (EPR) da vasculatura tumoral permite o acúmulo dessas nanopartículas no interstício tumoral; entretanto a falta de drenagem linfática permite a retenção dessas nanopartículas no ambiente tumoral (BELOQUI et al., 2013; TORCHILIN, 2011).

Mastria et al., 2015, desenvolveram nanopartículas polipeptídicas e observaram um acúmulo de fármaco no tumor primário e aumento nas taxas de sobrevivência em camundongos afetados com tumor mamário e carcinoma de LEWIS. Além disso, mostraram que o sistema foi capaz de inibir a formação de metástases (MASTRIA et al., 2015).

Estudos de Wu et al., 2010 e Yu et al., 2015 mostram que carreadores de lipídios nanoestruturados funcionalizados com ácido fólico e polietilenoglicol para o tratamento do câncer foram muito promissores, pois encontraram uma maior taxa de inibição tumoral (45%) quando comparados ao fármaco livre (37%). Além disso, o sistema apresentou maior internalização, devido aos receptores de endocitose do ácido fólico para células tumorais e menor efeito citotóxico (CHEN et al., 2015; WU; TANG; YIN, 2010; YU et al., 2015).

Após o sacrifício dos animais, os tumores foram excisados e apresentaram morfologia esférica, bem definida, consistência maciça. Existe uma pequena diferença no tamanho do tumor, por isso decidiu-se analisar o peso de cada tumor. Na Figura 26, há uma redução significativa na média das massas tumorais dos camundongos tratados com CLN-AF-RAP em relação ao Taxol® e ao controle sem qualquer tratamento.

Figura 25. Peso dos tumores do camundongo após o sacrifício dos animais. Os dados correspondem a valores médios com desvio padrão (n = 5), a estatística com anova, ****p< 0.001, *** p <0,005.



Assim, embora existam algumas variações nas respostas aos tratamentos, com desvios elevados, podemos sugerir que a redução tumoral causada pelo CLN-AF-RAP tem relevância biológica, apresentando atividade antitumoral em camundongos. Sabe-se que camundongos possuem semelhança fisiológica, molecular e genotípica com humanos, tornando este modelo um avanço para pesquisas científicas e resultados mais efetivos (ABATE-SHEN, 2006; FRESE; TUVESON, 2007).

O CLN funcionalizados com ácido fólico e encapsulado com rapamicina, foi muito eficaz, pois não deixou com que o tumor se desenvolvesse nos animais. Além disso, observamos que de 6 animais infectados com célula tumorais, 5 animais foram totalmente curados, sugerindo que a formulação está sendo muito promissora.

5.12. Histologia

Cortes histológicos evidenciam a presença de células compatíveis com malignidade (cartilagem e tecido adiposo) nos pulmões para os grupos controle negativo e tratados com rapamicina. Já para os demais grupos (Taxol®, CLN-AF-RAP e CLN-AF) nenhuma alteração foi observada. No fígado e nos rins foram observados tecido hepático com sinais de

normalidade e vasos congestos, ductos proximais e distais normais, cápsula de Bowman íntegra, ausência de áreas de necrose ou hemorragia, para todos os grupos.

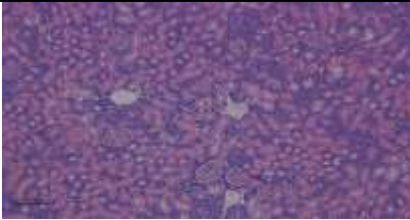
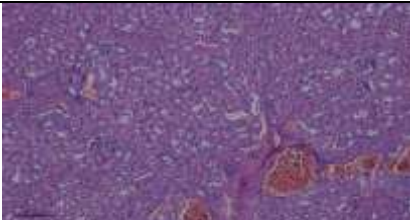
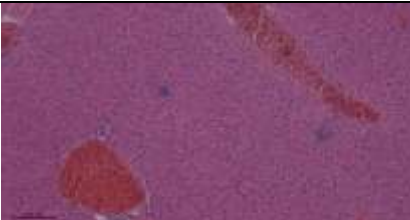
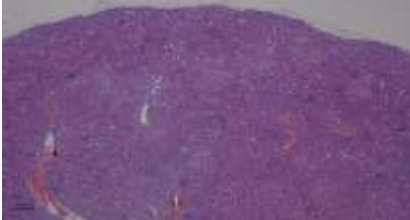
Nos tumores do grupo controle foram observados 30 a 50% de área tumoral necrótica, invasão de tecido adiposo, neural, muscular e linfovascular, com índice mitótico de 8,3 (média da contagem de 10 campos de 400x). Já no grupo com rapamicina observou-se mais de 50% de área tumoral necrótica, invasão de tecido adiposo, neural, muscular e linfovascular, com índice mitótico de 0,7 (média da contagem de 10 campos de 400x). Por fim, o grupo com CLN-AF apresentou menos de 15% da área tumoral necrótica, ausência de invasão de tecido adiposo, mas presença de invasão muscular, neural e linfovascular, com índice mitótico de 5,1 (média da contagem de 10 campos de 400x). Para os outros grupos experimentais, não se observou tumor aparente e desta forma não foram realizadas as análises, conforme mostra a Figura 27.

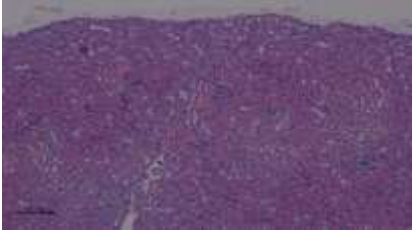
Desta forma, podemos sugerir que o experimento *in vivo* utilizando células 4T1 foram muito promissores, pois os grupos CLN-AF-RAP, tanto intravenoso quando intraperitoneal observaram a regressão total do tumor em duas semanas e 4 dias, que foi o tempo de tratamento do experimento. O Taxol® que é um medicamento utilizado na terapia do câncer de mama, não se mostrou tão eficaz quanto o sistema desenvolvido.

As células 4T1 são facilmente manipuláveis e podem ser muito invasivas, formando metástases espontâneas a partir do tumor primário, podendo espalhar para sítios distantes, como fígado e pulmão, de modo semelhante ao que ocorre em humanos (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2000).

Por este motivo retiramos esses órgãos e realizamos as análises histológicas, podendo observar mais uma vez que o CLN-AF-RAP não apresentou nenhuma alteração nesses órgãos, sugerindo que o carreador chegou até as células cancerígenas, regrediu o tumor e não houve metástase nos animais estudados.

Figura 26. Análise dos órgãos de camundongos Swiss com tumor de 4T1 com tratamentos de solução salina, rapamicina, Taxol®, CLN-AF, CLN-AF-RAP.

	Pulmões	Rins	Fígado	Tumor
Controle				
Rap				
Taxol®	nenhuma alteração			
CLN-AF	nenhuma alteração		nenhuma alteração	

CLN- AF- RAP	nenhuma alteração		nenhuma alteração	nenhuma alteração
--------------------	-------------------	--	-------------------	-------------------

6. Conclusões

Os resultados obtidos indicaram que ocorreu a formação do lipídio funcionalizado e a metodologia utilizada para obtenção dos CLN se mostrou adequada, possibilitando o desenvolvimento de seis formulações.

As formulações funcionalizadas e acrescidas de fármaco (CLN-AF, CLN-AF-RAP1%, CLN-AF-RAP3%, CLN-AF-RAP5%) analisadas por DLS apresentaram tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta dentro dos limites toleráveis para nanopartículas.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que os CLN funcionalizados ou não apresentaram morfologia esférica e em escala nanométrica.

As curvas de calorimetria exploratória diferencial dos componentes utilizados na formulação apresentaram picos de temperaturas de fusão como os esperados e condizentes com a literatura.

Análise termogravimétrica mostrou uma degradação térmica entre 300 e 400 °C, indicando que a formulação mais termicamente estável foi a CLN-AF-RAP5%.

A validação do método analítico para a rapamicina seguiu as normativas da RDC 66/2017 da ANVISA e ICH, sendo possível o desenvolvimento do método analítico satisfatório.

O ensaio de eficiência de encapsulação evidenciou alta porcentagem de encapsulação (95%), independente das formulações avaliadas.

Os CLN promoveram um controle eficiente das taxas de liberação do fármaco, seguindo modelo de Korsmeyer-Peppas e Weibull.

Desta forma, o sistema que melhor se destacou em toda a caracterização foi o CLN-AF-RAP3%, por isso escolhido para continuar os ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade mostraram que CLN-AF não foram tóxicos para as células e quando encapsulados com a rapamicina apresentaram IC₅₀ de 84,1nM, 176nM e 110nM para as células LEWIS, MCF-7 e MCF10-A, respectivamente.

Os *C. elegans* quando tratados com a CLN-AF-RAP apresentam prolongamento do seu tempo de vida, podendo-se observar que o meio contendo somente NGM teve um tempo de vida de 16 dias e já os tratados com CLN-AF-RAP viveram cerca de 25 dias.

Os ensaios de microscopia confocal e citometria de fluxo evidenciaram a internalização celular das formulações nas linhagens testadas e o experimento *in vivo* sugere diminuição do

tumor, evidenciando a eficácia do sistema e potencial aplicação no tratamento do câncer de mama.

Sendo assim, o presente trabalho mostra que os carreadores lipídicos nanoestruturados e encapsulado com rapamicina e funcionalizados com ácido fólico, podem ser muito promissores para o tratamento de câncer de mama.

7. Referências Bibliográficas

- 2018, B. Guidelines for early detection of breast cancer in Brazil. II – New national recommendations, main evidence, and controversies. **Cadernos de Saude Publica**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 1–15, 2018.
- A, J. S. B.; LEE, R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. [s. l.], v. 41, p. 147–162, 2000.
- ABATE-SHEN, C. A new generation of mouse models of cancer for translational research. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 12, n. 18, p. 5274–5276, 2006.
- ACS. **Cancer Facts & Figures 2018**. [s.l: s.n.].
- ADVANI, S. Targeting mTOR pathway: A new concept in cancer therapy. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 132, 2010. Disponível em: <<http://www.ijmpo.org/text.asp?2010/31/4/132/76197>>
- AGAYAN, R. R.; HORVATH, T.; MCNAUGHTON, B. H.; ANKER, J. N. Optical manipulation of metal-silica hybrid nanoparticles. [s. l.], v. 5514, p. 502–513, 2004.
- AHMED, K.; LI, Y.; MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 132, n. 2, p. 799–807, 2012.
- ALAVEZ, S.; VANTIPALLI, M. C.; ZUCKER, D. J. S.; KLANG, I. M.; LITHGOW, G. J. Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan. **Nature**, [s. l.], v. 472, n. 7342, p. 226–230, 2011.
- ALEXIS, F.; PRIDGEN, E. M.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. **Nanoparticle technologies for cancer therapy**. [s.l: s.n.]. v. 197
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Follow-up care after breast cancer treatment. **Follow up Care After Breast Cancer Treatment**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1–23, 2019.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2021**, 2021.
- AMORNPHIMOLTHAM, P.; LEELAHAVANICHKUL, K.; MOLINOLO, A.; PATEL, V.; GUTKIND, J. S. Inhibition of mammalian target of rapamycin by rapamycin causes the regression of carcinogen-induced skin tumor lesions. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 14, n. 24, p. 8094–8101, 2008.
- AMORNPHIMOLTHAM, P.; PATEL, V.; SODHI, A.; NIKITAKIS, N. G.; SAUK, J. J.; SAUSVILLE, E. A.; MOLINOLO, A. A.; GUTKIND, J. S. Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Cancer Research**, [s. l.], v. 65, n. 21, p. 9953–9961, 2005.
- ANOTHAISINTAWEE, T.; WIRATKAPUN, C.; LERDSITTHICHAI, P.; KASAMESUP, V.; WONGWAISAYAWAN, S.; SRINAKARIN, J.; HIRUNPAT, S.; WOODTICHARTPRECHA, P.; BOONLIKIT, S.; TEERAWATTANANON, Y.; THAKKINSTIAN, A. Risk factors of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **Asia-Pacific Journal of Public Health**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 368–387, 2013.
- ANVISA. Ministério da Saúde - MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RE nº 899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 19 de março de 2003.**, [s. l.], v. 2017, 2017.
- ARIFIN, D. Y. et Al. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 58, n. 12–13, p. 1274–1325, 2006.
- BARRASA, A.; VAN DE SPEETEN, K.; ANTHONY STUART, O.; HENDRICK SUGARBAKER, P.; ZAPPA, L. Rationale for perioperative chemotherapy treatment in peritoneal carcinomatosis. **Cirugía Española (English Edition)**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 3–13, 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2173-5077\(09\)70110-3](http://dx.doi.org/10.1016/S2173-5077(09)70110-3)>
- BELOQUI, A.; DES RIEUX, A.; PRÉAT, V. Mechanisms of transport of polymeric and lipidic nanoparticles across the intestinal barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 106, p. 242–255, 2016.
- BELOQUI, A.; SOLINÍS, M. A.; DELGADO, A.; ÉVORA, C.; DEL POZO-RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A. Biodistribution of Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) after

intravenous administration to rats: Influence of technological factors. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 309–314, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.01.029>>

BENJAMIN, D.; COLOMBI, M.; MORONI, C.; HALL, M. N. Rapamycin passes the torch: A new generation of mTOR inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 868–880, 2011.

BIKIARIS, D. Can nanoparticles really enhance thermal stability of polymers? Part II: An overview on thermal decomposition of polycondensation polymers. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 523, n. 1–2, p. 25–45, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2011.06.012>>

BJEDOV, I.; TOIVONEN, J. M.; KERR, F.; SLACK, C.; JACOBSON, J.; FOLEY, A.; PARTRIDGE, L. Mechanisms of Life Span Extension by Rapamycin in the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 35–46, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2009.11.010>>

BLANCO, E.; SANGAI, T.; WU, S.; HSIAO, A.; RUIZ-ESPARZA, G. U.; GONZALEZ-DELGADO, C. A.; CARA, F. E.; GRANADOS-PRINCIPAL, S.; EVANS, K. W.; AKCAKANAT, A.; WANG, Y.; DO, K. A.; MERIC-BERNSTAM, F.; FERRARI, M. Colocalized delivery of rapamycin and paclitaxel to tumors enhances synergistic targeting of the PI3K/Akt/mTOR pathway. **Molecular Therapy**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1310–1319, 2014.

BONDÌ, M. L.; AZZOLINA, A.; CRAPARO, E. F.; BOTTO, C.; AMORE, E.; GIAMMONA, G.; CERVELLO, M. Entrapment of an EGFR inhibitor into nanostructured lipid carriers (NLC) improves its antitumor activity against human hepatocarcinoma cells. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–9, 2014.

BOUGUÉON, G.; LAGARCE, F.; MARTIN, L.; PAILHORIÈS, H.; BASTIAT, G.; VRIGNAUD, S. Formulation and characterization of a 0.1 % rapamycin cream for the treatment of Tuberous Sclerosis Complex-related angiofibromas. [s. l.], v. 509, p. 279–284, 2016.

BRANDON, M.; BALDI, P.; WALLACE, D. C. Mitochondrial mutations in cancer. [s. l.], p. 4647–4662, 2006.

BUECH, G.; BERTELMANN, E.; PLEYER, U.; SIEBENBRODT, I.; BORCHERT, H. H. Formulation of sirolimus eye drops and corneal permeation studies. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 292–303, 2007.

CALERO, M.; CHIAPPI, M.; LAZARO-CARRILLO, A.; RODRÍGUEZ, M. J.; CHICHÓN, F. J.; CROSBIE-STANTON, K.; PRINA-MELLO, A.; VOLKOV, Y.; VILLANUEVA, A.; CARRASCOSA, J. L. Characterization of interaction of magnetic nanoparticles with breast cancer cells. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–15, 2015.

CHADAR, R.; AFSANA; KESHARWANI, P. Nanotechnology-based siRNA delivery strategies for treatment of triple negative breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 605, n. June, p. 120835, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120835>>

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Drug – excipient compatibility screening — Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. [s. l.], v. 87, p. 82–97, 2014.

CHADHA, R.; BHANDARI, S.; ARORA, P.; CHHIKARA, R. prepared amorphous forms of some oral hypoglycaemic agents. [s. l.], v. 18, n. June 2012, p. 504–514, 2013.

CHEN, C. C.; TSAI, T. H.; HUANG, Z. R.; FANG, J. Y. Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and pharmacokinetics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 474–482, 2010.

CHEN, H. H.; HUANG, W. C.; CHIANG, W. H.; LIU, T. I.; SHEN, M. Y.; HSU, Y. H.; LIN, S. C.; CHIU, H. C. Ph-responsive therapeutic solid lipid nanoparticles for reducing P-glycoprotein-mediated drug efflux of multidrug resistant cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 10, p. 5035–5048, 2015.

CHEN, Y. C.; LO, C. L.; LIN, Y. F.; HSIUE, G. H. Rapamycin encapsulated in dual-responsive micelles for cancer therapy. **Biomaterials**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 1115–1127, 2013. a.

CHEN, Y. C.; LO, C. L.; LIN, Y. F.; HSIUE, G. H. Rapamycin encapsulated in dual-responsive

micelles for cancer therapy. **Biomaterials**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 1115–1127, 2013. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.034>>

CHOI, J. Y.; THAPA, R. K.; YONG, C. S.; KIM, J. O. Nanoparticle-based combination drug delivery systems for synergistic cancer treatment. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 325–339, 2016.

CHOLKAR, K.; GUNDA, S.; EARLA, R.; PAL, D.; MITRA, A. K. Nanomicellar Topical Aqueous Drop Formulation of Rapamycin for Back-of-the-Eye Delivery. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 610–622, 2015.

CHRISSAFIS, K.; BIKIARIS, D. Thermochimica Acta Can nanoparticles really enhance thermal stability of polymers ? Part I: An overview on thermal decomposition of addition polymers. [s. l.], v. 523, p. 1–24, 2011.

CITRI, A.; YARDEN, Y. EGF-ERBB signalling: Towards the systems level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 505–516, 2006.

CLÁUDIA BERNAL, ANDRÉA BOLDARINI COUTO, S. T. B. e É. T. G. C. Educação. **Química nova**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 849–855, 2002.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 123–133, 2001.

CURY, B. S. F.; CASTRO, A. D.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 2: Physical parameters, cross-linking degrees and drug delivery relationships. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 371, n. 1–2, p. 8–15, 2009.

DAL MAGRO, R.; ALBERTINI, B.; BERETTA, S.; RIGOLIO, R.; DONZELLI, E.; CHIORAZZI, A.; RICCI, M.; BLASI, P.; SANCINI, G. Artificial apolipoprotein corona enables nanoparticle brain targeting. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 429–438, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.11.008>>

DALL, G. V.; BRITT, K. L. Estrogen effects on the mammary gland in early and late life and breast cancer risk. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 7, n. MAY, p. 1–10, 2017.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 62–76, 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1208/s12249-010-9563-0>>

DE MATOS, J. C.; PELLOSO, S. M.; DE BARROS CARVALHO, M. D. Prevalência de fatores de risco para o câncer de mama no município de Maringá, Paraná, Brasil. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 352–359, 2010.

DEVANAND VENKATASUBBU, G.; RAMASAMY, S.; RAMAKRISHNAN, V.; KUMAR, J. Folate targeted PEGylated titanium dioxide nanoparticles as a nanocarrier for targeted paclitaxel drug delivery. **Advanced Powder Technology**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 947–954, 2013.

DHANDHUKIA, J. P.; SHI, P.; PEDDI, S.; LI, Z.; ALURI, S.; JU, Y.; BRILL, D.; WANG, W.; JANIB, S. M.; LIN, Y. A.; LIU, S.; CUI, H.; MACKAY, J. A. Bifunctional Elastin-like Polypeptide Nanoparticles Bind Rapamycin and Integrins and Suppress Tumor Growth in Vivo. **Bioconjugate Chemistry**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 2715–2728, 2017.

DOKTOROVÁ, S.; ARAÚJO, J.; GARCIA, M. L.; RAKOVSKÝ, E.; SOUTO, E. B. Formulating fluticasone propionate in novel PEG-containing nanostructured lipid carriers (PEG-NLC). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 538–542, 2010.

DUBEY, R. D.; ALAM, N.; SANEJA, A.; KHARE, V.; KUMAR, A.; VAIDH, S.; MAHAJAN, G.; SHARMA, P. R.; SINGH, S. K.; MONDHE, D. M.; GUPTA, P. N. Development and evaluation of folate functionalized albumin nanoparticles for targeted delivery of gemcitabine. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 492, n. 1–2, p. 80–91, 2015.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006.

DURÁN ET AL., 2010. TECNOLOGIA DE NANOCRISTAIS EM FÁRMACOS Nelson. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 151–158, 2010.

ELOY, J. O.; PETRILLI, R.; BRUEGGEMEIER, R. W.; MARCHETTI, J. M.; LEE, R. J. Rapamycin-

loaded Immunoliposomes Functionalized with Trastuzumab: A Strategy to Enhance Cytotoxicity to HER2-positive Breast Cancer Cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], p. 48–56, 2017. a.

ELOY, J. O.; PETRILLI, R.; FERNANDO, J.; MARCELO, H.; ANTONIO, R.; PALMA, J.; BARCELLOS, A.; CHESCA, D. L.; NEDER, L.; TIEZZI, D. G.; LEE, R. J.; MALDONADO, J. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Co-loaded paclitaxel / rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 141, p. 74–82, 2016. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.032>>

ELOY, J. O.; PETRILLI, R.; NOBORU, L.; TREVIZAN, F.; CHORILLI, M. Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], 2017. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.085>>

ELOY, J.; PETRILLI, R.; BRUEGGEMEIER, R.; MARCHETTI, J.; LEE, R. Rapamycin-loaded immunoliposomes functionalized with trastuzumab: a strategy to enhance cytotoxicity to HER2-positive breast cancer cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 16, n. 999, p. 1–1, 2016. b. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&doi=10.2174/1871520616666160526103432>>

EVASON, K.; HUANG, C.; YAMBEN, I.; COVEY, D. F.; KORNFELD, K. Anticonvulsant medications extend worm life-span. **Science**, [s. l.], v. 307, n. 5707, p. 258–262, 2005.

FACHINETTI, N.; RIGON, R. B.; ELOY, J. O.; SATO, M. R.; DOS SANTOS, K. C.; CHORILLI, M. Comparative Study of Glyceryl Behenate or Polyoxyethylene 40 Stearate-Based Lipid Carriers for Trans-Resveratrol Delivery: Development, Characterization and Evaluation of the In Vitro Tyrosinase Inhibition. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 1401–1409, 2018.

FAIVRE, S.; KROEMER, G.; RAYMOND, E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 671–688, 2006.

FANG, G.; TANG, B.; CHAO, Y.; XU, H.; GOU, J.; ZHANG, Y.; XU, H.; TANG, X. Cysteine-Functionalized Nanostructured Lipid Carriers for Oral Delivery of Docetaxel: A Permeability and Pharmacokinetic Study. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 2384–2395, 2015.

FANTUS, D.; ROGERS, N. M.; GRAHAMMER, F.; HUBER, T. B.; THOMSON, A. W. Roles of mTOR complexes in the kidney: Implications for renal disease and transplantation. **Nature Reviews Nephrology**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 587–609, 2016.

FARBER, E. Cellular Biochemistry of the Stepwise Development of Cancer with Chemicals: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. **Cancer Research**, [s. l.], v. 44, n. December, p. 5463–5474, 1984.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R.; EXCELLENCE, C. N.; ENGINEERING, C. Impact of Nanotechnology on Drug. **American Chemical Society Nano**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 16–20, 2009.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. [s. l.], v. 386, 2015.

FERREIRA, V. A.; SILVEIRA, I. D. N. T.; GOMES, N. S.; RUIZ, M. T.; SILVA, S. R. Da. Quality of life of women with gynecologic and breast cancer undergoing chemotherapy. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, [s. l.], v. 16, n. 2, 2015.

FORREST, M. L.; WON, C. Y.; MALICK, A. W.; KWON, G. S. In vitro release of the mTOR inhibitor rapamycin from poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone) micelles. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 370–377, 2006.

FOSTER, D. A.; TOSCHI, A. Targeting mTOR with rapamycin: One dose does not fit all. **Cell Cycle**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1026–1029, 2009.

FREAG, M. S.; ELNAGGAR, Y. S. R.; ABDELMONSIF, D. A.; ABDALLAH, O. Y. Layer-by-layer-coated lyotropic liquid crystalline nanoparticles for active tumor targeting of rapamycin. **Nanomedicine**, [s. l.], v. 11, n. 22, p. 2975–2996, 2016.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN®) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 168, n. 2, p. 221–229, 1998.

FRESE, K. K.; TUVESON, D. A. Maximizing mouse cancer models. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 645–658, 2007.

GABA, B.; FAZIL, M.; KHAN, S.; ALI, A.; BABOOTA, S.; ALI, J. Nanostructured lipid carrier system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 147–159, 2015.

GAO, J.; LV, Q.; LI, L.; TANG, X.; LI, F.; HU, Y.; HAN, M. Biomaterials Glioma targeting and blood e brain barrier penetration by dual-targeting doxorubicin liposomes. [s. l.], v. 34, 2013.

GARIGAN, D.; HSU, A. L.; FRASER, A. G.; KAMATH, R. S.; ABRINGET, J.; KENYON, C. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: A role for heat-shock factor and bacterial proliferation. **Genetics**, [s. l.], v. 161, n. 3, p. 1101–1112, 2002.

GAUBITZ, C.; PROUTEAU, M.; KUSMIDER, B.; LOEWITH, R. TORC2 Structure and Function. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 532–545, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2016.04.001>>

GAUDET, M. M.; GIERACH, G. L.; CARTER, B. D.; LUO, J.; MILNE, R. L.; WEIDERPASS, E.; GILES, G. G.; TAMIMI, R. M.; ELIASSEN, A. H.; ROSNER, B.; WOLK, A.; ADAMI, H. O.; MARGOLIS, K. L.; GAPSTUR, S. M.; GARCIA-CLOSAS, M.; BRINTON, L. A. Pooled analysis of nine cohorts reveals breast cancer risk factors by tumor molecular subtype. **Cancer Research**, [s. l.], v. 78, n. 20, p. 6011–6021, 2018.

GHAZNAVI, H.; SOHEILI, Z.; SAMIEL, S.; SOLTANPOUR, M. S. Association study of methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation with cerebral venous thrombosis in an Iranian population. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 869–873, 2015.

GLEHEN, O.; MITHIEUX, F.; OSINSKY, D.; BEAUJARD, A. C.; FREYER, G.; GUERTSCH, P.; FRANCOIS, Y.; PEYRAT, P.; PANTEIX, G.; VIGNAL, J.; GILLY, F. N. Surgery combined with peritonectomy procedures and intraperitoneal chemohyperthermia in abdominal cancers with peritoneal carcinomatosis: A phase II study. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 799–806, 2003.

GUIMARÃES, K. L.; RÉ, M. I. Lipid Nanoparticles as Carriers for Cosmetic Ingredients: The First (SLN) and the Second Generation (NLC). **Nanocosmetics and Nanomedicines**, [s. l.], p. 101–122, 2011. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-19792-5_5>

H., L.; C., S.; C., Z.; J.H., S.; P., H.; A.-C., R.; C.-O., S.; K., P. Metformin and the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) sensitize breast cancer cells to the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs in vitro. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 1627–1638, 2012. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed14&NEWS=N&AN=364889918>>

HAERI, A.; SADEGHIAN, S.; RABBANI, S.; ANVARI, M. S.; LAVASANIFAR, A.; AMINI, M.; DADASHZADEH, S. Sirolimus-loaded stealth colloidal systems attenuate neointimal hyperplasia after balloon injury: A comparison of phospholipid micelles and liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 455, n. 1–2, p. 320–330, 2013.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 57–64, 2008.

HANSEN, M.; CHANDRA, A.; MITIC, L. L.; ONKEN, B.; DRISCOLL, M.; KENYON, C. A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. **PLoS Genetics**, [s. l.], v. 4, n. 2, 2008.

HARRISON, D. E.; STRONG, R.; SHARP, Z. D.; NELSON, J. F.; ASTLE, C. M.; FLURKEY, K.; NADON, N. L.; WILKINSON, J. E.; FRENKEL, K.; CARTER, C. S.; PAHOR, M.; JAVORS, M. A.; FERNANDEZ, E.; MILLER, R. A. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. **Nature**, [s. l.], v. 460, n. 7253, p. 392–395, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature08221>>

HENNINK, W. E.; NOSTRUM, C. F. Van. Novel crosslinking methods to design hydrogels ☆. [s. l.], v. 64, p. 223–236, 2012.

HONJOH, S.; YAMAMOTO, T.; UNO, M.; NISHIDA, E. Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*. **Nature**, [s. l.], v. 457, n. 7230, p. 726–730, 2009.

HU, S.; XU, Y.; MENG, L.; HUANG, L.; SUN, H. Curcumin inhibits proliferation and promotes

apoptosis of breast cancer cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 1266–1272, 2018.

HUMBER, D.; JAHANSOUZ, F. Clinical Pharmacology Review. **Trauma**, [s. l.], p. 59–76, 2007.

HURVITZ, S. A.; DIRIX, L.; KOCSIS, J.; BIANCHI, G. V.; LU, J.; VINHOLES, J.; GUARDINO, E.; SONG, C.; TONG, B.; NG, V.; CHU, Y. W.; PEREZ, E. A. Phase II randomized study of trastuzumab emtansine versus trastuzumab plus docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 1157–1163, 2013.

HUSSIEN, N. A.; İŞIKLAN, N.; TÜRK, M. Aptamer-functionalized magnetic graphene oxide nanocarrier for targeted drug delivery of paclitaxel. **Materials Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 211, p. 479–488, 2018.

INCA. **6ª edição revista e atualizada Rio de Janeiro, RJ**. [s.l.: s.n.].

JANG, S. W.; KANG, M. J. Improved oral absorption and chemical stability of everolimus via preparation of solid dispersion using solvent wetting technique. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 473, n. 1–2, p. 187–193, 2014.

JIA, K.; CHEN, D.; RIDDLE, D. L. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. **Development**, [s. l.], v. 131, n. 16, p. 3897–3906, 2004.

JONES, K. T.; GREER, E. R.; PEARCE, D.; ASHRAFI, K. Rictor/torc2 regulates *Caenorhabditis elegans* fat storage, body size, and development through *sgk-1*. **PLoS Biology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 0604–0615, 2009.

JOSIMAR O. ELOY, RAQUEL PETRILLI, DEISE L. CHESCA, FABIANO P. SAGGIORO, ROBERT J. LEE, J. M. M. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics IR780-loaded TPGS-TOS micelles for breast cancer photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 115, n. January, p. 159–167, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.01.002>>

KADAKIA, E.; HARPUDE, P.; PARAYATH, N.; BOTTINO, D.; AMIJI, M. Challenging the CNS Targeting Potential of Systemically Administered Nanoemulsion Delivery Systems: a Case Study with Rapamycin-Containing Fish Oil Nanoemulsions in Mice. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 36, n. 9, 2019.

KAPAH, P.; CHEN, D.; ROGERS, A. N.; KATEWA, S. D.; LI, P. W. L.; THOMAS, E. L.; KOCKEL, L. With TOR, less is more: A key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 453–465, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.001>>

KATIIYAR, S. S.; MUNTIMADUGU, E.; RAFEEQI, T. A.; DOMB, A. J.; KHAN, W. Co-delivery of rapamycin- and piperine-loaded polymeric nanoparticles for breast cancer treatment. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 2608–2616, 2016.

KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI, M.; YAMADA, S.; ONOUE, S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 420, n. 1, p. 1–10, 2011.

KILIAY, E.; DEMIRBILEK, M.; TÜRK, M.; GÜVEN, E.; HAZER, B.; DENKBAS, E. B. Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHX) based nanoparticles for targeted cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 310–320, 2011.

KIM, D. H.; SARBASSOV, D. D.; ALI, S. M.; LATEK, R. R.; GUNTUR, K. V. P.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; SABATINI, D. M. GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 895–904, 2003.

KIM, J. H.; KO, J. A.; KIM, J. T.; CHA, D. S.; CHO, J. H.; PARK, H. J.; SHIN, G. H. Preparation of a capsaicin-loaded nanoemulsion for improving skin penetration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 725–732, 2014.

KIM, Y. I. Folate and colorectal cancer: An evidence-based critical review. **Molecular Nutrition and Food Research**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 267–292, 2007.

KNOLL, G. A.; KOKOLO, M. B.; MALLICK, R.; BECK, A.; BUENAVENTURA, C. D.; DUCHARME, R.; BARSOUM, R.; BERNASCONI, C.; BLYDT-HANSEN, T. D.; EKBERG, H.; FELIPE, C. R.; FIRTH, J.; GALLON, L.; GELENS, M.; GLOTZ, D.; GOSSMANN, J.; GUBA, M.; MORSY, A. A.; SALGO, R.; SCHEUERMANN, E. H.; TEDESCO-SILVA, H.; VITKO, S.; WATSON, C.; FERGUSON, D. A. Effect of sirolimus on malignancy and survival after kidney transplantation: Systematic review and meta-analysis of individual patient data. **BMJ (Online)**, [s. l.], v. 349, n. November, p. 1–14, 2014.

KOTHARI, C.; DIORIO, C.; DUROCHER, F. The importance of breast adipose tissue in breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 16, p. 1–33, 2020.

KRAUSE, B.; MENDE, M.; PÖTSCHKE, P.; PETZOLD, G. Dispersability and particle size distribution of CNTs in an aqueous surfactant dispersion as a function of ultrasonic treatment time. **Carbon**, [s. l.], v. 48, n. 10, p. 2746–2754, 2010.

KUMAR, B.; PRASAD, M.; BHAT-NAKSHATRI, P.; ANJANAPPA, M.; KALRA, M.; MARINO, N.; STORNIOLO, A. M.; RAO, X.; LIU, S.; WAN, J.; LIU, Y.; NAKSHATRI, H. Normal breast-derived epithelial cells with luminal and intrinsic subtype-enriched gene expression document interindividual differences in their differentiation Cascade. **Cancer Research**, [s. l.], v. 78, n. 17, p. 5107–5123, 2018.

LAPIERRE, L. R.; GELINO, S.; MELÉNDEZ, A.; HANSEN, M. Autophagy and lipid metabolism coordinately modulate life span in germline-less *C. elegans*. **Current Biology**, [s. l.], v. 21, n. 18, p. 1507–1514, 2011.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. MTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, [s. l.], v. 149, n. 2, p. 274–293, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>>

LATTIN, J. R.; JAVADI, M.; MCRAE, M.; PITT, W. G. Cytosolic delivery via escape from the endosome using emulsion droplets and ultrasound. **Journal of Drug Targeting**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 469–479, 2015.

LEE, B. L.; LIEDKE, P. E. R.; BARRIOS, C. H.; SIMON, S. D.; FINKELSTEIN, D. M.; GOSS, P. E. Breast cancer in Brazil: Present status and future goals. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 13, n. 3, 2012.

LEE, G. D.; WILSON, M. A.; ZHU, M.; WOLKOW, C. A.; DE CABO, R.; INGRAM, D. K.; ZOU, S. Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 515–524, 2006.

LEE, K.; SHIN, S. C.; OH, I. Fluorescence spectroscopy studies on micellization of poloxamer 407 solution. **Archives of Pharmacal Research**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 653–658, 2003.

LI, W. H.; HSU, F. L.; LIU, J. T.; LIAO, V. H. C. The ameliorative and toxic effects of selenite on *Caenorhabditis elegans*. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 812–819, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.12.002>>

LIFSON, M. A.; CARTER, J. A.; MILLER, B. L. et Al. Functionalized Polymer Microgel Particles Enable Customizable Production of Label-Free Sensor Arrays. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 87, n. 15, p. 7887–7893, 2015.

LIMA, A. M.; DAL, C.; MONTEIRO, F. B. F.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; ANDRADE, G. P.; RIBEIRO, A. O.; PERUSSI, J. R. Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles : Phototoxicity and photodynamic efficiency. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, [s. l.], v. 125, p. 146–154, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.05.010>>

LIN, N. U.; WINER, E. P.; WHEATLEY, D.; CAREY, L. A.; HOUSTON, S.; MENDELSON, D.; MUNSTER, P.; FRANKS, L.; KELLY, S.; GARCIA, A. A.; CLEATOR, S.; UTTENREUTHER-FISCHER, M.; JONES, H.; WIND, S.; VINISKO, R.; HICKISH, T. A phase II study of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker, in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing after trastuzumab. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 133, n. 3, p. 1057–1065, 2012.

LIN, P. C.; LIN, S.; WANG, P. C.; SRIDHAR, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 711–726, 2014.

LIU, P.; CHENG, H.; ROBERTS, T. M.; ZHAO, J. J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase

pathway in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 627–644, 2009.

LIU, Y.; LI, K.; PAN, J.; LIU, B.; FENG, S. S. Folic acid conjugated nanoparticles of mixed lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for targeted delivery of Docetaxel. **Biomaterials**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 330–338, 2010.

LIU, Y.; LU, W. L.; WANG, J. C.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; WANG, X. Q.; ZHOU, T. Y.; ZHANG, Q. Controlled delivery of recombinant hirudin based on thermo-sensitive Pluronic® F127 hydrogel for subcutaneous administration: In vitro and in vivo characterization. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 117, n. 3, p. 387–395, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.11.024>>

LLOYD SNYDER, JOSEPH J. KIRKLAND, J. W. D. **INTRODUCTION TO MODERN LIQUID Third Edition INTRODUCTION TO MODERN LIQUID Third Edition**. [s.l: s.n.].

LONG, X.; SPYCHER, C.; HAN, Z. S.; ROSE, A. M.; MÜLLER, F.; AVRUCH, J. TOR deficiency in *C. elegans* causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. **Current Biology**, [s. l.], v. 12, n. 17, p. 1448–1461, 2002.

LOUREIRO, A.; AZOIA, N.; GOMES, A.; CAVACO-PAULO, A. Albumin-Based Nanodevices as Drug Carriers. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 22, n. 10, p. 1371–1390, 2016.

LOURENCO, C.; TEIXEIRA, M.; SIMES, S.; GASPAR, R. international journal of pharmaceutics Steric stabilization of nanoparticles: size and surface properties. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 138, n. 96, p. 1–12, 1996.

LUCIO, D.; MARTÍNEZ-OHÁRRIZ, M. C.; JARAS, G.; ARANAZ, P.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J.; RADULESCU, A.; IRACHE, J. M. Optimization and evaluation of zein nanoparticles to improve the oral delivery of glibenclamide. In vivo study using *C. elegans*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 121, n. October, p. 104–112, 2017.

LUONG, D.; KESHARWANI, P.; ALSAAB, H. O.; SAU, S.; PADHYE, S.; SARKAR, F. H.; IYER, A. K. Folic acid conjugated polymeric micelles loaded with a curcumin difluorinated analog for targeting cervical and ovarian cancers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 157, p. 490–502, 2017.

LUYIMBAZI, D.; AKCAKANAT, A.; MCAULIFFE, P. F.; ZHANG, L.; SINGH, G.; GONZALEZ-ANGULO, A. M.; CHEN, H.; DO, K.-A.; ZHENG, Y.; HUNG, M.-C.; MILLS, G. B.; MERIC-BERNSTAM, F. Rapamycin Regulates Stearoyl CoA Desaturase 1 Expression in Breast Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 2770–2784, 2010. Disponível em: <<http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-09-0980>>

MA, Y.; BAI, R.; TRIEU, R.; WONG, L. C. Biochimica et Biophysica Acta Mitochondrial dysfunction in human breast cancer cells and their transmitochondrial cybrids. [s. l.], v. 1797, p. 29–37, 2010.

MANADAS, R. et al. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 375–399, 2002.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas Preparation,. **Revista eletrônica de farmacia**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 255, 2009. a. Disponível em: <??>

MARCATO, P. et al. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas Preparation,. **Revista eletrônica de farmacia**, [s. l.], v. VI, n. 2, p. 1–37, 2009. b.

MARTORELL, P.; LLOPIS, S.; GONZÁLEZ, N.; MONTÓN, F.; ORTIZ, P.; GENOVÉS, S.; RAMÓN, D. Caenorhabditis elegans as a model to study the effectiveness and metabolic targets of dietary supplements used for obesity treatment: The specific case of a conjugated linoleic acid mixture (Tonalin). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 60, n. 44, p. 11071–11079, 2012.

MASTRIA, E. M.; CHEN, M.; MCDANIEL, J. R.; LI, X.; HYUN, J.; DEWHIRST, M. W.; CHILKOTI, A. Doxorubicin-conjugated polypeptide nanoparticles inhibit metastasis in two murine models of carcinoma. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 208, p. 52–58, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.01.033>>

MCCOLL, G.; ROGERS, A. N.; ALAVEZ, S.; HUBBARD, A. E.; MELOV, S.; LINK, C. D.; BUSH,

A. I.; KAPAH, P.; LITHGOW, G. J. Insulin-like signaling determines survival during stress via posttranscriptional mechanisms in *C. elegans*. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 260–272, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.08.004>>

MEDEIROS, G. C.; BERGMANN, A.; AGUIAR, S. S. De; THULER, L. C. S. Análise dos determinantes que influenciam o tempo para o início do tratamento de mulheres com câncer de mama no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 1269–1282, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2015000601269&lng=pt&tlng=pt>

MENG, H.; CHEN, J. Y.; MI, L.; WANG, P. N.; GE, M. Y.; YUE, Y.; DAI, N. Conjugates of folic acids with BSA-coated quantum dots for cancer cell targeting and imaging by single-photon and two-photon excitation. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 117–123, 2011.

MERAZ, I. M.; SAVAGE, D. J.; SEGURA-IBARRA, V.; LI, J.; RHUDY, J.; GU, J.; SERDA, R. E. Adjuvant cationic liposomes presenting MPL and IL-12 induce cell death, suppress tumor growth, and alter the cellular phenotype of tumors in a murine model of breast cancer. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 3484–3491, 2014.

MIAO, Z. L.; DENG, Y. J.; DU, H. Y.; SUO, X. Bin; WANG, X. Y.; WANG, X.; WANG, L.; CUI, L. J.; DUAN, N. Preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 941–946, 2015.

MOASSER, M. M. The oncogene HER2: Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene**, [s. l.], v. 26, n. 45, p. 6469–6487, 2007.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 561–573, 2006.

MOJA, L.; TAGLIABUE, L.; BALDUZZI, S.; PARMELLI, E.; PISTOTTI, V.; GUARNERI, V.; D'AMICO, R. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], v. 2021, n. 2, 2012.

MONDESIRE, W. H. Targeting Mammalian Target of Rapamycin Synergistically Enhances Chemotherapy-Induced Cytotoxicity in Breast Cancer Cells. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 10, n. 20, p. 7031–7042, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-0361>>

MUHAMMAD, F.; GUO, M.; GUO, Y.; QI, W.; QU, F.; SUN, F.; ZHAO, H.; ZHU, G. Acid degradable ZnO quantum dots as a platform for targeted delivery of an anticancer drug. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 21, n. 35, p. 13406–13412, 2011.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 54, n. SUPPL., p. 131–155, 2002.

MUSCHIOL, D.; SCHROEDER, F.; TRAUNSPURGER, W. Life cycle and population growth rate of *Caenorhabditis elegans* studied by a new method. **BMC Ecology**, [s. l.], v. 9, p. 1–13, 2009.

MUSSI, S. V.; PAREKH, G.; PATTEKARI, P.; LEVCHENKO, T.; LVOV, Y.; FERREIRA, L. A. M.; TORCHILIN, V. P. Improved pharmacokinetics and enhanced tumor growth inhibition using a nanostructured lipid carrier loaded with doxorubicin and modified with a layer-by-layer polyelectrolyte coating. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 495, n. 1, p. 186–193, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.079>>

NEMEN, D. Quim. Nova., [s. l.], v. 34, n. 3, p. 408–413, 2011.

NI, Z.; LEE, S. S. RNAi screens to identify components of gene networks that modulate aging in *Caenorhabditis elegans*. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 53–64, 2010.

NIU, H.; WANG, J.; LI, H.; HE, P. Rapamycin potentiates cytotoxicity by docetaxel possibly through downregulation of Survivin in lung cancer cells. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 1–8, 2011.

NOGUEIRA, E.; GOMES, A. C.; PRETO, A.; CAVACO-PAULO, A. Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1113–1126, 2016.

OBEIDAT, W. M.; SCHWABE, K.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 76, n. 1,

p. 56–67, 2010.

OKKENHAUG, K.; VANHAESEBROECK, B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 317–330, 2003.

OLAYIOYE, M. A. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. **Breast cancer research : BCR**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 385–9, 2001.

Disponível

em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11737890>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC138705>

OLSEN, C. P. Why Make Fat?: The Impact of de novo Fatty Acid Synthesis on Fat Storage, Reproduction, and Longevity in *C. elegans*. [s. l.], p. 148, 2011.

ONKEN, B.; DRISCOLL, M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2010.

PAGE, S.; MAURER, R.; WYTTEBACH, N. **Structured development approach for amorphous systems**. [s. l.: s. n.], v. 22

PANIS, C.; VICTORINO, V. J.; HERRERA, A. C. S. A.; FREITAS, L. F.; DE ROSSI, T.; CAMPOS, F. C.; COLADO SIMÃO, A. N.; BARBOSA, D. S.; PINGE-FILHO, P.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L. Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 133, n. 3, p. 881–888, 2012.

PANWALKAR, A.; VERSTOVSEK, S.; GILES, F. J. Mammalian Target of Rapamycin Inhibition As Therapy for Hematologic Malignancies. **Cancer**, [s. l.], v. 100, n. 4, p. 657–666, 2004.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 309, n. 1–2, p. 44–50, 2006.

PATIL, Y. B.; TOTI, U. S.; KHDAR, A.; MA, L.; PANYAM, J. Single-step surface functionalization of polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. **Biomaterials**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 859–866, 2009.

PEROU, C. M.; SØRILE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; RESS, C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L. A.; FLUGE, Ø.; PERGAMMENSCHLOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, [s. l.], v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.

PETRASCHECK, M.; YE, X.; BUCK, L. B. An antidepressant that extends lifespan in adult *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, [s. l.], v. 450, n. 7169, p. 553–556, 2007.

PETROULAKIS, E.; MAMANE, Y.; LE BACQUER, O.; SHAHBAZIAN, D.; SONENBERG, N. mTOR signaling: Implications for cancer and anticancer therapy. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 94, n. 2, p. 195–199, 2006.

PIETSCH, K.; SAUL, N.; MENZEL, R.; STÜRZENBAUM, S. R.; STEINBERG, C. E. W. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. **Biogerontology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 565–578, 2009.

PINO, E. C.; WEBSTER, C. M.; CARR, C. E.; SOUKAS, A. A. Biochemical and high throughput microscopic assessment of fat mass in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 73, p. 1–11, 2013.

PLESCA, M.; BORDEA, C.; EL HOUCHEIMI, B.; ICHIM, E.; BLIDARU, A. Evolution of radical mastectomy for breast cancer. **Journal of medicine and life**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 183–186, 2016.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols in Immunology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 1–16, 2000.

RAD, E.; MURRAY, J. T.; TEE, A. R. Oncogenic signalling through mechanistic target of rapamycin (mTOR): A driver of metabolic transformation and cancer progression. **Cancers**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–17, 2018.

REDHEAD, H. M.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: In vitro characterisation and in vivo evaluation. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 353–363, 2001.

REIS-FILHO, J. S.; PUSZTAI, L. Breast Cancer 2 Gene expression profiling in breast cancer : classification , prognostication , and prediction. [s. l.], v. 378, 2011.

RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 465, De 24 de F. de 2021. Seção 1. [s. l.], p. 2021, 2021.

REY-VARGAS, L.; MEJÍA-HENAO, J. C.; SANABRIA-SALAS, M. C.; SERRANO-GOMEZ, S. J. Effect of neoadjuvant therapy on breast cancer biomarker profile. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020.

RIGON, R. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS PARA ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE TRANS-RESVERATROL. **tese**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 156, 2013. Disponível em: <<http://www.eldis.org/vfile/upload/1/document/0708/DOC23587.pdf%0Ahttp://socserv2.socsci.mcmaster.ca/~econ/ugcm/3ll3/michels/polipart.pdf%0Ahttps://www.theatlantic.com/magazine/archive/1994/02/the-coming-anarchy/304670/%0Ahttps://scholar.google.it/scholar?>>>

RIGON, R. B.; FACHINETTI, N.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Skin Delivery and in Vitro Biological Evaluation of Trans -Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles. [s. l.], p. 1–14, 2016. a.

RIGON, R. B.; FACHINETTI, N.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; CHORILLI, M. Skin delivery and in vitro biological evaluation of trans-Resveratrol-Loaded solid lipid nanoparticles for skin disorder therapies. **Molecules**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1–14, 2016. b.

ROBIDA-STUBBS, S.; GLOVER-CUTTER, K.; LAMMING, D. W.; MIZUNUMA, M.; NARASIMHAN, S. D.; NEUMANN-HAEFELIN, E.; SABATINI, D. M.; BLACKWELL, T. K. TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 713–724, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.007>>

ROSS, J. S.; SLODKOWSKA, E. A.; SYMMANS, W. F.; PUSZTAI, L.; RAVDIN, P. M.; HORTOBAGYI, G. N. The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. **The Oncologist**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 320–368, 2009.

ROUF, M. A.; VURAL, I.; RENOIR, J. M.; HINCAL, A. A. Development and characterization of liposomal formulations for rapamycin delivery and investigation of their antiproliferative effect on MCF7 cells. **Journal of Liposome Research**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 322–331, 2009.

ROWE, R. C. SHESKEY, P. J. QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. [s.l: s.n.].

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. **Handbook of pharmaceutical excipients**, [s. l.], v. 44, n. 0, p. 917, 2009.

RUGGIERO, A.; TRIARICO, S.; TROMBATORE, G.; BATTISTA, A.; DELL'ACQUA, F.; RIZZARI, C.; RICCARDI, R. Incidence, clinical features and management of hypersensitivity reactions to chemotherapeutic drugs in children with cancer. **European Journal of Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 69, n. 10, p. 1739–1746, 2013.

SADZUKA, Y.; SUGIYAMA, I.; TSURUDA, T.; SONOBE, T. Characterization and cytotoxicity of mixed polyethyleneglycol modified liposomes containing doxorubicin. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 312, n. 1–2, p. 83–89, 2006.

SAMADIAN, H.; HOSSEINI-NAMI, S.; KAMRAVA, S. K.; GHAZNAVI, H.; SHAKERI-ZADEH, A. Folate-conjugated gold nanoparticle as a new nanoplatform for targeted cancer therapy. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [s. l.], v. 142, n. 11, p. 2217–2229, 2016.

SANTIDRIAN, A. F.; MATSUNO-YAGI, A.; RITLAND, M.; SEO, B. B.; LEBOEUF, S. E.; GAY, L. J.; YAGI, T.; FELDING-HABERMANN, B. Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 123, n. 3, p. 1068–1081, 2013.

SANTOS, R. P. C.; BENVENUTI, T. T.; HONDA, S. T.; DEL VALLE, P. R.; KATAYAMA, M. L. H.; BRENTANI, H. P.; CARRARO, D. M.; ROZENCHAN, P. B.; BRENTANI, M. M.; DE LYRA, E. C.; TORRES, C. H.; SALZGEBER, M. B.; KAIANO, J. H. L.; GÓES, J. C. S.; FOLGUEIRA, M. A. A. K. Influence of the interaction between nodal fibroblast and breast cancer cells on gene expression. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 145–157, 2011.

SARBASSOV, D. D.; ALI, S. M.; SENGUPTA, S.; SHEEN, J. H.; HSU, P. P.; BAGLEY, A. F.; MARKHARD, A. L.; SABATINI, D. M. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 159–168, 2006.

SARBASSOV, D. D.; GUERTIN, D. A.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, [s. l.], v. 307, n. 5712, p. 1098–1101, 2005.

SATO, M.; DA SILVA, P.; DE SOUZA, R.; DOS SANTOS, K.; CHORILLI, M. Recent Advances in Nanoparticle Carriers for Coordination Complexes. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 287–297, 2015.

SATO, M. R.; OSHIRO JUNIOR, J. A.; MACHADO, R. T. A.; DE SOUZA, P. C.; CAMPOS, D. L.; PAVAN, F. R.; DA SILVA, P. B.; CHORILLI, M. Nanostructured lipid carriers for incorporation of copper(II) complexes to be used against Mycobacterium tuberculosis. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. 11, p. 909–921, 2017. a.

SATO, M. R.; OSHIRO JUNIOR, J. A.; MACHADO, R. T. A.; DE SOUZA, P. C.; CAMPOS, D. L.; PAVAN, F. R.; DA SILVA, P. B.; CHORILLI, M. Nanostructured lipid carriers for incorporation of copper(II) complexes to be used against Mycobacterium tuberculosis. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. 11, p. 909–921, 2017. b.

SAUPE, A.; GORDON, K. C.; RADES, T. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 314, n. 1, p. 56–62, 2006.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 427–443, 2007.

SCHAFFAZICK ET AL. CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS. **química nova**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHOLKMANN, F.; KLEISER, S.; METZ, A. J.; ZIMMERMANN, R.; MATA PAVIA, J.; WOLF, U.; WOLF, M. A review on continuous wave functional near-infrared spectroscopy and imaging instrumentation and methodology. **NeuroImage**, [s. l.], v. 85, p. 6–27, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.004>>

SEO, E. J.; WIENCH, B.; HAMM, R.; PAULSEN, M.; ZU, Y.; FU, Y.; EFFERTH, T. Cytotoxicity of natural products and derivatives toward MCF-7 cell monolayers and cancer stem-like mammospheres. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 438–443, 2015. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2015.01.012>>

SEO, E.; WIENCH, B.; HAMM, R.; PAULSEN, M.; ZU, Y.; FU, Y.; EFFERTH, T. Phytomedicine Cytotoxicity of natural products and derivatives toward MCF-7 cell monolayers and cancer stem-like mammospheres. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 438–443, 2015. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2015.01.012>>

SHAO, Z.; SHAO, J.; TAN, B.; GUAN, S.; LIU, Z.; ZHAO, Z.; HE, F.; ZHAO, J. Targeted lung cancer therapy: Preparation and optimization of transferrin-decorated nanostructured lipid carriers as novel nanomedicine for co-delivery of anticancer drugs and DNA. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 10, p. 1223–1233, 2015.

SHAPIRA, M.; KAKIASHVILI, E.; ROSENBERG, T.; HERSHKO, D. D. The mTOR inhibitor rapamycin down-regulates the expression of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in breast cancer cells. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1–9, 2006.

SHI, F.; YANG, G.; REN, J.; GUO, T.; DU, Y.; FENG, N. Formulation design, preparation, and in vitro and in vivo characterizations of β -elemene-loaded nanostructured lipid carriers. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 8, p. 2533–2541, 2013.

SHIMOBAYASHI, M.; HALL, M. N. Making new contacts : the mTOR. **Nature Publishing Group**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 155–162, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3757>>

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 7–34, 2019.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Hydrophilic matrices for controlled drug delivery: An improved mathematical model to predict the resulting drug release kinetics the “sequential layer” model). **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 1290–1298, 2000.

SILVA, A. C.; GONZÁLEZ-MIRA, E.; GARCÍA, M. L.; EGEA, M. A.; FONSECA, J.; SILVA, R.; SANTOS, D.; SOUTO, E. B.; FERREIRA, D. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 158–165, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.035>>

SIMAMORA, P. et al. 2001. Solubilization of rapamycin. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 213, n. 1–2, p. 25–29, 2001. a.

SIMAMORA, P. et al. 2001. Solubilization of rapamycin. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 213, n. 1–2, p. 25–29, 2001. b.

SLAMON, D. J.; GODOLPHIN, W.; JONES, L. A.; HOLT, J. A.; STEVEN, G.; KEITH, D. E.; LEVIN, W. J.; STUART, S. G.; UDOVE, J.; ULLRICH, A.; PRESS, M. F.; HOLT, J. A.; WONG, S. G.; KEITH, D. E.; LEVIN, W. J.; STUART, S. G.; UDOVE, J.; ULLRICH, A.; PRESS, M. F. Studies of the HER-2 / neu Proto-Oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1703358>

REFERENCES Linked references are available on JSTOR for this a. [s. l.], v. 244, n. 4905, p. 707–712, 2016.

SLAVCEV, T. kaur and R. Solid Lipid Nanoparticles: Tuneable Anti-Cancer Gene/Drug Delivery Systems. **Novel Gene Therapy Approaches**, [s. l.], 2013.

SLOAT, B. R.; SANDOVAL, M. A.; LI, D.; CHUNG, W. G.; LANSAKARA-P, D. S. P.; PROTEAU, P. J.; KIGUCHI, K.; DIGIOVANNI, J.; CUI, Z. In vitro and in vivo anti-tumor activities of a gemcitabine derivative carried by nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 409, n. 1–2, p. 278–288, 2011.

SNEHALATHA, M.; VENUGOPAL, K.; SAHA, R. N.; BABBAR, A. K.; SHARMA, R. K. Etoposide loaded PLGA and PCL nanoparticles II: Biodistribution and pharmacokinetics after radiolabeling with Tc-99m. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 277–287, 2008.

SOBHANI, H.; SHAFATI, A.; NAFISSI-VARCHEH, N.; ABOOFAZELI, R. A Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Rapamycin. [s. l.], v. 12, n. January, p. 77–81, 2013.

SOE, Z. C.; THAPA, R. K.; OU, W.; GAUTAM, M.; NGUYEN, H. T.; JIN, S. G.; KU, S. K.; OH, K. T.; CHOI, H. G.; YONG, C. S.; KIM, J. O. Folate receptor-mediated celastrol and irinotecan combination delivery using liposomes for effective chemotherapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 170, n. April, p. 718–728, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.013>>

SONVICO, F.; DUBERNET, C.; JAILLARD, D.; DEGROUARD, J.; HOEBEKE, J.; DUGUET, E.; COLOMBO, P.; COUVREUR, P. Folate-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Solid Tumor Targeting as Potential Specific Magnetic Hyperthermia Mediators : Synthesis , Physicochemical Characterization , and in Vitro Experiments. **Bioconjugate Chemistry**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 1181–1188, 2005.

SØRLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

SOUKAS, A. A.; KANE, E. A.; CARR, C. E.; MELO, J. A.; RUVKUN, G. Rictor / TORC2 regulates fat metabolism , feeding , growth , and life span in *Caenorhabditis elegans*. [s. l.], p. 496–511, 2009.

SOUTO, E. B.; ALMEIDA, A. J.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN®, NLC®) for cutaneous drug delivery: Structure, protection and skin effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 317–331, 2007.

SUN, M.; SI, L.; ZHAI, X.; FAN, Z.; MA, Y.; ZHANG, R.; YANG, X. The influence of co-solvents on the stability and bioavailability of rapamycin formulated in self-microemulsifying drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 986–994, 2011.

SUN, T.; ZHANG, Y. S.; PANG, B.; HYUN, D. C.; YANG, M.; XIA, Y. Engineered nanoparticles

for drug delivery in cancer therapy. **Angewandte Chemie - International Edition**, [s. l.], v. 53, n. 46, p. 12320–12364, 2014.

SUTPHIN, G. L.; KAEBERLEIN, M. Measuring *Caenorhabditis elegans* Life Span on Solid Media Part 3 : Score animals for life span. [s. l.], p. 1–7, 2009.

SWAIN, S. M.; BASELGA, J.; KIM, S.-B.; RO, J.; SEMIGLAZOV, V.; CAMPONE, M.; CIRUELOS, E.; FERRERO, J.-M.; SCHNEEWEISS, A.; HEESON, S.; CLARK, E.; ROSS, G.; BENYUNES, M. C.; CORTÉS, J. Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 372, n. 8, p. 724–734, 2015.

TAMIMI, R. M.; SPIEGELMAN, D.; SMITH-WARNER, S. A.; WANG, M.; PAZARIS, M.; WILLETT, W. C.; ELIASSEN, A. H.; HUNTER, D. J. Population attributable risk of modifiable and nonmodifiable breast cancer risk factors in postmenopausal breast cancer. **American Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 184, n. 12, p. 884–893, 2016.

TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J.; NASIRPOUR, A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 19, p. 29–43, 2013.

TAN, S. W.; BILLA, N.; ROBERTS, C. R.; BURLEY, J. C. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Surfactant effects on the physical characteristics of Amphotericin B-containing nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 372, n. 1–3, p. 73–79, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.09.030>>

TEIXEIRA, J. A.; NUNES, W. D. G.; DO NASCIMENTO, A. L. C. S.; COLMAN, T. A. D.; CAIRES, F. J.; GÁLICO, D. A.; IONASHIRO, M. Synthesis, thermoanalytical, spectroscopic study and pyrolysis of solid rare earth complexes (Eu, Gd, Tb and Dy) with p-aminobenzoic acid. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [s. l.], v. 121, p. 267–274, 2016.

THAKOR, A. S.; GAMBHIR, S. S. Nanooncology: The future of cancer diagnosis and therapy. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 63, n. 6, p. 395–418, 2013.

THAPA, R. K.; BYEON, J. H.; CHOI, H. G.; YONG, C. S.; KIM, J. O. PEGylated lipid bilayer-wrapped nano-graphene oxides for synergistic co-delivery of doxorubicin and rapamycin to prevent drug resistance in cancers. **Nanotechnology**, [s. l.], v. 28, n. 29, 2017.

TIAN, B. C.; ZHANG, W. J.; XU, H. M.; HAO, M. X.; LIU, Y. Bin; YANG, X. G.; PAN, W. S.; LIU, X. H. Further investigation of nanostructured lipid carriers as an ocular delivery system: In vivo transcorneal mechanism and in vitro release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 102, p. 251–256, 2013.

TOMASINA, J.; LHEUREUX, S.; GAUDUCHON, P.; RAULT, S.; MALZERT-FRÉON, A. Nanocarriers for the targeted treatment of ovarian cancers. **Biomaterials**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 1073–1101, 2013.

TORCHILIN, V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 431–444, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.026>>

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 131–135, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.011>>

TRAN, P.; LEE, S. E.; KIM, D. H.; PYO, Y. C.; PARK, J. S. Recent advances of nanotechnology for the delivery of anticancer drugs for breast cancer treatment. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 261–270, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40005-019-00459-7>>

TRAN, T. H.; NGUYEN, A. N.; KIM, J. O.; YONG, C. S.; NGUYEN, C. N. Enhancing activity of artesunate against breast cancer cells via induced-apoptosis pathway by loading into lipid carriers. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. 1979–1987, 2016.

TSANG, C. K.; QI, H.; LIU, L. F.; ZHENG, X. F. S. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. [s. l.], v. 12, n. February, 2007.

TU, Q.; ZHANG, Y.; LIU, R.; WANG, J.-C.; LI, L.; NIE, N.; LIU, A.; WANG, L.; LIU, W.; REN, L.; WANG, X.; WANG, J. Active Drug Targeting of Disease by Nanoparticles Functionalized with

Ligand to Folate Receptor. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 19, p. 3152–3162, 2012.

VALE, B. R. C.; VIEIRA, K. O.; SOUSA, J. C. L.; FERRARI, J. L.; NATURAIS, D. D. C.; FEDERAL, U.; JOÃO, D. S.; BOSCO, C. D.; HELVÉCIO, P. D. Artigo. [s. l.], v. 38, n. 1, p. 22–29, 2015.

VANDERWEELE, D. J.; ZHOU, R.; RUDIN, C. M. Akt up-regulation increases resistance to microtubule-directed chemotherapeutic agents through mammalian target of rapamycin. [s. l.], v. 3, n. December, p. 1605–1614, 2004.

VELLAI, T.; TAKACS-VELLAI, K.; ZHANG, Y.; KOVACS, A. L.; OROSZ, L.; MÜLLER, F. Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. **Nature**, [s. l.], v. 426, n. 6967, p. 620, 2003.

VENUGOPAL, R.; HAI, R. Phytochemicals in diets for breast cancer prevention : The importance of resveratrol and ursolic acid. [s. l.], v. 1, p. 1–13, 2012.

VERWAAL, V. J.; BRUIN, S.; BOOT, H.; VAN SLOOTEN, G.; VAN TINTEREN, H. 8-Year follow-up of randomized trial: Cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. **Annals of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 2426–2432, 2008.

VICIER, C.; DIECI, M. V.; ARNELOS, M.; DELALOGUE, S.; VIENS, P.; ANDRE, F. Clinical development of mTOR inhibitors in breast cancer. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–9, 2014.

WANG, C.; HWANG, Y.; CHIANG, P.; SHEN, C.; HONG, W.; HSIUE, G. Extended Release of Bevacizumab by Thermosensitive Biodegradable and Biocompatible Hydrogel. [s. l.], 2012.

WARANIS, R. P.; CHAZY, N. Y.; THOMAS, W. L.; WILMINGTON, N. C. Rapamycin formulation for IV injection. **United states patent**, [s. l.], v. 1, n. 19, p. 1–5, 1997.

WHO. No Title. **World Health Organization**, [s. l.], p. 138, 2017.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 56, n. 9, p. 1257–1272, 2004.

WITKAMP, A. J.; DE BREE, E.; KAAG, M. M.; BOOT, H.; BEIJNEN, J. H.; VAN SLOOTEN, G. W.; VAN COEVORDEN, F.; ZOETMULDER, F. A. N. Extensive cytoreductive surgery followed by intra-operative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with mitomycin-C in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. **European Journal of Cancer**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 979–984, 2001.

WOLFF, A. C.; MCSHANE, L. M.; HAMMOND, M. E. H.; ALLISON, K. H.; FITZGIBBONS, P.; PRESS, M. F.; HARVEY, B. E.; MANGU, P. B.; BARTLETT, J. M. S.; HANNA, W.; BILOUS, M.; ELLIS, I. O.; DOWSETT, M.; JENKINS, R. B.; SPEARS, P. A.; VANCE, G. H.; VIALE, G. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 142, n. 11, p. 1364–1382, 2018.

WORD HEALTH ORGANIZATION, 2021. **Word Health Organization**, 2021. Disponível em: <ww.who.int/tb/en/>

WU, L.; TANG, C.; YIN, C. Folate-mediated solid-liquid lipid nanoparticles for paclitaxel-coated poly(ethylene glycol). **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 439–448, 2010.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, [s. l.], v. 124, n. 3, p. 471–484, 2006.

YADAV, M.; TRIVEDI, V.; UPADHYAY, V.; SHAH, G.; BAXI, G. A.; GOSWAMI, S.; SHRIVASTAV, P. S. Comparison of extraction procedures for assessment of matrix effect for selective and reliable determination of atazanavir in human plasma by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 885–886, p. 138–149, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.12.031>

YAN, T. D.; BLACK, D.; SUGARBAKER, P. H.; ZHU, J.; YONEMURA, Y.; PETROU, G.; MORRIS, D. L. A systematic review and meta-analysis of the randomized controlled trials on adjuvant intraperitoneal chemotherapy for resectable gastric cancer. **Annals of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 2702–2713, 2007.

YAN, W.; ZHANG, W.; JIANG, T. Oncogene addiction in gliomas: Implications for molecular

targeted therapy. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 1–5, 2011.

YANG, L.; LIU, Y.; WANG, M.; QIAN, Y.; DONG, X.; GU, H.; WANG, H.; GUO, S.; HISAMITSU, T. Quercetin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells via inhibition of the Akt-CSN6-Myc signaling axis. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 4559–4566, 2016.

YANG, Y.; CORONA, A.; SCHUBERT, B.; REEDER, R.; HENSON, M. A. Journal of Colloid and Interface Science The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. [s. l.], v. 418, p. 261–272, 2014.

YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 127–137, 2001.

YATSCOFF, R.; LEGATT, D.; KEENAN, R.; CHACKOWSKY, P. Blood distribution of rapamycin. **Transplantation**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 1202–1206, 1993.

YAZIJI, H.; GOLDSTEIN, L. C.; BARRY, T. S.; WERLING, R.; HWANG, H.; ELLIS, G. K.; GRALOW, J. R.; LIVINGSTON, R. B.; GOWN, A. M. HER-2 Testing in Breast Cancer Using Parallel Tissue-Based Methods. **Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 291, n. 16, p. 1972–1977, 2004.

YOSHIZAWA, Y.; OGAWARA, K.; KIMURA, T.; HIGAKI, K. European Journal of Pharmaceutical Sciences A novel approach to overcome multidrug resistance : Utilization of P-gp mediated efflux of paclitaxel to attack neighboring vascular endothelial cells in tumors. [s. l.], v. 62, p. 274–280, 2014.

YU, Q.; HU, X.; MA, Y.; XIE, Y.; LU, Y.; QI, J.; XIANG, L.; YU, Q.; HU, X.; MA, Y.; XIE, Y.; LU, Y.; QI, J.; XIANG, L.; LI, F.; WU, W. Lipids-based nanostructured lipid carriers (NLCs) for improved oral bioavailability of sirolimus Lipids-based nanostructured lipid carriers (NLCs) for improved oral bioavailability of sirolimus. [s. l.], v. 7544, 2016.

YU, Y.; CHI, L.; LAU, M.; LO, A. C.; CHAU, Y. Injectable Chemically Crosslinked Hydrogel for the Controlled Release of Bevacizumab in Vitreous : A 6-Month In Vivo Study. [s. l.], v. 4, n. 2, p. 1–11, 2015.

YUAN, L.; LIU, C. Y.; CHEN, Y.; ZHANG, Z. H.; ZHOU, L.; QU, D. Antitumor activity of tripterine via cell-penetrating peptide-coated nanostructured lipid carriers in a prostate cancer model. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 8, p. 4339–4350, 2013.

ZAHIR-JOUZDANI, F.; KHONSARI, F.; SOLEIMANI, M.; MAHBOD, M.; AREFIAN, E.; HEYDARI, M.; SHAHHOSSEINI, S.; DINARVAND, R.; ATYABI, F. Nanostructured lipid carriers containing rapamycin for prevention of corneal fibroblasts proliferation and haze propagation after burn injuries: In vitro and in vivo. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 234, n. 4, p. 4702–4712, 2019.

ZHANG, H.; YEE, D.; WANG, C. Quantum dots for cancer diagnosis and therapy : biological and clinical perspectives. [s. l.], v. 3, p. 83–91, 2008.

ZHANG, S.; LU, C.; ZHANG, X.; LI, J.; JIANG, H.; ZHANG, S.; LU, C.; ZHANG, X.; LI, J.; JIANG, H. Targeted delivery of etoposide to cancer cells by folate-modified nanostructured lipid drug delivery system Targeted delivery of etoposide to cancer cells by folate-modified nanostructured lipid drug delivery system. [s. l.], v. 7544, 2016.

ZHANG, W.; SHI, Y.; CHEN, Y.; YE, J.; SHA, X.; FANG, X. Biomaterials Multifunctional Pluronic P123 / F127 mixed polymeric micelles loaded with paclitaxel for the treatment of multidrug resistant tumors. [s. l.], v. 32, p. 2894–2906, 2011.

ZHANG, X.; MIAO, J.; DAI, Y.; DU, Y.; YUAN, H.; HU, F. Reversal activity of nanostructured lipid carriers loading cytotoxic drug in multi-drug resistant cancer cells. [s. l.], v. 361, p. 239–244, 2008.

ZHANG Y.; KOHLER, N.; ZHANG, M. Surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles and their intracellular uptake. **Biomaterials**, [s. l.], v. 23, p. 1553–1561, 2002.

ZHANG, Y.; SUN, C.; KOHLER, N.; ZHANG, M. Self-assembled coatings on individual monodisperse magnetite nanoparticles for efficient intracellular uptake. **Biomedical Microdevices**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 33–40, 2004.

ZHANG, Z.; XU, L.; CHEN, H.; LI, X. Rapamycin-loaded poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles: Preparation, characterization and potential application in corneal transplantation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 557–563,

2014.

ZHAO, X.; LI, H.; LEE, R. J. Targeted drug delivery via folate receptors. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 309–319, 2008. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.5.3.309>>

ZHOU, H.; HUANG, S. mTOR Signaling in Cancer Cell Motility and Tumor Metastasis. [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–16, 2010.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. MTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 21–35, 2011.

8. Produção científica no período do doutorado

DE ARAÚJO, PATRICIA ROCHA; CALIXTO, GIOVANA MARIA FIORAMONTI; ARAÚJO, VICTOR HUGO SOUSA; SATO, MARIANA RILLO; **RODERO, CAMILA FERNANDA**; OSHIRO-JUNIOR, JOÃO AUGUSTO; BAUAB, TAÍS MARIA; CHORILLI, MARLUS. In vivo study of hypericin-loaded poloxamer-based mucoadhesive in situ gelling liquid crystalline precursor system in a mice model of vulvovaginal candidiasis. MEDICAL MYCOLOGY, v. 5, p. 1-7, 2021. JCR 4.07

FERREIRA, P. S.; VIICTORELLI, F. D.; **RODERO, C. F.**; FORTUNATO, G. C.; ARAUJO, V. H. S.; FONSECA-SANTOS, B.; BAUAB, T. M.; DIJCK, P. V.; CHORILLI, M. p-Coumaric acid loaded into liquid crystalline systems as a novel strategy to the treatment of vulvovaginal candidiasis. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, v. 603, p. 120658, 2021. JCR 5.87

RAMOS, M. A.; SANTOS, K. C.; SILVA, P. B.; TOLEDO, L. G.; MARENA, G. D.; **RODERO, C. F.**; CAMARGO, B. A. F.; FORTUNATO, G. C.; BAUAB, TAÍS M.; CHORILLI, M. Nanotechnological strategies for systemic microbial infections treatment: A review. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, v. 589, p. 119780, 2020. JCR 5.87

GASPAR DE TOLEDO, LUCIANI ; DOS SANTOS RAMOS, MATHEUS APARECIDO ; BENTO DA SILVA, PATRÍCIA ; **RODERO, CAMILA FERNANDA** ; DE SÁ GOMES, VERIDIANA ; NORONHA DA SILVA, ANDERSON ; PAVAN, FERNANDO ROGÉRIO ; DA SILVA, ISABEL CRISTIANE ; BOMBARDA ODA, FERNANDO ; FLUMIGNAN, DANILO LUIZ ; GONZAGA DOS SANTOS, ANDRÉ ; CHORILLI, MARLUS ; GOTTARDO DE ALMEIDA, MARGARETE TERESA ; BAUAB, TAÍS MARIA . Improved in vitro and in vivo Anti-Candida albicans Activity of Cymbopogon nardus Essential Oil by Its Incorporation into a Microemulsion System. International Journal of Nanomedicine, v. Volume 15, p. 10481-10497, 2020. JCR 6.4

C. DE LIMA, LAURA; A.S. RAMOS, MATHEUS; TOLEDO, LUCIANI G. DE; **RODERO, CAMILA F.**; HILÁRIO, FELIPE; DOS SANTOS, LOURDES C.; CHORILLI, MARLUS; BAUAB, TAÍS M. Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland Derivatives Loaded into a Lipid Nanoemulsion for Enhanced Antifungal Activity Against Candida parapsilosis. CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, v. 26, p. 1556-1565, 2020. JCR 3.11

GONZAGA, VIRGÍNIA DE A. M.; POLI, ALESSANDRA L.; GABRIEL, JULIANA S.; TEZUKA, DAIANE Y.; VALDES, TALITA A.; LEITÃO, ANDREI; **RODERO, CAMILA F.**; BAUAB, TAÍS M.; CHORILLI, MARLUS; SCHMITT, CARLA C. Chitosan-laponite nanocomposite scaffolds for wound dressing application. JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART B-APPLIED BIOMATERIALS, v. 10.100, p.34487-10, 2019. JCR 3.36

RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; SPOSITO, L.; TOLEDO, L. G.; BONIFÁCIO, B. V.; **RODERO, C. F.**; SANTOS, K. C.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. International Journal of Nanomedicine, v. Volume 13, p. 1179-1213, 2018. JCR 6.4

RODERO, C. F.; CALIXTO, G; SANTOS, K. C.; SATO, M. R.; RAMOS, M. A. S.; MIRÓ; RODRIGUEZ, E.; VIGEZZI, C.; BAUAB, T. M.; SOTOMAYOR, C. E.; CHORILLI, M. Curcumin-Loaded Liquid Crystalline Systems for Controlled Drug Release and Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. MOLECULAR PHARMACEUTICS, v. 15, p. 4491-4504, 2018. JCR 4.93

OSHIRO-JUNIOR, JOAO A.; ALVES, RENATA CAROLINA; HANCK-SILVA, GILMAR; SATO, MARIANA R.; **RODERO, CAMILA**; ELOY, JOSIMAR O.; CHORILLI, MARLUS. Stimuli-responsive drug delivery nanocarriers in the treatment of breast cancer. CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, v. 25, p. 2494-2513, 2018. JCR 4.53.0. Produção científica no período do doutorado

DE ARAÚJO, PATRICIA ROCHA; CALIXTO, GIOVANA MARIA FIORAMONTI; ARAÚJO, VICTOR HUGO SOUSA; SATO, MARIANA RILLO; **RODERO, CAMILA FERNANDA**; OSHIRO-JUNIOR, JOÃO AUGUSTO; BAUAB, TAÍS MARIA; CHORILLI,

MARLUS. In vivo study of hypericin-loaded poloxamer-based mucoadhesive in situ gelling liquid crystalline precursor system in a mice model of vulvovaginal candidiasis. MEDICAL MYCOLOGY, v. 5, p. 1-7, 2021. JCR 4.07

FERREIRA, P. S.; VIICTORELLI, F. D.; **RODERO, C. F.**; FORTUNATO, G. C.; ARAUJO, V. H. S.; FONSECA-SANTOS, B.; BAUAB, T. M.; DIJCK, P. V.; CHORILLI, M. p-Coumaric acid loaded into liquid crystalline systems as a novel strategy to the treatment of vulvovaginal candidiasis. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, v. 603, p. 120658, 2021. JCR 5.87

RAMOS, M. A.; SANTOS, K. C.; SILVA, P. B.; TOLEDO, L. G.; MARENA, G. D.; **RODERO, C. F.**; CAMARGO, B. A. F.; FORTUNATO, G. C.; BAUAB, TAÍS M.; CHORILLI, M. Nanotechnological strategies for systemic microbial infections treatment: A review. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, v. 589, p. 119780, 2020. JCR 5.87

GASPAR DE TOLEDO, LUCIANI ; DOS SANTOS RAMOS, MATHEUS APARECIDO ; BENTO DA SILVA, PATRÍCIA ; **RODERO, CAMILA FERNANDA** ; DE SÁ GOMES, VERIDIANA ; NORONHA DA SILVA, ANDERSON ; PAVAN, FERNANDO ROGÉRIO ; DA SILVA, ISABEL CRISTIANE ; BOMBARDA ODA, FERNANDO ; FLUMIGNAN, DANILO LUIZ ; GONZAGA DOS SANTOS, ANDRÉ ; CHORILLI, MARLUS ; GOTTARDO DE ALMEIDA, MARGARETE TERESA ; BAUAB, TAÍS MARIA . Improved in vitro and in vivo Anti-Candida albicans Activity of Cymbopogon nardus Essential Oil by Its Incorporation into a Microemulsion System. International Journal of Nanomedicine, v. Volume 15, p. 10481-10497, 2020. JCR 6.4

C. DE LIMA, LAURA; A.S. RAMOS, MATHEUS; TOLEDO, LUCIANI G. DE; **RODERO, CAMILA F.**; HILÁRIO, FELIPE; DOS SANTOS, LOURDES C.; CHORILLI, MARLUS; BAUAB, TAÍS M. Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland Derivatives Loaded into a Lipid Nanoemulsion for Enhanced Antifungal Activity Against Candida parapsilosis. CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, v. 26, p. 1556-1565, 2020. JCR 3.11

GONZAGA, VIRGÍNIA DE A. M.; POLI, ALESSANDRA L.; GABRIEL, JULIANA S.; TEZUKA, DAIANE Y.; VALDES, TALITA A.; LEITÃO, ANDREI; **RODERO, CAMILA F.**; BAUAB, TAÍS M.; CHORILLI, MARLUS; SCHMITT, CARLA C. Chitosan-laponite nanocomposite scaffolds for wound dressing application. JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART B-APPLIED BIOMATERIALS, v. 10.100, p.34487-10, 2019. JCR 3.36

RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; SPOSITO, L.; TOLEDO, L. G.; BONIFÁCIO, B. V.; **RODERO, C. F.**; SANTOS, K. C.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. International Journal of Nanomedicine, v. Volume 13, p. 1179-1213, 2018. JCR 6.4

RODERO, C. F.; CALIXTO, G; SANTOS, K. C.; SATO, M. R.; RAMOS, M. A. S.; MIRÓ; RODRIGUEZ, E.; VIGEZZI, C.; BAUAB, T. M.; SOTOMAYOR, C. E.; CHORILLI, M. Curcumin-Loaded Liquid Crystalline Systems for Controlled Drug Release and Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. MOLECULAR PHARMACEUTICS, v. 15, p. 4491-4504, 2018. JCR 4.93

OSHIRO-JUNIOR, JOAO A.; ALVES, RENATA CAROLINA; HANCK-SILVA, GILMAR; SATO, MARIANA R.; **RODERO, CAMILA**; ELOY, JOSIMAR O.; CHORILLI, MARLUS. Stimuli-responsive drug delivery nanocarriers in the treatment of breast cancer. CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, v. 25, p. 2494-2513, 2018. JCR 4.53